

BENEDITO BARRAVIERA

**MALÁRIA CAUSADA PELO *Plasmodium falciparum* E AVALIAÇÃO
INDIRETA DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE E DA
DEFICIÊNCIA DE RIBOFLAVINA, POR MEIO DA REDUÇÃO DA
METAHEMOGLOBINA PELA CISTAMINA:**

— Estudo em hemácias de indivíduos doentes, em normais tratados ou não pela riboflavina e em deficientes em glicose - 6 - fosfato desidrogenase.

CA P E S
2.12.00.00 Parasitologia.

CAH EW
1. Malaria - Fisiopatologia

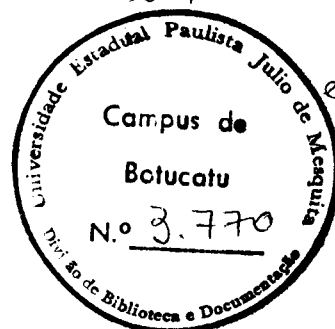
Orientador: Paulo Eduardo Abreu Machado

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação de «Fisiopatologia em Clínica Médica», da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista «Júlio de Mesquita Filho», para obtenção do título de Doutor.

UNESP - Campus de Botucatu	
D. de Biblioteca e Documentação	
Solicitante	
Procedência	
Processo n.º	018/98. AG
Preço	R\$ 50,00
Doador	Benedito Barraviera
Permutado com	
Data	23.10.98

BOTUCATU

1986



Orientador:

Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado

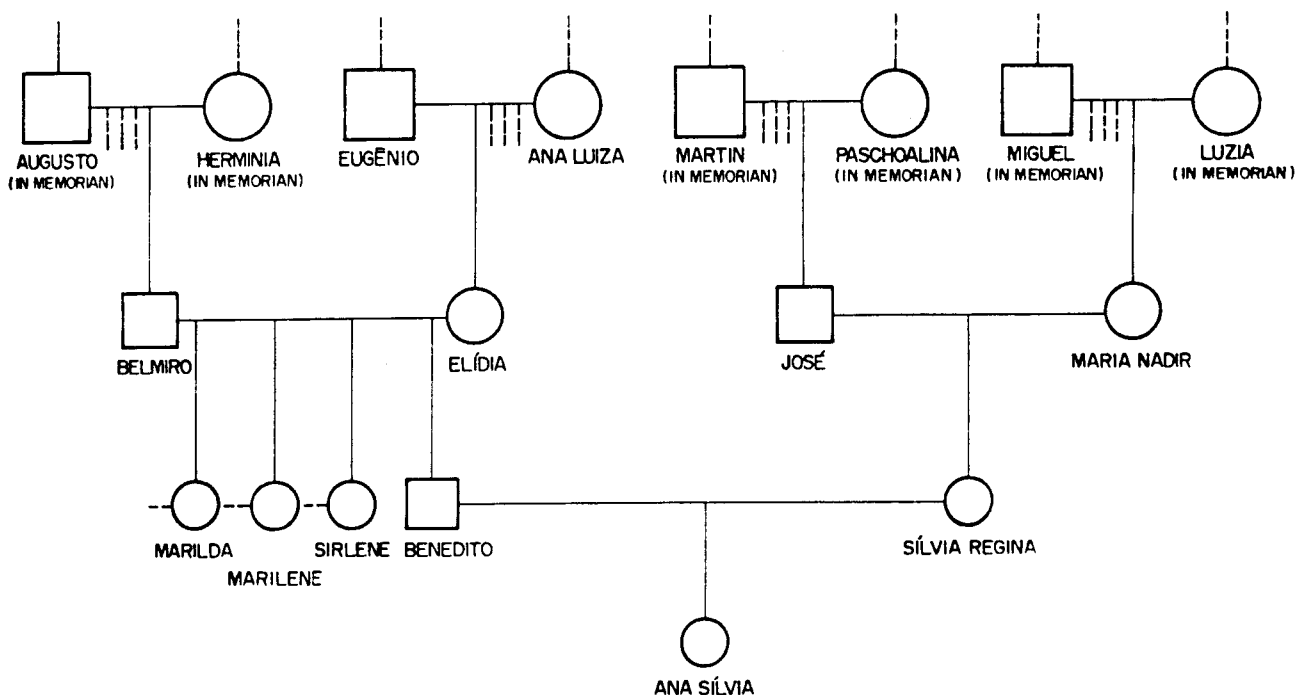
"O segredo dos que triunfam
é começar sempre de novo".

