



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**MARCADORES BIOQUÍMICOS E MOLECULARES DAS MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS
EM PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX**

Estudante: Rita de Cássia Mascarenhas Netto

UBERLÂNDIA, MG

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**MARCADORES BIOQUÍMICOS E MOLECULARES DAS MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS
EM PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX**

Estudante: Rita de Cássia Mascarenhas Netto

Orientador: Prof. Dr. Nilson Penha-Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

Tese apresentada à Universidade Federal
de Uberlândia como parte dos requisitos
para obtenção do Título de Doutor em
Genética e Bioquímica

UBERLÂNDIA, MG

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M395m Mascarenhas Netto, Rita de Cássia, 1985-
2013 Marcadores bioquímicos e moleculares das modificações oxidativas em
 pacientes com malária vivax / Rita De Cássia Mascarenhas Netto. -- 2013.
 119 p. : il.
 Orientador: Nilson Penha-Silva.
 Coorientador: Emerson Silva Lima.

 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
 Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Inclui bibliografia.

 1. Bioquímica - Teses. 2. Marcadores biológicos - Teses. 3. Malária -
 Teses. I. Penha-Silva, Nilson. II. Lima, Emerson Silva. III. Universidade
 Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
 Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**MARCADORES BIOQUÍMICOS E MOLECULARES DAS MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS
EM PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX**

Estudante: Rita de Cássia Mascarenhas Netto

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:	Prof. Dr. Nilson Penha-Silva (Presidente)	[UFU]
Examinador:	Prof^a. Dra Luciana Karen Calábria	[UFJF]
Examinador:	Dra Stefanie Costa Pinto Lopes	[UNICAMP]
Examinador:	Dr. Morun Bernardino Neto	[UFU]
Examinador:	Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho	[UFU]

Data da defesa: 23/12/2013

As sugestões da comissão examinadora e as normas do PPGGB para o formato da tese foram contempladas.

Prof. Dr. Nilson Penha-Silva
(Orientador)

“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistas do que parecia impossível.”

(Charlie Chaplin)

“O esforço despendido para essa conquista ainda provém do que parecia impossível. O que a tornou possível? Minha fé em Deus, nas pessoas ao meu redor e em mim.”

(Rita de Cássia Mascarenhas Netto)

Agradecimentos

A Deus, pela força e esperança nos momentos de dificuldade, luz sempre presente em minha vida.

Posterior a Ele, tenho que agradecer às pessoas com quem me envolvi, umas de forma mais superficial, outras em relações mais intensas, mas todas ESSENCIAIS!

Aos meus pais, Marcos Antônio e Eloísa, e irmãos, Luanna e João Henrique, pela compreensão, paciência e acima de tudo, pela credibilidade em mim. Obrigada, pais, pelos esforços que me conduziram até aqui, e por se dedicarem à nossa formação profissional e pessoal. Essa conquista é mais deles que minha!

Ao meu marido Luiz Antônio Theodoro de Souza, obrigada pelo apoio e compreensão. Essa conquista, além dos meus pais, também é dele. A paciência, a dedicação, os esforços para tornar tudo mais fácil e prático para que eu conseguisse finalizar mais essa etapa. E o mais importante, ele foi grandiosamente capaz de suprir a ausência da família e dos amigos, nesse últimos 4 anos, me fazendo companhia em todos os momentos. A saudade dos demais era imensa, mas sua presença me confortava.

Ao Professor Dr. Nilson Penha-Silva, pela orientação. Obrigada pela confiança depositada em mim e pela paciência nos momentos difíceis de expectativa. São 9 anos de aprendizado e crescimento profissional e pessoal, e que foram determinantes na minha formação. Hoje, o que me tornei como pesquisadora reflete o que pude absorver e aprender com ele. Tenho certeza que todos que tenham estado presentes no LABFIQ (Laboratório de Biosifecoquímica) compartilham da mesma opinião.

Aos amigos e colegas que adquiri no LABIFIQ, Mariana Vaini, Juliana Huss, Tatiana Theodoro, Cynthia Firmino, Fransciene Reis, Cleine Cunha, Lúbia Fonseca, Letícia Arvelos, Lara Paraíso, Ana Flávia Oliveira, Lucas Cunha, Morun Bernardino Neto, Mário Garrote, que, mesmo à distância, compartilhamos conhecimento, e mantivemos a amizade. Obrigada a todos!

Ao Professor Dr. Emerson Silva Lima, da Universidade Federal Amazonas, Laboratório de Atividade Biológica, pela co-orientação, auxílio, tanto pessoal, profissional e financeiro na pesquisa, contribuindo também para as características diferenciais do trabalho. Não mediu esforços e me envolveu em suas parcerias com

outros laboratórios, como o Laboratório Especializado em Biologia Molecular (LAEBM-UFAM), sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto, que atuou como pesquisador colaborador e teve grande relevância na segunda parte do trabalho, seja profissional e pessoal. Outra grande oportunidade foi a parceria com o Dr. Marcus Vinícius Guimarães Lacerda, responsável pela Gerência de Malária, da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), que possibilitou acesso ao hospital e instalações de pesquisa clínica, bem como aos pacientes.

Dentro dessas instituições, essa tese de doutorado foi possível mediante o apoio, incentivo e trabalho de várias pessoas. No Laboratório de Atividade Biológica, tenho a agradecer aos companheiros de pesquisa e que até hoje estão presentes em minha vida, Camila Fabbri, Ana Paula Boleti, Gisele Bacelar, Denise Lopes, Jaqueline Silva, Brena Lima; e aos técnicos de laboratório, ao longo desses 4 anos. Na FMT-HDV sou muito grata pela recepção e carisma. Agradeço a todos os profissionais, médicos, enfermeiros, bioquímicos, técnicos e pesquisadores, comprometidos com a pesquisa e atendimento hospitalar aos pacientes com malária. É admirável o trabalho que realizam nessa instituição. E, mais importante, o meu agradecimento ao pacientes, que voluntariamente colaboraram com a execução desse trabalho. Agradeço a eles pela disposição, carisma e pelas boas conversas durante as coletas, mesmo com todos os sintomas da doença, quando aprendi sobre a Amazônia e vários costumes dessa região que encanta a todos. Ressalvo ainda a preocupação da sociedade com a saúde, o que permite realizarmos essas pesquisas, que, futuramente, terão retorno a todos esses voluntários que um dia apoiaram a pesquisa científica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da UFU pela oportunidade de ingressar, e ao corpo docente, por se dedicar à qualidade de ensino e pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), bem como ao projeto Redoxoma-INCT vinculado ao Prof. Dr. Emerson Silva Lima, pelo apoio financeiro para realização desse trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente me incentivaram e me deram suporte em mais essa batalha, e que acredito que estarão comigo até o final de todas minhas conquistas.

Apoio

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS



INSTITUTOS NACIONAIS DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA (INCT)
PROCESSOS REDOX EM BIOMEDICINA (REDOXOMA)



inct
institutos nacionais
de ciência e tecnologia



Redoxoma

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO



COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR



LABORATÓRIO DE BIOFISICOQUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS



FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR HEITOR VIEIRA DOURADO (FMT-HVD)



Sumário

	Página
Lista de abreviaturas e siglas	xi
Lista de figuras	xiv
Lista de tabelas	xv
Apresentação	1
Capítulo 1 - Malária: eritrócito, estresse oxidativo e genética do hospedeiro	3
Fundamentação teórica	
BREVE HISTÓRICO	4
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA MALÁRIA	7
Malária no mundo	7
Malária no Brasil	8
Ciclo biológico do <i>Plasmodium vivax</i>	9
ERITRÓCITO: membranas biológicas, invasão pelo parasita e susceptibilidade ao estresse oxidativo	11
Invasão pelo <i>Plasmodium vivax</i>	11
Eritrócito e membranas biológicas	12
Estresse oxidativo e malária	14
POLIMORFISMOS DOS GENES REDOX	20
Polimorfismo de enzimas antioxidantes	21
Superóxido dismutase (SOD)	21
Glutathione peroxidase (GPx)	23
Metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR)	24
NADPH-quinona oxidoreductase (NQO)	25
Genética do hospedeiro <i>versus</i> malária	26
Considerações finais	29
Referências	39
Capítulo 2 – Influência da malária por <i>Plasmodium vivax</i> nas relações entre estabilidade osmótica da membrana de eritrócitos humanos e variáveis hematológicas e bioquímicas	50
Resumo	52
Abstract	53
Introduction	54

Material and Methods	55
Results and discussion	58
Conclusion	65
References	66
Capítulo 3 - Efeito de variantes genéticas de enzimas do sistema redox em pacientes com malária vivax	80
Resumo	82
Abstract	84
Introduction	85
Material and Methods	87
Results and discussion	91
Conclusion	101
References	102
Apêndices	116

Lista de abreviaturas e siglas

A1	Absorbância com percentual mínimo de hemólise
A2	Absorbância com percentual máximo de hemólise
A _{560nm}	Absorbância em comprimento de onda de 560 nm
Ala	Alanina
ALT	Do inglês <i>alanine aminotransferase</i> (alanina aminotransferase)
AST	Do inglês <i>aspartate aminotransferase</i> (aspartato aminotransferase)
ATP	Adenosina trifosfato
Cat	Catalase
CQ	Cloroquina
Cu	Cobre
dX	Variação na concentração de NaCl necessária para promover 100% de hemólise
DARC	Antígeno Duffy/receptor para quimiocinas
DBP	Proteína de ligação ao antígeno Duffy
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DNA	Do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EO	Estresse oxidativo
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FP	Ferroprotoporfirina
Fe ²⁺	Ferro ferroso
Fe ³⁺	Ferro férrico
GGT	Do inglês <i>gamma-glutamyltransferase</i> (gama-glutamil-transferase)
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida ou somente glutathione
GSSG	Glutathione oxidada
G6PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase
H ₅₀	Hipotonicidade capaz de promover 50% de hemólise
HBV	Vírus da hepatite B
Hb	Do inglês <i>hemoglobin</i> (hemoglobina)
Hcy	Homocisteína
HDL	Do inglês <i>high density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidade)
Ht	Do inglês <i>hematocrit</i> (hematócrito)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HO ₂ [·]	Hidroperoxila
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSA	Do inglês <i>human serum albumin</i> (albumina sérica humana)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IFN-γ	Interferon gama
IPA	Índice parasitário anual
IPs	Isoprostanos
Kb	Quilobase

L•	Alquila
LDL	Do inglês <i>low density lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade)
Leu	Leucina
LO•	Alcoxila
LOO•	Peroxila
LPO	Lipoperoxidação
MCH	Do inglês <i>mean corpuscular hemoglobin</i> (hemoglobina corpuscular média)
MCHC	Do inglês <i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i> (concentração de hemoglobina corpuscular média)
MDA	Malondialdeído
Mn	Manganês
MPV	Do inglês <i>mean platelet volume</i> (volume plaquetário médio)
MTHFR	Metilenotetraidrofolato redutase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NQO1	NADPH-quinona oxidoreductase 1
O ₂	Oxigênio
O ₂ •	Ânion superóxido
HO•	Radical hidroxila
O ₃	Ozônio
ONOO ⁻	Ânion peroxinitrito
pb	Pares de bases
PCR	Do inglês <i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
Plt	Do inglês <i>platelets</i> (plaquetas)
PQ	Primaquina
Primer	Oligonucleotídeo sintético
Pro	Prolina
Prx	Peroxiredoxina
RBC	Do inglês <i>red blood cell</i> (eritrócito)
RDW	Do inglês <i>red cells distribution width</i> (distribuição de volume das células vermelhas)
RFLP	Do inglês <i>restriction fragment length polymorphism</i> (polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrição)
RL	Radical livre
ROS	Do inglês <i>reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
RP	Razão de prevalência
SARA	Síndrome de angústia respiratória do adulto
SIVEP	Sistema de vigilância epidemiológica
-SH	Grupo tiol
SNP	Do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de base única)
SOD	Superóxido dismutase
SOD1	Superóxido dismutase 1 ou Cu/Zn SOD
SOD2	Superóxido dismutase 2 ou MnSOD
SPSS	Do inglês <i>Statistical Package for Social Sciences</i>

TBA	Ácido tiobarbitúrico
TAC	Do inglês <i>total antioxidant capacity</i> (capacidade antioxidante total)
TOS	Do inglês <i>total oxidant status</i> (capacidade oxidante total)
Th1	Célula T com resposta 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TrxR	Tioredoxina redutase
Val	Valina
VLDL	Do inglês <i>very low density lipoprotein</i> (lipoproteína de densidade muito baixa)
WHO	Do inglês <i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde - OMS)
Zn	Zinco

Lista de figuras

	Pág.
Capítulo 1	
Figura 1.1 Mapa da distribuição e endemidade da malária <i>vivax</i> mundial	31
Figura 1.2 Áreas de transmissão de malária no Brasil de acordo com Índice Parasitário Anual (IPA [casos/1.000 hab])	32
Figura 1.3 Ocorrência de casos registrados na Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD	33
Figura 1.4 Ciclo biológico do <i>Plasmodium vivax</i>	34
Figura 1.5 Estabilidade osmótica da membrana de eritrócito representada pelo ajuste sigmoidal da dependência da liberação de hemoglobina com a concentração de NaCl	35
Figura 1.6 Localização cromossômica dos genes das enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, GPx1, MTHFR e NQO1.	36
Figura 1.7 Síntese e metilação do DNA via metabolismo de um carbono pela MTHFR	37
Figura 1.8 Propriedades bioquímicas da enzima antioxidante NADPH:quinona oxidoreductase	38
Capítulo 2	
Figura 2.1 Sigmoidal fitting of a typical curve of hypotonic hemolysis	71

Lista de tabelas

	Pág.
Capítulo 2	
Tabela 2.1 Baseline characteristics (first day) of patients (n=72) with <i>P.vivax</i> malaria	72
Tabela 2.2 Hematological, biochemical, and stability parameters of patients with <i>P. vivax</i> malaria on the day of the diagnosis (first day) and after treatment	73
Tabela 2.3 Spearman's correlation matrix of the studied variables for a sample of 72 patients with <i>P. vivax</i> malaria on the first day of the study	74
Tabela 2.4 Comparison between the first and the 14th day of the study in relation to the regression lines of $1/H_{50}$ versus some variables	75
Tabela 2.5 Organized groups of variables for use in the multivariate statistical analyses (canonical correlations)	76
Tabela 2.6 Canonical loadings and canonical pairs determined between the stability parameters ($1/H_{50}$ and dX) and the variables of group 1	77
Tabela 2.7 Canonical loadings and canonical pairs determined between the stability parameters ($1/H_{50}$ and dX) and the variables of group 2	78
Tabela 2.8 Analyses of multiple stepwise linear regression for $1/H_{50}$ and dX in relation to groups of dependent variables	79
Capítulo 3	
Tabela 3.1 Protocols for determining SNPs with forward (F) and reverse (R) primer sequences	108
Tabela 3.2 Hematological, biochemical and oxidative stress parameters for <i>Plasmodium vivax</i> malaria	109
Tabela 3.3 Bivariate analysis between oxidative stress markers and hematologic and biochemical parameters in malaria patients (n=73)	110
Tabela 3.4 Genotypic and allele frequency of SOD1 A35C, SOD2 Ala16Val, GPx Pro197Leu, NQO1 C609T and MTHFR C677T SNPs in the study population	111
Tabela 3.5 Antioxidant enzymes genotypes and changes in hematological, biochemical and antioxidant biomarkers of <i>vivax</i> malaria patients (mean $\pm$ SD)	112
Tabela 3.6 Genotypic and allelic distribution of SOD2 Ala16Val in <i>vivax</i> malaria patients	113
Tabela 3.7 Genotypic and allelic distribution of MTHFR C677T in <i>vivax</i> malaria patients	114
Tabela 3.8 Genotypic and allelic distribution of GPx1 Pro197Leu in <i>vivax</i> malaria patients	115

Apresentação

O Brasil é um país endêmico para malária *vivax*, sendo responsável por 50-60% do número total de casos de malária na América Latina. Embora os casos estejam diminuindo ao longo dos anos, a situação ainda se caracteriza por alta instabilidade e permanente ameaça de desenvolver surtos epidêmicos, de alastrar-se a regiões vizinhas, provocando metástases focais em outras regiões do país, e de estar sujeita a largas oscilações em função de variáveis climáticas, demográficas ou socioeconômicas.

Nos últimos anos foram comunicadas diversas complicações da infecção por *Plasmodium vivax* em áreas endêmicas. Atualmente a busca é pelo maior conhecimento acerca dos mecanismos fisiopatogênicos envolvidos na malária grave por *P. vivax*, antes associada ao *P. falciparum*, bem como a influência dos fatores genéticos no aumento da susceptibilidade ou resistência individual do hospedeiro ao desenvolvimento de formas graves da doença.

O Capítulo 1 dessa tese traz a Fundamentação Teórica acerca da malária, entre aspectos epidemiológicos, patogênese, aspectos clínicos e vínculos com os processos oxidativos e genéticos.

Dentre as diversas possibilidades de abordagem da patogênese da malária, estudar os mecanismos envolvidos na fragilidade ou resistência dos eritrócitos infectados pelo *Plasmodium* nos permite determinar outros fatores, além da invasão do parasita, que interferem nas propriedades dessas células sanguíneas e como isso reflete no desenvolvimento das características clínicas dessa doença. No Capítulo 2 avaliamos a influência da infecção por *Plasmodium vivax* nas relações entre variáveis bioquímicas e hematológicas, e a estabilidade de membrana dos eritrócitos infectados, através do choque hipotônico (fragilidade osmótica).

Vários fatores genéticos parasitários ou do hospedeiro, estado imune e níveis de exposição estão associados ao desenvolvimento de várias doenças. Os polimorfismos genéticos das células sanguíneas e fatores parasitários como a composição da(s) população(ões) parasitária(s) presentes na infecção têm sido estudados. Neste aspecto, no Capítulo 3 pesquisamos alguns polimorfismos no hospedeiro relacionados à susceptibilidade e/ou proteção contra a malária por *Plasmodium vivax*, levando em consideração a influência do estresse oxidativo na fisiopatologia da doença.

Conforme as normas definidas pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da UFU, o Capítulo 1 desta tese traz a Fundamentação Teórica e os Capítulos 2 e 3 trazem a íntegra dos trabalhos experimentais realizados.

Capítulo 1

Fundamentação teórica

BREVE HISTÓRICO

A malária, doença milenar conhecida desde 2700 AC, sempre despertou na comunidade científica e política muitos desafios, não só na perspectiva de eliminação, como na implantação de programas de luta sustentáveis, sobretudo para os países em desenvolvimento (Carter and Mendis 2002; Cunha and Cunha 2008). A malária ou a doença que a ela se assemelhava, foi descrita há mais de 4.000 anos. De origem italiana, a palavra malária (*mal "aria"*) etimologicamente significa "ar ruim"; esta expressão presumivelmente influenciou em grande parte a história da humanidade. Consta da história (2700 AC– 340 DC), que foram descritos os sintomas característicos da malária em registros médicos chineses antigos, no Nei Ching, o Cânon de Medicina (Carter and Mendis 2002; Sherman 1998).

A descoberta das propriedades antimaláricas do quinino remonta ao século XVII, com a chegada dos missionários Jesuítas espanhóis à América do Sul. O quinino foi descoberto em 1632, antimalárico eficaz, para o tratamento das formas mais graves da doença (Sherman 1998; World Health Organization 2011).

Em 1880, Charles Louis Alphonse Laveran, um cirurgião do exército francês, estacionado em Constantine (Argélia), identificou um "parasita" no sangue dos pacientes com malária. Camillo Golgi, em 1886, um neurofisiologista italiano, estabeleceu a diferenciação das espécies de malária ao identificar que existiam pelo menos duas formas de apresentação da doença: uma com periodicidade terçã (febre de dois em dois dias) e outra com periodicidade quartã (febre em cada terceiro dia), e observou que as formas produziam números discrepantes de merozoítos (parasitas novos) e com diferentes fases de maturidade. Golgi estabeleceu também a coincidência da febre com a ruptura dos eritrócitos e liberação dos merozoítos na circulação sanguínea (Sherman 1998). Em 1890, dois investigadores italianos, Giovanni Batista Grassi e Raimondo Filetti, atribuíram, pela primeira vez, nomes aos dois parasitas da malária que infectavam os humanos: *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*, enquanto Laveran, em 1880, acreditava que só existia uma espécie: *Oscillaria malariae*. Em 1897, o americano, William H. Welch, efetuou uma ampla revisão sobre o assunto e, atribuiu o nome *Plasmodium falciparum* ao parasita da malária responsável pela febre terçã maligna. Em 1922, John William Watson Stephens, descreveu um quarto

parasita causador de malária humana: *Plasmodium ovale* (Molineaux et al. 1980; Sherman 1998).

Ronald Ross foi premiado com o Prêmio Nobel em 1902, por ter sido o primeiro investigador a identificar o papel do mosquito na transmissão da malária. Em 1897, Ross descobriu que os parasitas da malária eram transmitidos de pessoas infectadas para os mosquitos. Esta pesquisa permitiu conhecer o ciclo esporogônio do mosquito (intervalo de tempo durante o qual o parasita se desenvolve no mosquito).

Os ciclos esporogônios completos de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* foram demonstrados, em 1898-1899, quando uma equipe de investigadores italianos, que incluía Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Giovanni Batista Grassi, utilizando mosquitos *Anopheles claviger*, infectados após terem sido alimentados em paciente com malária em Roma, foram transportados para Londres, onde, ao picarem dois voluntários, ambos desenvolveram malária do tipo terçã benigna (Carter and Mendis 2002; Cunha and Cunha 2008). Em meados do século XX, período coincidente com a ocupação militar americana de Cuba e construção do Canal de Panamá, grandes avanços foram alcançados no controle da malária nos Estados Unidos.

A partir do conhecimento do ciclo de vida do parasito, diferentes estratégias de ataque à doença têm sido propostas, visando à interrupção de sua transmissão. Entre elas destaca-se o Programa de Erradicação da Malária, proposto em 1955 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), centrado em ações verticais, incluindo borrifação de paredes com inseticida de ação residual (o Dicloro-Difenil-Tricloroetano ou DDT) e o tratamento em massa com um antimalárico de baixa toxicidade, a cloroquina (CQ). A CQ foi descoberta em 1934, por um investigador alemão, Hans Andersag. Dados os sucessivos conflitos, ocorridos durante a II Guerra Mundial, a CQ só foi reconhecida como um antimalárico eficaz e seguro em 1946 pelos britânicos e americanos, mantendo a sua eficácia até 1957, altura em que foi assinalado o primeiro caso de resistência (Sherman 1998).

No Brasil, a partir dos anos 60 pode ser observado que até 1976 foram registrados menos de 100 mil casos de malária por ano. A partir daquele ano, houve forte tendência na elevação do número de casos da doença em função da ocupação desordenada da região amazônica. Este incremento deveu-se também à implantação, na região, de projetos de colonização e mineração sem a necessária estrutura de saúde

para atender à população. No período de 1984 a 1995, foram registrados de 400 a 500 mil casos em média por ano. Em 1996 e 1997 houve redução importante nos registros da doença. Nos anos de 1998 e 1999, a incidência aumentou de forma preocupante, atingindo seu limite, em 1999, com 635.646 casos. De 2000 a 2002, foi observado o maior declínio na ocorrência da malária nos últimos 40 anos. Em 2002, registraram-se 348.259 casos, o que representou 43% de queda em relação a 2000. De 2003 a 2005, observou-se nova elevação progressiva no número de casos, chegando a 607.730 casos notificados em 2005, um aumento de 74% em relação ao número de casos de 2002. O Ministério da Saúde desencadeou então, amplo processo de mobilização de forças multissetoriais priorizando as ações de vigilância, prevenção e o controle da malária. Os efeitos dessa articulação refletiram-se a partir do ano de 2006 até 2008, quando foi observado declínio constante no número de casos, passando de 550.930 para 313.922, uma redução de 43%. Até a década de 80, houve relativa equivalência entre as espécies parasitárias (*P. vivax* e *P. falciparum*) inclusive com um período de inversão parasitária de 1983 a 1988 com predominância de *P. falciparum*. A partir de então, nota-se um distanciamento no número de registros causados pelas duas espécies, que culminou com a predominância do *P. vivax* (Ministério da Saúde 2010).

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA MALÁRIA

Malária no mundo

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa e de evolução crônica, com manifestações de caráter agudo, crônico ou recorrente, sendo considerada um importante problema de saúde pública, com impactos na economia e na sociedade de 104 países e regiões onde é considerada endêmica (Bassat and Alonso 2011; World Health Organization 2013).

A malária é uma protozoonose dos eritrócitos, causada nos seres humanos por cinco espécies do gênero *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*) (Cox-Singh et al. 2008; Crawley et al. 2010) transmitida pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Em situações excepcionais, a doença pode ser transmitida por transfusão sanguínea e por via congênita (da mãe para o feto), embora estas duas formas de transmissão não tenham qualquer impacto epidemiológico. Mundialmente, estima-se que 3,3 bilhões de pessoas estavam sob risco de contrair malária em 2011, com populações vivendo na África Subsaariana apresentando maior risco, de aproximadamente 80% dos casos e 90% de mortes registrados, com prevalência de crianças e mulheres grávidas (Bassat and Alonso 2011; World Health Organization 2013).

Plasmodium falciparum é a espécie responsável pela maioria dos casos de morte por malária, sobretudo na África Subsaariana, entretanto *P. vivax* é mais difundida geograficamente (em particular no sul e sudeste da Ásia, América Central e América do Sul) e responde 25 a 40% dos casos de malária no mundo. Estudos estimaram que no ano de 2009, aproximadamente 2,85 bilhões de pessoas encontravam-se expostas ao risco de transmissão da malária por *P. vivax* (Guerra et al. 2010).

Atualmente, de acordo com os dados da OMS (World Health Organization 2011), cerca de metade da população mundial está em risco de contrair a malária, apesar de ter sido erradicada dos Estados Unidos, Canadá, Europa e Rússia, mantendo-se endêmica nas regiões tropicais e subtropicais.

Áreas endêmicas para *P. vivax* nas Américas compreende a 9,5 milhões de quilômetros quadrados, com maior proporção na região amazônica do Brasil (Figura

1.1). As regiões mais endêmicas são encontradas na Amazônia e América Central – primariamente Nicarágua e Honduras. Uma importante característica da infecção por *P. vivax* nas Américas é que sua distribuição é aproximadamente inversa à distribuição da população. Considerando que as Américas contribuem com 53% da área de transmissão ainda não controlada no mundo, os dois países endêmicos mais populosos da região, Brasil e México, apresentam somente 5% de suas populações totais em risco de contrair a doença (Gething et al. 2012), embora compreendam aproximadamente um quarto (22%) da área global de risco.

Malária no Brasil

No Brasil, embora os casos de malária tenham diminuído durante a última década, o país ainda é responsável por 50-60% dos casos registrados no continente americano (Bassat and Alonso 2011; World Health Organization 2013). Em 2012 foram notificados 241.000 casos de malária no país (SIVEP-Malária, 2012), sendo 998% na região Amazônica, considerada área endêmica. Mesmo na área endêmica, o risco de contrair a doença não é uniforme. Este risco é medido pela incidência parasitária anual (IPA), que serve para classificar as áreas de transmissão em alto, médio e baixo risco, de acordo com o número de casos por mil habitantes (Figura 1.2).

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, centro de referência no diagnóstico e tratamento de doenças tropicais, em Manaus, AM, relatou 3.182 casos de malária, em sua maioria (95,91%) pelo *Plasmodium vivax* (SIVEP - Malária - Ministério da Saúde, 2013) no ano de 2012. Até outubro de 2013 foram relatados 1.885 casos positivos (Figura 1.3).

Um dos principais objetivos do Programa Nacional de Controle da Malária tem sido acabar com o número de mortes pela doença. No ano de 2011, foram registrados no Sistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde 69 óbitos por malária, representando uma redução de 71,8% em relação a 2000 (245 óbitos), e de 9,2% quando comparado com 2010 (76 óbitos).

Esses dados revelam que o *P. vivax* tem se tornado espécie dominante em áreas endêmicas da malária, e dentre as razões que podem justificar essa alta prevalência tem-se a menor disponibilidade do diagnóstico por ensaios imunocromatográficos para

distinguir as infecções causadas por *P. vivax* do que por *P. falciparum*, além da dificuldade em controlar a doença causada por aquela espécie, em função da produção precoce de gametócitos e da presença de hipnozoítos, além de sua crescente resistência à CQ e da falta de eficácia da primaquina (PQ), que é o medicamento de primeira linha para a prevenção de recaídas da doença (Costa et al. 2012).

Ciclo biológico do *Plasmodium vivax*

Os plasmódios apresentam um ciclo de vida complexo (Figura 1.4), com o envolvimento de dois hospedeiros, um hospedeiro intermediário vertebrado e um hospedeiro definitivo invertebrado.

Resumidamente, o ciclo de vida dos plasmódios inicia-se com a picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* sp., que durante o repasto sanguíneo, inocula formas esporozoítas no hospedeiro vertebrado. Recentemente, observou-se que a maioria dos esporozoítos são retidos na pele por minutos ou horas antes de atingir o fluxo sanguíneo e ainda que alguns deles migram de forma ativa ou passiva para os linfonodos (Amino et al. 2006). Após invadirem os hepatócitos, apenas as formas que atingem a corrente sanguínea são capazes de se desenvolverem (Amino et al. 2007).

Nos hepatócitos, os parasitos se desenvolvem em esquizontes, que originarão merozoítos. Ainda no fígado, o *P. vivax* evolui para uma forma latente (hipnozoíta) que, pode dar início a um novo ciclo sanguíneo e levar a uma reagudização da doença com elevação da parasitemia do indivíduo e reaparecimento dos sintomas, dificultando o controle da doença (Mueller et al. 2009). O reaparecimento da parasitemia após o tratamento pode ter três diferentes origens: recaída, recrudescência ou reinfecção. A recrudescência é resultante de parasitos assexuais sanguíneos, que sobreviveram ao tratamento por uma falha terapêutica. A reinfecção é originada de uma nova inoculação de esporozoítos pelo mosquito vetor. E, por último, a verdadeira recaída, que se caracteriza pela ativação dos hipnozoítos no fígado.

O ciclo hepático dura entre 6 a 15 dias, e corresponde ao período de incubação da doença. Os merozoítos liberados pelos hepatócitos nos sinusóides hepáticos, inicialmente em pequenas vesículas chamadas merossomos (Sturm et al. 2006), irão rapidamente invadir os eritrócitos, desenvolvendo-se em trofozoítos, que por divisão

nuclear darão origem aos esquizontes. Os esquizontes se rompem, culminando com a ruptura dos eritrócitos infectados e, então, há liberação de merozoítos na corrente sanguínea, que rapidamente invadem novos eritrócitos, repetindo o ciclo assexuado.

O ciclo eritrocítico se repete a cada 48 h nas espécies *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, e a cada 72 h em *P. malariae*. Esse sincronismo é o que causa o cenário de febres cíclicas em infecções estabelecidas. Alguns merozoítos diferenciam-se em formas sexuais masculinas e femininas (gametócitos), que são ingeridas pelo mosquito durante o repasto sanguíneo. A fusão dos gametas forma o zigoto, que se desenvolve em um oocineto. Este penetra na parede do intestino do inseto, formando um oocisto entre o epitélio intestinal e a lâmina basal. Então, muitos esporozoítos são formados assexuadamente dentro do oocisto e são liberados ao amadurecer. Esses esporozoítos migram para a glândula salivar do mosquito, onde podem ser transmitidos para o hospedeiro intermediário durante o repasto sanguíneo, dando continuidade ao ciclo.

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

A malária grave, por ser responsável por grande número de óbitos em áreas tropicais, tem sido o alvo de grande parte dos estudos em malária. Alguns fatores estão envolvidos com a virulência dos plasmódios, como a capacidade de multiplicação do parasita, a capacidade do parasita em citoaderir ao endotélio capilar e tecido placentário e formação de rosetas (Carvalho et al. 2010; Marin-Menendez et al. 2013), a imunidade do hospedeiro (Good et al. 2005), além de questões geográficas e sociais (Miller et al. 2002), fatores até então associadas à infecção pelo *P. falciparum*.

Em 1990, a OMS estabeleceu os sinais e sintomas clínicos que caracterizam a malária grave por *P. falciparum*: malária cerebral, anemia grave, insuficiência renal aguda, edema pulmonar e síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA), hipoglicemia, sangramento espontâneo, icterícia, hemoglobinúria, choque e parasitemia elevada.

Embora os mecanismos fisiopatogênicos não sejam ainda totalmente elucidados, têm sido relatados casos de malária grave por *P. vivax* (Alexandre et al. 2010; Andrade et al. 2010; Baird 2007; Baird 2009; Barcus et al. 2007; Genton et al. 2008; Kochar et al.

2009; Kochar et al. 2005; Kochar et al. 2007; Lacerda et al. 2012; Lowry et al. 1951; Price et al. 2007), com observação de alguns dos mecanismos descritos para infecção por *P. falciparum*, bem como características peculiares daquele parasita.

ERITRÓCITO: invasão pelo parasita, membranas biológicas e susceptibilidade ao estresse oxidativo

Invasão pelo *Plasmodium vivax*

A entrada do parasita nos eritrócitos é um processo complexo e dinâmico. É necessária a interação de proteínas de superfície do protozoário com proteínas do eritrócito, como por exemplo, a glicoproteína banda 3. Essas interações estimulam a deformação da membrana do eritrócito seguida da formação de uma junção estável entre o parasita e a célula. Essa junção ocorre através de eventos de remodelação do eritrócito, os quais incluem a criação e manutenção de uma membrana vacuolar que circunda o protozoário, além do desenvolvimento de alterações antigênicas, estruturais e de transporte durante o desenvolvimento do parasita intracelular (Haldar et al. 2007).

Ao decorrer deste desenvolvimento, a deformação dos eritrócitos é uma das consequências da doença. Este agravante é o principal determinante da viscosidade do sangue em condições de alto cisalhamento. Em arteríolas, apesar do pequeno fluxo, por terem menor calibre, o fenômeno de cisalhamento é ainda maior (Dondorp et al. 2000).

O *P. vivax* invade preferencialmente reticulócitos (eritrócitos jovens) e utiliza uma via principal de invasão que é a interação de uma proteína micronemal do parasito, a proteína de ligação ao antígeno Duffy (DBP), com o seu receptor na membrana do eritrócito, o antígeno Duffy/receptor para quimiocinas (DARC) (Miller et al. 2002; Mons 1990). Essa forte inclinação do parasita para invadir reticulócitos sugere que essa especificidade pode ser atribuída a interação com outros receptores de membrana. Estudos sobre infecção em pacientes negativos para antígeno Duffy (Cavasini et al. 2007; Mendes et al. 2011; Ryan et al. 2006) suportam a hipótese que a DARC não é o único componente requerido para invasão por *P. vivax*, como inicialmente proposto.

Eritrócito e membranas biológicas

O eritrócito tem uma forma de disco bicôncavo que fornece uma razão entre superfície e volume que é importante para a troca de gás e tolera elevadas quantidades de força de cisalhamento. Para lidar com este estresse físico, o eritrócito possui um citoesqueleto especializado que proporciona estabilidade mecânica, integridade e flexibilidade.