Dedico este trabalho à *Sílvia* e à *Ana Sílvia*,
pela oportunidade que a natureza me deu de po
dermos viver o *NOSSO LAR*.

"A natureza deu ao ser humano a
necessidade de amar e ser amado"

Rivail D.H.L.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que par
ticipam ou participaram da formação da minha VIDA.



"O nascer e o morrer são os pontos de inflexão da gigantesca senóide biológica que se desenvolve em alternâncias às quais ora chamamos vida, ora chamamos morte. Viver e morrer são os dois aspectos de um mesmo fenômeno, ao qual poderíamos chamar, simplificadamente, de VIDA, apenas, pois a morte já está nela implícita".

ANDRADE, H.G.

A G R A D E C I M E N T O S

Desejo agradecer profundamente àqueles que, direta ou indiretamente permitiram a realização deste trabalho.

- Ao Dr. *Paulo Eduardo de Abreu Machado*, infatigável colaborador, que me acompanhou durante o desenvolvimento desta pesquisa.
- Ao Dr. *Domingos Alves Meira* que, com espírito devotado à ciência, contribuiu de forma inestimável para a concretização deste estudo.
- Ao Dr. *Paulo Roberto Curi*, pelo interesse e competência com que orientou a metodologia estatística empregada.
- Ao Dr. *Álvaro Oscar Campana*, coordenador do Curso de Pós-Graduação de Fisiopatologia em Clínica Médica.
- Ao Dr. *Domingos Alves Meira*, coordenador do Projeto de Estudo da Malária na região de Humaitá.
- Ao Dr. *Nelson de Souza*, pela colaboração oferecida ao estudo realizado no município de Anhembi.
- À Fundação Projeto Rondon, pelas facilidades criadas durante o estudo de campo.

- Aos técnicos da SUCAM de Humaitá, pela cessão de parte de suas instalações para o atendimento aos doentes.
- Ao corpo clínico do Hospital de Humaitá, pela ajuda prestada no atendimento e internação dos doentes graves.
- Ao 54º Batalhão de Infantaria de Selva, pelo envio de voluntários para o estudo de indivíduos normais da região.
- Ao Diretor e aos Funcionários do "Campus Avançado de Humaitá", pelo carinho com que sempre me receberam.
- Aos colegas da Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, que souberam compatibilizar comigo as responsabilidades diárias.
- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação de Fisiopatologia em Clínica Médica, pelo incentivo.
- Aos estudantes da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo voluntariado na padronização dos valores normais do método.
- Ao pessoal do Laboratório Clínico, pelo auxílio no fornecimento de vidrarias e drogas.
- Aos funcionários do Centro de Saúde de Anhembi, pela colaboração prestada.

- Ao *Jair Natal Pires Martins*, técnico de laboratório de Hemoglobinas.
- À *Maria Julia de Souza*, técnica de laboratório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.
- À Bibliotecária *Enilze de Souza Nogueira Volpato*, pela orientação na organização das referências bibliográficas.
- À Professora *Miriam Celí Pimentel Porto Foresti*, pelo auxílio na correção do texto.
- À *Ivonete Aparecida Dorini de Aguiar e Silva*, pe los serviços de datilografia.
- À Dra. *Jussara Marcondes Machado*, pela versão do resumo e conclusões.
- Aos indivíduos doentes e normais que se dispueram voluntariamente participar deste estudo.
- À Faculdade de Medicina de Botucatu, que tornou exequível este trabalho.

Este trabalho recebeu auxílio financeiro do CNPq, Processo nº 400.755/85.

AO "PROJETO MALÁRIA"

Dedico este trabalho ao grupo de colegas da Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, que compõem o "Projeto Malária".

Este, desenvolvido no município de Humaitã, Estado do Amazonas, completou 10 anos de existência em agosto de 1986.

O conhecimento mais profundo da malária, ainda que limitada a uma pequena região do país, torna possível sugerir modificações que podem amenizar o sofrimento daqueles que padecem dessa doença.

Assim sendo, o principal objetivo do estudo desta endemia é transformar e propiciar vida social mais humana aos irmãos que residem no norte do país e aqueles que migram para lá.