A complexa interação entre a membrana plasmática e o citoesqueleto dos eritrócitos permite flexibilidade morfológica. Entretanto, alterações genéticas podem resultar em células vermelhas deformadas, bem como comportamento disfuncional. Algumas dessas mutações podem oferecer proteção contra malária; no entanto, a maior parte da população é suscetível à doença e eritrócitos parasitados pelo plasmódio mostram muitas mudanças em sua estrutura químico-física (Imai 2008; Scheetz 2008).

Todos os parâmetros que determinam a deformabilidade dos eritrócitos são afetados por células parasitadas na malária, sendo eles rigidez, volume e viscosidade. Eritrócitos que contêm um maior número de parasitas maduros apresentam um aumento na rigidez de membrana. Estes parasitas produzem antígenos que se ligam ao citoesqueleto, favorecendo a deformabilidade do eritrócito. Além disso, o parasita exerce estresse oxidativo na membrana do eritrócito, favorecendo a perda de flexibilidade da mesma (Dondorp et al. 2000).

A fluidez é essencial para determinação da deformabilidade dos eritrócitos e do comportamento reológico do sangue. É por isso que a influência dos lipídeos plasmáticos na reologia do sangue têm sido motivo de muitos estudos (Aloulou et al. 2006; Seki et al. 2006; Velcheva et al. 2006). As moléculas de lipídeos constituem cerca de 50% da massa da maioria das membranas das células. Uma maior quantidade de ácidos graxos insaturados nos fosfolipídeos aumentará a fluidez, uma vez que a presença de dobramentos da cadeia na configuração espacial *cis*, presente em insaturações de ocorrência natural, minimiza a magnitude das atrações intermoleculares de van der Waals e, por consequência diminui a temperatura de fusão da membrana. Por outro lado, quanto maior for a quantidade de ácidos graxos saturados nos fosfolipídeos da membrana, maior será sua rigidez. O sistema rígido de

anéis de colesterol fundidos também aumenta a rigidez de membrana (Cooper 1977; Tsuda et al. 2003).

Além dos lipídeos, as proteínas também desempenham funções específicas e podem constituir até 80% da composição das membranas. Um eritrócito apresenta cerca de vinte tipos de proteínas estruturais importantes além de outras com funções diversas como o transporte de diferentes solutos (Storry 2004). As proteínas estruturais e os lipídeos da membrana estão associados ao citoesqueleto proteico subjacente por interações proteína-proteína e proteína-lipídio (Bennett and Stenbuck 1979; Cohen 1983; Marchesi and Palade 1967), que são essenciais para a deformabilidade e estabilidade da membrana (Chasis and Mohandas 1986).

O teor de colesterol na membrana é essencial para determinação da fluidez crítica. Tanto o excesso quanto a diminuição de colesterol na membrana pode comprometer a estabilidade, a permeabilidade e a deformabilidade da membrana (Bernardino Neto et al. 2013). Nesse aspecto é importante salientar que o conteúdo de colesterol nas membranas de eritrócitos é reflexo do conteúdo de colesterol das lipoproteínas plasmáticas (Cooper 1977).

A estabilidade de membrana do eritrócito é influenciada pela sua elasticidade (Starodubtseva 2011) e composição (Perk et al. 1964), bem como por todas as condições ambientais que influenciam as propriedades mecânicas e reológicas da membrana eritrocitária (Williams 1973). Essas duas características da membrana permitem à célula uma resposta a estímulos de estresse e tensão.

Embora a organização estrutural tenha papel importante nas propriedades dos eritrócitos (fluidez, elasticidade e deformabilidade), há evidências que sugerem que estas sofrem influência das condições homeostáticas intra- e extracelular. Por exemplo, a rigidez da membrana depende da concentração de cálcio no citosol, mantida a baixos níveis pelos canais dependentes de ATP na membrana do eritrócito (Mohandas and Gallagher 2008).

Distúrbios na homeostase, sejam locais ou sistêmicos, têm potencial para induzir alterações nas propriedades reológicas do eritrócito. Alterações no hematócrito contribuem significativamente para variações hemo-reológicas tanto em condições fisiológicas quanto em certas doenças. A deformabilidade é sensível à homeostase local e sistêmica, com alterações de propriedades e associações das proteínas, a razão da área

de superfície e volume celular, morfologia celular e viscosidade citoplasmática; alterações que devem resultar de desordens genéticas ou serem induzidas pelo metabolismo local do tecido, estresse oxidativo e atividade de leucócitos. Além disso, proteínas plasmáticas e de superfície podem ser causa do aumento de agregação dos eritrócitos (Baskurt and Meiselman 2003).

Em solução hipotônica, o fluido iso-osmolar entra no eritrócito e muda sua forma de disco bicôncavo para esfera, enquanto que soluções hipertônicas mudam a forma dessa célula para um formato conhecido como equinócito (Mohandas and Gallagher 2008). A incubação de eritrócitos em gradiente de hipotonicidade leva ao aumento na liberação de hemoglobina com a diminuição na concentração de sal. Os valores de absorbância na região de 540 e 560 nm (Y) em função da concentração de sal (X) podem ser ajustados por regressão não-linear sigmoidal, com base na equação de Boltzmann:

$$A = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(X-H_{50})/dX}} + A_2$$

Como o aumento da lise ocorre com a diminuição na concentração salina, a curva de lise por hipotonicidade é dada por uma sigmóide decrescente. A regressão sigmoidal observada nessas relações é típica de sistemas cooperativos saturáveis, em que a liberação de hemoglobina parte de um platô mínimo estável (A_2) até atingir um platô máximo estável (A_1) com a diminuição da concentração salina. A transição entre os valores de A_2 e A_1 exige uma variação na concentração de sal (X) dada por $4 \times dX$ e passa por um ponto intermediário de concentração salina (H_{50}) (Figura 1.5).

As variáveis dX e H_{50} estão relacionadas com a estabilidade de membrana dos eritrócitos. Quanto menor o valor de dX , menor é a estabilidade ou maior é a fragilidade osmótica dos eritrócitos, pois é necessária uma menor variação na concentração salina para promover a hemólise. Por outro lado, quanto menor o valor de H_{50} maior é a estabilidade ou menor é a fragilidade osmótica dos eritrócitos, pois maior é a hipotonicidade necessária para promover a hemólise (Bernardino Neto et al. 2013; de Freitas et al. 2008; Penha-Silva et al. 2008; Penha-Silva et al. 2007).

Estresse oxidativo e malária

Estudos têm demonstrado que os eritrócitos parasitados pelo plasmódio são muito susceptíveis ao dano oxidativo (Akanbi et al. 2010) e que a geração de espécies

reativas de oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, o estresse oxidativo (EO) possuem papel crucial no desenvolvimento de complicações sistêmicas da malária (Dockrell et al. 1986; Guha 2006; Sohail et al. 2010).

Essa produção de ROS durante a infecção da malária ocorre através de dois mecanismos separados. Um deles envolve a degradação da hemoglobina pelo parasita, com o objetivo de gerar um bioproduto para a sua nutrição. Neste mecanismo, o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} , o heme é separado da globina e os elétrons produzidos durante este processo reagem com o oxigênio molecular para formar as ROS, inclusive H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$. O segundo mecanismo exige a ativação da resposta imune do hospedeiro, que conduz à produção das citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ nas células Th1. Posteriormente, há fagocitose dos parasitas por macrófagos ativados, que secretam óxido nítrico e ROS. A liberação dessas espécies radiculares neste mecanismo gera um efeito semelhante a uma ação antimicrobiana (Erel et al. 1997; Pabon et al. 2003).

O estresse oxidativo nas células vermelhas do sangue pode causar mudanças na hemoglobina, como também na membrana da célula, induzindo o processo de peroxidação lipídica e polimerização de proteínas. Embora os eritrócitos possuam um sistema antioxidante celular eficiente, algumas doenças, como a deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), podem aumentar a susceptibilidade do eritrócito aos danos produzidos por estresse oxidativo (Akanbi et al. 2010).

Um dos fatores que modificam a membrana do eritrócito é o EO gerado pelo parasita. Além deste mecanismo, o EO pode ser gerado nos eritrócitos pelos próprios medicamentos utilizados para combater a doença. Isto ocorre pelo fato de que o mecanismo de ação desses fármacos, em parte, utiliza ROS. A CQ, medicamento utilizado para eliminar as formas eritrocíticas, gera de forma secundária, EO nas hemácias. Esta geração ocorre pelo acúmulo de heme oxidado, ferroprotoporfirina (FP), resultante da ação do medicamento, que atua inibindo a enzima hemepolimerase. Esta enzima utiliza o FP como substrato para gerar o pigmento malárico ou hemozoína (Becker et al. 2004; Deharo et al. 2003). Outros medicamentos utilizados também geram EO. Acredita-se que a PQ, durante o ciclo redox dos seus metabólitos, exerce um substancial EO. Já a artemisinina reage com moléculas de heme formando radicais citotóxicos (Becker et al. 2004).

Para proteger-se das ROS, as células lançam mão de dois tipos de sistema antioxidante: enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (Cat), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e peroxiredoxina (Prx). O sistema antioxidante não enzimático é composto de substâncias extracelulares, dentre as quais estão as vitaminas C e E, o β -caroteno, a cisteína e minerais como selênio, zinco, magnésio e cobre. A vitamina E confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação (LPO). O β -caroteno interage com as ROS, especialmente quando ocorrem baixas tensões de O_2 e a vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as ROS (Halliwell and Gutteridge 2007; Vasconcelos et al. 2007).

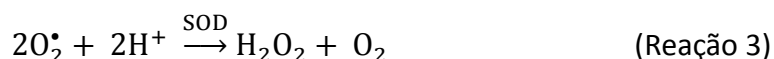
O ciclo redox da glutathione é o maior sistema de defesa para desintoxicação de ROS dentro dos eritrócitos (Erel et al. 1997; Halliwell and Gutteridge 2007; Lima and Abdalla 2001; Vasconcelos et al. 2007). Ele é composto pelas formas glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSG), glutathione e pelas enzimas GPx e GR. Alterações qualitativas e quantitativas neste sistema são consideradas índices de dano oxidativo (Monostori et al. 2009). A GSH é um tripeptídeo contendo tiol (-SH), que desempenha um papel central nas vias de sinalização e na defesa contra o dano oxidativo, eliminando produtos da LPO (Forman et al. 2009; Monostori et al. 2009). A GPx, enzima que faz parte da família das selenoenzimas, catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois às expensas da conversão da GSH a GSSG (Reação 1) (Ferreira and Matsubara 1997; Halliwell and Gutteridge 2007). A atividade da GPx também está fortemente relacionada com os níveis plasmáticos de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBA), que é um marcador de dano oxidativo às macromoléculas.



A GR é uma flavoenzima homodimérica da família disulfito redutase, NADPH dependente, que catalisa a redução da GSSG à GSH (Reação 2). Ela é essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. Possui uma relação com diversos fenômenos celulares, incluindo a resposta de defesa contra as ROS (Ferreira and Matsubara 1997; Kim et al. 2010; Li et al. 2004). Sob diminuição do fornecimento de

NADPH, como no jejum e na deficiência de G6PDH, há prejuízo da função da GR, podendo ocasionar o acúmulo de GSSG, o que resulta na geração de um estado de EO (Ferreira and Matsubara 1997; Kim et al. 2010).

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



A enzima Cat é uma hemoproteína tetramérica citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 (Reação 4). É mediadora na sinalização da proliferação celular, apoptose, metabolismo de carboidratos e ativação plaquetária (Ferreira and Matsubara 1997; Min et al. 2010). Encontra-se livre no citoplasma de eritrócitos maduros e é dependente de NADPH. Tem como uma das suas principais funções proteger a hemoglobina, removendo mais da metade do H_2O_2 gerado em eritrócitos humanos normais, que são expostos a altas concentrações de oxigênio substancial (Goyal and Basak 2010).



Em tecidos de mamíferos, a atividade da enzima é maior no fígado e eritrócitos, relativamente elevada no rim e no tecido adiposo, intermediária no pulmão e pâncreas, e muito baixa no coração e no cérebro. Em humanos, a Cat está ausente em células musculares lisas e células endoteliais, porém, encontra-se livre no citoplasma de eritrócitos maduros. A enzima está enclausurada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa. Além disso, para exercer sua função, esta enzima é dependente de NADPH.

Outra forma de detectar o EO no organismo é através da mensuração de produtos da oxidação de substâncias. Por exemplo, a alantoína – produto da oxidação do ácido

úrico – e o malondialdeído (MDA) e os isoprostanos, ambos produtos da LPO (Halliwell and Gutteridge 2007; Lima and Abdalla 2001; Tolun et al. 2010).

O ácido úrico formado pela conversão da xantina é o produto final do metabolismo das purinas em seres humanos e possui importantes propriedades antioxidantes. Quando este sofre oxidação por ROS, ocorre a formação de alantoína (Gruber et al. 2009; Kand'ár 2008). A determinação da alantoína tem sido sugerida como um marcador de EO porque ela não é produzida metabolicamente em nosso organismo. Dessa forma, pode ser útil para a determinação de EO gerado por várias doenças, como por exemplo, hemocromatose, artrite reumatóide, diabetes, insuficiência renal e doenças cardíacas crônicas (Gruber et al. 2009; Halliwell and Gutteridge 2007; Kand'ár 2008). A alantoína é um produto estável na urina. Além disso, também pode ser mensurada no plasma e nos eritrócitos. Historicamente, a alantoína tem sido determinada por ensaio colorimétrico baseado na reação de Rimini-Schryver. Sua quantificação foi melhorada pelo uso de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em procedimento que inclui desproteinização da amostra, pré-purificação de alantoína, conversão de alantoína em ácido glioxílico, derivatização do ácido glioxílico com 2,4-dinitrofenilhidrazina e separação dos derivados por HPLC (Kand'ár 2008; Tolun et al. 2010).

Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a oxidação de lipídeos é o teste do MDA. Ele é um dialdeído formado como um produto secundário da LPO, derivado da β -ruptura de endociclicização de ácidos graxos polinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico. É o principal escolhido como marcador geral de dano oxidativo em plasma. Reage com o TBA, gerando cromógeno de cor rosa fluorescente, o $(TBA)_2$ -MDA. Este produto absorve luz no comprimento de onda de 532 nm. O MDA possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas doenças associadas ao estresse oxidativo (Halliwell and Gutteridge 2007; Lima and Abdalla 2001; Vasconcelos et al. 2007).

Atualmente, o melhor marcador para LPO é a família de isoprostanos (IPs). São derivados da oxidação de ácidos graxos por via não enzimática. A maioria dos IPs são esterificados a fosfolipídeos. Finalmente, eles são hidrolisados a IPs livres, que são rapidamente metabolizados. Os IPs mais comumente determinados são os da família

F₂-isoprostanos, derivados da oxidação do ácido araquidônico. Outros são derivados do ácido eicosapentaenóico e do ácido docosahexaenóico. Podem ser mensurados por HPLC acoplada a espectro de massa ou ainda por cromatografia gasosa. Além desses métodos, alguns kits imunológicos para determinação de F₂-IPs também estão disponíveis. Altos níveis de IPs no plasma humano têm sido associados ao EO em doenças renais, hepáticas, cardiovasculares e pulmonares, bem como no diabetes e hipertensão, dentre outras condições (Halliwell and Gutteridge 2007; Lima and Abdalla 2001).

Na malária *vivax*, os mecanismos oxidativos são dominantes em relação aos antioxidantes. Por esse motivo, o EO produzido é mantido pelo hospedeiro como um mecanismo de defesa contra a infecção malárica (Erel et al. 1997).

Algumas ROS parecem contribuir para os sinais e sintomas apresentados na malária, tanto agravando como atenuando este quadro, e podem explicar algumas alterações encontradas nos pacientes com esta doença. Os eritrócitos são expostos ao EO endógeno e exógeno na malária *vivax*, que podem levar as várias alterações metabólicas no hospedeiro (Erel et al. 1997; Kochar et al. 2005).

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

Além do mecanismo de trombocitopenia na malária, os radicais livres (RL) também são responsáveis por danos ocasionados no fígado (Lacerda et al. 2011). Ratos infectados por *Plasmodium yoelii* apresentaram altos níveis de xantina oxidase e LPO no fígado, indicando o desenvolvimento de EO (Siddiqi and Pandey 1999). Estudos demonstraram que a infecção malárica, pela indução da geração de radicais HO^{*}, causa apoptose nos hepatócitos (Dey et al. 2009; Guha 2006).

Em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* foram encontrados baixos níveis de GSH e de vários antioxidantes, tais como GST, Cat, SOD, GPx, TrxR, NADPH-metemoglobina redutase, desferroxamina (quelante de metais pesados), ferritina,

vitaminas A, E e C, bem como α - e β -caroteno, licopeno e luteína; além de altos níveis de ceruloplasmina, GR e MDA, indicativos de aumento do EO, seja pela produção excessiva de radicais livres ou pela diminuição do perfil antioxidante (Becker et al. 2004; Bilgin et al. 2012; Erel et al. 1997; Fabbri et al. 2013; Hassan et al. 2004; Yazar et al. 2004). Nos eritrócitos, esse perfil enzimático depende da resposta do organismo e sofre influência dos mecanismos das células fagocíticas ao liberarem mediadores imunológicos para o ambiente ao redor dos eritrócitos. Como resultado, o EO é intensificado no sangue devido ao conjunto agente infeccioso e resposta imune do organismo (Dondorp et al. 2000; Kochar et al. 2005).

POLIMORFISMOS DOS GENES REDOX

Durante metabolismo normal, o oxigênio é reduzido à água e, nesse processo, os produtos intermediários são o radical superóxido ($O_2^{\bullet}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), denominados espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes compostos têm meia vida ultracurta, pois a presença de um elétron não-pareado os torna extremamente reativos e capazes de causar danos a moléculas de DNA, proteínas e lipídeos. O radical $HO^{\bullet}$ é o mais reativo, podendo reagir com o DNA por adição às duplas ligações das bases nitrogenadas e, ainda, sequestrando um átomo de hidrogênio do grupo metil da timina e/ou de cada uma das ligações C-H da 2'-desoxirribose, causando quebra no DNA. A adição deste radical à dupla ligação entre os carbonos C_5 e C_6 das pirimidinas leva à formação dos radicais C_5-OH e C_6-OH , e o sequestro do átomo de hidrogênio da timina resulta no radical alil (Cooke et al. 2003). Os radicais formados diferem de acordo com suas propriedades redox, sendo o radical C_5-OH redutor e o C_6-OH oxidante.

Os danos ao DNA e estresse oxidativo se inter-relacionam no que se diz respeito à susceptibilidade ou proteção a certas doenças.

Numerosos fatores podem afetar a eficiência dos antioxidantes, incluindo alterações nas enzimas (Valko et al. 2007) e toxinas ou processos que as deletam (Mates et al. 1999). Estratégias são usadas para explorar o genoma humano e buscar evidências de alterações genéticas que contribuam para o desenvolvimento de doenças. Uma delas é aquela que pressupõe algum conhecimento sobre a fisiopatologia da doença, ou seja,

a abordagem do gene candidato, em se investigam genes envolvidos em vias biológicas específicas relacionadas ao que se conhece da fisiopatologia da doença que está sendo estudada. Aproximadamente 0,1% da sequência do genoma diferem entre os seres humanos, e a maioria dessas diferenças corresponde a polimorfismos e mutações.

Os polimorfismos genéticos consistem em variações nucleotídicas na sequência de um gene e devem apresentar frequência maior ou igual a 1% dentro da população. Estes polimorfismos podem ocorrer tanto nas regiões codificadoras (exons) quanto nas regiões não codificadoras (íntrons e promotores) do gene; podendo ser a substituição, inserção e/ou deleção de nucleotídeos em um ponto específico do gene (Mitchison 2001). Os polimorfismos ocorrentes nos éxons dos genes podem levar a alterações na estrutura da proteína codificada, já que, apesar do código genético ser degenerado, um polimorfismo pode mudar o padrão de leitura do códon e inserir um aminoácido diferente na sequência da proteína, ou inserir um códon de parada e até mesmo torná-lo sem sentido. Já os polimorfismos presentes em regiões não codificadoras, principalmente aqueles localizados nos promotores, podem estar relacionados a alterações nas taxas de transcrição do gene (Mitchison 2001).

A forma mais comum é o polimorfismo de base única - SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), em que há troca, inserção ou deleção de um nucleotídeo que resulta na troca de um aminoácido em uma posição específica afetando também o fenótipo. Certos SPNs nos genes destas enzimas antioxidantes podem levar a diminuição ou comprometimento na regulação da atividade enzimática, além de promover EO.

Estudos têm revelado a relação do aumento do EO com o SPN das enzimas SOD, Cat e GPx, vinculados a condições fisiológicas, como, por exemplo, idade e nutrição, bem como a diferentes tipos de doenças (Bastaki et al. 2006; Fabre et al. 2008; Hiragi 2011).

Polimorfismo de enzimas antioxidantes

Superóxido dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) catalisa a reação de conversão do radical superóxido ($O_2^{\bullet}$), favorecendo sua dismutação e resultando na formação de oxigênio e peróxido de hidrogênio (Barreiros et al. 2006). Uma das ações é proteger o DNA das lesões provocadas pela sobrecarga de Fe^{2+} (Hermes-Lima 2004).

Três isoformas distintas foram identificadas e caracterizadas em mamíferos: SOD1 ou Cu/Zn SOD; SOD2 ou MnSOD; SOD3 ou ECSOD. Elas possuem funções similares, porém características de sua estrutura proteica, localização cromossômica, cofatores, distribuição gênica e compartimentalização celular as tornam diferentes (Miao and St Clair 2009; Parge et al. 1992).

SOD1 (CuZnSOD)

O gene da SOD1 está localizado no cromossomo 21q22 (Figura 1.6) (Levanon et al. 1985). A SOD1 contém cobre (Cu) e zinco (Zn) no sítio ativo e é principalmente encontrada no citosol, lisossoma, núcleo e nos espaços entre as membranas interna e externa da mitocôndria.

Associações entre SNPs da SOD1 e doenças têm sido relatadas. O SNP rs7277748 está presente no éxon 1, na região promotora TATA box, e há modificação de A<G. Nenhuma associação foi encontrada entre esse polimorfismo e amiotrofia lateral esclerótica familiar (Niemann et al. 2007). A troca de C<T no íntron 1 (rs 1788180) e A<C no íntron 3 (rs2234694) foram associados com risco aumentado de nefropatia em pacientes com *diabetes mellitus* do tipo 1 (Al-Kateb et al. 2008; Panduru et al. 2010). Esse último polimorfismo está associado a atividade aumentada de SOD1 nos indivíduos com genótipo AA (Flekac et al. 2008; Shimoda-Matsubayashi et al. 1996).

SOD2 (MnSOD)

Entre as 3 isoformas, a SOD2 tem uma organização genética única e pouco similar à SOD1 e SOD3. Considerada a única enzima antioxidante presente dentro da mitocôndria, ela tem importantes implicações, uma vez que é o principal sítio para produção de ROS durante metabolismo celular normal.

O gene da MnSOD2, localizado no cromossomo 6q25.3 (Figura 1.6), contém um SNP que envolve a troca de um C por T resultando na substituição do aminoácido alanina por valina (Bastaki et al. 2006; Wan et al. 1994). O polimorfismo Ala16Val tem sido proposto afetar transporte de enzimas através do espaço intra-mitocondrial (Sutton et al. 2003). O alvo de ação da variante 16Ala é a matriz mitocondrial, enquanto que a variante 16Val é associada à parede interna da mitocôndria. O alelo Val tem sido associado a condições relacionadas ao estresse oxidativo, como o envelhecimento

(Bastaki et al. 2006), câncer de pulmão, cardiomiopatias (Hiroi et al. 1999); e o alelo selvagem Ala, ao câncer de mama (Ambrosone et al. 1999) e hipertensão (Hsueh et al. 2005).

Glutathione peroxidase (GPx)

A GPx (EC 1.11.1.9) localiza-se no cromossomo 3p13-q12 (Figura 1.6), é selênio dependente e possui 4 formas: GPx1 (oxidoreductora extracelular), GPx2 (gastrointestinal), GPx3 (presente no plasma) e GPx4 (hidroperóxido fosfolipídico). A GPx catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água e de peróxidos orgânicos em álcool, por meio da conversão do GSSH em GSSG, possuindo ação antioxidante, tanto no citosol, quanto na membrana citoplasmática (Margis et al. 2008).

GPx1

Uma variação foi identificada no gene GPx1 devido a uma mutação pontual, na qual houve a troca de uma citosina por uma timina na posição 593, resultando na substituição do aminoácido prolina-197 por leucina (Bastaki et al. 2006; Forsberg et al. 2000). Este é o polimorfismo de maior interesse, uma vez que a ativação enzimática nos portadores do alelo mutante GPx Leu197 é menor que no genótipo selvagem GPx Pro198, influenciando então o balanço entre EO e defesa antioxidante. Alguns estudos têm indicado que a variante Leu (TT) ao afetar a atividade da enzima GPx1, a torna menos responsiva à estimulação (Hu and Diamond 2003; Shinkai et al. 2006).

Diversos estudos têm investigado a relação entre o polimorfismo GPx1 Pro197Leu e doenças como câncer, diabetes e doenças renais e vasculares. Esta variação apresenta frequência polimórfica ($p=0,066$) e revelou o potencial preditivo deste marcador, na recorrência do câncer superficial de bexiga. Indivíduos com o alelo variante T (Leu) apresentaram associação protetora quanto à recorrência do tumor (Zhao et al. 2005). Entretanto, uma maior atividade enzimática foi associada a menor risco de câncer (Arsova-Sarafinovska et al. 2009; Erdem et al. 2012; Hong et al. 2013; Ravn-Haren et al. 2006).

Metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR)

A enzima 5,10-metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR, EC 1.5.1.20), dependente de flavina-adenina nucleotídeo (FAD), catalisa a conversão irreversível de 5,10-metilenotetraidrofolato a 5-metiltetraidrofolato, que serve como um doador de grupo metil na remetilação da homocisteína (Hcy) à metionina (Bronowicki et al. 2008) (Figura 1.7).

O gene da MTHFR está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p36.3) (Figura 1.6). A sequência desse gene é de aproximadamente 2,2 kb, a qual inclui 11 éxons. Cada éxon apresenta tamanho variável, podendo se estender de 103 a 432 pares de bases (Goyette et al. 1998; Goyette et al. 1994). Dois polimorfismos são bem descritos no gene MTHFR: C677T e A1298C. O polimorfismo C677T ocorre no éxon 4 e resulta na troca de uma alanina por uma valina. Esse polimorfismo reside na base no sítio de ligação do cofator FAD (Frosst et al. 1995; Guenther et al. 1999).

Indivíduos com MTHFR 677T apresentam, *in vitro*, 30% da atividade enzimática quando comparados com o tipo selvagem, enquanto aqueles com genótipo heterozigoto CT têm 60% da atividade do genótipo selvagem (Frosst et al. 1995). O alelo 677T está associado a aumento nos níveis plasmáticos de Hcy (Gudnason et al. 1998; Kluijtmans et al. 1997) e da ocorrência de defeitos congênitos, especialmente no tubo neural (Chevrier et al. 2007). Genótipos variantes MTHFR 677T têm apresentado efeito protetor em leucemias em crianças e susceptibilidade diminuída para leucemia linfóide aguda (LLA) (Miranda-Vilela 2013). O genótipo TT para SNP C677 foi também associado a aumento da susceptibilidade a isquemia em crianças (Sarecka-Hujar et al. 2012) e alelo T apresentou proteção contra infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) (Bronowicki et al. 2008).

Estudos têm sugerido que em situações de atividade diminuída da enzima MTHFR existe maior disponibilidade do seu substrato (N5,N10-metilenotetraidrofolato) para a síntese de purinas e pirimidinas, o que pode resultar em maior estabilidade na síntese de DNA e diminuição de mutações genéticas (Chen et al. 1999; Ulrich et al. 1999). Entretanto, Stern et al. (2000) mostraram que o genótipo TT está associado a menor metilação do DNA em leucócitos periféricos quando comparado com o genótipo CC. Uma possível razão para isso é a disponibilidade diminuída de N5,N10-metilenotetraidrofolato, requerido para biossíntese de S-adenosilmetionina. Essa

observação é relevante, uma vez que distribuição de folato comprometida nos indivíduos com genótipo TT leva a efeitos metabólicos secundários associados à hiperhomocisteinemia.

A relação entre o polimorfismo MTHFR C677T e doença envolve dois aspectos: a doença influencia a concentração de Hcy e deve ser efeito da modificação pelo polimorfismo da enzima; ou, o genótipo deve estar associado com o risco de doença, possivelmente mediada pela alteração no metabolismo do folato e Hcy.

NAD(P)H: Quinona Oxidoreductase

NQO1

NQO1 (EC 1.699.2) é uma enzima antioxidante de fase II envolvida na formação de ROS e de outros RL. É uma enzima citosólica com massa molecular de 31 kDa, amplamente distribuída nos tecidos, porém em maior concentração no fígado e tecidos cardiovasculares. Em humanos, seu gene está localizado no cromossomo 16q22.1 (Figura 1.6).

A NQO1 catalisa a redução de dois elétrons de uma variedade de compostos quinonas e seus derivados, resultando no combate a compostos eletrofílicos, assim como evitando a geração de radicais livres e ROS (Dinkova-Kostova and Talalay 2010). Mais especificamente, além dessa função, as propriedades bioquímicas da NQO1 envolvem (Figura 1.8): manutenção dos antioxidantes solúveis α -tocoferol e ubiquinona nos seus estados reduzidos e ativos; sequestro do radical ânion superóxido via reações dependentes de NADPH; estabilização da proteína supressora de tumor p53 (Anwar et al. 2003; Ross 2004; Siegel et al. 2004). Algumas evidências sugerem que a NQO1 também possa interagir diretamente com ROS, como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, o que pode influenciar no equilíbrio oxidante-antioxidante.

O papel da NQO1 na saúde e doença tem sido estudado pela determinação de mudanças da enzima ao nível do RNAm e expressão da proteína, assim como pela determinação da atividade enzimática nos tecidos em várias condições patológicas, bem como pela execução de estudos clínicos e epidemiológicos que tentam fazer associações entre polimorfismos gênicos da NQO1 e risco de doenças.

O SNP mais estudado para essa enzima envolve uma mudança na posição 609 do cDNA, de um C por um T, resultando na substituição de uma prolina por uma serina na posição 187 da sequência de aminoácidos da proteína (NOQ1 C609T ou Pro187Ser). A proteína mutante TT é muito instável e é rapidamente degradada pelo proteassoma. Células em heterozigose, um alelo selvagem e outro mutante, tem aproximadamente metade da atividade enzimática apresentada pela célula com genótipo selvagem. Ambas, expressão da proteína e atividade são indetectáveis em amostras de indivíduos carreadores do genótipo homozigoto, o qual é assim chamado de genótipo nulo (Zhu and Li 2012).

Genética do hospedeiro *versus* malária

A malária é considerada por alguns como a maior fonte de pressão seletiva que age sobre as populações humanas provenientes de áreas endêmicas (Kwiatkowski 2005; Ruwende et al. 1995). A distribuição geográfica de vários polimorfismos genéticos que geram proteção contra a malária são consistentes com essa teoria (Carter and Mendis 2002; Kwiatkowski 2005).

A malária exerceu grande impacto na seleção natural. Hoje sabemos que a combinação de fatores ambientais, do patógeno e do hospedeiro participa tanto na suscetibilidade aos agentes infecciosos quanto na gravidade da doença (Anstey et al. 2009).

Estima-se que aproximadamente 25% do risco de progressão para formas graves da malária sejam determinadas por variações no genótipo do hospedeiro, porém pouco se conhece sobre quais variantes genéticas podem interferir na suscetibilidade ao desenvolvimento das manifestações clínicas da malária *vivax* (Manjurano et al. 2012). As diferentes distribuições geográficas de anemia falciforme, alfa-talassemia, deficiência de G6PDH, ovalocitose e Duffy negativo são exemplos do princípio geral de que diferentes populações estão envolvidas em diferentes variantes genéticas para proteção contra malária (Campino et al. 2006).

Algumas populações expostas à infecção por *P. vivax* apresentam maiores riscos de desenvolver anemia severa. Isto pode ser explicado, em parte, pela genética do

hospedeiro, que envolve diferenças na prevalência de hemoglobinopatias hereditárias tais como α^+ -talassemia. Em infecções por *P. falciparum*, a microcitose em pacientes homozigotos para α^+ - talassemia reduz o risco de anemia severa pelo fato da hemólise dos eritrócitos resultar em menor redução nos níveis totais de hemoglobina (Fowkes et al. 2008). Cockburn et al. (2004) mostraram que menor expressão do receptor de complemento 1 no eritrócito aumenta suscetibilidade de fagocitose esplênica e destruição de células e está associado a anemia por malária *falciparum* grave. Já o aumento da expressão desses receptores nos eritrócitos expostos ao *P. vivax* deve contribuir para menor prevalência de anemia grave associada a esse parasita (Kai and Roberts 2008).

No sistema glutathione peroxidase eritrocitário onde há a oxidação da GSH por peróxido de hidrogênio e outros peróxidos, o produto do alelo GPx1*2 interfere com a habilidade das células HBB*A/*S (gene hemoglobina em heterozigose) limitarem a invasão e crescimento do parasita *P. falciparum*. A alta atividade peroxidásica do produto do alelo GPX1*2 poderia interferir nas modificações da membrana do eritrócito que causam o efeito antimalárico do genótipo HBB*A/*S, provocando um efeito epistático, pelo decréscimo da proteção deste genótipo contra a malária *falciparum* (Luzzatto and Notaro 2001). Em nível clínico espera-se encontrar um aumento significativo de portadores do alelo GPX1*2 entre os indivíduos HBB*A/*S que desenvolvem malária severa (Destro-Bisol et al. 1999).

Para malária *vivax*, merozoítos de *Plasmodium vivax* são geralmente dependentes de um único receptor, chamado antígeno Duffy, para invadir os eritrócitos, embora eles possam ter mecanismos de invasão alternativos. A falta do receptor Duffy em populações do oeste africano permite menor morbidade pela infecção por *P. vivax* (Price et al. 2007).

Todo o contexto sobre as peculiaridades da enzima G6PDH (as consequências de sua deficiência e suas possíveis variantes) em relação à suscetibilidade e/ou proteção ao *Plasmodium* são biologicamente plausíveis. Eritrócitos deficientes de G6PDH infectados por *P. falciparum* são mais sensíveis ao EO produzido pelo parasita (Beutler et al. 2007). O dano celular resultante compromete o crescimento do parasita, causa lise das células infectadas e estimula precocemente a fagocitose dos eritrócitos. Isso é tão relevante na malária *vivax* quanto na *falciparum*. A lise de eritrócitos deficientes de G6PDH

acometidas com estresse oxidativo é, em parte, dependente da idade da célula. A variante africana geralmente causa lise significativa somente em eritrócitos velhos, mas a variante mediterrânea também causa danos e lise de eritrócitos jovens (reticulócitos) na presença de uma variedade de estressores como drogas ou infecção. A malária *vivax* preferencialmente infecta reticulócitos, enquanto que a *falciparum* infecta eritrócitos de todas as idades. A variante mediterrânea da G6PDH é a mais comum das deficiências severas e tem efeitos seletivos negativos adversos.

O polimorfismo no gene da enzima GST, no cromossomo 11, pode alterar sua atividade e leva a um menor índice de desintoxicação de RL em células do hospedeiro ou, ainda, a uma maior disponibilidade de GSH para o metabolismo do parasita. Em ambos os casos a condição patológica pode ser agravada (Kavishe et al. 2009; Sohail et al. 2010). Além destes fatores, o polimorfismo da GST também pode estar envolvido no mecanismo multifatorial de resistência à antimaláricos presente em algumas cepas de *Plasmodium falciparum* (Wisedpanichkij et al. 2010).

A relação entre os polimorfismos genéticos no homem com resistência/suscetibilidade e severidade na infecção por *P. vivax* no Brasil ainda é pouco estudada. O país apresenta uma situação epidemiológica peculiar, sendo um dos poucos com predominância dessa espécie do parasita. Dados de suscetibilidade a infecção por *P. vivax* aliados a particularidades da região da Amazônia brasileira, incluindo a diversidade genética da população, indicam que os achados nos trabalhos em outras regiões endêmicas podem não ser aplicadas para essa região (Lacerda et al. 2012).

Em um estudo realizado em Manaus, AM, determinou-se a frequência dos polimorfismos nos genes GSTT1, GSTM1 e GSTP1 em pacientes com malária grave e malária não grave por *Plasmodium vivax*. Portadores da deleção nos genes GSTT1 e GSTM1 apresentaram menor risco de desenvolver trombocitopenia quando comparados aos pacientes portadores dos genótipos selvagem e pacientes com malária grave. Já os portadores da mutação A313G no gene GSTP1 em heterozigose ou homozigose apresentaram maior risco de desenvolver icterícia e anemia quando comparados aos pacientes portadores do genótipo GSTP1 selvagem (Lima 2013).

Recentemente, a influência de polimorfismos nos genes do sistema imune como interleucinas IL1B, IL4R, IL12RB1, TNF- α e IFN- γ na suscetibilidade à malária *vivax* foi reportada (Medina et al. 2011; Sortica et al. 2012).

Considerações finais

A busca por marcadores vinculados à rotina de análises laboratoriais têm se intensificado ao longo dos anos, com o objetivo de prever a suscetibilidade do indivíduo ao desenvolvimento de doenças crônicas e graves ou o seu diagnóstico precoce.

Fatores intra- e extracelulares, ao influenciarem as membranas biológicas, seja em qualquer de suas propriedades (deformabilidade, estabilidade e fluidez) comprometem suas funções e disponibilidade para mecanismos metabólicos adjacentes. Uma vez que a estabilidade de membrana do eritrócito está associada a parâmetros bioquímicos, hematológicos e reologia do sangue, o parasitismo pelo *Plasmodium* nos permite pesquisar qual conjunto de variáveis podem influenciar a estabilidade de membrana, e não somente o mecanismo de invasão. Essas análises nos instigam a prever também qual desses grupos de variáveis biológicas pode estar envolvido no desenvolvimento de casos graves de malária, por exemplo, anemia grave e comprometimento hepático mais severo.

Associada a essa abordagem, é importante realçarmos o papel do estresse oxidativo e o perfil genético do hospedeiro na fisiopatologia da malária. O mecanismo antioxidante celular tem ação protetora no sentido de reparar e/ou evitar os danos no material genético (Hermes-Lima 2004). A variação gênica das enzimas que participam desse mecanismo sugere a existência de diferenças individuais no grau de proteção antioxidante, bem como nas consequências da infecção por *Plasmodium vivax*.

As relações entre mutações dos genes que codificam enzimas antioxidantes têm gerado interesse na expectativa de que possam delinear e fornecer respostas aos processos patológicos, seja na suscetibilidade ou proteção contra eles. Os polimorfismos aqui selecionados e discutidos constituem foco em diversas pesquisas relacionando estresse oxidativo às doenças. Uma revisão da literatura descrita por Crawford e colaboradores (2012), relatou que até 2011 os trabalhos com SOD2 Ala16Val e GPx1 Pro197Leu chegavam a mais de 88% e 77%, respectivamente, dos artigos até então publicados. Os polimorfismos genéticos de enzimas que participam tanto na produção como nos processos de metilação do DNA (MTHFR), além de enzimas que metabolizam substâncias citotóxicas ou genotóxicas (NQO1), são descritos constantemente na

literatura científica, destacando sua relação com a fisiopatologia de diversas doenças (Dinkova-Kostova and Talalay 2010; Gong et al. 2013; Izmirli 2013; Mamasoula et al. 2013; Yanling et al. 2013).

Um ponto fundamental é o fato do papel estresse oxidativo não estar completamente elucidado na malária. Apesar de alguns grupos de pesquisa situados no Brasil, Índia e África abordarem o assunto de forma ampla, ainda existem muitos fatores a serem discutidos. Na literatura, essa associação entre os polimorfismos de enzimas antioxidantes e suscetibilidade/resistência à infecção por *P. vivax*, bem como a evolução da forma grave da doença ainda não foi apresentada.

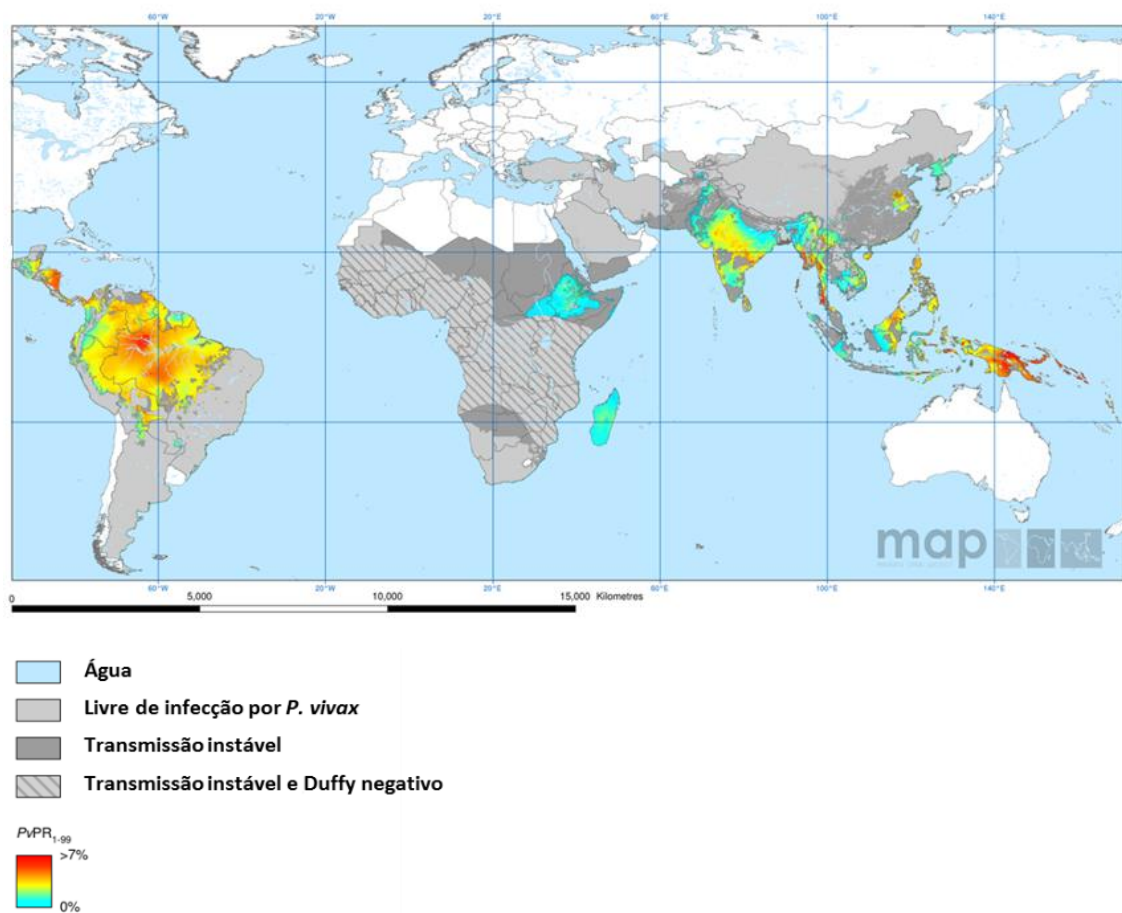


Figura 1.1. Mapa da distribuição e endemicidade da malária *vivax* mundial [Adaptado de Gething et al., 2012].

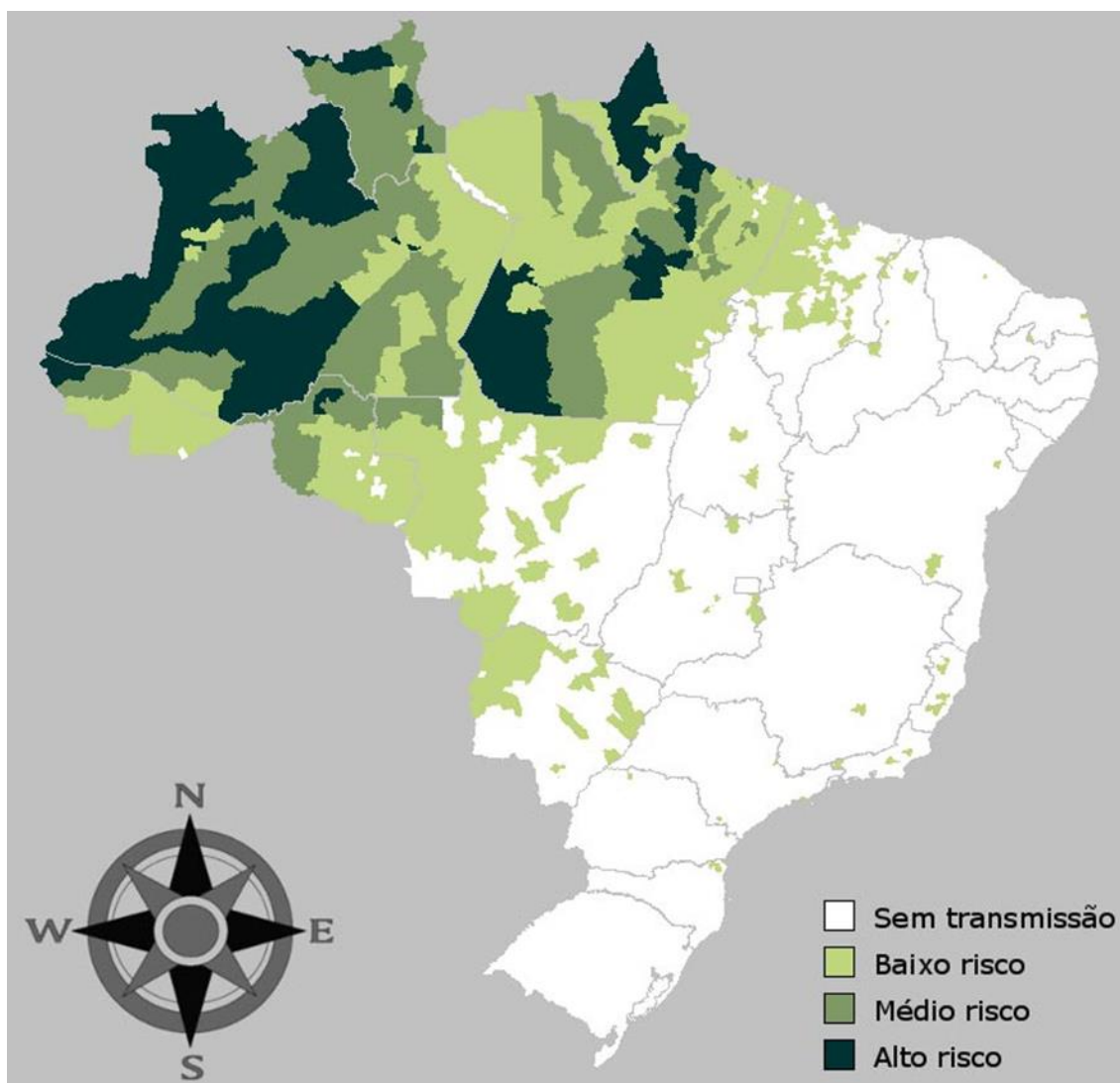


Figura 1.2. Áreas de transmissão de malária no Brasil de acordo com o Índice Parasitário Anual (IPA [casos/1.000 hab]) [SIVEP/Malária, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. 2012].

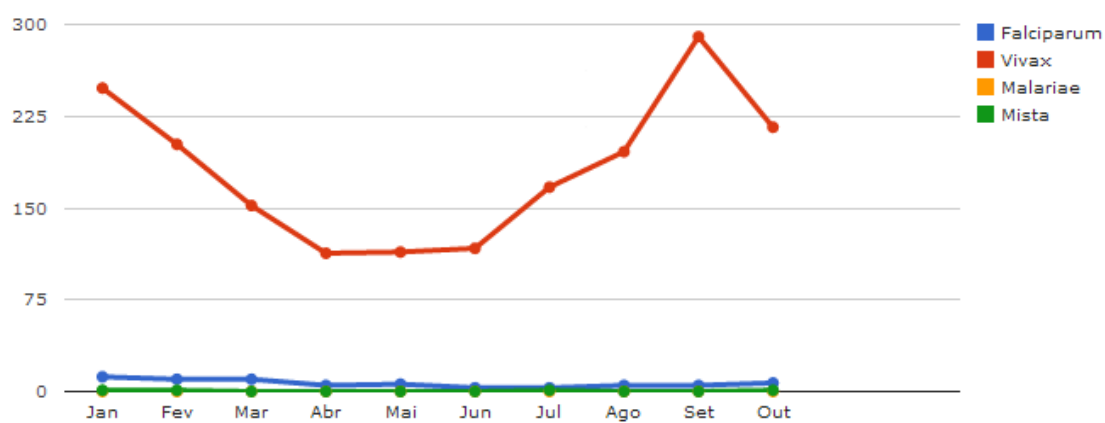


Figura 1.3. Ocorrência de casos registrados na Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, até outubro de 2013, com prevalência de infecção por *P. vivax* [VIGIWEB/FMT-HDV, 2013].

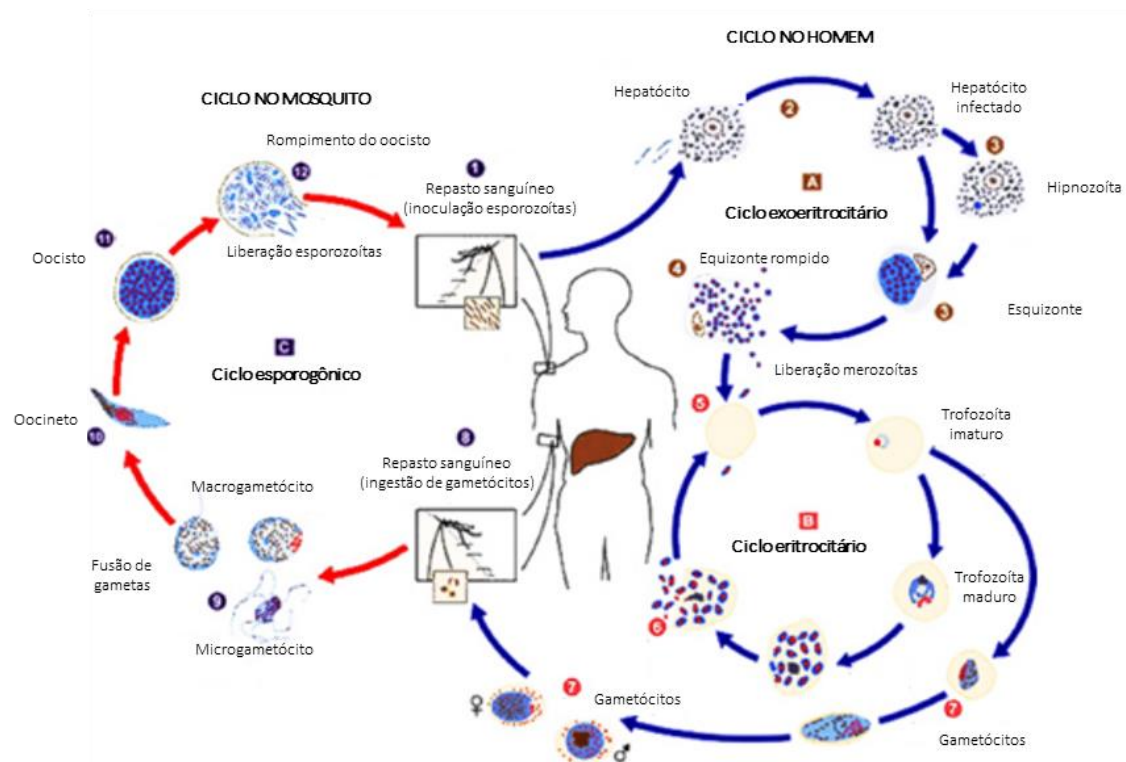


Figura 1.4. Ciclo biológico do *Plasmodium vivax*. O ciclo da malária envolve dois hospedeiros. Durante o repasto sanguíneo, o mosquito *Anopheles* fêmea infectado inocula esporozoítas no hospedeiro humano (1). Os esporozoítas infectam hepatócitos (2) e se desenvolvem em uma forma latente hipnozoíta ou em esquizontes (3), que se rompem e liberam merozoítas (4). Após essa primeira replicação no fígado (Ciclo Exoeritrocitário A), o parasita se multiplica assexuadamente no eritrócito (Ciclo Eritrocítico B). Os merozoítas liberados infectam os eritrócitos (5). Os trofozoítas amadurecem em esquizontes, que se rompem culminando com a liberação de mais merozoítas (6). Alguns parasitas se diferenciam em estágios sexuais (gametócitos) (7). Os gametócitos, macho (microgametócitos) e fêmea (macrogametócito) são ingeridos pelo mosquito *Anopheles* durante o repasto sanguíneo (8). A multiplicação do parasita no mosquito é conhecida como Ciclo Esporogônico (C). No estômago do mosquito o microgameta penetra o macrogameta gerando o zigoto (9). O zigoto se torna móvel e alongado (oocineto) (10), invade a parede do intestino do mosquito e se desenvolve em oocisto (11). O oocisto cresce e rompe, liberando esporozoítas (12), que migram para a glândula salivar do mosquito. A inoculação de esporozoítas (1) em um novo hospedeiro humano perpetua o ciclo da malária. Adaptado de *Center for Disease Control and Prevention* [www.cdc.gov/malaria].

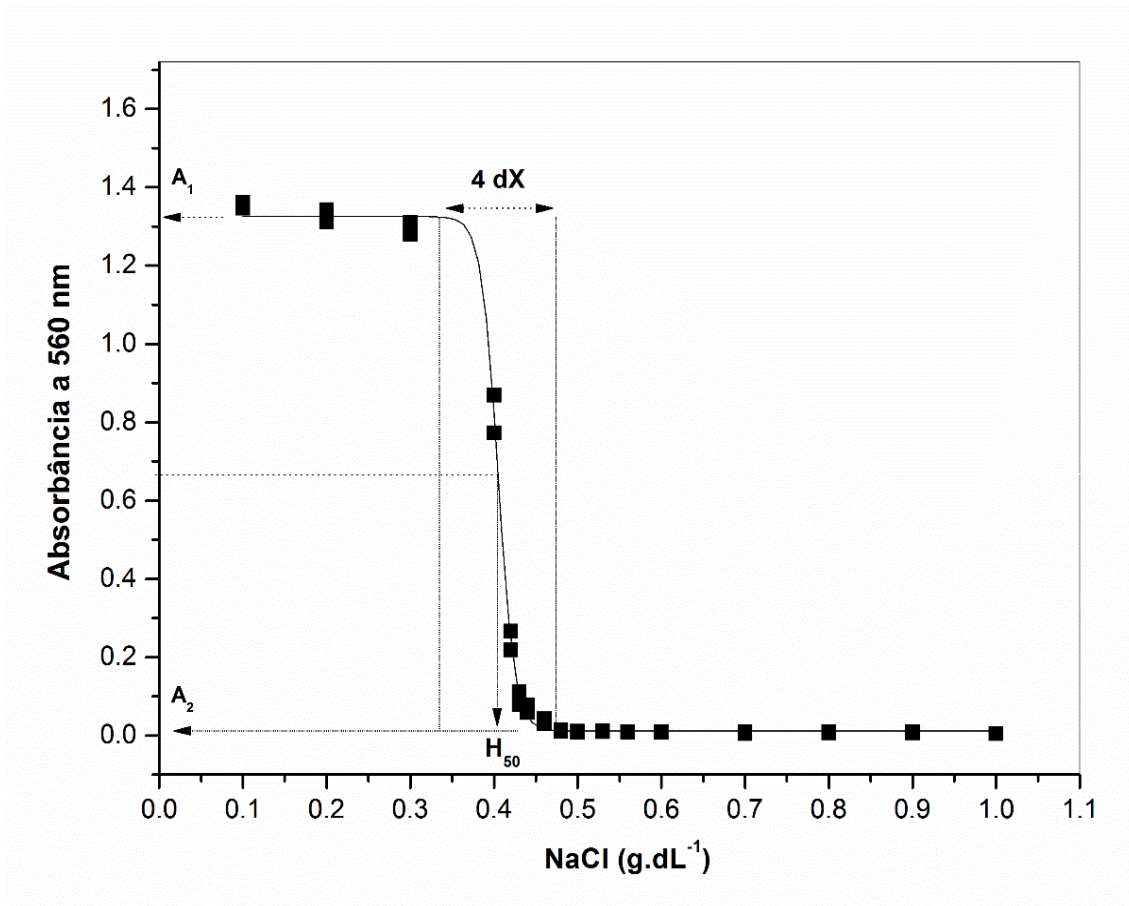
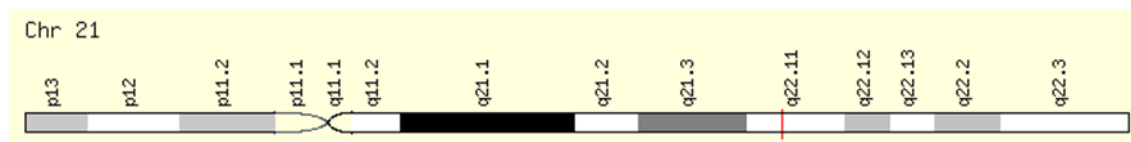
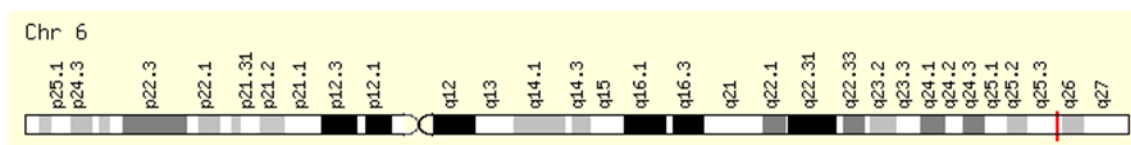


Figura 1.5. Estabilidade osmótica da membrana de eritrócito representada pelo ajuste sigmoideal da dependência da liberação de hemoglobina com a concentração de NaCl. H₅₀ é a concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise. dX representa a variação na concentração de NaCl responsável pela lise completa da população de eritrócito. A₁ e A₂ representam os valores máximo e mínimo da absorbância a 560nm, respectivamente [Mascarenhas Netto et al., 2013]

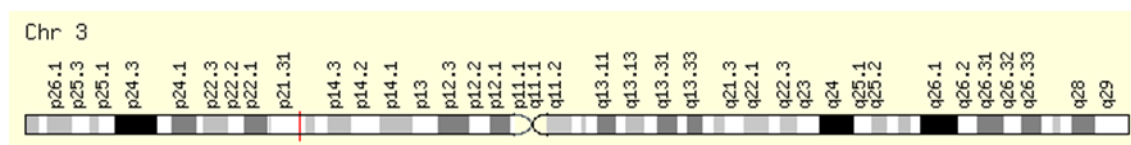
Superóxido dismutase 1



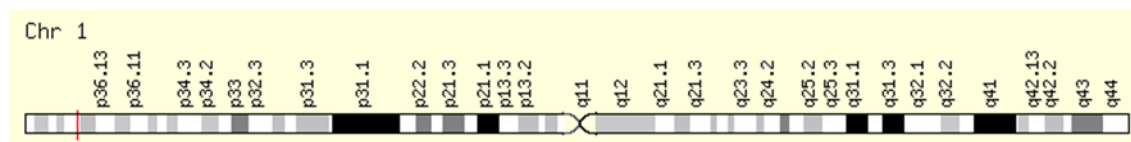
Superóxido dismutase 2



Glutathione peroxidase 1



Metileno tetraidrofolato redutase



NADPH-quinona oxidoreductase 1

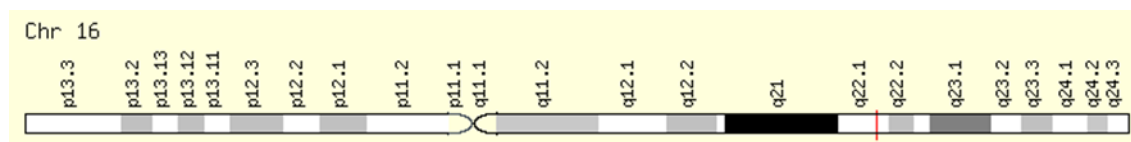


Figura 1.6. Localização cromossômica dos genes das enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, GPx1, MTHFR e NQO1 [www.genecards.org].

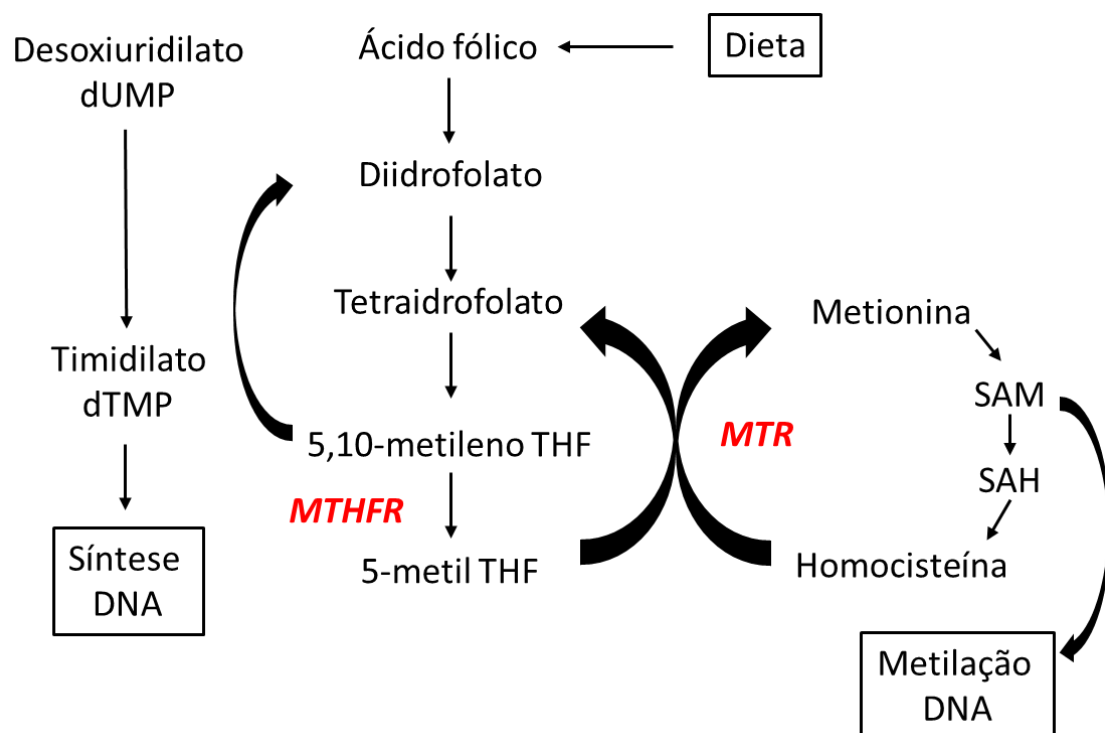


Figura 1.7. Síntese e metilação do DNA via metabolismo de um carbono pela MTHFR (N5,N10-metileno-tetraidrofolato redutase). MTR, metionina sintase; THF, tetraidrofolato, SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína [Adaptado de Bronowicki et al., 2008].

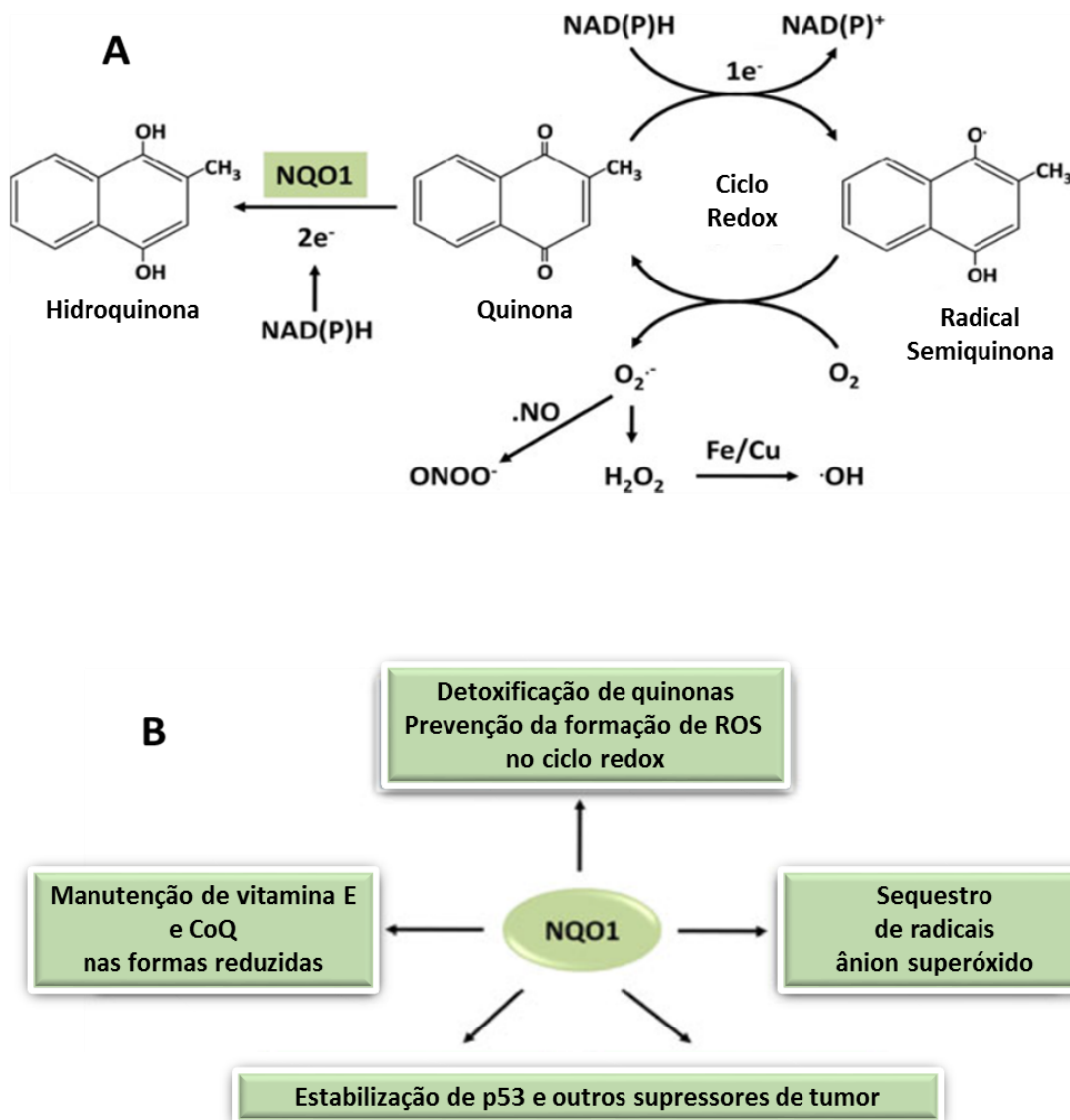


Figura 1.8. Propriedades bioquímicas da enzima antioxidante NADPH:quinona oxidoreductase. **A)** Mecanismo de anti-oxidação pela redução de 2 elétrons e consequente sequestro de radical ânion superóxido. **B)** Múltiplas funções nos processos bioquímicos e celulares [Adaptado de Zhu, Li, 2012].