S U M Á R I O

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS	8
3 - RESULTADOS	30
4 - DISCUSSÃO	61
5 - RESUMO E CONCLUSÕES	81
6 - SUMMARY AND CONCLUSIONS	85
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
8 - APÊNDICE	104

1 - INTRODUÇÃO

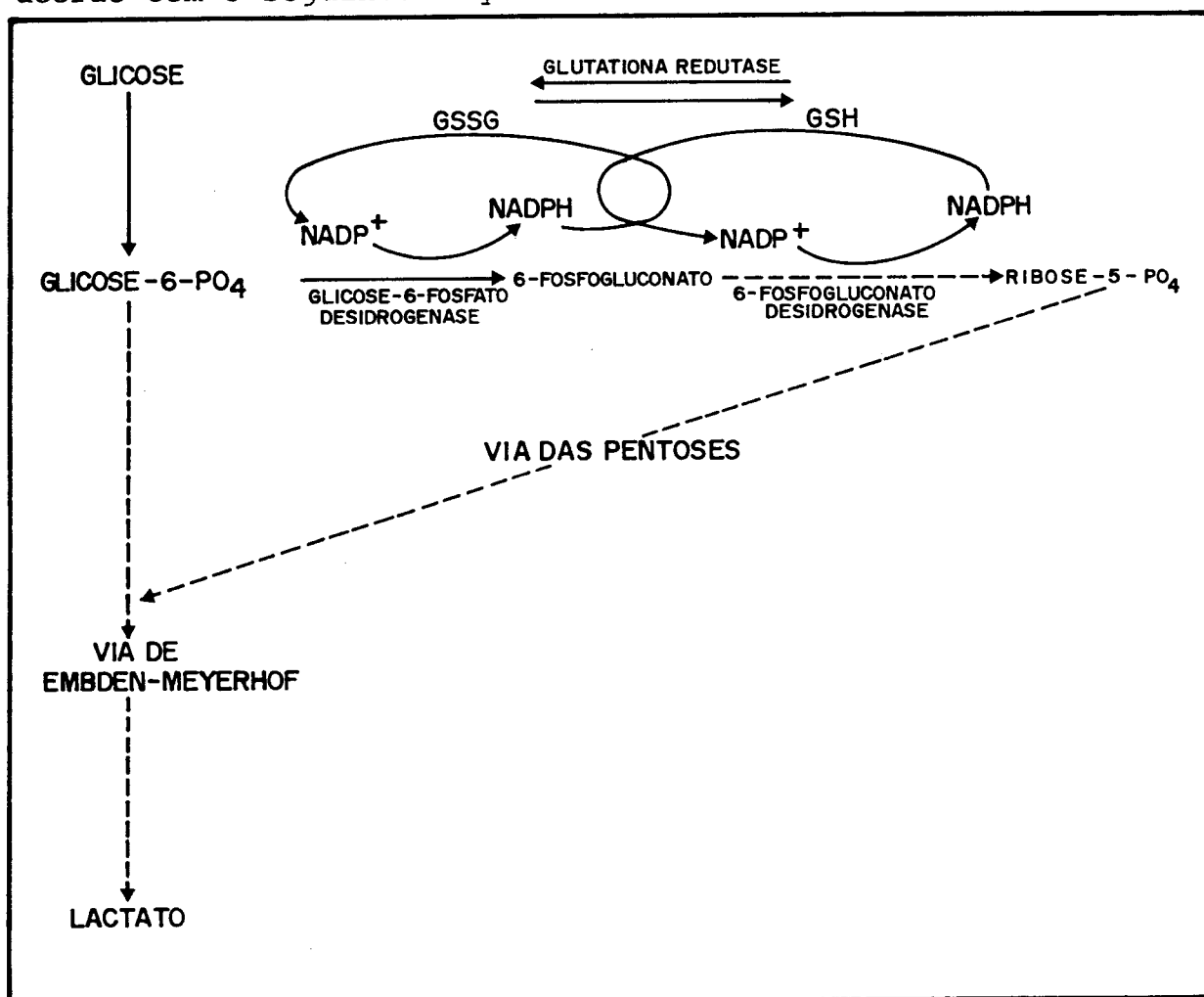
A hemoglobina, componente principal do eritrócito, apresenta no interior de sua molécula o átomo de ferro no estado oxidativo +2. Este pode sofrer oxidação, transformando-se em +3. Nessa situação, a hemoglobina, que é vermelha, torna-se de tom castanho, recebendo a denominação de metahemoglobina^(6, 34,59).