Referências

- Akanbi OM, Odaibo AB, Olatoregun R, Ademowo OG (2010) Role of malaria induced oxidative stress on anaemia in pregnancy. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3(3):211-211
- Al-Kateb H, et al. (2008) Multiple superoxide dismutase 1/splicing factor serine alanine 15 variants are associated with the development and progression of diabetic nephropathy: the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Genetics study. *Diabetes* 57(1):218-28 doi:10.2337/db07-1059
- Alecrim MGC (2000) Clinical aspects, resistance and parasitary polymorphism of *Plasmodium vivax* malaria in Manaus. Brasília University
- Alexandre MA, et al. (2010) Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerging infectious diseases* 16(10):1611-4 doi:10.3201/eid1610.100685
- Aloulou I, Varlet-Marie E, Mercier J, Brun JF (2006) Hemorheological disturbances correlate with the lipid profile but not with the NCEP-ATPIII score of the metabolic syndrome. *Clin Hemorheol Microcirc* 35(1-2):207-12
- Ambrosone CB, et al. (1999) Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer research* 59(3):602-6
- Amino R, et al. (2007) Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc* 2(7):1705-12 doi:10.1038/nprot.2007.120
- Amino R, Thiberge S, Shorte S, Frischknecht F, Menard R (2006) Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Comptes rendus biologies* 329(11):858-62 doi:10.1016/j.crvi.2006.04.003
- Andrade BB, et al. (2010) Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria journal* 9:13 doi:10.1186/1475-2875-9-13
- Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN (2009) The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol* 25(5):220-7 doi:10.1016/j.pt.2009.02.003
- Anwar A, et al. (2003) Interaction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) with the tumor suppressor protein p53 in cells and cell-free systems. *The Journal of biological chemistry* 278(12):10368-73 doi:10.1074/jbc.M211981200
- Araujo CF, Lacerda MV, Abdalla DS, Lima ES (2008) 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* 103(6):517-21
- Arsova-Sarafinovska Z, et al. (2009) Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. *International urology and nephrology* 41(1):63-70 doi:10.1007/s11255-008-9407-y
- Baird JK (2007) Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol* 23(11):533-9 doi:10.1016/j.pt.2007.08.011
- Baird JK (2009) Severe and fatal vivax malaria challenges 'benign tertian malaria' dogma. *Ann Trop Paediatr* 29(4):251-2 doi:10.1179/027249309X12547917868808
- Barcus MJ, et al. (2007) Demographic risk factors for severe and fatal vivax and falciparum malaria among hospital admissions in northeastern Indonesian Papua. *Am J Trop Med Hyg* 77(5):984-91

- Barreiros ALBS, David JM, David JP (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29(1):113-123 doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021
- Baskurt OK, Meiselman HJ (2003) Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 29(5):435-50 doi:10.1055/s-2003-44551
- Bassat Q, Alonso PL (2011) Defying malaria: Fathoming severe *Plasmodium vivax* disease. *Nature medicine* 17(1):48-9 doi:10.1038/nm0111-48
- Bastaki M, et al. (2006) Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenetics and genomics* 16(4):279-86 doi:10.1097/01.fpc.0000199498.08725.9c
- Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H (2004) Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol* 34(2):163-89 doi:10.1016/j.ijpara.2003.09.011
- Benhardt HA, Cosgriff-Hernandez EM (2009) The role of mechanical loading in ligament tissue engineering. *Tissue engineering Part B, Reviews* 15(4):467-75 doi:10.1089/ten.TEB.2008.0687
- Bennett V, Stenbuck PJ (1979) Identification and partial purification of ankyrin, the high affinity membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. *The Journal of biological chemistry* 254(7):2533-41
- Bernardino Neto M, et al. (2013) Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. *Biorheology*: 50:305-20 (doi:10.3233/BIR-130641)
- Beutler E, Duparc S, Group GPDW (2007) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development. *Am J Trop Med Hyg* 77(4):779-89
- Bilgin R, Yalcin MS, Yucebilgic G, Koltas IS, Yazar S (2012) Oxidative stress in vivax malaria. *The Korean journal of parasitology* 50(4):375-7 doi:10.3347/kjp.2012.50.4.375
- Bronowicki JP, et al. (2008) Methylenetetrahydrofolate reductase 677 T allele protects against persistent HBV infection in West Africa. *Journal of hepatology* 48(4):532-9 doi:10.1016/j.jhep.2007.11.017
- Campino S, Kwiatkowski D, Dessein A (2006) Mendelian and complex genetics of susceptibility and resistance to parasitic infections. *Seminars in immunology* 18(6):411-22 doi:10.1016/j.smim.2006.07.011
- Carter R, Mendis KN (2002) Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clinical Microbiology Reviews* 15(4):564-+ doi:Doi 10.1128/Cmr.15.4.564-594.2002
- Carvalho BO, et al. (2010) On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *The Journal of infectious diseases* 202(4):638-47 doi:10.1086/654815
- Cavasini CE, et al. (2007) *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101(10):1042-4 doi:10.1016/j.trstmh.2007.04.011
- Chasis JA, Mohandas N (1986) Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *The Journal of cell biology* 103(2):343-50

- Chen J, Giovannucci EL, Hunter DJ (1999) MTHFR polymorphism, methyl-replete diets and the risk of colorectal carcinoma and adenoma among U.S. men and women: an example of gene-environment interactions in colorectal tumorigenesis. *The Journal of nutrition* 129(2S Suppl):560S-564S
- Chevrier C, et al. (2007) Fetal and maternal MTHFR C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. *American journal of medical genetics Part A* 143(3):248-57 doi:10.1002/ajmg.a.31462
- Cockburn IA, et al. (2004) A human complement receptor 1 polymorphism that reduces *Plasmodium falciparum* rosetting confers protection against severe malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(1):272-7 doi:10.1073/pnas.0305306101
- Cohen CM (1983) The Molecular-Organization of the Red-Cell Membrane Skeleton. *Semin Hematol* 20(3):141-158
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb Journal* 17(10):1195-1214 doi:DOI 10.1096/fj.02-0752rev
- Cooper RA (1977) Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med* 297(7):371-7 doi:10.1056/NEJM197708182970707
- Costa FT, et al. (2012) On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol* 42(12):1099-105 doi:10.1016/j.ijpara.2012.08.007
- Cox-Singh J, et al. (2008) *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical Infectious Diseases* 46(2):165-171 doi:Doi 10.1086/524888
- Crawford A, et al. (2012) Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene* 501(2):89-103 doi:10.1016/j.gene.2012.04.011
- Crawley J, Chu C, Mtove G, Nosten F (2010) Malaria in children. *Lancet* 375(9724):1468-81 doi:10.1016/S0140-6736(10)60447-3
- Cunha CB, Cunha BA (2008) Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. *J Vector Borne Dis* 45(3):194-9
- de Freitas MV, et al. (2008) Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 22(1):219-24 doi:10.1016/j.tiv.2007.07.010
- Deharo E, Barkan D, Krugliak M, Golenser J, Ginsburg H (2003) Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. *Biochemical pharmacology* 66(5):809-817 doi:Doi 10.1016/S0006-2952(03)00396-4
- Destro-Bisol G, Vienna A, Battaglia C, Paoli G, Spedini G (1999) Testing a biochemical model of human genetic resistance to *falciparum* malaria by the analysis of variation at protein and microsatellite loci. *Human Biology* 71(3):315-332
- Dey S, et al. (2009) Malarial infection develops mitochondrial pathology and mitochondrial oxidative stress to promote hepatocyte apoptosis. *Free radical biology & medicine* 46(2):271-81 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.032
- Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2010) NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile

- cytoprotector. Archives of biochemistry and biophysics 501(1):116-23 doi:10.1016/j.abb.2010.03.019
- Dockrell HM, Alavi A, Playfair JH (1986) Changes in oxidative burst capacity during murine malaria and the effect of vaccination. Clin Exp Immunol 66(1):37-43
- Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J, White NJ (2000) Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. (vol 16, pg 228, 2000). Parasitology Today 16(7):272-272 doi:Doi 10.1016/S0169-4758(00)01722-1
- Erdem O, et al. (2012) Association of GPX1 polymorphism, GPX activity and prostate cancer risk. Human & experimental toxicology 31(1):24-31 doi:10.1177/0960327111411499
- Erel O, Kocyigit A, Avci S, Aktepe N, Bulut V (1997) Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. Clinical biochemistry 30(8):631-9
- Fabbri C, et al. (2013) Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in Plasmodium vivax malaria patients evolving with cholestatic jaundice. Malaria journal 12(1):315 doi:10.1186/1475-2875-12-315
- Fabre EE, et al. (2008) Gene polymorphisms of oxidative stress enzymes: prediction of elderly renutrition. Am J Clin Nutr 87(5):1504-12
- Ferreira ALA, Matsubara LS (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Revista da Associação Médica Brasileira 43(1):61-68 doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014
- Flekac M, Skrha J, Hilgertova J, Lacinova Z, Jarolimkova M (2008) Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. BMC medical genetics 9:30 doi:10.1186/1471-2350-9-30
- Forman HJ, Zhang H, Rinna A (2009) Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Mol Aspects Med 30(1-2):1-12 doi:10.1016/j.mam.2008.08.006
- Forsberg L, de Faire U, Marklund SL, Andersson PM, Stegmayr B, Morgenstern R (2000) Phenotype determination of a common Pro-Leu polymorphism in human glutathione peroxidase 1. Blood Cells Molecules and Diseases 26(5):423-426 doi:DOI 10.1006/bcmd.2000.0325
- Fowkes FJ, Allen SJ, Allen A, Alpers MP, Weatherall DJ, Day KP (2008) Increased microerythrocyte count in homozygous alpha(+)-thalassaemia contributes to protection against severe malarial anaemia. PLoS Med 5(3):e56 doi:10.1371/journal.pmed.0050056
- Frosst P, et al. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 10(1):111-3 doi:10.1038/ng0595-111
- Genton B, et al. (2008) Plasmodium vivax and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. PLoS Med 5(6):e127 doi:10.1371/journal.pmed.0050127
- Gething PW, et al. (2012) A long neglected world malaria map: Plasmodium vivax endemicity in 2010. PLoS neglected tropical diseases 6(9):e1814 doi:10.1371/journal.pntd.0001814
- Girotti S, Fini F, Ferri E, Budini R, Piazzini S, Cantagalli D (2000) Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay. Talanta 51(4):685-92

- Gong M, Yi QT, Wang WM (2013) Association between NQO1 C609T polymorphism and bladder cancer susceptibility: a systemic review and meta-analysis. *Tumor Biol* 34(5):2551-2556 doi:DOI 10.1007/s13277-013-0799-7
- Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR (2005) Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol* 23:69-99 doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115638
- Goyal MM, Basak A (2010) Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell* 1(10):888-97 doi:10.1007/s13238-010-0113-z
- Goyette P, et al. (1998) Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 9(8):652-6
- Goyette P, et al. (1994) Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. *Nat Genet* 7(4):551
- Gruber J, et al. (2009) Allantoin in human plasma, serum, and nasal-lining fluids as a biomarker of oxidative stress: avoiding artifacts and establishing real in vivo concentrations. *Antioxidants & redox signaling* 11(8):1767-76 doi:10.1089/ARS.2008.2364
- Gudnason V, Stansbie D, Scott J, Bowron A, Nicaud V, Humphries S (1998) C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. EARS group. *Atherosclerosis* 136(2):347-54
- Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML (1999) The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nature structural biology* 6(4):359-65 doi:10.1038/7594
- Guerra CA, et al. (2010) The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS neglected tropical diseases* 4(8):e774 doi:10.1371/journal.pntd.0000774
- Guha MK, S.; Maity, P.; Bandyopadhyay, U. (2006) Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implications of mitochondrial pathway. *FASEB Journal* 20:339-449
- Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE (2007) Malaria: Mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease* 2:217-249 doi:DOI 10.1146/annurev.pathol.2.010506.091913
- Halliwell B, Gutteridge J (2007) Free Radicals in Biology and Medicine,
- Hassan GI, Gregory U, Maryam H (2004) Serum ascorbic acid concentration in patients with acute *Falciparum* malaria infection: possible significance. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 8(5):378-81 doi:/S1413-86702004000500007
- Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: (ed). SK (ed) *Functional metabolism: Regulation and adaptation*. John Wiley & Sons, Hoboken, p 319-368
- Hiragi COM-V, A.L.; Rocha, D.M.S.; Oliveira, S.F.; Hatagima, A.; Klautau-Guimarães, M.N. (2011) Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferases M1 and T1 gene polymorphisms in three Brazilian population

- groups. *Genetics and Molecular Biology* 34(1):11-18
- Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A (1999) Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochemical and biophysical research communications* 261(2):332-9 doi:10.1006/bbrc.1999.1036
- Hong Z, Tian C, Zhang X (2013) GPX1 gene Pro200Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, and cancer risk. *Molecular biology reports* 40(2):1801-12 doi:10.1007/s11033-012-2234-3
- Hsueh YM, et al. (2005) Genetic polymorphisms of oxidative and antioxidant enzymes and arsenic-related hypertension. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 68(17-18):1471-84 doi:10.1080/15287390590967414
- Hu YJ, Diamond AM (2003) Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer research* 63(12):3347-51
- Imai YK, H.; Ishikawa,T.; Tsubota, K.; Yamaguchi, T. (2008) A numerical model of blood flow with malaria-infected red blood cells. *J Biomech* 41(1)
- Izmirli M (2013) A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk. *Molecular biology reports* 40(1):625-37 doi:10.1007/s11033-012-2101-2
- Kai OK, Roberts DJ (2008) The pathophysiology of malarial anaemia: where have all the red cells gone? *BMC Med* 6:24 doi:10.1186/1741-7015-6-24
- Kand'ár R, Záková, P. (2008) Allantoin as a marker of oxidative stress in human erythrocytes. *Clin Chem Lab Med* 46(9):1270-1274 doi:10.1515/CCLM.2008.244.
- Kavishe RA, et al. (2009) Common genotypic polymorphisms in glutathione S-transferases in mild and severe falciparum malaria in Tanzanian children. *Am J Trop Med Hyg* 81(2):363-5
- Kim SJ, Jung HJ, Hyun DH, Park EH, Kim YM, Lim CJ (2010) Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. *Biochimie* 92(8):927-32 doi:10.1016/j.biochi.2010.03.007
- Kluijtmans LA, et al. (1997) Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 96(8):2573-7
- Kochar DK, et al. (2009) Severe Plasmodium vivax malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *Am J Trop Med Hyg* 80(2):194-8
- Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A (2005) Plasmodium vivax malaria. *Emerging infectious diseases* 11(1):132-4 doi:10.3201/eid1101.040519
- Kochar DK, et al. (2007) Post-malaria neurological syndrome--a case of bilateral facial palsy after Plasmodium vivax malaria. *J Vector Borne Dis* 44(3):227-9
- Kwiatkowski DP (2005) How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *American Journal of Human Genetics* 77(2):171-192 doi:Doi 10.1086/432519
- Labios M, et al. (2009) Superoxide dismutase and catalase anti-oxidant activity in leucocyte lysates from hypertensive patients: effects of eprosartan treatment. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 10(1):24-30 doi:10.1177/1470320309104067
- Lacerda MV, et al. (2012) Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malaria journal* 11:12 doi:10.1186/1475-2875-11-12

- Lacerda MV, Mourao MP, Coelho HC, Santos JB (2011) Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 106 Suppl 1:52-63
- Levanon D, et al. (1985) Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. *EMBO J* 4(1):77-84
- Li Y, Wei G, Chen J (2004) Glutathione: a review on biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* 66(3):233-42 doi:10.1007/s00253-004-1751-y
- Lima BLA (2013) Caracterização molecular das enzimas glutatona S-transferase (Genes GSTT1, GSTM1 e GSTP1) em pacientes com malária por *Plasmodium vivax*. Universidade Federal do Amazonas/UFAM
- Lima ES, Abdalla DSP (2001) Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 37(3):293-303
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1):265-275
- Luzzatto L, Notaro R (2001) Malaria - Protecting against bad air. *Science* 293(5529):442-443 doi:DOI 10.1126/science.1063292
- Mamasoula C, et al. (2013) Association Between C677T Polymorphism of Methylene Tetrahydrofolate Reductase and Congenital Heart Disease: Meta-Analysis of 7697 Cases and 13 125 Controls. *Circ-Cardiovasc Gene* 6(4):347-353 doi:Doi 10.1161/Circgenetics.113.000191
- Manjurano A, et al. (2012) Candidate human genetic polymorphisms and severe malaria in a Tanzanian population. *PloS one* 7(10):e47463 doi:10.1371/journal.pone.0047463
- Marchesi VT, Palade GE (1967) Localization of Mg-Na-K-Activated Adenosine Triphosphatase on Red Cell Ghost Membranes. *Journal of Cell Biology* 35(2p1):385-& doi:Doi 10.1083/Jcb.35.2.385
- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M (2008) Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *The FEBS journal* 275(15):3959-70 doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x
- Marin-Menendez A, et al. (2013) Rosetting in *Plasmodium vivax*: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia. *PLoS neglected tropical diseases* 7(4):e2155 doi:10.1371/journal.pntd.0002155
- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry* 32(8):595-603
- Medina TS, et al. (2011) Increased interleukin-10 and interferon-gamma levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malaria journal* 10:264 doi:10.1186/1475-2875-10-264
- Mendes C, et al. (2011) Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax*--molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS neglected tropical diseases* 5(6):e1192 doi:10.1371/journal.pntd.0001192
- Miao L, St Clair DK (2009) Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free radical biology & medicine* 47(4):344-56 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415(6872):673-9 doi:10.1038/415673a

- Min JY, Lim SO, Jung G (2010) Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS letters* 584(11):2427-32 doi:10.1016/j.febslet.2010.04.048
- Ministério da Saúde Aspectos epidemiológicos da malária (2010).
- Miranda-Vilela ALL, G.S. (2013) Role of Methylenetetrahydrofolate Reductase (Mthfr), Glutathione S-transferases (Gsts M1 and T1) and Haptoglobin (Hp) Gene Polymorphisms in Susceptibility to Chronic Myeloid Leukemia (Cml). *J Hematol Thromb Dis* 1(1) doi:http://dx.doi.org/10.4172/2329-8790.1000103
- Mitchison NA (2001) Polymorphism in regulatory gene sequences. *Genome biology* 2(1):COMMENT2001 doi:10.1186/gb-2000-2-1-comment2001
- Mohandas N, Gallagher PG (2008) Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 112(10):3939-48 doi:10.1182/blood-2008-07-161166
- Molineaux L, Storey J, Cohen JE, Thomas A (1980) A Longitudinal-Study of Human Malaria in the West-African Savanna in the Absence of Control Measures - Relationships between Different Plasmodium Species, in Particular P-Falciparum and Plasmodium-Malariae. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29(5):725-737
- Monostori P, Wittmann G, Karg E, Turi S (2009) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877(28):3331-46 doi:10.1016/j.jchromb.2009.06.016
- Mons B (1990) Preferential invasion of malarial merozoites into young red blood cells. *Blood cells* 16(2-3):299-312
- Mueller I, et al. (2009) Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. *The Lancet infectious diseases* 9(9):555-66 doi:10.1016/S1473-3099(09)70177-X
- Niemann S, Broom WJ, Brown RH, Jr. (2007) Analysis of a genetic defect in the TATA box of the SOD1 gene in a patient with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 36(5):704-7 doi:10.1002/mus.20855
- Pabon A, Carmona J, Burgos LC, Blair S (2003) Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *Clinical biochemistry* 36(1):71-8
- Panduru NM, et al. (2010) Association of +35A/C (intron3/exon3) polymorphism in SOD1-gene with diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 51(1):37-41
- Parge HE, Hallewell RA, Tainer JA (1992) Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu,Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(13):6109-13
- Penha-Silva N, et al. (2008) Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. *Bioelectrochemistry* 73(1):23-9 doi:10.1016/j.bioelechem.2008.04.002
- Penha-Silva N, et al. (2007) Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mechanisms of ageing and development* 128(7-8):444-9 doi:10.1016/j.mad.2007.06.007

- Perk K, Frei YF, Herz A (1964) Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. *American journal of veterinary research* 25:1241-8
- Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM (2007) *Vivax* malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* 77(6 Suppl):79-87
- Ravn-Haren G, et al. (2006) Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis* 27(4):820-5 doi:10.1093/carcin/bgi267
- Ross D (2004) Quinone reductases multitasking in the metabolic world. *Drug metabolism reviews* 36(3-4):639-54 doi:10.1081/DMR-200033465
- Ruwende C, et al. (1995) Natural-Selection of Hemizygotes and Heterozygotes for G6pd Deficiency in Africa by Resistance to Severe Malaria. *Nature* 376(6537):246-249 doi:10.1038/376246a0
- Ryan JR, et al. (2006) Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 75(4):575-81
- Sarecka-Hujar B, Kopyta I, Pienczk-Reclawowicz K, Reclawowicz D, Emich-Widera E, Pilarska E (2012) The TT genotype of methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism increases the susceptibility to pediatric ischemic stroke: meta-analysis of the 822 cases and 1,552 controls. *Molecular biology reports* 39(8):7957-63 doi:10.1007/s11033-012-1641-9
- Scheetz E (2008) Erythrocyte biology and its impact on *Plasmodium vivax* invasion Case Western Reserve University
- Seki K, Sumino H, Nara M, Ishiyama N, Nishino M, Murakami M (2006) Relationships between blood rheology and age, body mass index, blood cell count, fibrinogen, and lipids in healthy subjects. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 34(3):401-410
- Sherman IW (1998) Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection., Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y (1996) Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 226(2):561-5 doi:10.1006/bbrc.1996.1394
- Shinkai T, et al. (2006) Genetic association analysis of the glutathione peroxidase (GPX1) gene polymorphism (Pro197Leu) with tardive dyskinesia. *Psychiatry research* 141(2):123-8 doi:10.1016/j.psychres.2004.06.023
- Siddiqi NJ, Pandey VC (1999) Studies on hepatic oxidative stress and antioxidant defence systems during arteether treatment of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infected mice. *Molecular and cellular biochemistry* 196(1-2):169-73
- Siegel D, et al. (2004) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Molecular pharmacology* 65(5):1238-47 doi:10.1124/mol.65.5.1238
- Sohail M, Kumar R, Kaul A, Arif E, Kumar S, Adak T (2010) Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria compared to *P falciparum* and upregulates the GST level during malarial infection. *Free Radical Biology and Medicine* 49(11):1746-1754 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.004

- Sortica VA, et al. (2012) IL1B, IL4R, IL12RB1 and TNF gene polymorphisms are associated with *Plasmodium vivax* malaria in Brazil. *Malaria journal* 11:409 doi:10.1186/1475-2875-11-409
- Starodubtseva MN (2011) Mechanical properties of cells and ageing. *Ageing research reviews* 10(1):16-25 doi:10.1016/j.arr.2009.10.005
- Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW (2000) Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 9(8):849-53
- Storry JR (2004) Review: the function of blood group-specific RBC membrane components. *Immunohematology* 20(4):206-16
- Sturm A, et al. (2006) Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313(5791):1287-90 doi:10.1126/science.1129720
- Sutton A, Houry H, Prip-Buus C, Cepanec C, Pessayre D, Degoul F (2003) The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics* 13(3):145-57 doi:10.1097/01.fpc.0000054067.64000.8f
- Tolun AA, Zhang HY, Il'yasova D, Sztaray J, Young SP, Millington DS (2010) Allantoin in human urine quantified by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry* 402(2):191-193 doi:10.1016/J.Ab.2010.03.033
- Tsuda K, Yoshikawa A, Kimura K, Nishio I (2003) Effects of mild aerobic physical exercise on membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(5-6):382-6
- Ulrich CM, et al. (1999) Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-environment interaction? *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 8(8):659-68
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84 doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT (2007) Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova* 30(5):1323 – 1338
- Velcheva I, Antonova N, Dimitrova V, Dimitrov N, Ivanov I (2006) Plasma lipids and blood viscosity in patients with cerebrovascular disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 35(1-2):155-7
- Wan XS, Devalaraja MN, St Clair DK (1994) Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol* 13(11):1127-36
- Williams AR (1973) The effect of bovine and human serum albumins on the mechanical properties on human erythrocyte membranes. *Biochimica et biophysica acta* 307(1):58-64

- Wisedpanichkij R, Chaicharoenkul W, Mahamad P, Prompradit P, Na-Bangchang K (2010) Polymorphisms of the oxidant enzymes glutathione S-transferase and glutathione reductase and their association with resistance of *Plasmodium falciparum* isolates to antimalarial drugs. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3(9):673-677 doi:Doi 10.1016/S1995-7645(10)60163-0
- World malaria report 2011 (2011) World Health Organization.
- World Health Organization W (2013) World malaria report 2013, vol xiii. World Health Organization, Geneva
- Yanling H, Yuhong Z, Wenwu H, Lei X, Mingwu C (2013) NQO1 C609T polymorphism and esophageal cancer risk: a HuGE review and meta-analysis. *BMC medical genetics* 14:31 doi:10.1186/1471-2350-14-31
- Yazar S, Kilic E, Saraymen R, Ozbilge H (2004) Serum malondialdehyde levels in patients infected with *Plasmodium vivax*. *The West Indian medical journal* 53(3):147-9
- Zhao H, Liang D, Grossman HB, Wu XF (2005) Glutathione peroxidase I gene polymorphism and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer. *Urology* 66(4):769-774 doi:DOI 10.1016/j.urology.2005.04.033
- Zhu H, Li Y (2012) NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and its potential protective role in cardiovascular diseases and related conditions. *Cardiovascular toxicology* 12(1):39-45 doi:10.1007/s12012-011-9136-9

Capítulo 2

Influência da malária por *Plasmodium vivax* nas relações entre estabilidade osmótica da membrana de eritrócitos humanos e variáveis hematológicas e bioquímicas

Capítulo redigido segundo as normas do periódico Parasitology Research, onde o artigo foi aceito para publicação.

Publisher: © Springer

Parasitology Research DOI 10.1007/s00436-013-3717-4

Influence of *Plasmodium vivax* malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables

P. vivax malaria and osmotic stability of human erythrocyte membrane

Rita de Cássia Mascarenhas Netto¹, Camila Fabbri³, Mariana Vaini de Freitas¹, Morun Bernardino Neto¹, Mário Silva Garrote-Filho¹, Marcus Vinícius Guimarães Lacerda², Emerson Silva Lima³, Nilson Penha-Silva^{1*}

¹Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

²Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM, Brazil

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus, AM, Brazil

*Corresponding author: Federal University of Uberlândia, Institute of Genetics and Biochemistry, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil. Tel.: +55 34 3218 2203x23, Fax: +55 34 3218 2203x24

E-mail address: nspenha@ufu.br (Nilson Penha-Silva)

Resumo

Influência da malária por *Plasmodium vivax* nas relações entre a estabilidade osmótica da membrana do eritrócito e variáveis hematológicas e bioquímicas

Esse estudo avaliou a influência da infecção por *Plasmodium vivax* nas relações entre variáveis bioquímicas e hematológicas e a estabilidade de membrana de eritrócitos em uma população da Amazônia brasileira. Um total de 72 pacientes diagnosticados com *P. vivax* foram incluídos no estudo e convidados a retornar 14 dias após o tratamento com cloroquina e primaquina, para reavaliações clínicas e laboratoriais. A estabilidade osmótica da membrana do eritrócito foi analisada por regressão não-linear da dependência da absorbância de hemoglobina, liberada com a hemólise, em função da concentração de NaCl, e foi representada pelo inverso da concentração de sal no ponto médio da curva ($1/H_{50}$) e pela variação da concentração de sal necessária para promoção de lise completa (dX). Métodos de estatística bivariada e multivariada foram utilizados na análise dos resultados. Antes do tratamento da doença, os eritrócitos apresentaram maior estabilidade, provavelmente devido à seleção natural de eritrócitos jovens e mais estáveis. A análise bivariada revelou que $1/H_{50}$ apresentou correlação positiva com RDW, ureia, triglicerídeos e VLDL, mas estava negativamente associado com albumina, HDL e bilirrubina indireta, enquanto dX apresentou correlação negativa com MCHC. Essas associações foram confirmadas por análises de correlação canônica. A regressão linear múltipla do tipo “stepwise” mostrou que albumina, ureia, triglicerídeos e VLDL representam um grupo de variáveis com melhor capacidade de prever a estabilidade do eritrócito. A análise bivariada também mostrou que o índice hematológico RDW foi relacionado a elevados níveis de bilirrubina e diminuição dos níveis de albumina e ureia, em decorrência dos danos hepáticos provocados pela malária.

Palavras-chave: malária, *Plasmodium vivax*, eritrócito, membrana, estabilidade

Abstract

This study evaluated the influence of infection by *Plasmodium vivax* on the relations between hematological and biochemical variables and the osmotic stability of the erythrocyte membrane in a Brazilian Amazon population. A total of 72 patients with *P. vivax* malaria were included in the study and invited to return after 14 days, post treatment with chloroquine and primaquine, for clinical and laboratorial re-evaluations. The osmotic stability of the erythrocyte membrane was analyzed by non-linear regression of the dependency of the absorbance of hemoglobin, released with hemolysis, as a function of the salt concentration, and it was represented by the inverse of the salt concentration at the midpoint of the curve ($1/H_{50}$) and by the variation of salt concentration, which promotes lysis (dX). Bivariate and multivariate methods were used in the analysis of the results. Prior to treatment of the disease, the erythrocytes showed greater stability, probably due to the natural selection of young and also more stable erythrocytes. The bivariate analysis showed that $1/H_{50}$ was positively correlated with red cell distribution width (RDW), urea, triglycerides, and very low-density lipoprotein (VLDL)-cholesterol, but negatively associated with albumin, HDL-cholesterol and indirect bilirubin, while dX was negatively associated with mean corpuscular hemoglobin concentration. These associations were confirmed by canonical correlation analysis. Stepwise multiple linear regression showed that albumin, urea, triglycerides and VLDL-cholesterol are the variables with highest abilities of predicting the erythrocyte stability. The bivariate analysis also showed that the hematological index RDW was related to elevated levels of bilirubin and decreased levels of albumin and urea, associated with liver damage resulting from malaria.

Key words: malaria, *Plasmodium vivax*, erythrocyte, membrane, stability

Introduction

Between infectious and parasitic diseases that affect humans, malaria stands out as an important public health problem in many countries of Asia, Africa and South and Central America. In Brazil, although malaria cases have decreased during the last decade, they still account for 50-60% of cases in the American continent (World Health Organization 2012), with 99.8% of the cases in the Amazon region, which is considered an endemic area. In 2012, the Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado, a reference tertiary care center located in Manaus, recorded 3,182 cases of malaria, of which 95.91% caused by *Plasmodium vivax* (Ministry for Health 2012).

The malaria cycle involves an erythrocytic phase that is responsible for the clinical characteristics of the disease (Haldar et al. 2007), since the parasitism alters the deformability of erythrocytes and impairs oxygen transport (Dondorp et al. 2000). This change in deformability, which is the result of complex interactions between membrane and cytoskeleton, was associated to lipoperoxidation of polyunsaturated fatty acids of the erythrocyte membrane and aggregation of proteins (Akanbi et al. 2010).

The parasitism by *Plasmodium* also affects other properties of the erythrocyte, such as stability of the membrane. In fact, the stability of erythrocyte membrane is greatly influenced by its elasticity (Starodubtseva 2011) and composition (Perk et al. 1964), as well as all the environmental conditions that influence the mechanical and rheological properties of erythrocyte membrane (Williams 1973).

The stability of the erythrocyte membrane can be easily determined in a concentration gradient of salt (osmotic stability) (Cunha et al. 2007; de Arvelos et al. 2013; de Freitas et al. 2010; de Freitas et al. 2008; Jain 1986; Penha-Silva et al. 2007) or chaotropic solutes such as ethanol, urea and sodium dodecyl sulfate (Cunha et al. 2007; de Arvelos et al. 2013; de Freitas et al. 2013, 2010, 2008; Fonseca et al. 2010; Jain 1986; Penha-Silva et al. 2007).

Since malaria disturbs the stability of erythrocyte membrane, the RBC indices and a broad set of blood biochemical parameters, this study aimed to determine the influence of parasitism by *Plasmodium vivax* on the relations between those variables.

Material and Methods

Ethical approval

The study was previously approved by the Ethics Review Board of the Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado (CAAE-0075.0.115.114-11). All participants signed a written consent after being informed about the objectives of the study.

Study design

The inclusion criteria comprised age above 18 years, both genders and no pregnancy. Participants were recruited among patients with clinical complications of malaria that were treated at the Clinical Research Ward of the Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado (TMF-HVD), a reference care center of Manaus (Amazonas, Brazil). During the years of 2011 and 2012, 80 patients with confirmed microscopic diagnosis of *P. vivax* mono-infection were enrolled. Patients included in this study were systematically analyzed for a possible deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) (Brewer et al. 1960). *P. vivax* mono-infection was confirmed by PCR (Snounou et al. 1993), in order to rule out mixed infections with *P. falciparum*. Other common infectious diseases were also ruled out through specific antibody detection (leptospirosis, hepatitis A, B and C, and HIV), blood culture (aerobic infections), and real-time PCR (serotypes 1, 2, 3, and 4 of dengue virus).

After confirmation of the diagnosis (mono-infection by *P. vivax*), patients were immediately treated (first day) with chloroquine (25 mg/kg over 3 days) and primaquine (0.5 mg/kg/day for 7 days). Patients were asked to return to TMF-HVD 14 days after initiation of treatment (14th day) for clinical and laboratorial re-evaluations.

Quantification of parasite density (PD) in thin blood films; automated blood analyses [erythrocytes (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), platelets (Plt), mean platelet volume (MPV)], and serum biochemical analyses [total cholesterol (t-C); HDL-cholesterol (HDL-C); LDL-cholesterol (LDL-C); VLDL-cholesterol (VLDL-C); glucose (Glu); aspartate aminotransferase (AST); alanine aminotransferase (ALT); gamma-glutamyltransferase

(GGT); total, direct, and indirect bilirubin (TB, DB, IB); human serum albumin (HSA); and urea (urea)] were systematically performed on the first and fourteenth day of assessment of patients.

PD was assessed by counting the number of asexual stage parasites per 500 leukocytes and expressed in number of parasites per microliter.

Blood samples

About 15 mL of venous blood were collected by intravenous puncture into evacuated tubes with and without K₃EDTA, after overnight (8-12 h) fasting. Aliquots of plasma, serum and whole blood were stored at -70 °C.

Determination of hematological and biochemical variables

Hemogram was done using an automated system of analysis (Sysmex KX-21N, Sysmex Corporation, Mundelein, IL, USA). Lipid, renal and hepatic profiles were performed in automated analyzer (COBAS Mira Plus™, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and microplate reader (DTX 800 Multimode Detector, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) using commercial kits (Labtest Diagnostica Ltda).

Osmotic stability of erythrocytes (resistance of erythrocytes to hypotonic shock)

Duplicated aliquots of 290 µL of 0-1.0 g.dL⁻¹ NaCl solutions were added to a 96-well microplate. After preincubation for 10 min at 37 °C, addition of 10 µL of blood to each well, the microplate was gently mixed, incubated at 37°C for 20 min, and then centrifuged at 1,300xg for 10 min at room temperature. The erythrocyte lysis was followed by measuring the supernatants' absorbances at 560 nm (A₅₆₀) in a microplate reader.

The dependence of absorbance at 560 nm (A) with the salt concentration was adjusted to a sigmoid regression line (Fig. 2.1) given by the Boltzmann equation:

$$A = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(X - H_{50})/dX}} + A_2 \quad (2.1),$$

where A_1 e A_2 are, respectively, the average values of A_{560} at the first and second plateaus of the sigmoid (maximum and minimum), X is the NaCl concentration, H_{50} is the intermediary point of the transition curve and represents the NaCl concentration

necessary to promote 50% of hemolysis and dX is the concentration range of NaCl in the sigmoidal transition between A_1 and A_2 . A_1 or A_{max} is the maximal stationary value of absorbance and is proportional to the amount of hemoglobin released in the blood sample under the extreme hypotonic conditions of the experiment. A_2 or A_{min} is related to the baseline hemolysis and can more appropriately represent the *in vivo* stability of erythrocytes, since it has not been due to the *in vitro* lysis associated with the handling of the patient's blood. The osmotic stability of erythrocytes was usually expressed by the values of $1/H_{50}$ and dX , since these variables are directly related to the osmotic stability of the erythrocyte membrane (Cunha et al. 2007; de Arvelos et al. 2013; de Freitas et al. 2010, 2008; Penha-Silva et al. 2007).

Statistical analyses of experimental data

The study used bivariate and multivariate statistical analyses to search for the existence of relations between the erythrocyte stability parameters and the hematological and biochemical variables. Sample size was estimated to achieve an 80% power and 5% significance.

Data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Some parameters were normally distributed, but others showed non-normal distribution. Comparison of experimental data between the two periods of this study (first and 14th day) was done using Student's "t" or Mann-Whitney-Wilcoxon test, with $p < 0.05$ showing statistically significant difference.

The existence of bivariate linear correlations between the stability parameters ($1/H_{50}$ and dX) and the hematological and biochemical variables also used the significance level of 0.05.

The two different periods of the study (first and 14th day) were also analyzed by comparing the intersection and slope of the regression lines obtained for the dependence of $1/H_{50}$ with different hematological and biochemical variables. This comparison was done using the "t" Student test, with $p < 0.05$ indicating the existence of a statistically significant difference.

The multivariate analyses were performed by canonical correlations (CC) and stepwise multiple linear regression (stepwise MLR).

CC is a multivariate statistical technique, which can be understood as a logical extension of the MLR. Just as the MLR correlates a set of independent variables with a single dependent variable, CC correlates sets of multiple dependent variables and multiple independent variables. In situations where the researcher pursues a correlation of groups of variables, the technique of CC is the most appropriate and powerful multivariate technique (Hair et al. 2009).

In the MLR analyses, $1/H_{50}$ and dX were considered the dependent variable and the hematological and biochemical parameters constituted the groups of independent variables. In this kind of analysis, the partial regression coefficient measures the strength of the relation between the dependent variable ($1/H_{50}$ ou dX) and a single independent variable of the group (hematological or biochemical), while the determination coefficient (R^2) measures the proportion of variance of the dependent variable (around its mean) that is explained by the whole set of independent variables. The basis of *stepwise* MLR is the construction of a linear combination that maximizes the correlation between a dependent variable and a set of independent variables, by assigning weights to each of the dependent variables (Hair et al. 2009).

The *a priori* calculation of n for this analysis considered a power of 0.80 and a magnitude of the effect of 0.15, with $p < 0.05$ indicating statistical significance. All analyses were done with help of BioEstat 5.0 (Mamirauá™, Belém, PA, Brazil), Origin 9.0 (MicroCal, Northampton, MA, USA) and GENES (Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil).

Results and discussion

After ruling out deficiency of G6PDH, mixed plasmodial infections and other comorbidities, a total of 72 patients with *Plasmodium vivax* malaria were included in the study (first day), but only 35 of these patients returned after 14 days for clinical and laboratorial re-evaluations (14th day).

Table 2.1 presents the baseline characteristics (first day) of patients ($n = 72$) with *Plasmodium vivax* malaria that constituted the population of this study.

Table 2.2 shows the descriptive statistics of the stability parameters and hematological and biochemical variables before (first day) and after (14th day) the

treatment of malaria. Although there has been normal distribution of most variables, some variables presented non-normal distribution.

Regarding the hematological variables, between the two study periods, there were statistical differences in Plt count, MPV and MCH. The median value in Plt was $86 \times 10^3/\mu\text{L}$ before treatment (first day), and increased to $272 \times 10^3/\mu\text{L}$ after the treatment (14th day) (Table 2.2). Thrombocytopenia (Plt $<150 \times 10^3/\mu\text{L}$) is a classic feature of malaria (Alecricim 2000; Ghosh and Shetty 2008; Lacerda et al. 2011), including in the mono-infection with *Plasmodium vivax* (Coelho et al. 2013; Kochar et al. 2010; Kochar et al. 2012; Tanwar et al. 2012).

The statistically significant increase observed in MCH between the first and 14th day should be related to the tendency to normalization of hematological changes promoted by parasitism, despite patients with malaria by *P. vivax* or *P. falciparum* have impaired erythropoiesis (Srichaikul et al. 1969; Wickramasinghe and Abdalla 2000) for at least two weeks after treatment (Wickramasinghe et al. 1989), probably due to an increase in the phagocytic activity of macrophages in the bone marrow and/or release of cytotoxic compounds (Wickramasinghe and Abdalla 2000).

Regarding the biochemical variables, between the two periods of the study there were statistically significant differences between the two periods of the study for the biochemical variables t-C, VLDL-C, LDL-C, HDL-C, TB, DB, IB, urea and HSA (Table 2.2).

Transient changes in the plasma levels of cholesterol and triglycerides have been observed by many authors in different acute infections (Faucher et al. 2002; Gallin et al. 1969). Hypertriglyceridemia, hypocholesterolemia, and reduced LDL-C and HDL-C were observed in uncomplicated and complicated malaria (Gallin et al. 1969; Gavino et al. 1981; Krishna et al. 2009; Nilsson-Ehle and Nilsson-Ehle 1990; Parola et al. 2004). The same pattern of lipid abnormalities was also observed on the first day of this study (Table 2.2), with values of TG, t-C, LDL-C and HDL-C significantly different from those observed on 14th day.

As commonly occurs in malaria, on the first day of this study, the serum levels of total, indirect and direct bilirubin were high (Table 2.2). The occurrence of hyperbilirubinemia is usually explained by exacerbation of hemolysis, when predominates indirect bilirubin, or hepatic cholestasis, when direct bilirubin

predominates. Regarding the erythrocyte stability parameters ($1/H_{50}$ and dX), there was a statistically significant decrease in $1/H_{50}$ after treatment.

As the erythrocyte membrane stability was associated with a different set of hematological and biochemical variables, the parasitism by *Plasmodium* seemed an interesting model for better understanding the set of variables that influence the stability of the erythrocyte membrane. The existence of larger variance in many of the parameters (Table 2.2) favors the correlation analyses.

Table 2.3 shows the matrix of Spearman correlations between stability parameters and hematological and biochemical variables. Within the limits of statistical significance considered in this study ($p < 0.05$), the variable of stability, $1/H_{50}$ was positively correlated with the values of peripheral parasitemia, dX , RDW, urea and VLDL-C, but negatively associated with the values of HSA, IB, HDL-C and $A_{\min}$. The stability variables dX was negatively correlated with $A_{\min}$ and MCHC.

Thus, significant direct correlations between $1/H_{50}$ or dX and parasite density observed on the first day of the study means that the stability of erythrocytes increases with increased parasite density (Table 2.3). But it decreased after treatment (14th day), since there was a significant fall in $1/H_{50}$ compared to first day of the study (Table 2.2).

The origin of this increase in the membrane stability must be related to the broad set of changes that parasitism causes not only in erythrocytes but also in the patient's bloodstream. Certainly, some of these changes should help to decrease the stability of the membrane, while others must have an opposite effect. The stabilization shall be the net result of antagonistic contributions of different factors.

These factors should comprehend the biochemical and hematological variables that showed significant correlation with the stability parameters $1/H_{50}$ and dX (Table 2.3). It is important to note, however, that the existence of a bivariate correlation does not necessarily mean a cause-effect relationship and even when the cause-effect relationship is present, it cannot predict which of the factors is cause and which is effect.

The stability parameter $1/H_{50}$ was positively correlated with RDW, urea, TG, and VLDL-C, but negatively associated with HSA, HDL-C and IB, while the stability parameter dX was negatively associated with MCHC (Table 2.3). These associations appear to constitute relations of cause and effect, since there were significant differences in the

values of all these hematological and biochemical variables between the two study periods (first and 14th day) (Table 2.2).

Further evidence of the existence of causal relations between RBC stability and those variables comes from the comparison of the linear regression lines of the stability parameter $1/H_{50}$ in relation to some studied variables (those for which the results showed normal distribution and regression lines were statistically significant) between the two different periods of the study (first and 14th day) (Table 2.4). The lines of $1/H_{50}$ in relation to dX, HSA and VLDL-C had intercept and slope coefficients which were different after treatment (14th day) as compared to before treatment (first day). The lines of $1/H_{50}$ relation to the variables RDW, urea, HDL-C and IB had equal slope coefficients and different intercepts between the two periods of the study.

In order to deepen the understanding of the existing interrelations, CC analyses were performed between the groups of dependent variables (dX and $1/H_{50}$) and groups of independent variables (Table 2.5) that have had significant correlations with $1/H_{50}$ (group 1) and dX (group 2). Both groups of independent variables presented significant correlations with the first canonical pair (Table 2.6 and Table 2.7). In all canonical correlations, stability parameters have had canonical loadings (CL) that were well differentiated, depending on the relationship with the set of variables in the group.

The variables in group 1 showed significant correlations with the parameter $1/H_{50}$ ($p=0.0115$). The stability parameters showed high values of canonical loadings, but the contribution of $1/H_{50}$ has more impact on the correlation between its group (dependent variable) and the independent variables in group 1, with a canonical loading of 0.9952 (Table 2.6). The variables PD, RDW, urea and VLDL-C showed positive relationships with the first canonical pair. On the other hand, the variables HSA, HDL-C and IB were negatively correlated with $1/H_{50}$ and dX. The independent variable that had the greatest impact on the canonical correlation was HSA (CL = -0.6119), followed by PD (CL = 0.5534) and blood levels of VLDL-C (CL = 0.4723), always with the preservation of the directions found in the bivariate correlations between each of the stability variables and each of these independent variables (Table 2.3).

Regarding the variables of group 2 (Table 2.7), the major influences came from the hematological index MCHC and the stability parameter A_{min} , which showed significant negative correlations with the first canonical pair.

Although the CC analysis can deal with metric and non-metric variables, it allow only detect the existence of associations between groups of variables, but not the establishment of relations of cause and effect, which would be possible by path analysis.

The stepwise MLR allows verifying the contribution of the independent variables in explaining the variance of the dependent variable ($1/H_{50}$ and dX). The results of this analysis (Table 2.8) were consistent with those of the CC analyses and showed that the variables with highest abilities of predicting RBC stability in patients with *P. vivax* malaria were HSA ($R^2 = 12.05\%$), urea ($R^2 = 6.26\%$), VLDL-C ($R^2 = 4.95\%$), and IB ($R^2 = 2.64\%$), in this sequence. The set of independent variables in this group accounted for approximately 27% of the predictive ability of $1/H_{50}$.

HSA binds cations (such as Na^+ and Ca^{2+}), free fatty acids, IB, hormones and many drugs (Peters 1996), and possibly play a key role as antioxidant (Bruschi et al. 2013). The decreased levels of HSA in infected patients (first day) (Table 2.2) can be explained by inflammation associated with the initial installation of the parasite in the liver, where that protein is produced (Attwood 2011; Ogbodo et al. 2010). Since albumin increases the osmotic stability of erythrocytes (Katchalsky et al. 1960; Williams 1973), the negative relations observed between $1/H_{50}$ and HSA in the bivariate (Table 2.3), canonical correlations (Table 2.6) and stepwise MLR (Table 2.8) analyses may seem paradoxical. The explanation for this paradox may be in the fact that the decrease in HSA is a consequence of parasitism and that the increased stability is occurs through independent type of mechanism.

This other type of mechanism must include the selection of cells that are more stable at the expense of those less stable, due to the proper propagation of parasite from infected to uninfected cells. This process involves the association of infected and uninfected erythrocytes by means of various serum proteins like albumin itself, fibrinogen, IgG and IgM, with the formation of structures called rosettes (Dondorp et al. 2000; Luginbuhl et al. 2007). When infected by the parasite, young erythrocytes (reticulocytes) are preserved, while the older ones are lysed. As young erythrocytes are osmotically more resistant (Marks and Johnson 1958), this would explain the positive correlation observed between the stability of the erythrocyte (dX and $1/H_{50}$) and parasite density.

In addition to this mechanism, based on the selection, other mechanisms of stabilization of erythrocytes may be associated with parasitism, once that preservation of *P. vivax* depends on the preservation of parasitized cell. It is important to note that this increase in erythrocyte stability does not mean a physiological benefit to the infected individual, but only to *P. vivax*.

Indeed, the infection by *P. falciparum* was associated with structural changes in the membrane of the host cell, such as reduced amount of net negative charges and increased resistance to lysis induced by unsaturated fatty acids (Sabolovic et al. 1994). Furthermore, the accessibility and distribution of intra-erythrocytic antigens of *Plasmodium*-infected erythrocytes are different from those of the uninfected cells (Wiser et al. 1993).

Digital analysis of changes in erythrocytes infected with *P. vivax* showed significant changes in shape descriptors such as area, perimeter and form factor, with increased parasitemia (Edison et al. 2011), what must change their deformability and flow properties (Manjunatha and Singh 2000). The membrane of the parasitized erythrocyte also presents electron-dense protrusions (Aikawa 1988; Bracho et al. 2006; Haldar et al. 2001) and an increase in viscosity that favors adhesion to endothelial cells of small vessels in various organs and cells, not only in infections caused by *P. falciparum* (Winograd et al. 2001) as well as in those caused by *P. vivax* (Carvalho et al. 2010; Costa et al. 2012, 2011; Marin-Menendez et al. 2013).

$1/H_{50}$ presented a significant and positive correlation with urea. Although urea is a well known chaotrope and promote protein unfolding and exposure of hydrophobic groups in the water (Fonseca et al. 2006; Patel et al. 2010a; Timasheff 1993), it also stabilizes the lipid bilayer of the biological membranes (Feng et al. 2002; Koynova et al. 1997), particularly against osmotic stress (Costa-Balogh et al. 2006).

$1/H_{50}$ also presented a significant and positive correlation with TG and VLDL-C (Table 3). Since levels of TG showed a significant negative correlation with the levels of HSA, it is possible that the positive relationship between $1/H_{50}$ and TG is associated with decreased lipolysis of VLDL-TG by lipoprotein lipase. The existence of strong and significant correlation between $1/H_{50}$ and VLDL-C was also shown in the CC analysis and stepwise MLR. Once the erythrocyte membrane is an important target for cholesterol

from non-high-density lipoproteins (Cooper 1977) the increase in the stability of the erythrocyte membrane should also have been influenced by its cholesterol content.

The erythrocyte infected by *P. vivax* undergoes not only biochemical, but also morphological changes that affect its physicochemical properties and functions.

RDW was the hematological variable which stood out in the correlation analyses with $1/H_{50}$, with a pattern of positive correlation in both the bivariate (Table 2.3) and in CC analyses (Table 2.6). In fact, osmotic stability of erythrocytes is strongly associated with RDW (Bernardino Neto 2011; Bernardino Neto et al. 2013). The RDW, which represents the percentage change in the mean corpuscular volume of the erythrocytes, was shown to be elevated in patients with malaria (Bunyaratvej et al. 1993; Koltas et al. 2007; Lathia and Joshi 2004). Although the evaluation of RDW does not have the ability of diagnosing malaria in relation to other non-malarial febrile illnesses, it is possible that RDW has in malaria the predictive ability that was reported for this variable in the risk of death from cardiovascular diseases (Nishizaki et al. 2012; Patel et al. 2010b; Tziakas et al. 2012) and diabetes (Malandrino et al. 2012).

RDW was also suggested as a potential prognostic index for liver disease, since it was positively correlated with serum bilirubin and negatively correlated with serum albumin (Hu et al. 2013). In the present study, RDW was also positively correlated with total and direct bilirubin and negatively correlated with human serum albumin and urea (Table 2.3). Indeed, the elevation in direct bilirubin observed in the first day (Table 2.2), along with the significant positive correlation observed between direct bilirubin and γ -glutamyl transferase (Table 2.3), is consistent with hepatic cholestasis and liver damage.

MCHC was another hematological variable that was associated with erythrocyte stability. The stability parameter dX showed a significant negative association with MCHC in the bivariate analysis (Table 2.3) and also in the CC analysis, where MCHC was the second variable that most contributed in the correlation (Table 2.7). Such a contribution of MCHC is consistent, because as MCHC values increase also increases the difference in the concentration gradient between the internal and external media of the cell, which causes increased water absorption and reduced stability.

The variable $A_{\min}$, which is also a parameter of stability, showed a significant negative association with dX in bivariate and multivariate analysis. $A_{\min}$ was the variable

with the highest canonical loading among the variables in group 2 ([Table 2.7](#)) and the variable that most contributed to dX in the stepwise MLR.

In summary, there is an increase in the stability of the erythrocyte membrane in patients suffering from malaria, which probably involves natural selection of young and more stable erythrocytes, but also the factors that determine the values of the hematological indices MCHC and RDW, as well as the serum levels of triglycerides, VLDL-C and urea. Moreover, the hematological index RDW showed to be related to the elevated levels of bilirubin and decreased levels of albumin and urea, associated with liver damage resulting from malaria.

Conflict of interest

None of the authors have financial or non-financial competing interests, as well as any other kind of interest conflict, in the work presented in this manuscript.

Acknowledgments

We would like to thank FAPEMIG (CDS-APQ-01862-09, CDS-APQ-02025-10 and PPM-00485-12), CAPES (PE-PNPD AUX 2718/2011) and CNPq (307705/2012-9), for the financial supports that have enable the development of this study, and also to Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado, where the participants of the study were recruited.

References

- Aikawa M (1988) Morphological changes in erythrocytes induced by malarial parasites. *Biol Cell* 64(2):173-81
- Akanbi OM, Odaibo AB, Ademowo OG (2010) Effect of antimalarial drugs and malaria infection on oxidative stress in pregnant women. *Afr J Reprod Health* 14(3):209-12
- Alecrim MGC (2000) Clinical aspects, resistance and parasitary polymorphism of *Plasmodium vivax* malaria in Manaus. Brasília University
- Attwood D (2011) Malaria in South Sudan 2: clinical features and diagnosis. *Southern Sudan Med J* 4(1):10-12
- Bernardino Neto M (2011) Analysis of correlations between stability of erythrocyte membrane, serum lipids and hematologic variables. Federal University of Uberlandia
- Bernardino Neto M, et al. (2013) Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. *Biorheology* 50:305-20 (doi:10.3233/BIR-130641)
- Beutler E, Duparc S, Group GPDW (2007) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 77(4):779-89
- Bracho C, et al. (2006) Caveolins and flotillin-2 are present in the blood stages of *Plasmodium vivax*. *Parasitol Res* 99(2):153-9 doi:10.1007/s00436-006-0139-6
- Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS (1960) Methaemoglobin reduction test: a new, simple, in vitro test for identifying primaquine-sensitivity. *Bull World Health Organ* 22:633-40
- Bruschi M, Candiano G, Santucci L, Ghiggeri GM (2013) Oxidized albumin. The long way of a protein of uncertain function. *Biochim Biophys Acta* doi:10.1016/j.bbagen.2013.04.017
- Bunyaratvej A, Butthep P, Bunyaratvej P (1993) Cytometric analysis of blood cells from malaria-infected patients and in vitro infected blood. *Cytometry* 14(1):81-5 doi:10.1002/cyto.990140114
- Carvalho BO, et al. (2010) On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis* 202(4):638-47 doi:10.1086/654815
- Coelho HC, et al. (2013) Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria is related to platelets phagocytosis. *PLoS One* 8(5):e63410 doi:10.1371/journal.pone.0063410
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb Journal* 17(10):1195-1214 doi:DOI 10.1096/fj.02-0752rev
- Cooper RA (1977) Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med* 297(7):371-7 doi:10.1056/NEJM197708182970707
- Costa-Balogh FO, Wennerstrom H, Wadso L, Sparr E (2006) How small polar molecules protect membrane systems against osmotic stress: the urea-water-phospholipid system. *J Phys Chem B* 110(47):23845-52 doi:10.1021/jp0632440
- Costa FT, et al. (2012) On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. *International journal for parasitology* 42(12):1099-105 doi:10.1016/j.ijpara.2012.08.007

- Costa FT, et al. (2011) On cytoadhesion of *Plasmodium vivax*: raison d'etre? Mem Inst Oswaldo Cruz 106 Suppl 1:79-84
- Cunha CC, Arvelos LR, Costa JO, Penha-Silva N (2007) Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. J Bioenerg Biomembr 39(4):341-7 doi:10.1007/s10863-007-9092-z
- de Arvelos LR, et al. (2013) Bivariate and multivariate analyses of the influence of blood variables of patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass on the stability of erythrocyte membrane against the chaotropic action of ethanol. J Membr Biol 246(3):231-42 doi:10.1007/s00232-013-9524-0
- de Freitas MV, de Oliveira MR, dos Santos DF, de Cassia Mascarenhas Netto R, Fenelon SB, Penha-Silva N (2010) Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. J Membr Biol 233(1-3):127-34 doi:10.1007/s00232-010-9232-y
- de Freitas MV, et al. (2013) Influence of age on the concentration of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. Hematology: (In press) doi:10.1179/1607845413Y.0000000145
- de Freitas MV, et al. (2008) Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. Toxicol In Vitro 22(1):219-24 doi:10.1016/j.tiv.2007.07.010
- Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J, White NJ (2000) Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. Parasitol Today 16(6):228-32
- Edison M, Jeeva JB, Singh M (2011) Digital analysis of changes by *Plasmodium vivax* malaria in erythrocytes. Indian J Exp Biol 49(1):11-5
- Faucher JF, Ngou-Milama E, Missinou MA, Ngomo R, Kombila M, Kremsner PG (2002) The impact of malaria on common lipid parameters. Parasitol Res 88(12):1040-3 doi:10.1007/s00436-002-0712-6
- Feng Y, Yu ZW, Quinn PJ (2002) Effect of urea, dimethylurea, and tetramethylurea on the phase behavior of dioleoylphosphatidylethanolamine. Chem Phys Lipids 114(2):149-57
- Fonseca LC, Arvelos LR, Netto RC, Lins AB, Garrote-Filho MS, Penha-Silva N (2010) Influence of the albumin concentration and temperature on the lysis of human erythrocytes by sodium dodecyl sulfate. J Bioenerg Biomembr 42(5):413-8 doi:10.1007/s10863-010-9310-y
- Fonseca LC, Correa NCR, Garrote MD, da Cunha CC, Penha-Silva N (2006) Effects of the solvent composition on the stability of proteins in aqueous solutions. Quimica Nova 29(3):543-548
- Gallin JI, Kaye D, O'Leary WM (1969) Serum lipids in infection. N Engl J Med 281(20):1081-6 doi:10.1056/NEJM196911132812001
- Gavino VC, Miller JS, Ikharebha SO, Milo GE, Cornwall DG (1981) Effects of polyunsaturated fatty acids and antioxidants on lipid peroxidation in tissue cultures. J Lipid Res 22:763-769
- Ghosh K, Shetty S (2008) Blood coagulation in *falciparum* malaria--a review. Parasitol Res 102(4):571-6 doi:10.1007/s00436-007-0832-0
- Hair JFJ, Black WC, Babin BJ, Anderson RE (2009) Multivariate data analysis, 7th Edition edn. Prentice Hall

- Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE (2007) Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annu Rev Pathol* 2:217-49 doi:10.1146/annurev.pathol.2.010506.091913
- Haldar K, Samuel BU, Mohandas N, Harrison T, Hiller NL (2001) Transport mechanisms in *Plasmodium*-infected erythrocytes: lipid rafts and a tubovesicular network. *Int J Parasitol* 31(12):1393-401
- Hu Z, et al. (2013) Red blood cell distribution width is a potential prognostic index for liver disease. *Clin Chem Lab Med*:1-6 doi:10.1515/cclm-2012-0704
- Jain NC (1986) Hematology techniques. In: Jain NC (ed) *Shalm's Veterinary Hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia
- Katchalsky A, Kedem O, Klibansky C, Devries A (1960) *Flow Properties of Blood and Other Biological Systems*. Pergamon Press, Inc., Elmsford, N. Y.
- Kochar DK, et al. (2010) Thrombocytopenia in *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and mixed infection malaria: a study from Bikaner (Northwestern India). *Platelets* 21(8):623-7 doi:10.3109/09537104.2010.505308
- Kochar DK, et al. (2012) Platelet count and parasite density: independent variable in *Plasmodium vivax* malaria. *J Vector Borne Dis* 49(3):191-2
- Koltas IS, Demirhindi H, Hazar S, Ozcan K (2007) Supportive presumptive diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria. Thrombocytopenia and red cell distribution width. *Saudi Med J* 28(4):535-9
- Koynova R, Brankov J, Tenchov B (1997) Modulation of lipid phase behavior by kosmotropic and chaotropic solutes: experiment and thermodynamic theory. *Eur Biophys J* 25(4):261-74 doi:10.1007/s002490050038
- Krishna AP, Chandrika, Kumar S, Acharya M, Patil SL (2009) Variation in common lipid parameters in malaria infected patients. *Indian J Physiol Pharmacol* 53(3):271-4
- Lacerda MV, Mourao MP, Coelho HC, Santos JB (2011) Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 Suppl 1:52-63
- Lathia TB, Joshi R (2004) Can hematological parameters discriminate malaria from nonmalarious acute febrile illness in the tropics? *Indian J Med Sci* 58(6):239-44
- Luginbuhl A, Nikolic M, Beck HP, Wahlgren M, Lutz HU (2007) Complement factor D, albumin, and immunoglobulin G anti-band 3 protein antibodies mimic serum in promoting rosetting of malaria-infected red blood cells. *Infect Immun* 75(4):1771-7 doi:10.1128/IAI.01514-06
- Malandrino N, Wu WC, Taveira TH, Whitlatch HB, Smith RJ (2012) Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. *Diabetologia* 55(1):226-35 doi:10.1007/s00125-011-2331-1
- Manjunatha M, Singh M (2000) Digital analysis of induced erythrocyte shape changes in hypercholesterolemia under in vitro conditions. *Curr Sci* 79
- Marin-Menendez A, et al. (2013) Rosetting in *Plasmodium vivax*: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia. *PLoS Negl Trop Dis* 7(4):e2155 doi:10.1371/journal.pntd.0002155
- Marks PA, Johnson AB (1958) Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: a basis for separating young and old erythrocytes. *J Clin Invest* 37(11):1542-8 doi:10.1172/JCI103746
- Ministry for Health (2012) Epidemiological surveillance information system for malaria. http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp

- Nilsson-Ehle I, Nilsson-Ehle P (1990) Changes in plasma lipoproteins in acute malaria. *J Intern Med* 227(3):151-5
- Nishizaki Y, et al. (2012) Red blood cell distribution width as an effective tool for detecting fatal heart failure in super-elderly patients. *Intern Med* 51(17):2271-6
- Ogbodo SO, Okeke A, Obu HA, Shu EN, Chukwurah E (2010) Nutritional status of parasitemic children from malaria endemic rural communities in eastern Nigeria. *Curr Pediatr Res* 14(2):131-135
- Parola P, Gazin P, Patella F, Badiaga S, Delmont J, Brouqui P (2004) Hypertriglyceridemia as an indicator of the severity of *falciparum* malaria in returned travelers: a clinical retrospective study. *Parasitol Res* 92(6):464-6 doi:10.1007/s00436-003-1012-5
- Patel H, Raval G, Nazari M, Heerklotz H (2010a) Effects of glycerol and urea on micellization, membrane partitioning and solubilization by a non-ionic surfactant. *Biophys Chem* 150(1-3):119-28 doi:10.1016/j.bpc.2010.03.015
- Patel KV, et al. (2010b) Red cell distribution width and mortality in older adults: a meta-analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65(3):258-65 doi:10.1093/gerona/glp163
- Penha-Silva N, et al. (2007) Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev* 128(7-8):444-9 doi:10.1016/j.mad.2007.06.007
- Perk K, Frei YF, Herz A (1964) Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. *Am J Vet Res* 25:1241-8
- Peters TJ (1996) All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Academic Press, New York
- Sabolovic D, Bouanga JC, Danis M, Mazier D, Gentilini M (1994) Alterations of uninfected red blood cells in malaria. *Parasitol Res* 80(1):70-3
- Snounou G, et al. (1993) High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 61:315-320
- Srichaikul T, Wasanasomsithi M, Poshychinda V, Panikbutr N, Rabieb T (1969) Ferrokinetic studies and erythropoiesis in malaria. *Arch Intern Med* 124(5):623-8
- Starodubtseva MN (2011) Mechanical properties of cells and ageing. *Ageing Res Rev* 10(1):16-25 doi:10.1016/j.arr.2009.10.005
- Tanwar GS, et al. (2012) Thrombocytopenia in childhood malaria with special reference to *P. vivax* mono-infection: A study from Bikaner (Northwestern India). *Platelets* 23(3):211-6 doi:10.3109/09537104.2011.607520
- Timasheff SN (1993) The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22:67-97 doi:10.1146/annurev.bb.22.060193.000435
- Tziakas D, Chalikias G, Grapsa A, Gioka T, Tentis I, Konstantinides S (2012) Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane. *Clin Hemorheol Microcirc* 51(4):243-54 doi:10.3233/CH-2012-1530
- Wickramasinghe SN, Abdalla SH (2000) Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13(2):277-99 doi:10.1053/beha.1999.0072
- Wickramasinghe SN, Looareesuwan S, Nagachinta B, White NJ (1989) Dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in *Plasmodium vivax* malaria. *Br J Haematol* 72(1):91-9

- Williams AR (1973) The effect of bovine and human serum albumins on the mechanical properties on human erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 307(1):58-64
- Winograd E, Robles WM, Caldas ML, Cortes GT (2001) Cytoadherence of the malaria-infected erythrocyte membrane to C32 melanoma cells after merozoites are released from parasitized infected cells. *Parasitol Res* 87(4):264-8
- Wiser MF, Faur LV, Lanners HN, Kelly M, Wilson RB (1993) Accessibility and distribution of intraerythrocytic antigens of *Plasmodium*-infected erythrocytes following mild glutaraldehyde fixation and detergent extraction. *Parasitol Res* 79(7):579-86
- World Health Organization (2012) World malaria report 2012. World Health Organization, Geneva

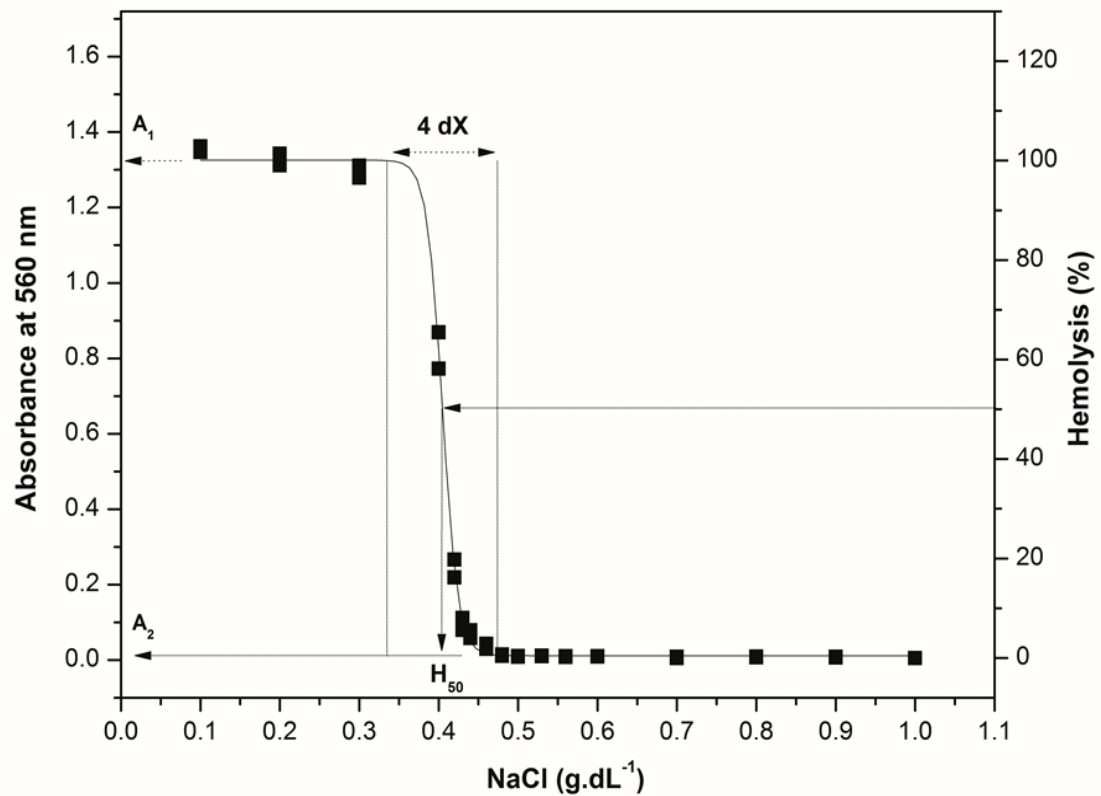


Figure 2.1. Sigmoidal fitting of a typical curve of hypotonic hemolysis. H50 is the concentration of NaCl capable of promoting 50% hemolysis. dX represents the change in NaCl concentration responsible for the full lysis of the erythrocytes population. A1 and A2 represent the maximum and minimum average values of absorbance at 560 nm, respectively.