A metahemoglobina pode ser formada em decorrência de alterações metabólicas oxidativas^(13,34) que ocorrem no interior do eritrócito, ou pela ação de drogas, entre elas o nitrato de sódio^(6,13,20,21,34,59). Uma vez formada, não tem capacidade de transporte de oxigênio, devendo ser revertida à hemoglobina e isto ocorre por intermédio das vias metabólicas da glicose^(6,13,20,21,34,59).

A hemoglobina apresenta, ainda, na sua configuração espacial, dois grupos SH reativos, correspondentes à cisteína 93, componente das cadeias beta normais^(13,34). O bloqueio destes grupos SH reativos leva a alterações importantes na estrutura da molécula de hemoglobina, formando complexos^(15, 16, 45), que são revertidos novamente à hemoglobina⁽⁴⁵⁾. A glutathiona, molécula formada de glutamato, cisteína e glicina, é a responsável, nesse processo, pela manutenção intacta dos grupos SH reativos das proteínas intraeritrocitárias^(13,15,16,34,45).

A glutathiona, para exercer sua atividade, necessita manter-se sob a forma de glutathiona reduzida (GSH). Ela po

de oxidar-se, transformando-se em glutathiona oxidada (GSSG). Esta última é novamente transformada em glutathiona reduzida, pela ação da glutathiona redutase (13,15,16,34,45,49,75,77,78). Para que a glutathiona redutase tenha bom desempenho enzimático, é necessário que os níveis de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzido (NADPH) intraeritrocitários sejam adequados. O NADP é reduzido na via das pentoses, sendo a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) a enzima moduladora deste sistema, de acordo com o seguinte esquema (6,13,20,21,34,59).