Table 2.1. Baseline characteristics (1st day) of patients (n = 72) with *Plasmodium vivax* malaria

Characteristics	<i>Plasmodium vivax</i> infection
Age (years) ^a	38.5 (26.25)
Male sex (%)	67
First malarial infection (%)	32
Time of disease (days) ^a	6.0 (4.0)
Parasite density (peripheral parasitemia / μ L) ^a	694.5 (3336.11)
Clinical features	Fever Jaundice Severe anemia Abdominal pain Hematuria Acute respiratory distress syndrome Vomiting

^a Parameters expressed as median and interquartile range (IQR)

Table 2.2. Hematological, biochemical, and stability parameters of patients with *Plasmodium vivax* malaria on the day of the diagnosis (first day) and after treatment (14th day)

Variables	Median (IQR)		<i>p</i>	Min		Max	
	1st day	14th day		1st	14th	1st	14th
	n=72	n=35		day n=72	day n=35	day n=72	day n=35
1/ <i>H</i> ₅₀ ^a	2.53 (0.26)	2.38 (0.113)	<0.0001 ^b	2.17	2.12	3.03	2.56
d <i>X</i> ^a	0.016 (0.014)	0.015 (0.004)	0.191 ^b	0.003	0.008	0.04	0.032
A _{min} (ΔOD)	0.010 (0.009)	0.010 (0.010)	0.766	0.001	0.0015	0.04	0.03
A _{max} (ΔOD)	1.32 (0.347)	1.29 (0.366)	0.78	0.68	0.96	1.94	1.76
Hb (g/dL) ^a	12.5 (3.03)	12.6 (2.65)	0.741	7.1	7.6	16.2	16.2
Ht (%) ^a	39.4 (8.03)	39.3 (6.35)	0.797	24.9	24.3	51.3	52.3
RBC (x10 ⁶ /μL) ^a	4.43 (0.86)	4.3 (0.6)	0.518	2.3	2.62	5.89	5.94
MCV (fL) ^a	88.1 (5.2)	89.6 (5.15)	0.067 ^c	73.2	33.1	110.2	100.4
RDW (%) ^a	14.3 (1.78)	14.1 (2.05)	0.940	11.9	12.9	18.5	19.7
MCH (pg) ^a	27.7 (2.05)	28.5 (2.85)	0.033 ^b	22.6	22.9	31.4	33.1
MCHC (g/dL) ^a	31.4 (2.9)	31.8 (2)	0.678	27.9	21.1	35.3	35.5
Plt (x10 ³ /μL) ^a	86 (66.8)	272 (78.5)	<0.0001 ^b	14.	39	389	558
Glu (mg/dL)	85.5 (23)	80 (19)	0.101	55	61	322	161.84
HSA (g/dL) ^a	3.7 (0.7)	4 (0.65)	0.003 ^b	2.2	3.3	5.4	4.9
Urea (mg/dL) ^a	32.1 (12.1)	26 (10.7)	0.006 ^b	10.5	14.8	69	56.3
TG (mg/dL) ^a	161 (96)	113 (87)	0.007 ^b	57	50	585	354
VLDL-C (mg/dL) ^a	31.4 (17.3)	22.6 (17.3)	0.011 ^b	11.4	10	90	70.8
LDL-C (mg/dL)	34.6 (28.9)	54 (44.4)	<0.0001 ^b	2.4	17	148.2	149.6
HDL-C (mg/dL) ^a	45.5 (35.7)	69 (21.3)	<0.0001 ^b	20	24.9	130	116
t-C (mg/dL) ^a	113 (34)	157 (38.5)	<0.0001 ^b	64.5	105	247	231
TB (μmol/L)	29.68 (23.7)	18.1 (11.2)	<0.0001 ^b	6.84	5.98	297.61	85.52
IB (μmol/L) ^a	19.2 (13.2)	10.3 (5.48)	<0.0001 ^b	2.22	2.91	87.92	27.71
DB (μmol/L)	11.5 (14.7)	4.62 (7.52)	0.0002 ^b	1.03	1.03	256	39.34
AST (U/L)	37.5 (28.5)	28 (20.21)	0.057 ^c	6	9	226	169
ALT (U/L) ^a	27.5 (30.5)	27 (22)	0.2298	6	10	256	99
GGT (U/L)	36.5 (59.5)	25 (20.5)	0.0736 ^c	8	9	325.9	99

^a Normally distributed parameters (Kolmogorov-Smirnov test)

^b Statistically significant differences (*p*<0.05)

^c Borderline differences (0.05<*p*<0.10)

Table 2.3. Spearman correlation matrix of the studied variables for a sample of 72 patients with *Plasmodium vivax* malaria on the 1st day of the study

	PD	1/H ₅₀	dX	A _{min}	A _{max}	Hb	Ht	RBC	MCV	RDW	MCH	MCHC	Plt	Glu	HSA	Urea	TG	VLDL-C	LDL-C	HDL-C	t-C	TB	IB	DB	AST	ALT	GGT
PD	1																										
1/H ₅₀	0.230	1																									
dX	0.242 ^a	0.571 ^b	1																								
A _{min}	-0.077 ^a	-0.175	-0.560 ^b	1																							
A _{max}	0.159	0.019	-0.026	0.081	1																						
Hb	0.265 ^b	-0.043	-0.030	0.012	0.581 ^b	1																					
Ht	0.289 ^b	-0.035	0.020	-0.015	0.529 ^b	0.950 ^b	1																				
RBC	0.256 ^b	-0.095	-0.014	-0.060	0.496 ^b	0.930 ^b	0.952 ^b	1																			
MCV	0.136	0.171	0.180	0.097	0.068	0.068	0.154	-0.111	1																		
RDW	-0.045	0.254 ^b	0.191	-0.029	-0.50 ^b	-0.580 ^b	-0.47 ^b	-0.530 ^b	0.178	1																	
MCH	0.112	0.061	-0.091	0.086	0.248 ^b	0.245 ^b	0.077	-0.061	0.537 ^b	-0.229 ^a	1																
MCHC	-0.021	-0.057	-0.316 ^b	0.110	0.166	0.240 ^b	-0.024	0.033	-0.24 ^b	-0.438 ^b	0.599 ^b	1															
Plt	0.010	-0.030	0.215 ^a	-0.291 ^b	0.038	0.013	0.048	0.038	0.033	0.045	-0.071	-0.219 ^a	1														
Glu	-0.006	0.115	-0.109	0.289 ^b	0.151	0.108	0.063	0.051	0.036	-0.208 ^a	0.131	0.212 ^a	-0.135	1													
HSA	0.022	-0.321 ^b	-0.139	-0.146	0.483 ^b	0.473 ^b	0.423 ^b	0.494 ^b	-0.176	-0.620 ^b	0.082	0.168	0.353 ^b	0.155	1												
Urea	0.100	0.250 ^b	0.109	0.109	0.325 ^b	0.349 ^b	0.233 ^b	0.214 ^a	0.071	-0.247 ^b	0.324 ^b	0.337 ^b	-0.066	0.158	0.188	1											
TG	-0.175	0.245 ^b	0.117	0.074	-0.186	-0.254 ^b	-0.262 ^b	-0.312 ^b	0.097	0.235 ^b	0.078	0.059	-0.141	0.304 ^b	-0.174	0.100	1										
VLDL-C	-0.158	0.312 ^b	0.131	0.056	-0.254 ^b	-0.362 ^b	-0.357 ^b	-0.394 ^b	0.063	0.295 ^b	0.025	0.026	-0.196 ^a	0.287 ^b	-0.263 ^b	0.122	0.929 ^b	1									
LDL-C	-0.078	-0.005	-0.004	0.079	-0.169	-0.321 ^b	-0.329 ^b	-0.257 ^b	-0.150	0.134	-0.219 ^a	-0.133	-0.090	0.086	-0.269 ^b	-0.070	-0.007	0.051	1								
HDL-C	0.039	-0.292 ^b	-0.143	0.001	0.215 ^a	0.355 ^b	0.320 ^b	0.319 ^b	0.072	-0.191	0.135	0.073	0.089	-0.001	0.251 ^b	-0.023	-0.370 ^b	-0.474 ^b	-0.312 ^b	1							
t-C	-0.018	-0.039	-0.046	0.129	-0.065	-0.065	-0.088	-0.098	0.031	0.066	-0.044	-0.045	0.031	0.231 ^a	-0.006	0.052	0.333 ^b	0.246 ^b	0.404 ^b	0.323 ^b	1						
TB	0.165	-0.065	-0.091	0.106	-0.178	-0.126	-0.158	-0.137	-0.024	0.269 ^b	-0.042	-0.041	-0.035	-0.169	-0.305 ^b	0.049	-0.129	-0.143	0.138	-0.025	0.021	1					
IB	0.122	-0.253 ^b	-0.129	0.008 ^a	-0.006	0.019	-0.036	-0.017	-0.039	0.088	0.058	0.072	0.183	-0.110	0.063	0.032	-0.210 ^a	-0.278 ^b	-0.127	0.156	-0.135	0.751 ^b	1				
DB	0.192	0.174	-0.051	0.197	-0.272 ^b	-0.133	-0.130	-0.121	0.013	0.268 ^b	-0.103	-0.055	-0.218 ^a	-0.077	-0.515 ^b	0.103	-0.045	-0.009	0.258 ^b	-0.107	0.140	0.771 ^b	0.268 ^b	1			
AST	-0.010	-0.048	-0.174	0.097	-0.037	-0.140	-0.173	-0.139	-0.118	0.107	-0.066	0.010	-0.282 ^b	-0.105	-0.289 ^b	-0.212 ^a	0.124	0.173	0.222 ^a	-0.200 ^a	0.091	0.119	-0.105	0.089	1		
ALT	0.045	0.035	-0.036	-0.050	0.072	0.047	0.017	0.066	-0.193	0.014	-0.064	0.053	-0.187	-0.167	-0.100	0.020	0.098	0.164	0.112	-0.181	0.045	-0.009	-0.205 ^a	-0.021	0.746 ^b	1	
GGT	0.151	0.154	0.150	0.082	-0.159	-0.074	-0.066	-0.089	0.102	0.148	0.004	-0.120	-0.304 ^b	-0.129	-0.487 ^b	-0.055	0.268 ^b	0.249 ^b	0.119	-0.212 ^a	0.102	0.229 ^a	-0.082	0.326 ^b	0.507 ^b	0.456 ^b	1

^aBorderline correlations (0.05< p<0.10)

^bStatistically significant correlations (p<0.05)

Table 2.4. Comparison between the first and the fourteenth day of the study in relation to the regression lines of $1/H_{50}$ versus some variables

Parameters	Day	Pearson's correlation coefficient	Intercept (<i>a</i>)		Slope (<i>b</i>)	
dX	1 st	0.6559	2.336	<0.0001 ^a	13.537	0.002 ^a
	14 th	-0.1481	2.417		-2.7951	
RDW	1 st	0.2456	2.048	<0.0001 ^a	0.0365	0.175
	14 th	0.1052	2.287		0.0058	
HSA	1 st	-0.3471	3.035	<0.0001 ^a	-0.1230	0.032 ^a
	14 th	0.1576	2.234		0.0346	
Urea	1 st	0.2632	2.422	<0.0001 ^a	0.0047	0.208
	14 th	-0.0039	2.375		0	
VLDL-C	1 st	0.2632	2.464	<0.0001 ^a	0.0033	0.055
	14 th	-0.1968	2.412		-0.0014	
HDL-C	1 st	-0.2314	2.664	<0.0001 ^a	-0.0019	0.129
	14 th	0.1772	2.303		0.0010	
IB	1 st	-0.2343	2.653	<0.0001 ^a	-0.0036	0.979
	14 th	-0.1939	2.414		-0.0038	

LR equation: $Y' = a + bX$

^a Statistically significant differences between the two different moments of the study ($p < 0.05$)

Table 2.5. Organized groups of variables for use in the multivariate statistical analyses (canonical correlations)

Group	Variables	Characteristics
Group 1	PD, RDW, HSA, Urea, All variables whose simple correlations were VLDL-C, HDL-C, IB significant or borderline with $1/H_{50}$	
Group 2	$A_{\min}$, MCHC, Plt	All variables whose simple correlations were significant or borderline with dX

RDW red cell distribution width, VLDL-C very low-density lipoprotein, IB indirect bilirubin, PD parasite density (peripheral parasitemia per microliter), MCHC mean corpuscular hemoglobin concentration, HSA human serum albumin, HDL-C high-density lipoprotein, Plt platelets

Table 2.6. Canonical loadings and canonical pairs determined between stability parameters ($1/H_{50}$ and dX) and variables of group 1

		Canonical pairs	
		First	Second
R		0.5789	0.1606
Significance		0.0115*	0.9430
Dependent variables			
$1/H_{50}$		0.9952	0.0978
dX		0.5778	0.8161
Independent variables			
PD		0.5534	0.4404
RDW		0.4251	0.0378
HSA		-0.6119	0.3565
Urea		0.4333	0.1042
VLDL-C		0.4723	-0.5693
HDL-C		-0.4062	0.1623
IB		-0.4021	-0.1613

PD parasite density (peripheral parasitemia per microliter), *RDW* red cell distribution width, *HSA* human serum albumin, *VLDL-C* very low density lipoprotein, *HDL-C* high density lipoprotein, *IB* indirect bilirubin

* $p < 0.05$

Table 2.7. Canonical loadings and canonical pairs determined between stability parameters ($1/H_{50}$ and dX) and variables of group 2

		Canonical pairs	
		First	Second
R		0.6586	0.1172
Significance		<0.0001*	0.6247
Dependent variables			
$1/H_{50}$		0.2538	0.9672
dX		0.9389	0.3440
Independent variables			
A_{min}		-0.8988	-0.2143
MCHC		-0.5294	0.2811
Plt		0.4044	-0.8649

MCHC mean corpuscular hemoglobin concentration, Plt platelets

* $p < 0.05$

Table 2.8. Analyses of multiple stepwise linear regression for $1/H_{50}$ and dX in relation to groups of dependent variables

Dependent variable		<i>R</i>	<i>R</i> ² (%)	<i>R</i> ² variation (%)	<i>MSE</i>	<i>p</i>
$1/H_{50}$	HSA	0.3471	12.05	12.05	0.0368	0.0032*
	HSA, VLDL-C	0.4122	16.99	4.95	0.0352	0.002*
	HSA, VLDL-C, UREA	0.4822	23.25	6.26	0.0330	0.0007*
	HSA, VLDL-C, UREA, RDW	0.488	23.81	0.56	0.0333	0.0013*
	HSA, VLDL-C, UREA, RDW, IB	0.5143	26.46	2.64	0.0326	0.0012*
	HSA, VLDL-C, UREA, RDW, IB, HDL-C	0.5205	27.09	0.63	0.0328	0.0020*
dX	A _{min}	0.5156	26.59	26.59	0.0001	<0.0001*
	A _{min} , MCHC	0.5521	30.48	3.90	0.0001	<0.0001*
	A _{min} , MCHC, AST	0.5963	35.56	5.07	0.0001	<0.0001*

MSE mean square error

**p*<0.05

Capítulo 3

Efeitos de variantes genéticas de enzimas do sistema redox em pacientes com malária *vivax*

Capítulo redigido para posterior submissão.

Effects of genetic variants of redox enzymes in *vivax* malaria patients

Rita de Cássia Mascarenhas Netto¹, Camila Fabbri⁴, Morun Bernardino Neto¹, José Pereira de Moura Neto³, Marcus Vinicius Guimarães Lacerda², Emerson Silva Lima³, Nilson Penha-Silva^{1*}

¹Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

²Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM, Brazil

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus, AM, Brazil

⁴Centro Universitário do Norte, UNINORTE, Manaus, Brazil

*Corresponding author: Federal University of Uberlândia, Institute of Genetics and Biochemistry, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil. Tel.: +55 34 3218 2203x23, Fax: +55 34 3218 2203x24

E-mail address: nspenha@ufu.br (Nilson Penha-Silva)

Resumo

Efeitos de variantes genéticas de enzimas redox em pacientes com malária *vivax*

Estudos na região amazônica brasileira, área endêmica para *Plasmodium vivax*, têm se concentrado na caracterização dos mecanismos envolvidos na patogênese da infecção por essa espécie de *Plasmodium*. Intensa resposta inflamatória e estresse oxidativo têm sido envolvidos nas complicações clínicas da doença. Entretanto, o papel exato do estresse oxidativo na doença malárica é incerto, mas a combinação de fatores do ambiente, do hospedeiro e do parasita está envolvida na susceptibilidade e severidade dessa doença. O presente estudo teve o objetivo de estudar a influência de polimorfismos genéticos das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD1 A35C e SOD2 Ala16Val), glutathione peroxidase (GPx1 Pro197Leu), N5,N10-metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR C677T) e NADPH-quinona oxidoreductase (NQO1 C609T) na resposta do estresse oxidativo em pacientes infectados com *P. vivax*. Avaliação do perfil dos marcadores redox foi realizada em uma amostra de 73 pacientes infectados por *P. vivax* no dia 1 e dia 14 após tratamento com antimaláricos, e em 30 indivíduos não infectados. A genotipagem dos sítios polimórficos para as enzimas foi realizada pelo método da PCR/RFLP. Associações entre genótipo e marcadores oxidativos foram analisados pelo método do qui-quadrado com determinação dos riscos relativos e intervalos de confiança, ajustados para características básicas como gênero. A distribuição da frequência dos genótipos para MTHFR C677T, GPx1 Pro197Leu e SOD2 Ala16Val é certamente devida à pressão seletiva que a malária exerce nas populações em áreas endêmicas. Pacientes infectados apresentaram diminuição nas atividades enzimáticas de Cat e GPx e da capacidade antioxidante total (TAC), bem como níveis elevados de malondialdeído (MDA) e alantoina. Com relação aos polimorfismos, portadores do alelo T para a MTHFR C677T apresentaram níveis menores de AST, ALT e GGT, resultante de um possível efeito protetor contra o comprometimento hepático grave. Pacientes com genótipo selvagem para a GPx1 Pro197Leu mostraram menor risco de desenvolver trombocitopenia. A SOD2 Ala16Val foi associada à diminuição dos níveis de MDA (lipoperoxidação reduzida) e menor atividade enzimática de Cat e GPx. A

atividade de GPx apresentou uma correlação inversa com o RDW, índice hematológico considerado potencial marcador de condições de estresse oxidativo e eritropoiético.

Palavras-chave: malária *vivax*, estresse oxidativo, antioxidante, polimorfismos genéticos

Abstract

Studies in the Brazilian Amazon region, an endemic area for *Plasmodium vivax*, has been featured in the characterization of the mechanisms involved in the pathogenesis of infection by this species of *Plasmodium*. Intense inflammatory response and oxidative stress have been involved in the clinical complications of the disease. However, the exact role of oxidative stress responses in malaria disease is unclear, but certainly the combination of environmental, host and parasite factors are involved in susceptibility and severity of this disease. The present study aimed to evaluate the influence of genetic polymorphisms of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD1 A35C and SOD2 Ala16Val), glutathione peroxidase (GPx1 Pro197Leu), N₅,N₁₀-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) and NADPH-quinone oxidoreductase (NQO1 C609T) on the oxidative stress responses in patients infected with *P. vivax*. An evaluation of redox markers profile was performed in 73 *P. vivax* infected patients at day 1 and day 14 after antimalarial therapy and 30 non-infected individuals. The genotyping of the polymorphic sites for enzymes were performed by PCR/RFLP methods. Associations between genotype and oxidative markers were analyzed by chi-square statistic with determination of relative risk and confidence intervals, adjusted for baseline factors that include gender. The distribution patterns of MTHFR C677T, GPx1 Pro197Leu and SOD2 Ala16Val genotypes is certainly due to the selective pressure that malaria has on human populations from endemic areas. *P. vivax* patients showed decrease in catalase (Cat) and GPx activities and total antioxidant capacity (TAC), as well as elevated levels of malondialdehyde (MDA) and allantoin. Regarding the polymorphisms, T allele carriers for MTHFR C677T SNP presented lower levels of AST, ALT and GGT, resulting from a possible protective effect against severe liver injury. Wild-type patients for GPx1 Pro197Leu SNP showed lower risk to develop thrombocytopenia. The SOD2 Ala16Val SNP was associated with decreased levels of MDA (reduced lipoperoxidation) and lower Cat and GPx activities. The GPx activity presented an inverse correlation with RDW, a hematological index that is a potential marker of erythropoietic and oxidative stress conditions.

Key words: *vivax* malaria, oxidative stress, antioxidant, genetic polymorphisms

Introduction

According to the World Health Organization, 104 countries in the world are at risk of malaria infection. *Plasmodium vivax* has the widest geographical distribution of the human malarias, with an estimated 2.49 billion individuals living at risk of infection in 2010 (Gething et al. 2012). In 2011, *P. vivax* malaria represented 87% of cases in Brazil (World Health Organization 2013).

Oxidative stress is an important clinical and pathobiochemical factor as well as an effective therapeutic principle in malaria (Becker et al. 2004). Several authors have discussed the implications of free radicals through oxidative stress in the physiopathogenesis of malaria and oxidative mechanisms were observed to be dominant when compared with antioxidant system in patients with *vivax* malaria. This involvement may be related to the pathogenic mechanisms triggered by the parasite, as well as free radical production and antioxidant defenses in host cells to combat the infection (Andrade et al. 2010b; Araujo et al. 2008; Becker et al. 2004; Bilgin et al. 2012; Fabbri et al. 2013; Narsaria et al. 2012; Pabon et al. 2003).

Oxidative stress results from increased concentrations of reactive oxygen species and/or a reduction in antioxidants. Human body has a complex antioxidant defense system, which includes the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (Cat), as well as other enzymes, such as N₅,N₁₀-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), which stimulates glutathione synthesis, and NADPH-quinone oxidoreductase (NQO1), which catalyze detoxification of electrophiles. Inter-individual variation in antioxidant capacity caused by different genetic profile could potentially influence patient's susceptibility to oxidative damage in many diseases.

SOD (EC 1.15.1.1), which converts superoxide (O₂[•]) to hydrogen peroxide (H₂O₂), has three known isoforms: SOD1 (CuZnSOD), which is present in red blood cells (RBCs), and SOD2 (MnSOD) and SOD3 (ECSOD), which are found, respectively, in mitochondrial and extracellular media (Kinnula et al. 2004; Whitin et al. 2002; Zelko et al. 2002). GPx is responsible for the conversion of H₂O₂ and other organic peroxides, to water and oxygen (Forsberg et al. 2000). Among the five known isoforms of GPx (EC 1.11.1.9), two are present in human blood: GPx1, in RBC (Ursini et al. 1985), and GPx3, in plasma

(Avisar et al. 1994). Catalase (EC 1.11.1.6), which converts H_2O_2 to water and oxygen, is present in all aerobic cells, with the highest levels in the liver, kidney and RBC (Deisseroth and Dounce 1970). MTHFR (EC 1.5.1.20) catalyses the irreversible conversion of N_5,N_{10} -methylenetetrahydrofolate to 5-methylenetetrahydrofolate, which serve as a methyl donors for homocysteine (Hcy) remethylation to methionine. Hcy is the precursor for the biosynthesis of the amino acid cysteine (Cys), which is present in the structure of glutathione, peptide that acts in many intracellular redox reactions (Ueland et al. 2001). NQO1 (EC 1.699.2) avoids the participation of quinone electrophiles in reactions that could lead to either sulphydryl depletion or one-electron reductions and generation of semiquinones radicals as a result of redox cycling (Deller et al. 2008).

A contribution of host genetic polymorphism to the pathogenesis of uncomplicated or severe *vivax* malaria has been proposed. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of antioxidant enzymes may contribute to diseases associated with oxidative stress. These SNPs related with SOD enzyme include: SOD1 + 35A/C (intron3, exon3) (rs 2234694), which results in a SOD1-AA-genotype with the higher activity when compared with other genotypes (Flekac et al. 2008; Shimoda-Matsubayashi et al. 1996); and SOD2 SNP rs4880 Ala16Val genotype, present in exon 2, which substitutes a C<T at position 2734 and changes the amino acid at position 16 from alanine (Ala) to valine (Val) (Rosenblum et al. 1996). The Val allele of this SNP results in reduced expression and production of an unstable mRNA, which affects the import of SOD2 into the mitochondrion (Sutton et al. 2005). A C>T mutation at nucleotide 593 in GPx1 (rs 1050450) substitutes proline (Pro) for leucine (Leu) at the position 197 of the enzyme (Forsberg et al. 2000). The thermolabile variant (rs 1801133) of the enzyme MTHFR, which is related to the common C<T change at nucleotide 677 of the MTHFR gene, results in substitution of alanine for valine at position 222 of the protein (Frosst et al. 1995). The SNP identified in NQO1 with a C<T change at position 609 of the NQO1 cDNA results in the substitution of proline for a serine residue at position 187 of the protein (rs 1800566). The mutant NQO1 allele is very unstable and the resultant enzyme activity is decreased and even undetectable in tissue samples (Dinkova-Kostova and Talalay 2010).

Since the pathogenesis of malaria involves changes in the oxidative status of erythrocytes, it is very relevant to know if the most common SNPs that are manifested in the redox enzymes of host have influence in the response of the organism to *vivax* malaria. Thus, we set out to systematically identify genetic variation in redox enzymes of patients with *vivax* malaria, with the aim to identify the influences of genetic polymorphism in SOD, GPx, NQO1 and MTHFR on the clinical manifestations of this disease.

Materials and methods

Ethical approval

This study was previously approved (CAAE-0075.0.115.114-11) by the Ethics Review Board of the 'Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado' (FMT-HVD), a reference tertiary care center for infectious diseases located in Manaus (Brazilian Amazon).

Study subjects and design

Patients who were attended at FMT-HVD with signs and symptoms of malaria and diagnosed with *vivax* malaria by optical microscopy in thick smears were invited to participate in this study. Each volunteer who agreed to participate signed a consent form. The researcher staff completed a standard questionnaire regarding epidemiological and clinical characteristics of the patients. After confirmation of the *Plasmodium vivax* mono-infection by PCR and ruling out other diseases like leptospirosis, hepatitis A, B and C, HIV, aerobic infections and dengue, 73 patients were enrolled in the study. Blood samples were collected before the beginning of the antimalarial treatment with chloroquine (25 mg/kg over 3 days) and primaquine (0.5 mg/kg/day for 7 days), according to the National Antimalarial Guidelines. Patients were asked to return to FMT-HVD 14 days after initiation of treatment (14th day) for clinical and laboratorial re-evaluations. Non-infected volunteers without past history of malaria served as controls.

Quantification of parasite density (PD) in thin blood films; automated blood analyses [erythrocytes (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht) , mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), platelets (Plt), mean platelet volume (MPV)], and serum biochemical analyses [total cholesterol (t-C) and fractions (HDL-C, LDL-C, VLDL-C, triglycerides (TG)); glucose (Glu); aspartate aminotransferase (AST); alanine aminotransferase (ALT); gamma-glutamyltransferase (GGT); bilirubins (TB, DB, IB); human serum albumin (HSA); urea (urea); uric acid (UA); creatinine (CRN)] were systematically performed on the first and fourteenth day of assessment of patients.

The oxidative stress markers [enzymes activities (catalase, Cat; superoxide dismutase, SOD; glutathione peroxidase, GPx); malondialdehyde, MDA; allantoin, AL; total antioxidant capacity, TAC; and total oxidant status, TOS] were also measured in these two moments.

Parasite density was assessed by counting the number of asexual stage parasites per 500 leukocytes and expressed in number of parasites per μL .

Blood sampling

Venous blood samples, collected in evacuated tubes (Vacutainer™, BD, Juiz de Fora, MG, Brazil) with (K_3EDTA) and without anticoagulants, were centrifuged ($2,300 \times g$; 10 min) for separation of serum and plasma and stored for analysis of biochemical and antioxidant markers. Aliquots of whole blood were used to isolate genomic DNA and perform hematological analysis. RBCs, after centrifugation ($2300 \times g$; 10 min), were washed with 0.1 M PBS buffer pH 7.4, lysed with distilled water and stored at -70°C for latter determination of SOD, GPx and catalase activities.

Determination of hematological and biochemical variables

Hemogram was done using an automated system of analysis (Sysmex KX-21N, Sysmex Corporation, Mundelein, IL, USA). Lipid, renal and hepatic profiles were performed in automated analyzer (COBAS Mira Plus™, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and microplate reader (DTX 800 Multimode Detector, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) using commercial kits (Labtest Diagnostica Ltda).

Oxidative stress markers

Commercially available kits (Randox Laboratories, Crumlin, Ireland) were used to measure RBC GPx and RBC SOD activities on a microplate reader DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). RBC Cat activity was determined from the spectrophotometric absorbance values produced during the oxidation of hydrogen peroxide (H₂O₂) and consequent oxygen production, as described by Aebi (1984). The oxidant activity marker allantoin was measured by using the colorimetric method described by Young et al. (1944). The total antioxidant capacity (TAC) assay was based on the suppression of the absorbance (630 nm) of the radical cations of ABTS (2,2'-azinobis[3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate]) by antioxidants. The process was calibrated with Trolox™ (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) and the TAC was expressed by millimolar Trolox equivalent per liter (mmol Trolox Eq/L) (Erel 2004). The plasma levels of malondialdehyde (MDA) were measured using a UV-VIS spectrophotometer (PG Instruments, Beijing, China) with basis in its reaction with thiobarbituric acid (TBA) (Esterbauer and Cheeseman 1990). Total oxidant status (TOS) was measured following methodology described by Erel (2005). The color intensity, which can be measured spectrophotometrically (560 nm), is related to the total amount of oxidant molecules present in the sample. The assay was calibrated with H₂O₂ and the results were expressed in terms of micromolar hydrogen peroxide equivalent per liter (μmol H₂O₂ Eq/L). The percent ratio TOS to TAC was accepted as the OSI, an indicator of the degree of oxidative stress. To perform the calculation, we changed the resulting unit of TAC, millimoles of Trolox per litre, to micromoles per litre, and the OSI value was calculated from the formula: $OSI = [TOS (\mu\text{mol/L}) / TAC (\mu\text{mol of Trolox/L}) \times 100]$.

Determination of genes polymorphisms

Genomic DNA was extracted from whole blood using Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), following the manufacturer's instructions and stored at -20 °C.

The genotyping of the polymorphic sites for five enzymes (SOD1, SOD2, GPx1, NQO1 and MTHFR) were performed by PCR amplification and restriction endonuclease digestion of the PCR products (PCR/restriction fragment-length polymorphism, PCR/RFLP).

The generated PCR products were digested by specific restriction enzymes (New England BioLabs Inc., Tozer Road, Beverly, MA, USA). The PCR primers, products sizes and PCR/RFLP protocol for detection of each polymorphism are listed in [Table 3.1](#).

The digested DNA materials were then analyzed by 12% polyacrylamide gel electrophoresis, followed by staining with ethidium bromide. The electrophoretic patterns of the digested material (PCR-RFLP) were recorded digitally using a gel documentation system (Gel-Doc 2000; Bio-Rad).

Statistical analysis

The observed genotype frequencies among malaria patients and controls were tested for Hardy–Weinberg equilibrium using the χ^2 method. Statistical analysis were performed using SPSS software package (revision 19.0 SPSS Inc., Chicago, IL), EPLinfo 6.04 (CDC, Atlanta, Georgia, USA) and GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Statistical significance was assumed at the $p < 0.05$ level. Baseline characteristics were summarized as means and standard deviations or proportions of selected variables. Laboratory clinical data are expressed as median and interquartile range [IQR]. Data values between controls and malaria patients were compared by ANOVA, with Tukey's post-hoc test for normally distributed data, and Kruskal-Wallis, with Dunn's post-hoc test for non-normally distributed data.

Differences in the distribution of genotypes and alleles between malaria patients and controls were tested using the chi-square statistic. Allele frequencies were estimated by gene counting methods. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. Correlations and relative risks with their confidence intervals (CI) were calculated and used to identify associations for SOD1 A35C, SOD2 Ala16Val, GPx1 Pro197Leu, MTHFR C677T and NQO1 C609T polymorphisms with several independent factors.

The comparison of genetic profiles in each polymorphism used ANOVA, with Bonferroni's post-hoc test, for normally distributed data, and Kruskal-Wallis test for non-normally distributed data.

Results and Discussion

P. vivax positive (n=73) patients attending the FMT-HVD with confirmed diagnosis for monoinfections were enrolled in this study, which aimed to evaluate the implications of genetic polymorphisms in disease pathogenesis. Patients with comorbidities, mixed plasmodium infections and virus infection were excluded from this study. The mean age of the study volunteers was 40.18 ± 15.6 years, 67.1% (49) was male and 32% (23) had their first malaria infection. At day 14 (D14), after treatment, 35 patients returned to the HVD-FMT and were submitted to the same clinical and laboratorial analysis. Their clinical features in the first day included jaundice, 16.4% (12); Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), 4.1% (3); abdominal pain, 5.5% (4); hematuria, 2.7% (2); and vomiting, 4.1% (3). A total of 30 non-infected volunteers were analyzed too.

Oxidative stress markers

Free radicals are constantly produced as a consequence of endogenous reactions. High level of exogenous or endogenous free radicals can lead to damage of major components of cellular structure, including nucleic acids, proteins, amino acids, lipids, and carbohydrates. This can disturb various cellular functions, including the membrane functions, metabolism and even gene expression, causing a large number of many pathological conditions.

Table 3.2 represents hematological, biochemical and oxidative stress parameters of study group (*vivax* malaria patients and non-infected individuals). The antioxidant markers Cat, GPx and TAC were lower in infected patients when compared to the healthy volunteers at the first moment of the study, but after treatment (D14) there was no significant difference between infected and non-infected participants.

Table 3.3 shows the hematological and biochemical parameters that correlated significantly with at least one of the oxidative stress biomarkers in a bivariate analysis. The hematological indices Hb, Ht and RBC presented significant and positive correlations with GPx, SOD and TAC, and a negative correlation with the oxidant marker allantoin. The GPx activity also presented a significant correlation with RDW. Regarding the biochemical parameters, the HSA levels presented direct correlations with activities of GPx and SOD. The oxidant markers MDA and allantoin presented positive correlations

with the serum levels of total and direct bilirubin and also with the serum levels of the hepatic enzyme biomarkers AST and ALT.

In malaria infection, during the intra-erythrocytic phase of its life cycle, the parasitism was associated to increase, in some situations, and decrease, in other situations, of the levels of some antioxidant defenses in host erythrocytes (Bilgin et al. 2012; Erel et al. 1997; Fabbri et al. 2013; Kulkarni et al. 2003; Pabon et al. 2003). Higher levels of antioxidants, which may be involved in the parasite clearance, have been reported in patients with uncomplicated malaria (Pabon et al. 2003). In our study, significantly lower values in the RBC Cat activity were observed in malaria patients at D1 when compared both with D14 ($p = 0.0013$) and with the non-infected volunteers ($p = 0.0002$) (Table 3.2). This Cat decrease may be related with the protein consumption, since the parasite itself utilizes erythrocyte proteins for its structural and metabolic requirements.

Indeed, a significant decrease was also observed in the SOD activity in the infected patients, although this decrease had been maintained at D14, after treatment with chloroquine and primaquine (Table 3.2). The action mechanism of these drugs involves the production of free radicals (Zhang et al. 2010) or inhibition of this antioxidant activity (Grellier et al. 2010). The pro-oxidant action of those antimalarial drugs can be responsible for maintaining the low levels of SOD after treatment, differently from what happened with Cat and GPx (Table 3.2). Indeed, Farombi et al. (2003) reported SOD activities decreased by 26% and 43% in malaria patients before and after treatment, respectively, with chloroquine. However, many others factors that can affect an enzyme activity, such as gender and SNPs (Bastaki et al. 2006), should be considered.

The intracellular thiol reductant that directly scavenges reactive species and serves as a GPx cofactor, GSH, contributes to the reduction of H_2O_2 , lipid peroxides and other oxidizing species, thus protecting red cells against oxidative damage (Dumaswala et al. 2001; Gizi et al. 2011; Schafer and Buettner 2001). It was reported that GSH is depleted in *vivax* malaria (Bhattacharya and Swarup-Mitra 1987), and the GPx activity is decreased (Bilgin et al. 2012). In our study, the GPx activity didn't change with treatment, but it was significantly lower when compared with the non-infected volunteers ($p = 0.0002$) (Table 3.2). Furthermore, this antioxidant marker showed significant and positive correlations with Hb, Ht and RBC (Table 3.3), hematological

variables that can be used to characterize anemia. This same pattern of dependence (with Hb, Ht and RBC) was also observed for SOD and TAC (Table 3.3). Since the anemia caused by *P. vivax* malaria has multifactorial causes that are not totally known (Douglas et al. 2012), this finding suggests that the anemia caused by malaria involves decrease in the RBC antioxidant activities. Indeed, it has been showed that deficiency of antioxidant enzymes induces elevation of oxidative stress in erythrocytes and causes anemia (Yoshihito 2012). The same profile was observed with the redox parameter, TAC (total antioxidant capacity) (Table 3.3).

The values of RDW presented a negative correlation with GPx ($r = -0.275$; $p = 0.019$) (Table 3.3). Oxidative stress and inflammation have been suggested to be a potential underlying biological mechanism for increased RDW (Patel et al. 2013b; Patel et al. 2010; Semba et al. 2010). RDW is elevated under conditions of erythropoietic stress and have been reported in adults with impaired renal function (Lippi et al. 2008), inflammatory bowel disease (Cakal et al. 2009), poor pulmonary function (Grant et al. 2003) and malaria conditions (Bunyaratvej et al. 1993; Koltas et al. 2007; Lathia and Joshi 2004), which are associated with low antioxidant status.

Among the biomarkers of oxidation, MDA, a lipid peroxidation marker, and allantoin, product of uric acid oxidation by ROS, presented significant differences between D1 and D14 (Table 3.2). Studies have shown that increased levels of MDA and allantoin are implicated in many diseases, including malaria (Araujo et al. 2008; Fabbri et al. 2013; Narsaria et al. 2012; Pabon et al. 2003) and may be used as good markers of oxidative stress. Although we found no significant correlation between uric acid and allantoin ($r = -0.119$, $p = 0.321$), this variable showed positive correlations with direct and total bilirubin ($r = 0.255$; $p = 0.003$). This association may be related in some way with the pro-oxidant properties that were described for high concentrations of bilirubin in the liver of *vivax* malaria patients, probably through generation of intracellular ROS and lipid peroxidation of hepatic cells (Fabbri et al. 2013; Kumar et al. 2008).

Gene polymorphism

Alterations in redox status contribute to disease manifestations such as microvascular sequestration of parasitized erythrocytes, anemia, respiratory distress and cerebral and placental malaria. The host immune response to malaria involves

phagocytosis, as well as the production of nitric oxide and oxygen radicals that form part of the host defense system and also contribute to the pathogenicity of malaria (Becker et al. 2004).

Although parasite diversity, host age, acquired immunity, oxidative stress and the overall health status may all influence the risk of severe disease complications, it has been estimated that 25% of this risk can be accounted for by variations in the host genotype (Mackinnon et al. 2005).

Most of the enzymes involved in the defense against oxidative stress are polymorphic. In this study, we set out to systematically identify genetic variation in redox enzymes of patients with *vivax* malaria, with the aim to identify the influences of genetic polymorphism in SOD (SOD1 A35C and SOD2 Ala16Val), GPx (GPx1 Pro197Leu), NQO (NQO1 C609T) and MTHFR (C677T), on the clinical manifestations of the disease.

Our study was designed to determine frequency and possible clinical modulators of these polymorphisms, as well as their relations with the sex of the *vivax* malaria hosts. Specifically, we measured hematological and biochemical parameters, oxidative markers such as antioxidant enzymes (Cat, SOD and GPx), allantoin, MDA, TAC and TOS in these patients and examined the associations between those variables and the genetic polymorphisms in the antioxidant enzymes of erythrocytes from hosts infected with *P. vivax*.

The genotypic distribution of each polymorphism (SOD1, $\chi^2=0.013$, $p=0.904$; SOD2, $\chi^2=0.359$, $p=0.549$; GPx1, $\chi^2=2.71$, $p=0.10$; NQO1, $\chi^2=0.011$, $p=0.915$) was consistent with Hardy-Weinberg equilibrium in *vivax* malaria patients and control groups, with exception of MTHFR C677T ($\chi^2=4.32$, $p=0.037$). We observed no statistically significant differences in all genotype and allele frequencies (Table 3.4). Brazil has a peculiar epidemiological situation as being one of the few countries around the world with predominance of *P. vivax*. Susceptibility to *P. vivax* infection allied to the genetic diversity of its population and several particularities of the Brazilian Amazonian region indicate that the generalization of findings from other regions of the planet to this region may not be appropriate (Lacerda et al. 2012).

The variables here investigated were compared between the genotypes of SOD2, GPx1, MTHFR and NQO1 (Table 3.5). The GPx1 Pro197Leu genotypes presented statistically significant differences regarding the hematological indices MCV and MPV,

and the enzymatic activity of SOD. Lymphocyte counts were decreased in homozygous patients for the NQO1 C609T polymorphism. The MTHFR C677T genotypes presented statistically significant differences in the blood levels of AST and ALT, with decreased levels of these hepatic biomarkers being present among T allele carriers. All three genotypes of the SOD2 Ala16Val SNP presented statistically significant differences regarding the oxidative stress marker Cat, although only the heterozygous patients presented significant differences in relation to the SOD activity.

Tables 3.6 to 3.8 represents the main relations obtained between these polymorphisms and some variables considered in this work. Here we showed the genotypic and allelic distribution of each SNP and the susceptibility or protectability that it can promote in these malaria patients, considering the typical clinical and laboratorial characteristics of this disease.

MnSOD or SOD2 Ala16Val

The Ala16Val missense mutation disrupts the secondary structure of MnSOD, decreasing its activity by approximately 40% and decreasing its transport into mitochondria. Among the infected volunteers, the distribution of SOD2 Ala16Val genotypes was 36.2% for homozygous C, 50.7% for heterozygous CT and 12.3% for homozygous T, with no significant difference in relation to the non-infected individuals (Table 3.4). The SOD2 Ala16Val polymorphism was recently associated with hypercholesterolemia (90% mutant allele carriers) (Duarte et al. 2010) and increased oxidative stress, probably under control of environmental factors (Bresciani et al. 2013).

Although the cytosine to thymine substitution in the SOD2 gene has been reported to decrease SOD2 efficiency against oxidative stress (Akyol et al. 2005; Shimoda-Matsubayashi et al. 1996), some studies showed that individuals with heterozygous SOD2 presented less tissue and DNA damages, as well as lower lipid peroxidation indices (Akimoto et al. 2010; Hiragi et al. 2011; Miranda-Vilela et al. 2010), indicating that SOD2 heterozygosis can favor defense against oxidative stress. Our results with malaria patients are in accordance with these studies. The SOD2 Ala/Val patients showed significantly higher SOD activity and lower MDA levels, which represent reduced lipid peroxidation, when compared with the mutant homozygous patients (Table 3.5).

Changes in individual antioxidants activities were influenced by the polymorphism of other antioxidant enzymes. Some authors related these markers have decreased in *P. vivax* malaria (Becker et al. 2004; Bilgin et al. 2012). Indeed, our results showed significantly lower values for Cat, SOD and GPx in the infected patients when compared with the non-infected group (Table 3.2). The carriers of the T allele for this SNP presented lower activities of Cat and GPx (Table 3.5), two of the enzymes that form the primary defense system against reactive species and oxidative stress. *vivax* malaria patients with the wild type genotype had a lower risk (RR=0.58 - CI:0.34 - 0.95 - p=0.013) to present decreased GPx activity in relation to the homozygous and heterozygous mutants for the Ala16Val SNP (Table 3.6). Previous studies have suggested that the Ala allele is associated with higher mitochondrial SOD activity and may hence be more protective against oxidative stress and progression of diseases that have been linked to oxidative stress (Crawford et al. 2012). Although the association between RDW and SOD2 SNP have not presented a statistical significance (at the level of $p<0.05$), the polymorphic allelic carriers had tendency to present increased values of RDW (Table 3.6). This finding can be related with the decreased enzymatic activity of GPx and its negative correlation with RDW (Table 3.3).

SOD2 is an important antioxidant protein to protect cells against mitochondrial superoxide (Dunning et al. 2013; Zelko et al. 2002). Carriers of SOD2 polymorphisms have persistent hemolytic anemia probably due to increased oxidative damage to red cells. Indeed, decreased hemoglobin levels and hematocrit values were observed in malaria patients of this study when compared with the control group (Table 3.2). This finding indicates that SOD must have a role in the regulation of red cell lifespan in malaria disease and other hemolytic disorders.

Both hypoglycemia and hyperglycemia have been described in association with severe malaria. Among malaria patients, 8.2% (6) presented hypoglycemia (Glu < 60 mg/dL) and 20.5% (15) presented blood glucose levels above 100 mg/dL. With exception of only one patient, all they restored their glucose blood levels to the normal range after treatment (D14). High glucose levels can induce a substantial change in the oxidative status, by stimulating the free radical production (Kassab and Piwovar 2012; Patel et al. 2013a). Although lower blood glucose levels have been found in malaria patients that were heterozygous and homozygous for SOD2, GPx1 and NQO1 SNPs (Table 3.5) when

compared with the wild types, the differences were not statistically significant. However, our results showed a tendency of male (but not female) patients with SOD2 Ala16Val SNP to maintain their blood glucose levels below 80 mg/dL ([Table 3.6](#)).

MTHFR C677T

The C677T polymorphism of *MTHFR* gene produces a 4-fold decrease in the catalytic rate of this enzyme, leading to moderate hyperhomocysteinemia when associated with low plasma levels of folate (Andreassi et al. 2003; Frosst et al. 1995; Gudnason et al. 1998; Gueant-Rodriguez et al. 2006; Verhoef et al. 1997).

The relationship between the *MTHFR* C677T polymorphism and disease may involve two aspects. First, the disease might have influence on the concentrations of t-Hcy, which might be also under influence of the proper *MTHFR* polymorphism. Second, the genotype might be associated with damage or protection, depending on how metabolism of folate and Hcy has been affected by the disease.

The distribution of genotypes for the *MTHFR* C677T SNP is presented in [Table 3.4](#). Similar frequencies were found for wild-type and polymorphic genotypes among malaria patients. There were no homozygous patients with the mutant allele. The allelic and genotypes frequencies observed in this study agree with results reported in other Brazilian surveys, especially in the relation to prevalence of the heterozygous genotype for this polymorphism (about 50%) (Biselli et al. 2009; Herkenhoff et al. 2012).

The complexity of the Hcy and methionine metabolic pathways and the perfect balance required for the correct function of this metabolic cycle may be strongly influenced by the presence of *Plasmodium vivax*. The parasites utilize the polyamine metabolism, which is essential for its growth, and causes drastic changes in the glutathione level of its host cell (Luersen et al. 2000).

Although 5-methyltetrahydrofolate in the red cell cytoplasm from resealed uninfected cells cannot be metabolized, at the trophozoite and schizont stages the parasite can uptake exogenous 5-methyltetrahydrofolate and use it to convert Hcy in methionine by the one-carbon transfer reaction of *MTHFR* (Asawamahasakda and Yuthavong 1993).

If we consider that the parasite replicates in the red cell and uses Hcy and folate pathways, the theoretically higher activity of *MTHFR* in CC than in TT and CT genotypes,

might favor the persistence of infection in the wild-type genotype. Indeed, this study showed significantly lower levels of indicators of hepatocellular injury in mutant MTHFR C677T genotypes (Table 3.5). Furthermore, the wild-type genotype of MTHFR presented a much higher risk to develop hepatic injury as a consequence of malaria infection in relation to the mutant genotypes, although this trend was shown to be valid just in the female volunteers (Table 3.7).

Hcy correlated directly with severity and number of parasites in *P. falciparum* malaria. Its use in evaluating the disease severity presented 100% sensitivity and 97% specificity (Chillemi et al. 2004).

Since patients with MTHFR C677T polymorphism are candidates to have high levels of Hcy, with imbalance in the folate cycle, as a consequence of the reduced availability of NADPH and vitamin B12, caused by increased oxidative stress in the malaria patients, this must mean that the Hcy levels can be useful in evaluating the disease severity and treatment efficacy.

However, there are still few studies correlating the C677T polymorphism with malaria and they were all carried out with *falciparum* malaria (Chillemi et al. 2004; Eisenhut 2007; Gueant-Rodriguez et al. 2006). Studies about the inter-relations of this polymorphism with plasma levels of folate, cobalamin and Hcy in *vivax* malaria patients will certainly give a much more precise picture of the importance of the MTHFR C677T polymorphism in this type of malaria.

GPx1 Pro197Leu

Many studies have showed that the GPX1 Leu allele is less responsive to stimulation (Zhao et al. 2005) and more strongly associated with increased risk of some kinds of cancer (Hu and Diamond 2003; Zhao et al. 2005). In our study population have been observed absence of homozygous patients with this allele and a prevalence of the wild-type genotype among infected (67.1%) and non-infected individuals (65.4%) (Table 3.4). These results agree with the results obtained in Brazilian populations of Goiás, Federal District and Mato Grosso states (Hiragi et al. 2011).

Since oxidative stress occurs from increased activities of enzymes that produce free oxygen radicals, decreased activities of enzymes that remove free oxygen radicals, and from insufficiency of antioxidants, with predominance of the oxidant status, the

GPx1 Pro197Leu SNP may interfere in redox metabolism and contribute to exacerbation of the oxidative processes involved in the generation of typical signs of malaria, as thrombocytopenia. Indeed, it was reported that oxidative stress might have a role in the ethiopathogenesis of thrombocytopenia (Araujo et al. 2008; Erel et al. 2001). Platelets counts under $150.000/\text{mm}^3$ is present in 24-94% of patients with acute malaria (Lacerda et al. 2011). Since platelet count was decreased in our malaria patients, we worry about the possibility of their levels continue to fall, with development of severe malaria, with platelets counts under $50.000/\text{mm}^3$. Altered platelet indices should be analysed as potential markers for the severity of malaria caused by *P. vivax* (Leal-Santos et al. 2013). Collectively, significant risk to develop severe thrombocytopenia (platelets count $< 75.000/\mu\text{L}$) were found in malaria patients with GPx1 Pro197Leu SNP in our female study population (RR= 2.91 - CI:1.31-6.46 - $p= 0.018$). This means that the wild type genotype confers protection against the risk to develop thrombocytopenia (Table 3.8), what can be reason by which the frequency of this genotype is much higher among our malaria patients (Table 3.4).

Although the GPx activity has not been significantly different among the GPx1 Pro197Leu SNP genotypes (Table 3.5), lower activities of this enzyme were much more frequent among the wild type patients, with 73% of the wild-type patients with the GPx activity below the normal reference value ($<4171 \text{ U/L}$).

NQO1 C609T

NQO1 is a cytosolic flavoprotein widely distributed in mammalian tissues, which catalyze two-electron reduction reactions involved in the detoxification of reactive quinone compounds and their derivatives. Among all biochemical properties, NQO1 plays a role as a superoxide scavenger, and so protects against superoxide-induced toxicity via NAD(P)H-dependent redox reactions (Siegel et al. 2004). Functional gene polymorphisms have been identified in human *NQO1* gene, and associated with susceptibility to disease development. NQO1 C609T is a single-nucleotide polymorphism that results in a proline to serine substitution at position 187 of the protein (Pro187Ser).

Our study identified the three genotypes for this polymorphism with a frequency distribution of 41.1%, 35.6% and 8.2% for wild-type (NQO1 C609T C/C), mutant

heterozygous (NQO1 C609T C/T) and mutant homozygous (NQO1 C609T T/T), respectively (Table 3.4). Approximately 10% of the human populations have the mutant homozygous genotype, but its frequency can vary in different ethnic groups. The homozygous NQO1 C609T genotype (TT) has also been referred to as null genotype (Zhu and Li 2012). The hematological index LYM presented significant differences between the genotypes of this SNP (Table 3.5). Carriers of NQO1 C609T C/T and T/T presented lower lymphocytes count when compared with CC allele. This difference was more evident in the mutant homozygous patients (T/T). Lymphopenia is usually observed in malaria infection. In the *vivax* malaria patients, the lymphocytes counts were significantly lower at D1 in relation to D14 ($p=0.004$) (Table 3.2). Lymphocyte apoptosis has been described as the mechanism that may contribute to the lymphopenia (Riccio et al. 2003). The total leucocytes (WBC) were also decreased in malaria patients in D1 (Table 3.2) both in relation to D14 ($p=0.013$) and in relation to the non-infected volunteers ($p=0.014$), with no significant differences among the different SNP genotypes (Table 3.5).

SOD1 +35A/C

For this polymorphism there were two patients with the mutant allele, in heterozygosis (SOD1 A/C) (Table 3.4). The comparisons between means showed that only the hematologic index RDW ($p = 0.032$) and antioxidant enzyme SOD ($p = 0.043$) showed significant differences between genotypes A/A and A/C. The presence of the mutant allele of this SNP SOD1 +35A/C is related to decreased enzyme activity (Flekac et al. 2008; Shimoda-Matsubayashi et al. 1996) and we found the same profile for patients with *vivax* malaria (SNP SOD1 A/A [479 ± 137 , $n = 70$], and A/C [278 ± 31 , $n = 2$]). So, it is not possible to implicate the susceptibility or pathogenesis of malaria with this polymorphism because of the small sample that contains the mutant allele.

It was shown that SOD1 is a powerful predictor of disease severity in individuals with different clinical presentations of *vivax* malaria (Andrade et al. 2010a; Andrade et al. 2010b). In our study, 97.2% of total malaria patients presented SOD values above the reference range and among patients with genotype AA for SOD1 gene polymorphism +35A/C, we observed clinical features that can predict the development of severe form of the disease (Alexandre et al. 2010; Costa et al. 2012; Lacerda et al. 2012; Lacerda et

al. 2011; Lanca et al. 2012): jaundice [17.1%] (bilirubin <51.3 $\mu\text{mol/L}$), bleeding [2.9%], severe anemia [1.4%], thrombocytopenia [81.4%] (<150.000 platelets/ μL) and acute respiratory distress syndrome [4.3%] (ARDS).

Conclusions

The presence of the mutant allele for MTHFR C677T determined a favorable condition to patients infected with *P. vivax*, since it decreased the risk of developing a more severe form of liver damage resulting from the infection.

The wild-type genotype for GPx1 Pro197Leu conferred protection to the development of severe thrombocytopenia, clinical characteristic consistently associated with severe cases of malaria by *P. vivax*.

The carriers of the mutant allele of SOD2 Ala16Val were susceptible to decreased antioxidant enzymes GPx and Cat. However, this polymorphism was linked to lower lipid peroxidation, characterized by lower levels of MDA in these patients.

The variability within each genotype suggests that other sources of interindividual variability are contributing to the determination of enzyme activity. Gender has proved to be an important source of interindividual variability in polymorphisms of MTHFR C677T, GPx1 Pro197Leu and SOD2 Ala16Val enzymes.

The SNPs of SOD and NQO1 C609T 1 A35C showed no marker properties to predict susceptibility or protectability complications arising from malaria infection.

Certainly the patterns of distribution of genotypes of MTHFR C677T, GPx1 Pro197Leu and SOD2 Ala16Val are due to the selective pressure that malaria has on human populations from endemic areas.

Acknowledgements

We are grateful to the patients and staff of the "Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado" for participation in the study, and FAPEMIG, CNPq, CAPES and INCT-Redoxoma for financial support.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-6
- Akimoto AK, et al. (2010) Evaluation of gene polymorphisms in exercise-induced oxidative stress and damage. *Free Radic Res* 44(3):322-31 doi:10.3109/10715760903494176
- Akyol O, et al. (2005) Association between Ala-9Val polymorphism of Mn-SOD gene and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(1):123-31 doi:10.1016/j.pnpbp.2004.10.014
- Alexandre MA, et al. (2010) Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 16(10):1611-4 doi:10.3201/eid1610.100685
- Andrade BB, et al. (2010a) Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J* 9:13 doi:10.1186/1475-2875-9-13
- Andrade BB, et al. (2010b) Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of *vivax* malaria severity. *PLoS Negl Trop Dis* 4(4):e650 doi:10.1371/journal.pntd.0000650
- Andreassi MG, et al. (2003) Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease. *Hum Genet* 112(2):171-7 doi:10.1007/s00439-002-0859-3
- Araujo CF, Lacerda MV, Abdalla DS, Lima ES (2008) The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with *vivax* malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(6):517-21
- Asawamahesakda W, Yuthavong Y (1993) The methionine synthesis cycle and salvage of methyltetrahydrofolate from host red cells in the malaria parasite (*Plasmodium falciparum*). *Parasitology* 107 (Pt 1):1-10
- Avissar N, et al. (1994) Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 266(2 Pt 1):C367-75
- Bastaki M, et al. (2006) Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenet Genomics* 16(4):279-86 doi:10.1097/01.fpc.0000199498.08725.9c
- Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H (2004) Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol* 34(2):163-89 doi:10.1016/j.ijpara.2003.09.011
- Bhattacharya J, Swarup-Mitra S (1987) Reduction in erythrocytic GSH level and stability in *Plasmodium vivax* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81(1):64-6
- Bilgin R, Yalcin MS, Yucebilgic G, Koltas IS, Yazar S (2012) Oxidative stress in *vivax* malaria. *Korean J Parasitol* 50(4):375-7 doi:10.3347/kjp.2012.50.4.375
- Biselli PM, Guerzoni AR, Goloni-Bertollo EM, Godoy MF, Abou-Chahla JAB, Pavarino-Bertelli EC (2009) MTHFR genetic variability on coronary artery disease development. *Rev Assoc Med Bras* 55(3)
- Bresciani G, Gonzalez-Gallego J, da Cruz IB, de Paz JA, Cuevas MJ (2013) The Ala16Val MnSOD gene polymorphism modulates oxidative response to exercise. *Clin Biochem* 46(4-5):335-40 doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.11.020
- Bunyaratvej A, Butthep P, Bunyaratvej P (1993) Cytometric analysis of blood cells from malaria-infected patients and in vitro infected blood. *Cytometry* 14(1):81-5 doi:10.1002/cyto.990140114

- Cakal B, Akoz AG, Ustundag Y, Yalinkilic M, Ulker A, Ankarali H (2009) Red cell distribution width for assessment of activity of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 54(4):842-7 doi:10.1007/s10620-008-0436-2
- Chillemi R, Zappacosta B, Simpoire J, Persichilli S, Musumeci M, Musumeci S (2004) Hyperhomocysteinemia in acute *Plasmodium falciparum* malaria: an effect of host-parasite interaction. *Clinica Chimica Acta* 348(1-2):113-120 doi:DOI 10.1016/j.cccn.2004.05.007
- Costa FT, et al. (2012) On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol* 42(12):1099-105 doi:10.1016/j.ijpara.2012.08.007
- Crawford A, et al. (2012) Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene* 501(2):89-103 doi:10.1016/j.gene.2012.04.011
- Deisseroth A, Dounce AL (1970) Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* 50(3):319-75
- Deller S, Macheroux P, Sollner S (2008) Flavin-dependent quinone reductases. *Cell Mol Life Sci* 65(1):141-60 doi:10.1007/s00018-007-7300-y
- Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2010) NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch Biochem Biophys* 501(1):116-23 doi:10.1016/j.abb.2010.03.019
- Douglas NM, et al. (2012) The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J* 11:135 doi:10.1186/1475-2875-11-135
- Duarte MM, et al. (2010) Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem* 43(13-14):1118-23 doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.07.002
- Dumaswala UJ, et al. (2001) Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(4):C867-73
- Dunning S, et al. (2013) Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. *Biochim Biophys Acta* 1832(12):2027-34 doi:10.1016/j.bbadis.2013.07.008
- Eisenhut M (2007) Role of folate deficiency in the pathogenesis of retinal and cerebral hemorrhages in cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 76(5):793; author reply 793-4
- Erel O (2004) A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 37(2):112-9
- Erel O (2005) A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38(12):1103-11 doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008
- Erel O, Kocyigit A, Avci S, Aktepe N, Bulut V (1997) Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with *vivax* malaria. *Clinical biochemistry* 30(8):631-9
- Erel O, Vural H, Aksoy N, Aslan G, Ulukanligil M (2001) Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with *vivax* malaria. *Clin Biochem* 34(4):341-4
- Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407-21

- Fabbri C, et al. (2013) Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in *Plasmodium vivax* malaria patients evolving with cholestatic jaundice. *Malar J* 12(1):315 doi:10.1186/1475-2875-12-315
- Farombi EO, Shyntum YY, Emerole GO (2003) Influence of chloroquine treatment and *Plasmodium falciparum* malaria infection on some enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense indices in humans. *Drug Chem Toxicol* 26(1):59-71 doi:10.1081/DCT-120017558
- Flekac M, Skrha J, Hilgertova J, Lacinova Z, Jarolimkova M (2008) Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Med Genet* 9:30 doi:10.1186/1471-2350-9-30
- Forsberg L, de Faire U, Marklund SL, Andersson PM, Stegmayr B, Morgenstern R (2000) Phenotype determination of a common Pro-Leu polymorphism in human glutathione peroxidase 1. *Blood Cells Mol Dis* 26(5):423-6 doi:10.1006/bcmd.2000.0325
- Frosst P, et al. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10(1):111-3 doi:10.1038/ng0595-111
- Gething PW, et al. (2012) A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis* 6(9):e1814 doi:10.1371/journal.pntd.0001814
- Gizi A, et al. (2011) Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: The glutathione system and the oxidant-antioxidant status. *Blood Cells Mol Dis* 46(3):220-5 doi:10.1016/j.bcmd.2011.01.002
- Grant BJ, et al. (2003) Relation between lung function and RBC distribution width in a population-based study. *Chest* 124(2):494-500
- Grellier P, Marozienne A, Nivinskas H, Sarlauskas J, Aliverti A, Cenas N (2010) Antiplasmodial activity of quinones: roles of aziridinyl substituents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* glutathione reductase. *Arch Biochem Biophys* 494(1):32-9 doi:10.1016/j.abb.2009.11.012
- Gudnason V, Stansbie D, Scott J, Bowron A, Nicaud V, Humphries S (1998) C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. *EARS group. Atherosclerosis* 136(2):347-54
- Gueant-Rodriguez RM, et al. (2006) Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 83(3):701-7
- Herkenhoff ME, Backes RG, Gaulke R, Remualdo VR (2012) Genotype frequency in MTHFR samples to C677T polymorphism in patients from the city of Curitiba-PR. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 48(6):435-438
- Hiragi CO, Miranda-Vilela AL, Rocha DMS, Oliveira SF, Hatagima A, Klautau-Guimarães MN (2011) Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferases M1 and T1 gene polymorphisms in three Brazilian population groups. *Genetics and Molecular Biology* 34(1):11-18
- Hu YJ, Diamond AM (2003) Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res* 63(12):3347-51

- Kassab A, Piwowar A (2012) Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes. *Biochimie* 94(9):1837-48 doi:10.1016/j.biochi.2012.01.020
- Kinnula VL, et al. (2004) Two functional variants of the superoxide dismutase genes in Finnish families with asthma. *Thorax* 59(2):116-9
- Koltas IS, Demirhindi H, Hazar S, Ozcan K (2007) Supportive presumptive diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria. Thrombocytopenia and red cell distribution width. *Saudi Med J* 28(4):535-9
- Kulkarni AG, Suryakar AN, Sardeshmukh AS, Rath DB (2003) Studies on biochemical changes with special reference to oxidant and antioxidants in malaria patients. *Indian J Clin Biochem* 18(2):136-49 doi:10.1007/BF02867380
- Kumar S, et al. (2008) Bilirubin inhibits *Plasmodium falciparum* growth through the generation of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 44(4):602-13 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.057
- Lacerda MV, et al. (2012) Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J* 11:12 doi:10.1186/1475-2875-11-12
- Lacerda MV, Mourao MP, Coelho HC, Santos JB (2011) Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 Suppl 1:52-63
- Lanca EF, et al. (2012) Risk factors and characterization of *Plasmodium vivax*-associated admissions to pediatric intensive care units in the Brazilian Amazon. *PLoS One* 7(4):e35406 doi:10.1371/journal.pone.0035406
- Lathia TB, Joshi R (2004) Can hematological parameters discriminate malaria from nonmalarious acute febrile illness in the tropics? *Indian J Med Sci* 58(6):239-44
- Leal-Santos FA, Silva SBR, Crepaldi NP, Nery AF, Martin TOG, Alves-Junior ER, Fontes CJF (2013) Altered platelet indices asw potencial markers of severe and complicated malaria caused by *Plasmodium vivax*: a cross-sectional descriptive study. *Malar J* 12 (462) doi:10.1186/1475-2875-12-462
- Lippi G, Targher G, Montagnana M, Salvagno GL, Zoppini G, Guidi GC (2008) Relationship between red blood cell distribution width and kidney function tests in a large cohort of unselected outpatients. *Scand J Clin Lab Invest* 68(8):745-8 doi:10.1080/00365510802213550
- Luersen K, Walter RD, Muller S (2000) *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells depend on a functional glutathione de novo synthesis attributable to an enhanced loss of glutathione. *Biochem J* 346 Pt 2:545-52
- Mackinnon MJ, Mwangi TW, Snow RW, Marsh K, Williams TN (2005) Heritability of malaria in Africa. *PLoS Med* 2(12):e340 doi:10.1371/journal.pmed.0020340
- Miranda-Vilela AL, Akimoto AK, Alves PC, Pereira LC, Klautau-Guimaraes MN, Grisolia CK (2010) Dietary carotenoid-rich oil supplementation improves exercise-induced anisocytosis in runners: influences of haptoglobin, MnSOD (Val9Ala), CAT (21A/T) and GPX1 (Pro198Leu) gene polymorphisms in dilutional pseudoanemia (sports anemia). *Genet Mol Biol* 33(2):359-67 doi:10.1590/S1415-47572010005000022
- Narsaria N, Mohanty C, Das BK, Mishra SP, Prasad R (2012) Oxidative stress in children with severe malaria. *J Trop Pediatr* 58(2):147-50 doi:10.1093/tropej/fmr043
- Pabon A, Carmona J, Burgos LC, Blair S (2003) Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *Clinical biochemistry* 36(1):71-8

- Patel H, Chen J, Das KC, Kavdia M (2013a) Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC. *Cardiovasc Diabetol* 12(1):142 doi:10.1186/1475-2840-12-142
- Patel KV, Mohanty JG, Kanapuru B, Hesdorffer C, Ershler WB, Rifkind JM (2013b) Association of the red cell distribution width with red blood cell deformability. *Adv Exp Med Biol* 765:211-6 doi:10.1007/978-1-4614-4989-8_29
- Patel KV, et al. (2010) Red cell distribution width and mortality in older adults: a meta-analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65(3):258-65 doi:10.1093/gerona/glp163
- Riccio EKP, et al. (2003) Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks. *Parasitology Research* 90(1):9-18 doi:DOI 10.1007/s00436-002-0816-z
- Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA (1996) On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9):4471-3
- Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30(11):1191-212
- Semba RD, et al. (2010) Serum antioxidants and inflammation predict red cell distribution width in older women: the Women's Health and Aging Study I. *Clin Nutr* 29(5):600-4 doi:10.1016/j.clnu.2010.03.001
- Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y (1996) Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 226(2):561-5 doi:10.1006/bbrc.1996.1394
- Siegel D, et al. (2004) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol* 65(5):1238-47 doi:10.1124/mol.65.5.1238
- Sutton A, et al. (2005) The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 15(5):311-9
- Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE (2001) Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 22(4):195-201
- Ursini F, Maiorino M, Gregolin C (1985) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 839(1):62-70
- Verhoef P, et al. (1997) The 677C-->T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: associations with plasma total homocysteine levels and risk of coronary atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* 132(1):105-13
- Vijayakrishnan J, Houlston RS (2010) Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Haematologia* 95 (8):1405-1414
- Whitin JC, Bhamre S, Tham DM, Cohen HJ (2002) Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283(1):F20-8 doi:10.1152/ajprenal.00014.2001
- World Health Organization W (2013) World malaria report 2013, vol xiii. World Health Organization, Geneva

- Yoshihito I (2012) Anemia caused by oxidative stress. In: Silverberg DS (ed) Anemia. InTech, Croatia
- Young EG, Conway M, Wentworth HP, Hawkins WW (1944) The estimation of allantoin in blood. *J Biol Chem* 152:245-253
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33(3):337-49
- Zhang S, Chen H, Gerhard GS (2010) Heme synthesis increases artemisinin-induced radical formation and cytotoxicity that can be suppressed by superoxide scavengers. *Chem Biol Interact* 186(1):30-5 doi:10.1016/j.cbi.2010.03.021
- Zhao H, Liang D, Grossman HB, Wu XF (2005) Glutathione peroxidase I gene polymorphism and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer. *Urology* 66(4):769-774 doi:DOI 10.1016/j.urology.2005.04.033
- Zhu H, Li Y (2012) NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and its potential protective role in cardiovascular diseases and related conditions. *Cardiovasc Toxicol* 12(1):39-45 doi:10.1007/s12012-011-9136-9

Table 3.1. Protocols for determining SNPs with forward (F) and reverse (R) primer sequences

SNP	Primers	Restriction digest
	PCR protocols	
^a SOD1 A35C	F, 5'-CTATCCAGAAAACACGGTGGGCC-3' R, 5'-TCTATATTCAATCAAATGCTACAAAACC-3' Denature: 94 °C for 5 min Followed by 94 °C for 30 s Annealing: 58 °C for 30 s Extension: 72 °C for 30 s # Cycles: 30	HhaI A/A-278 pb A/C-278, 207 and 71 pb C/C-71 and 207 pb
^b SOD2 Ala16Val	F, 5'-CACCAGCACTAGCAGCATGT-3', R, 5'-GGTGACGTTTCAGGTTGTCA-3' Denature: 94 °C for 15 min Followed by 94 °C for 30 s Annealing: 60 °C for 45 s Extension: 72 °C for 30 s # Cycles: 35	BsaWI Ala/Ala-492 pb Ala/Val-492, 339 and 153 pb Val/Val-339 and 153 pb
^c GPx1 Pro197Leu	F, 5'-CGCCAAGAACGAAGAGATTC-3', R, 5'-CAGGTGTTCTCCCTCGTAG-3' Denature: 94 °C for 15 min Followed by 94 °C for 45 s Annealing: 56 °C for 45 s Extension: 72 °C for 45 s # Cycles: 30	ApaI Pro/Pro-252, 120 and 88 pb Pro/Leu-252, 208, 120 and 88 pb Leu/Leu-252 and 208 pb
^d NQO1 C609T	F-5'-TCCTCAGAGTGGCATTCTGC -3' R-5'-TCTCCTCATCCTGTACCTCT -3' Denature: 94 °C for 10 min Followed by 94 °C for 60 s Annealing: 59 °C for 45 s Extension: 72 °C for 1 min # Cycles: 35	HinfI C/C-195 and 35pb C/T- 195, 151, 44 and 35pb T/T-151, 44 and 35pb
^e MTHFR C677T	F-5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA -3' R-5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG -3' Denature: 94 °C for 10 min Followed by 94 °C for 60 s Annealing: 55 °C for 1 min Extension: 72 °C for 2 min # Cycles: 30	HinfI C/C-198pb C/T-175, 23 and 198pb T/T-175 and 23pb

^aUkkola et al., 2002 ; ^bLi et al., 2005 ; ^cForsberg et al, 1999 ; ^dVijayakrishnan, Houlston, 2010, ^eFrosst et al., 1995

Table 3.2. Hematological, biochemical and oxidative stress parameters for *Plasmodium vivax* malaria

	Median (IQR)			<i>p</i>
	Day 1 n=73	Day 14 n=35	Non-infected n=30	
Hb (g/dL)*	12.5 (3.03)	12.6 (2.65)	12.8 (1.7)	0.109
Ht (%)*	39.4 (8.03)	39.3 (6.35)	39.1 (6.7)	0.644
RBC (x10 ⁶ /μL)*	4.43 (0.86)	4.3 (0.6)	4.51 (0.93)	0.351
RDW (%)*	14.3 (1.78)	14.1 (2.05)	12.7 (0.5)	<0.001 [§]
MCH (pg)*	27.7 (2.05)	28.5 (2.85)	28.6 (1.8)	0.05
MCHC (g/dL)	31.4 (2.9)	31.8 (2)	33 (0.8)	0.0015 [§]
Platelets (x10 ³ /μL)*	86 (66.8)	272 (78.5)	226 (101)	<0.001 [§]
MPV (fL)	10.3 (1.2)	9.6 (1.1)	10 (1.2)	0.0013 [§]
WBC (x10 ³ /μL)*	5.3 (1.55)	6.1 (2.4)	6.35 (2.2)	0.001 [§]
LYM (%)*	28.2 (16)	37.2 (12.2)	34.3 (11.5)	0.002 [§]
Glu (mg/dL)	85.5 (24)	80 (19)	86 (20)	0.185
HSA (g/dL)*	3.7 (0.7)	4 (0.65)	4.2 (0.7)	<0.001 [§]
TP (g/dL)	6.4 (1.14)	6.2 (0.7)	6.1 (0.79)	0.792
Urea (mg/dL)*	32.1 (12.1)	26 (10.7)	28.9 (9.1)	0.003 [§]
CRN (mg/dL)*	0.95 (0.28)	0.93 (0.24)	0.85 (0.22)	0.05
UA (mg/dL)*	4.2 (2.5)	5 (2.8)	3.45 (2.62)	0.06
TG (mg/dL)*	161 (96)	113 (87)	87.5 (61)	<0.001 [§]
VLDL-C (mg/dL)*	31.4 (17.3)	22.6 (17.3)	18.5 (16)	<0.001 [§]
LDL-C (mg/dL)	34.6 (28.9)	54 (44.4)	70.1 (58.4)	<0.001 [§]
HDL-C (mg/dL)*	45.5 (35.7)	69 (21.3)	78 (55)	<0.001 [§]
t-C (mg/dL)*	113 (34)	157 (38.5)	174 (44)	<0.001 [§]
TB (μmol/L)	29.68 (23.7)	18.1 (11.2)	15.1 (10.3)	<0.001 [§]
IB (μmol/L)*	19.2 (13.2)	10.3 (5.48)	9.1 (6.15)	<0.001 [§]
DB (μmol/L)	11.5 (14.7)	4.62 (7.52)	7.2 (7.5)	<0.001 [§]
AST (U/L)	37.5 (28.5)	28 (20.21)	21.5 (8)	<0.001 [§]
ALT (U/L)	27.5 (30.5)	27 (22)	15 (12)	<0.001 [§]
GGT (U/L)	36.5 (59.5)	25 (20.5)	10 (6)	<0.001 [§]
Cat (k/ghb/min)*	3.08 (2.3)	4.8 (3.28)	5 (3.2)	<0.001 [§]
SOD (U/mL)*	476 (144)	444 (160)	612 (112)	<0.001 [§]
GPx (U/L)*	3831 (1461)	4057 (2136)	4565 (1483)	<0.001 [§]
AL (mg/L)*	5.11 (2.22)	4.37 (1.98)	3.13 (1.98)	<0.001 [§]
MDA (μmol/L)	1.92 (2.03)	1.34 (0.65)	1.43 (0.37)	<0.001 [§]
TOS (μmol H ₂ O ₂ Eq/L)*	19.63 (22.64)	18 (17.1)	19 (12.3)	0.422
TAC (mmol Trolox Eq/L)*	0.63 (0.36)	0.69 (0.43)	1.1 (0.23)	<0.001 [§]
OSI	3.51 (4.16)	3.34 (3.83)	1.68 (1.3)	<0.001 [§]