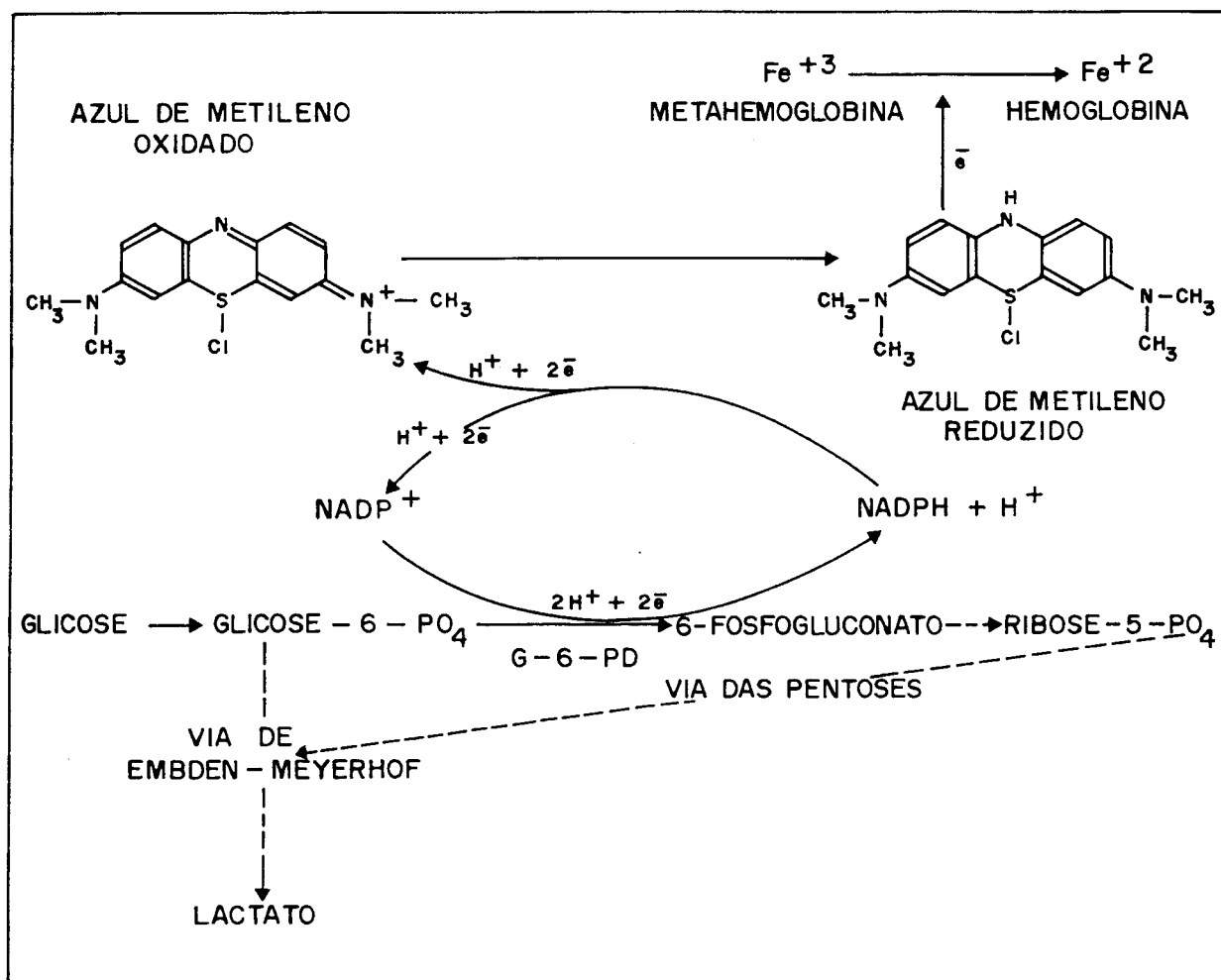


ESQUEMA 1 - Principais vias metabólicas intraeritrocitárias (13,34,83).

Para que a glutathiona redutase funcione satisfatoriamente (13,34,83), portanto, há necessidade de que a via das pentoses esteja reduzindo o NADP, mantendo níveis adequados de NADPH.

A verificação da atividade da via das pentoses pode ser pesquisada por vários métodos. Um deles é o de BREWER et alii (21), modificado por BARRAVIERA (6), baseado na formação artificial de metahemoglobina pelo nitrito de sódio, seguida da redução desta à hemoglobina, pela estimulação da via das pentoses com azul de metileno.

A metahemoglobina é revertida em hemoglobina nos eritrócitos de indivíduos normais, porém, naqueles com deficiência de G6PD esta redução não ocorre pela adição do azul de metileno, de acordo com o seguinte esquema:



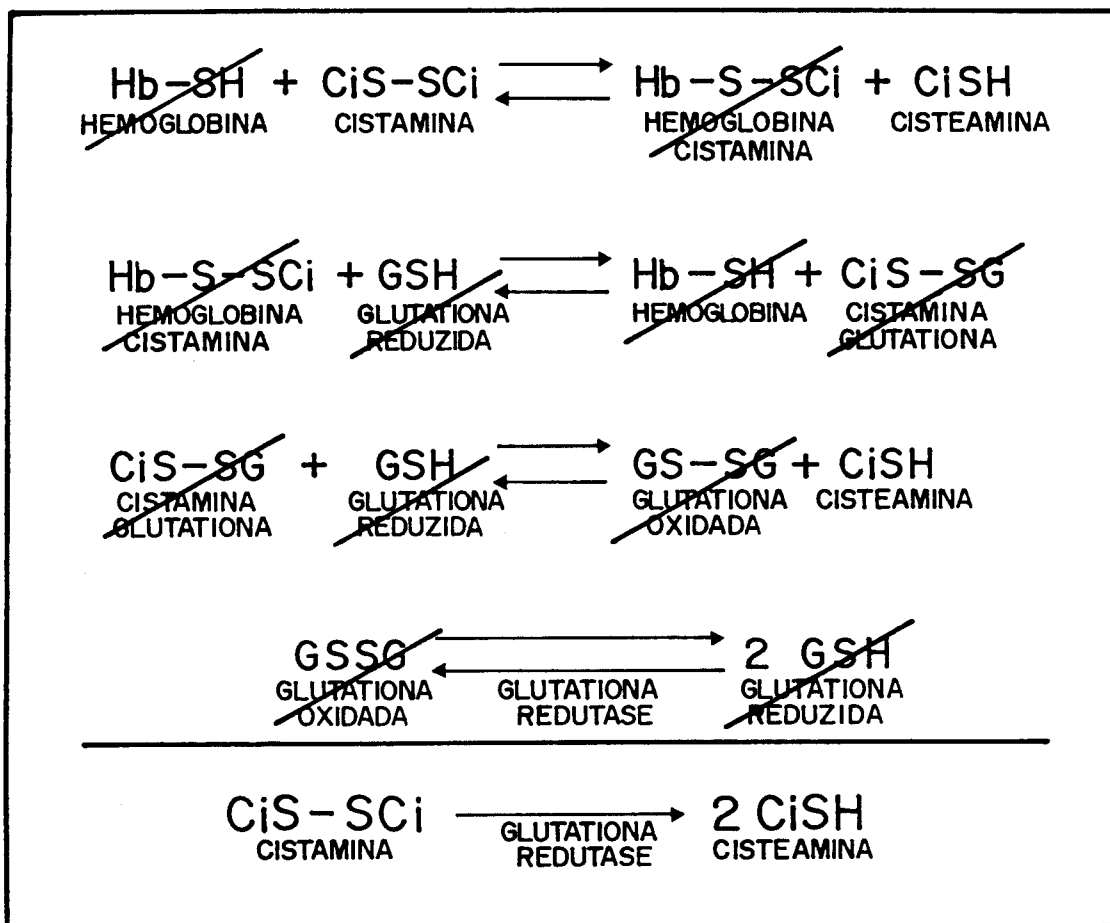
ESQUEMA 2 - Redução da metahemoglobina pelo azul de metileno (6,13,34).