* Normally distributed data

§ Statistically significant difference (*p*<0.05) (ANOVA, with Tukey's post-hoc test for normally distributed data, and Kruskal-Wallis, with Dunn's post-hoc test, for non-normally distributed data)

Table 3.3. Bivariate analysis between oxidative stress markers and hematological and biochemical parameters in *vivax* malaria patients (n=73)

		HB	HT	RBC	RDW	MCHC	PLT	LYM	HSA	TP	GLU	TB	DB	AST	ALT	GGT	Cat	SOD	GPx	AL	MDA	TOS	TAC	OSI
Cat	r	-0.308*	-0.296*	-0.306*	0.227	-0.052	-0.101	0.045	-0.335*	-0.544*	0.131	0.092	0.033	0.056	-0.140	0.073	1							
	p	0.008	0.011	0.009	0.053	0.663	0.394	0.703	0.004	0.000	0.269	0.437	0.779	0.636	0.237	0.537								
SOD	r	0.215	0.201	0.248*	-0.090	0.055	0.078	-0.088	0.364*	0.300*	0.011	-0.227	-0.231*	-0.068	0.025	-0.265*	-0.245*	1						
	p	0.068	0.089	0.035	0.449	0.643	0.514	0.457	0.002	0.010	0.928	0.054	0.049	0.566	0.835	0.024	0.038							
GPx	r	0.303*	0.287*	0.310*	-0.275*	0.136	-0.198	0.013	0.231*	0.159	0.056	-0.111	-0.064	-0.037	0.074	-0.069	-0.240*	0.171	1					
	p	0.009	0.014	0.008	0.019	0.252	0.093	0.915	0.049	0.180	0.635	0.349	0.591	0.758	0.536	0.562	0.04	0.147						
AL	r	-0.203	-0.240*	-0.242*	0.180	0.069	-0.038	0.021	-0.230	-0.118	0.346*	0.255*	0.314*	0.041	-0.074	0.207	0.114	-0.250*	-0.017	1				
	p	0.088	0.042	0.040	0.131	0.567	0.750	0.858	0.052	0.326	0.003	0.031	0.007	0.730	0.534	0.082	0.339	0.034	0.889					
MDA	r	-0.161	-0.195	-0.205	0.019	0.059	-0.031	-0.098	0.040	-0.087	0.375*	0.126	-0.021	0.244*	0.249*	0.054	0.125	0.291*	0.149	0.011	1			
	p	0.173	0.098	0.082	0.873	0.618	0.792	0.411	0.737	0.465	0.001	0.287	0.859	0.037	0.034	0.652	0.293	0.012	0.207	0.928				
TOS	r	0.069	0.169	0.135	-0.093	-0.317*	0.256*	0.019	0.012	-0.059	0.159	-0.151	-0.138	-0.122	-0.162	-0.080	-0.038	-0.178	-0.094	0.066	-0.119	1		
	p	0.562	0.152	0.253	0.432	0.006	0.029	0.874	0.921	0.618	0.178	0.203	0.243	0.304	0.170	0.502	0.749	0.133	0.427	0.581	0.316			
TAC	r	0.439*	0.426*	0.421*	-0.174	0.090	-0.196	-0.364*	0.168	0.081	-0.192	0.061	0.030	0.009	-0.102	-0.126	0.021	0.122	0.034	-0.072	-0.136	-0.236*	1	
	p	0.000	0.000	0.000	0.144	0.450	0.099	0.002	0.158	0.497	0.106	0.611	0.802	0.942	0.396	0.291	0.859	0.307	0.774	0.549	0.255	0.046		
OSI	r	-0.174	-0.102	-0.163	0.029	-0.282*	0.216	0.153	-0.065	-0.105	0.073	-0.086	0.059	0.051	0.046	0.135	0.004	-0.179	-0.113	0.115	-0.053	0.852*	-0.615*	1
	p	0.144	0.395	0.171	0.808	0.016	0.068	0.200	0.590	0.379	0.541	0.474	0.622	0.669	0.702	0.257	0.976	0.133	0.344	0.339	0.656	<0.001	<0.001	

Spearman and Pearson coefficients for non-normally and normally distributed data, respectively

*p<0.05

Table 3.4. Genotypic and allele frequency of SOD1 A35C, SOD2 Ala16Val, GPx Pro197Leu, NO1C609T and MTHFR C677T SNPs in the study population

SNP	Genetic profile	Genotype	Malaria vivax		Control		$p^{(1)}$	$p^{(2)}$ OR (95% CI)
			Genotypic % (N)	% allele	Genotypic % (N)	% allele		
SOD1 A35C	Wild type	A/A	97.2 (70)		96.3 (26)			
	Mutation ^{AC/CC}	A/C	2.7 (2)	1.38	3.7 (1)	1.85	1.0	1.0
		C/C	0		0			1.34 (0.117-15.48)
	Total		72		27			
SOD2 Ala16Val	Wild type	Ala/Ala	36.2 (25)		26.9 (7)			
	Mutation ^{AlaVal/ValVal}	Ala/Val	50.7 (35)	37.65	57.7 (15)	42.8	0.692	0.392
		Val/Val	12.3 (9)		15.4 (4)			1,542 (0.57-4.17)
	Total		69		26			
GPx1 Pro197Leu	Wild type	Pro/Pro	67.1 (47)		65.4 (17)			
	Mutation ^{ProLeu/LeuLeu}	Pro/Leu	32.9 (23)	16.45	34.6 (9)	17.3	0.767	0.767
		Leu/Leu	0		0			1,155 (0.44-2.99)
	Total		70		26			
NQO1 C609T	Wild type	C/C	41.1 (30)		39.3 (11)			
	Mutation ^{CT/TT}	C/T	35.6 (26)	31	50 (14)	35.7	0.721	0.422
		T/T	8.2 (6)		10.7 (3)			1.449 (0.585-3.59)
	Total		62		28			
MTHFR C677T	Wild type	C/C	52 (23)		45.5 (10)			
	Mutation ^{CT/TT}	C/T	47 (21)	23.5	54.5 (12)	27.1	0.602	0.602
		T/T	0		0			1,314 (0.471-3.669)
	Total		44		22			

N, total of subjects; OR, Odds Ratio; CI, Confidence Interval; $p^{(1)}$, p values for differences between genotype frequencies; $p^{(2)}$, p values for difference between allelic frequencies; % allele, polymorphic allele; SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase; NQO, NAD(P)H quinone oxidoreductase; MTHFR, N5,N10-methylenetetrahydrofolate reductase

Table 3.5. Antioxidant enzymes genotypes and changes in hematological, biochemical and antioxidant biomarkers of *vivax* malaria patients (mean $\pm$ SD)

	<i>SOD2 Ala16Val</i>			<i>GPx1 Pro197Leu</i>		<i>MTHR C677T</i>		<i>NQO1 C609T</i>		
	<i>Ala/Ala (n=25)</i>	<i>Ala/Val (n=35)</i>	<i>Val/Val (n=9)</i>	<i>Pro/Pro (n=47)</i>	<i>Pro/Leu (n=23)</i>	<i>C/C (n=23)</i>	<i>C/T (n=21)</i>	<i>C/C (n=30)</i>	<i>C/T (n=26)</i>	<i>T/T (n=6)</i>
PD (PP/ μ L)	2631 $\pm$ 3163	2260 $\pm$ 5591	3845 $\pm$ 6962	2147 $\pm$ 3726	3847 $\pm$ 6960	2766 $\pm$ 4092	3400 $\pm$ 7843	1847 $\pm$ 2650	3115 $\pm$ 6385	3958 $\pm$ 3771
Hb (g/dL)	12.6 $\pm$ 1.64	12 $\pm$ 2.24	11.45 $\pm$ 2.52	12.4 $\pm$ 2.03	11.8 $\pm$ 2.21	12.3 $\pm$ 2.30	12 $\pm$ 2.21	11.9 $\pm$ 2.08	12.34 $\pm$ 20.5	12.41 $\pm$ 2.04
Ht (%)	40 $\pm$ 5.56	38.27 $\pm$ 6.74	36.5 $\pm$ 7	39.43 $\pm$ 6.40	38 $\pm$ 6.62	39.9 $\pm$ 7.32	38.5 $\pm$ 6.9	38.22 $\pm$ 6.37	38.9 $\pm$ 6.13	38.8 $\pm$ 5.93
RBC ($\times 10^6/\mu$ L)	4.54 $\pm$ 0.62	4.34 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 0.77	4.48 $\pm$ 0.71	4.31 $\pm$ 0.83	4.42 $\pm$ 0.84	4.43 $\pm$ 0.73	4.33 $\pm$ 0.74	4.4 $\pm$ 0.74	4.54 $\pm$ 0.78
MCV (fL)	88.3 $\pm$ 4.15	88.61 $\pm$ 5.98	86.65 $\pm$ 2.55	87.86 $\pm$ 4.04*	89.15 $\pm$ 6.46*	90.6 $\pm$ 5.45	86.7 $\pm$ 4.3	88.62 $\pm$ 5.68	88.58 $\pm$ 3.57	85.65 $\pm$ 4.1
RDW (%)	14.24 $\pm$ 1.25	14.9 $\pm$ 1.47	14.7 $\pm$ 1.27	14.88 $\pm$ 1.27	14.91 1.54	14.8 $\pm$ 1.42	14.8 $\pm$ 1.44	14.57 $\pm$ 1.46	14.8 $\pm$ 1.34	14 $\pm$ 1.36
MCH (pg)	27.82 $\pm$ 1.79	27.65 $\pm$ 1.71	27.1 $\pm$ 1.74	27.61 $\pm$ 1.55	27.61 $\pm$ 2.12	27.8 $\pm$ 1.17	27.1 $\pm$ 2	27.53 $\pm$ 1.94	28.05 $\pm$ 1.56	27.36 $\pm$ 0.93
MCHC (g/dL)	31.59 $\pm$ 1.71	31.26 $\pm$ 1.68	31.35 $\pm$ 1.78	31.45 $\pm$ 1.46	31.1 $\pm$ 2.1	30.8 $\pm$ 1.42	31.3 $\pm$ 1.7	31.14 $\pm$ 1.72	31.7 $\pm$ 1.64	32 $\pm$ 1.45
Platelets ($\times 10^3/\mu$ L)	93.84 $\pm$ 67	104.11 $\pm$ 71	101.77 $\pm$ 51	97.98 $\pm$ 46	109.4 $\pm$ 99	104.4 $\pm$ 85	94.5 $\pm$ 38	114.46 $\pm$ 83.	84.77 $\pm$ 54	95.33 $\pm$ 42
MPV (fL)	10.13 $\pm$ 0.85	10.7 $\pm$ 1.54	10.42 $\pm$ 0.92	10.44 $\pm$ 1.25*	10.2 $\pm$ 1.03*	10.8 $\pm$ 1.13	10 $\pm$ 0.98	10.5 $\pm$ 1.51	10.35 $\pm$ 1.13	10.8 $\pm$ 1.33
WBC ($\times 10^3/\mu$ L)	5.36 $\pm$ 1.63	5.56 $\pm$ 1.66	6.65 $\pm$ 2.45	5.54 $\pm$ 1.85	5.8 $\pm$ 1.65	5.3 $\pm$ 1.64	5.6 $\pm$ 1.75	5.85 $\pm$ 2.3	5.6 $\pm$ 1.38	5.03 $\pm$ 1.62
LYM (%)	29.6 $\pm$ 15.1	28.32 $\pm$ 10.8	35.76 $\pm$ 13.3	29.68 $\pm$ 13.3	28.91 $\pm$ 12.5	30.8 $\pm$ 12.9	31.6 $\pm$ 16	31.9 $\pm$ 12.4*	27.9 $\pm$ 11.4	20.9 $\pm$ 9.9 *
Glu (mg/dL)	96.84 $\pm$ 29.7	86.02 $\pm$ 34.2	81.2 $\pm$ 20.9	95.46 $\pm$ 45.9	90.53 $\pm$ 33.23	82.1 $\pm$ 19.7	96 $\pm$ 54	95.8 $\pm$ 51.6	91.5 $\pm$ 38.6	85.3 $\pm$ 23.7
HSA (g/dL)	3.75 $\pm$ 0.47	3.67 $\pm$ 0.65	3.6 $\pm$ 0.58	3.75 $\pm$ 0.58	3.58 $\pm$ 0.58	3.55 $\pm$ 0.41	3.57 $\pm$ 0.6	3.68 $\pm$ 0.51	3.63 $\pm$ 0.62	4.05 $\pm$ 0.75
TP (g/dL)	5.97 $\pm$ 0.7	6.35 $\pm$ 0.8	6.23 $\pm$ 0.7	6.25 $\pm$ 0.85	6.23 $\pm$ 0.84	6.13 $\pm$ 1	6 $\pm$ 0.7	6.23 $\pm$ 0.65	6.21 $\pm$ 0.87	6.39 $\pm$ 0.88
Urea (mg/dL)	35.4 $\pm$ 10.1	31.87 $\pm$ 10.2	31.39 $\pm$ 10.3	34.1 $\pm$ 11.45	31.9 $\pm$ 9.8	29.2 $\pm$ 13.3	35.2 $\pm$ 10.3	34.7 $\pm$ 11.3	33.1 $\pm$ 10.2	30.2 $\pm$ 7.2
CRN (mg/dL)	0.91 $\pm$ 0.25	0.93 $\pm$ 0.31	0.95 $\pm$ 0.18	0.89 $\pm$ 0.26	0.99 $\pm$ 0.29	0.9 $\pm$ 0.27	0.88 $\pm$ 0.29	0.96 $\pm$ 0.23	0.93 $\pm$ 0.32	0.82 $\pm$ 0.22
UA (mg/dL)	4.11 $\pm$ 1.44	4.68 $\pm$ 1.88	4.1 $\pm$ 1.51	4.41 $\pm$ 1.77	4.44 $\pm$ 1.55	4.05 $\pm$ 1.21	4.47 $\pm$ 1.99	4.19 $\pm$ 1.5	4.93 $\pm$ 1.99	3.91 $\pm$ 1.68
TG (mg/dL)	158.8 $\pm$ 42	185.81 $\pm$ 103.2	202.2 $\pm$ 126.3	182.76 $\pm$ 103	177.71 $\pm$ 92.2	162.8 $\pm$ 61.6	202.8 $\pm$ 131.4	178.7 $\pm$ 98.8	196 $\pm$ 110.8	127.5 $\pm$ 69.8
VLDL-C (mg/dL)	31.7 $\pm$ 15.2	32.7 $\pm$ 12.3	40.44 $\pm$ 25.2	33.22 $\pm$ 15	35.55 $\pm$ 18.4	32.6 $\pm$ 12.3	33.4 $\pm$ 15.9	35.73 $\pm$ 19.7	33.21 $\pm$ 11.5	25.5 $\pm$ 13.9
LDL-C (mg/dL)	39.43 $\pm$ 18.9	38.2 $\pm$ 28.4	54.8 $\pm$ 45.8	43.62 $\pm$ 32	36.5 $\pm$ 19.8	35.6 $\pm$ 18.8	46.8 $\pm$ 35	48.31 $\pm$ 35.4	35.6 $\pm$ 20.6	47.1 $\pm$ 10.8
HDL-C (mg/dL)	44.1 $\pm$ 16.9	47.4 $\pm$ 28	41.1 $\pm$ 27.5	42.5 $\pm$ 25	49.4 $\pm$ 23.5	44.7 $\pm$ 29.2	49.5 $\pm$ 25.6	44.2 $\pm$ 21.1	46.5 $\pm$ 23.2	31.08 $\pm$ 27.3
t-C (mg/dL)	111.2 $\pm$ 21.1*	119.7 $\pm$ 37	136.4 $\pm$ 24.3*	120.38 $\pm$ 38.1	116.93 $\pm$ 24.4	113.3 $\pm$ 26.2	132.1 $\pm$ 40	125.6 $\pm$ 38.6	116.4 $\pm$ 26.7	103.7 $\pm$ 22.1
TB (μ mol/L)	41.9 $\pm$ 30.3	41.8 $\pm$ 49.4	39.6 $\pm$ 42.5	42.2 $\pm$ 47	40.9 $\pm$ 30.6	38 $\pm$ 20.8	52.5 $\pm$ 63.3	41.48 $\pm$ 33.7	38.6 $\pm$ 28.1	31.9 $\pm$ 14.6
IB (μ mol/L)	21.4 $\pm$ 15.7	20.6 $\pm$ 12	11.3 $\pm$ 7.5	19.44 $\pm$ 13.9	19.9 $\pm$ 11.9	21.7 $\pm$ 17.9	19.1 $\pm$ 11.8	20.4 $\pm$ 16.9	20.4 $\pm$ 9.8	15.5 $\pm$ 7.9
DB (μ mol/L)	19.3 $\pm$ 23.8	21.35 $\pm$ 44.4	28.2 $\pm$ 41.7	22.52 $\pm$ 41.4	20.51 $\pm$ 27.2	16.4 $\pm$ 11.6	32.1 $\pm$ 56.8	19.8 $\pm$ 26.6	18.8 $\pm$ 25.8	16.4 $\pm$ 15.5
AST (U/L)	43.9 $\pm$ 41	38.44 $\pm$ 18.4	42.5 $\pm$ 35.8	37.4 $\pm$ 22	47.7 $\pm$ 42	46.3 $\pm$ 21.6*	30.1 $\pm$ 17.1*	43.6 $\pm$ 21.1	42.7 $\pm$ 41.4	30.4 $\pm$ 22
ALT (U/L)	44.4 $\pm$ 45.3	34.77 $\pm$ 22.3*	68.09 $\pm$ 78.6*	39.2 $\pm$ 40.2	49.7 $\pm$ 46.9	51.1 $\pm$ 53.9*	27 $\pm$ 19.8*	49.6 $\pm$ 47.6	42.4 $\pm$ 44.8	28.37 $\pm$ 17.9
GGT (U/L)	49.73 $\pm$ 59.4	49.82 $\pm$ 59.4	82.45 $\pm$ 99.7	50.31 $\pm$ 63	75.5 $\pm$ 65.7	78 $\pm$ 62.1*	44 $\pm$ 37.2*	61.5 $\pm$ 63.9	58 $\pm$ 62.8	33.7 $\pm$ 41.6
Cat (k/ghb/min)	4.43 $\pm$ 2.57*	2.82 $\pm$ 1.48*	3.33 $\pm$ 1.39*	3.26 $\pm$ 1.72	3.77 $\pm$ 2.64	3.68 $\pm$ 2.9	3.82 $\pm$ 1.65	3.83 $\pm$ 2.1	3.27 $\pm$ 2.04	2.26 $\pm$ 0.92
SOD (U/mL)	458.12 $\pm$ 124.7	512.34 $\pm$ 126.3*	401.7 $\pm$ 200.1*	504.1 $\pm$ 142*	438.8 $\pm$ 81.1*	433.4 $\pm$ 113.1	477.8 $\pm$ 92.7	484.1 $\pm$ 129.6	466.8 $\pm$ 112	520 $\pm$ 230
GPx (U/L)	4086 $\pm$ 1369	3539 $\pm$ 1116	3174 $\pm$ 1231	3540 $\pm$ 1131	3942 $\pm$ 1386	3232 $\pm$ 1281	3772 $\pm$ 1207	3660 $\pm$ 1300	3520 $\pm$ 1360	4108 $\pm$ 781
AL (mg/L)	5.51 $\pm$ 1.78	5.21 $\pm$ 1.96	5.98 $\pm$ 2.14	5.45 $\pm$ 1.84	5.43 $\pm$ 2.04	5.33 $\pm$ 1.64	5.93 $\pm$ 2.07	5.27 $\pm$ 2.27	5.41 $\pm$ 1.75	6.01 $\pm$ 1.48
MDA (μ mol/L)	2.83 $\pm$ 1.43*	2.17 $\pm$ 1.02*	2.46 $\pm$ 1.53	2.42 $\pm$ 1.26	2.46 $\pm$ 1.32	2.22 $\pm$ 1.16	2.05 $\pm$ 0.93	2.69 $\pm$ 1.49	2.34 $\pm$ 1.16	2.24 $\pm$ 0.83
TOS (μ mol H ₂ O ₂ Eq/L)	24.4 $\pm$ 13.1	25.83 $\pm$ 18.2	27.04 $\pm$ 20.1	25.26 $\pm$ 16.1	27.82 $\pm$ 19.5	29.13 $\pm$ 16.3	27.2 $\pm$ 21	29.6 $\pm$ 18.5*	20.6 $\pm$ 14.2*	27.1 $\pm$ 16.7
TAC (mmol Trolox Eq/L)	0.68 $\pm$ 0.27	0.62 $\pm$ 0.25	0.59 $\pm$ 0.25	0.66 $\pm$ 0.24	0.6 $\pm$ 0.29	0.61 $\pm$ 0.24	0.71 $\pm$ 0.29	0.59 $\pm$ 0.25	0.64 $\pm$ 0.26	0.75 $\pm$ 0.18
OSI	4.28 $\pm$ 3.44	5.65 $\pm$ 6.92	7.63 $\pm$ 11.4	4.7 $\pm$ 5.67	8.3 $\pm$ 11.3	6.25 $\pm$ 7.14	5.9 $\pm$ 9	7.3 $\pm$ 9.23	4.01 $\pm$ 3.45	4.12 $\pm$ 2.84

* Statistically significant differences ($p < 0.05$) between genotypes (ANOVA, with Bonferroni's post-hoc test for normally distributed data; Kruskal-Wallis, for non-normally distributed data)

Table 3.6. Genotypic and allelic distribution of SOD2 Ala16Val in *vivax* malaria patients

Genotype	Female		Male	
	RDW ≤ 14%	RDW > 14%	RDW ≤ 14%	RDW > 14%
Ala/Ala	4	5	9	7
Ala/Val				
Val/Val	3	11	10	20
p-value / RR (CI)	0.363 / 2.07 (0.60-7.17)		0.234 / 1.69 (0.87-3.28)	
	0.111 ^a / 1.76 (0.97-3.18)			
	TP ≤ 6.0 g/dL	TP > 6.0 g/dL	TP ≤ 6.0 g/dL	TP > 6.0 g/dL
Ala/Ala	7	1	8	8
Ala/Val				
Val/Val	9	5	6	24
p-value/ RR (CI)	0.351 / 1.36 (0.85-2.17)		0.039 / 2.50 (1.05-5.95)	
	0.045 ^a / 1.83 (1.10-3.07)			
	Glu ≤ 80 mg/dL	Glu > 80 mg/dL	Glu ≤ 80 mg/dL	Glu > 80 mg/dL
Ala/Ala	2	7	4	12
Ala/Val				
Val/Val	6	8	16	14
p-value / RR (CI)	0.289 / 0.52 (0.13-2.02)		0.067 / 0.47 (0.19-1.17)	
	0.063 ^a / 0.48 (0.23-1.02)			
	GPx ≤ 4171 U/L	GPx > 4171 U/L	GPx ≤ 4171 U/L	GPx > 4171 U/L
Ala/Ala	4	5	6	10
Ala/Val				
Val/Val	12	2	19	11
p-value / RR (CI)	0.052/ 0.52 (0.24-1.11)		0.097/ 0.59 (0.30-1.18)	
	0.013 ^a / 0.57 (0.34-0.95)			

^a Fisher's exact test; ^b χ^2 test (Yates's corrected); RR: Risk Ratio; CI: Confidence Interval

Table 3.7. Genotypic and allelic distribution of MTHFR C677T in *vivax* malaria patients

Genotype	Female		Male	
	AST ≤ 37 U/L	AST > 37 U/L	AST ≤ 37 U/L	AST > 37 U/L
C/C	1	8	6	8
C/T	8	3	8	3
p-values/ RR (CI)	0.009 / 3.26 (1.21-8.79)		0.138 / 2.10 (0.72-6.09)	
	0.011 ^a / 2.55 (1.22-5.31)			
	ALT < 20 U/L	ALT > 60 U/L	ALT < 20 U/L	ALT > 60 U/L
C/C	1	4	3	3
C/T	5	1	5	0
p-values/ RR (CI)	0.067 / 4.80 (0.76-30.29)		0.121	
	0.012 ^b / 7.0 (1.02-47.82)			
	GGT ≤ 61 U/L	GGT > 61 U/L	GGT ≤ 61 U/L	GGT > 61 U/L
C/C	2	7	9	8
C/T	7	3	5	3
p-values/ RR (CI)	0.051 / 2.59 (0.85-7.11)		0.49 / 1.25 (0.45-3.50)	
	0.11 ^a / 1.73 (0.83-3.60)			

^a Fisher's exact test; ^b χ^2 test (Yates's corrected); RR, Risk Ratio; CI, Confidence Interval

Table 3.8. Genotypic and allelic distribution of GPx1 Pro197Leu in *vivax* malaria patients

Genotype	Female		Male	
	Platelet ≤ 75.000/μL	Platelet >75.000/μL	Platelet ≤ 75.000/μL	Platelet > 75.000/μL
Pro/Pro	5	12	9	21
Pro/Leu	6	1	7	9
p-values/RR (CI)	0.018 / 0.34 (0.15-0.76)		0.356 / 0.69 (0.31-149)	
	0.032 ^a / 0.53 (0.30-0.93)			
	Ht < 35%	Ht > 40%	Ht < 35%	Ht > 40%
Pro/Pro	10	3	1	21
Pro/Leu	1	1	5	8
p-value/RR (CI)	0.476 / 1.54 (0.37-6.35)		0.019 / 0.12 (0.02-0.90)	
	0.558 ^b / 0.79 (0.36-1.73)			

^a Fisher's exact test; ^b χ^2 test (Yates's corrected); RR: Risk Ratio; CI: Confidence Interval

Apêndices

Apêndice A



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



APROVAÇÃO Nº 2045

Registro CEP Nº912-11

CAAE – 0075.0.115.114-11

Processo Nº912/2011-FMT-AM

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

Pesquisador responsável: Camila Fabbri.

Instituição Sediadora: Universidade Federal do Amazonas.

Instituição Vinculada: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

Área Temática Especial: Não se aplica.

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

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

Ao se proceder à análise relativa do Projeto em questão, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), em sessão ordinária do dia 28 de abril de 2011 e de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Situação do Protocolo: APROVADO

Manaus, 28 de abril de 2011.

Carlos de Lima Almeida
Secretário de Ética em Pesquisa
-FMT-AM

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

Apêndice B



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para pacientes com malária *vivax*



Você está sendo convidado para participar do projeto intitulado **Marcadores bioquímicos e moleculares das modificações oxidativas em pacientes com malária *vivax***. Você foi selecionado por ter sido assistido pelo médico responsável no Ambulatório ou estar internado na FMT-AM, hospital de referência para o tratamento da malária em Manaus. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. O acompanhamento da sua doença e tratamento continuará sendo realizado independentemente de você estar na pesquisa ou não. Você será retirado do estudo caso você deixe de seguir as orientações para a participação no estudo. Trata-se de um estudo observacional sobre malária *vivax* diagnosticada como grave e não grave, em pacientes atendidos no Ambulatório e/ou internados na unidade hospitalar da FMT-AM e terá duração de **36 meses**. Você não precisa fazer qualquer coisa especial para participar desse projeto e receberá o mesmo tratamento e acompanhamento estabelecido de acordo com as normas do Ministério da Saúde. Como parte do estudo, nós vamos estabelecer um sistema de monitoramento para malária durante sua internação até o momento em que você puder receber alta hospitalar ou durante seus retornos ambulatoriais. Nós coletaremos além de várias informações clínicas, amostras de sangue nos seguintes dias: primeiro (18 mL), segundo (9mL) e no último dia (22,5 mL) através de uma agulha (venopunção) para fazer o teste de malária (gota espessa) e outros exames laboratoriais. Nós gostaríamos de sua permissão para fazer testes com as parasitas de malária nas amostras de sangue coletadas e para guardar o restante do sangue para ser usado em estudos sobre malária no futuro.

Você pode sentir alguma dor por causa da picada no dedo ou pela coleta de amostra de sangue na veia do braço. Mas qualquer dor deve durar apenas alguns instantes. Existe um risco muito pequeno de infecção onde o sangue for coletado, mas qualquer infecção será monitorada e tratada pela equipe médica. A amostra de sangue colhida é muito pequena e não representa nenhum risco à sua saúde. O benefício em estar participando deste estudo será um aumento de informações sobre malária *vivax* e seus riscos na nossa cidade, mas você não será pago nem receberá incentivo financeiro durante o acompanhamento.

Se você concordar em participar, todas as informações coletadas serão confidenciais, usadas somente no estudo. Nós não compartilharemos suas informações, e um código será usado para identificar você em vez de seu nome. Nós não tornaremos público qualquer detalhe sobre você. No caso de algum pesquisador tirar uma foto sua, ele cuidará para que você não seja identificado. Esta imagem sua será publicada apenas em revistas para médicos.

Pessoas para contato

Se você tiver qualquer pergunta ou preocupação sobre o estudo, por favor, vamos esclarecer isso agora. Mesmo assim, se depois você desejar esclarecer suas dúvidas sobre a pesquisa ou sobre ser um sujeito de pesquisa, por favor, sinta-se à vontade para contatar **Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda**, pesquisador principal do projeto na **Fundação de Medicina Tropical do Amazonas**. O endereço do hospital é Av. Pedro Teixeira, nº 25, Dom Pedro e o número do telefone é (92) 3656 0620. O endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-AM (que é um grupo de pessoas que avaliam este projeto e acompanham a pesquisa) é também na Av. Pedro Teixeira, nº 25, Bairro Dom Pedro, e o telefone para contato é o (92) 2127 3432. O presidente deste comitê é o Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira.

Eu, _____, participante desse estudo ou responsável pelo paciente _____, entendi todas as informações dadas a mim sobre o estudo **Caracterização da Malária Grave por *Plasmodium vivax* na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Brasil**, com subprojeto intitulado **Biomarcadores do estresse oxidativo em pacientes com malária *vivax* grave e não grave**, inclusive o seu propósito e a forma como será executado. Eu tive a chance de fazer perguntas sobre o estudo e concordo em participar do mesmo.

_____		Data ____/____/____
Assinatura do participante ou responsável ou impressão do polegar direito		
_____	_____	Data ____/____/____
Nome do entrevistador	Assinatura do entrevistador	
_____	_____	Data ____/____/____
Nome do pesquisador responsável	Assinatura do pesquisador responsável	



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para voluntários saudáveis



Você está sendo convidado para participar do projeto intitulado **Marcadores bioquímicos e moleculares das modificações oxidativas em pacientes com malária vivax**. Você foi selecionado por nunca ter tido malária *vivax* ou *falciparum* e por estar saudável, sem estar apresentando nenhuma doença como hipertensão e/ou diabetes. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. Trata-se de um estudo observacional sobre malária *vivax* diagnosticada como grave e não grave, em pacientes atendidos no Ambulatório e/ou internados na unidade hospitalar da FMT-AM e terá duração de **36 meses**, onde pacientes como você, saudáveis, terão seus resultados comparados com estas pessoas doentes. Nós coletaremos além de várias informações clínicas, apenas uma amostra de sangue em um único dia de 22,5 mL através de uma agulha (venopunção) para fazer exames laboratoriais. Nós gostaríamos de sua permissão para fazer testes com as substâncias contidas na sua amostra e para guardar o restante do sangue para ser usado em estudos no futuro.

Você pode sentir alguma dor por causa da picada no dedo ou pela coleta de amostra de sangue na veia do braço. Mas qualquer dor deve durar apenas alguns instantes. Existe um risco muito pequeno de infecção onde o sangue for coletado, mas qualquer infecção será monitorada e tratada pela equipe médica. A amostra de sangue colhida é muito pequena e não representa nenhum risco à sua saúde. O benefício em estar participando deste estudo será um aumento de informações sobre malária *vivax* e seus riscos na nossa cidade, mas você não será pago nem receberá incentivo financeiro durante o acompanhamento. Se você concordar em participar, todas as informações coletadas serão confidenciais, usadas somente no estudo. Nós não compartilharemos suas informações, e um código será usado para identificar você em vez de seu nome. Nós não tornaremos público qualquer detalhe sobre você.

Pessoas para contato

Se você tiver qualquer pergunta ou preocupação sobre o estudo, por favor, vamos esclarecer isso agora. Mesmo assim, se depois você desejar esclarecer suas dúvidas sobre a pesquisa ou sobre ser um sujeito de pesquisa, por favor, sinta-se à vontade para contatar a farmacêutica Camila Fabbri ou a bióloga Rita de Cássia Mascarenhas Netto. O endereço é Av. Alexandre Amorim, 530, bairro N. S. Aparecida. O telefone para contato é (92) 3305-5000. O endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-AM (que é um grupo de pessoas que avaliam este projeto e acompanham a pesquisa) é na Av. Pedro Teixeira, nº 25, Bairro Dom Pedro, e o telefone para contato é o (92) 2127 3432. O presidente deste comitê é o Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira.

Eu, _____, participante desse estudo ou responsável pelo paciente _____, entendi todas as informações dadas a mim sobre o estudo **Caracterização da Malária Grave por *Plasmodium vivax* na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Brasil**, com subprojeto intitulado **Biomarcadores do estresse oxidativo em pacientes com malária *vivax* grave e não grave**, inclusive o seu propósito e a forma como será executado. Eu tive a chance de fazer perguntas sobre o estudo e concordo em participar do mesmo.

_____		Data ____/____/____
Assinatura do participante ou responsável ou impressão do polegar direito		
_____	_____	Data ____/____/____
Nome do entrevistador	Assinatura do entrevistador	Data ____/____/____
_____	_____	
Nome do pesquisador responsável	Assinatura do pesquisador responsável	

Apêndice C



**Marcadores bioquímicos e moleculares das
modificações oxidativas em pacientes com
malária *vivax***



FICHA CLÍNICA

Código EO: _____ Código MALÁRIA: CXBS- _____

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____

Endereço: _____

Telefones:

Celular: _____ Residencial: _____ Trabalho: _____

Parasitemia: () menor que ½ () ½ () + () ++ () +++

Já teve Dengue? _____ Se teve, há quanto tempo? _____

Está tomando algum medicamento? _____

Possui Diabetes e/ou Hipertensão? _____

Há quanto tempo está doente? _____

Quantas vezes foi diagnosticado com malária? _____

É fumante? _____

D0	D1	D14