Por outro lado, a glutathiona redutase, enzima

que atua na redução da glutathiona oxidada para glutathiona redu zida, em condições fisiológicas, contribui com 12% da transfor ma ção da metahemoglobina à hemoglobina (34).

Os grupos SH da hemoglobina, que são protegidos pela glutathiona redutase, podem ser bloqueados pelos agentes tióis (13,15,16,34,45).

A cistamina, agente tiol, cuja fórmula é $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, liga-se aos grupos SH da cisteína 93, lo calizada nas cadeias beta da hemoglobina. Os demais grupos SH não reativos da molécula são preservados, de acordo com o es quema a seguir:



ESQUEMA 3 - Efeito da cistamina sobre a molécula de hemoglobi-
na (15,16,45).

Desta maneira, os complexos formados pela hemoglobina e cistamina são revertidos pela ação da glutathione redutase. Nesta reação há formação de glutathione oxidada, que é novamente transformada em glutathione reduzida, necessitando, para tanto, de NADPH, que é fornecido pela via das pentoses, na metabolização da glicose (13,34,45). Como a formação do NADPH é modulada pela G6PD, o consumo desta coenzima estimularia, de maneira indireta, a via das pentoses.

A atividade da glutathione redutase pode ser aumentada pela adição da flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), que é derivada da riboflavina (14,34,40,65,66,69). Esta, ao ser absorvida no trato gastro intestinal alto, é fosforilada e transformada em flavina-mononucleotídeo (FMN). A outra coenzima, FAD, é encontrada em grande quantidade no fígado (69) e no interior do eritrócito, ela é formada a partir da fosforilação da riboflavina (46).

Tem-se observado em indivíduos normais que a ingestão de 5 mg de riboflavina por dia determina aumento significativo da atividade da glutathione redutase em dois dias (14, 69). Indivíduos que ingerem dieta deficiente em riboflavina, portanto, têm atividade diminuída da glutathione redutase.

Desta forma, para que haja atividade completa da glutathione redutase, há necessidade, também, de quantidades adequadas de FAD intra-eritrocitária.

A deficiência de G6PD tem sido demonstrada com freqüência maior em populações que habitam há muito tempo zonas endêmicas de malária (1,13,18,27,35,36,41,42,89). Tal deficiência

ficiência tem sido relatada como um dos fatores genéticos de resistência à infecção causada pelo *Plasmodium falciparum* (8, 13, 18, 26, 33, 41, 42, 43, 74).

Estudos "in vitro" têm demonstrado que o *Plasmodium falciparum* não consegue se desenvolver adequadamente em eritrócitos deficientes em G6PD (70). Esta dificuldade também é verificada quando esses eritrócitos são submetidos à ação de drogas oxidativas (33, 57). Entre estas, a diamida, no interior do eritrócito, tem a capacidade de bloquear os grupos SH reativos causando, em última análise, o "estado tiol", que é semelhante ao efeito da cistamina (57). Neste momento, a glutathione redutase é acionada, na tentativa de reverter o processo e, para tanto, há necessidade de glutathione reduzida e NADPH. Como a quantidade de NADPH está diminuída pela deficiência de G6PD, há formação excessiva de glutathione oxidada, sem redução da mesma. Nesta situação, o parasita não consegue completar o seu ciclo intra-eritrocitário e o seu desenvolvimento fica prejudicado (33, 75).

Nesse mesmo sentido, tem sido demonstrada a importância da riboflavina no desenvolvimento de plasmódios não humanos inoculados em animais (37, 68, 73). Estudos "in vitro" têm relatado que a deficiência dietética desta vitamina dificulta o desenvolvimento dos parasitas durante o seu ciclo evolutivo (2, 10, 24, 37, 68, 73, 84).

Em países tropicais, onde a malária é endêmica, tem sido observada a presença da deficiência de riboflavina nos indivíduos normais dessas populações (10, 31, 32, 76, 84, 86).

Portanto, há, pontos ainda não esclarecidos referentes a deficiência de G6PD, alteração na atividade da glutathiona redutase, deficiência de riboflavina e suas relações com o *Plasmodium falciparum*, em populações residentes nas áreas endêmicas de malária, provavelmente submetidas à pressão seletiva por esta endemia^(9,22,52).

Dessa forma, os objetivos do presente trabalho são:

- verificar se a cistamina tem capacidade de reduzir a metahemoglobina à hemoglobina;
- padronizar o método de estudo, relativo à redução de metahemoglobina por este agente tiol;
- aplicar o método padronizado em indivíduos normais e doentes com infecção causada pelo *Plasmodium falciparum*, habitantes de região endêmica de malária;
- aplicar o método padronizado em indivíduos normais residentes em zona não endêmica de malária;
- aplicar o método padronizado em indivíduos tratados pela riboflavina;
- aplicar o método padronizado em indivíduos com deficiência de G6PD.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - MATERIAL UTILIZADO

Para atingir os objetivos propostos no presente trabalho e para facilitar a compreensão da metodologia utilizada, serão relacionados inicialmente os conjuntos de drogas, equipamentos, vidrarias e soluções utilizados.

2.1.1 - DROGAS

Ácido clorídrico	MERCK
Cianeto de potássio	MERCK
Cistamina	SIGMA
Cloreto de azul de metileno triidratado	MERCK
Cloreto de sódio	MERCK
Cloroquina	WINTHROP
Ferricianeto de potássio	MERCK
Fosfato de clindamicina	Up JOHN
Fosfato de potássio monobásico	REAGEN
Fosfato de sódio dibásico	BAKER
Glicose	MERCK
Heparina	ROCHE
Nitrito de sódio	BAKER
Riboflavina	ANDRÔMACO
Saponina branca	MERCK
Tris	MERCK

2.1.2 - EQUIPAMENTOS E VIDRARIAS

Balança de precisão	SAUTER
Balões volumétricos	HERKA
Banho maria	FANEM
Becker	HERKA
Centrifugador Excelsa 2	FANEM
Cubetas de quartzo ES 10	KLEINKUVETTE=UV
Espectrofotômetro SPECORD UV-VIS	CARL ZEISS JENA
Espectrofotômetro SPECTRONIC 70 com conversor digital LD 100	BAUSCH & LOMB
Potenciômetro	CELM
Micropipetas automáticas	OXFORD
Papel parafilme	SUPPLIER
Pipetas	HERKA
Seringas descartáveis	IBRASGAMMA
Tubos de ensaio	VIDROLABOR

2.1.3 - SOLUÇÕES E DOSES UTILIZADAS

a - Solução de glicose a 5%

glicose 5 gramas (g)

água destilada 100 mililitros (ml)

A dose utilizada nos experimentos foi de 10 microlitros (µl) da solução para cada 200 microlitros (µl) de hemácias lavadas.

b - Solução de azul de metileno a 0,015%

cloreto de azul de
metileno triidratado 0,15 gramas(g)
água destilada 1000 mililitros(ml)

Esta solução é conservada a 4°C. A dose utilizada nos experimentos foi de 10 microlitros (μ l) da solução para cada 200 microlitros (μ l) de hemácias lavadas.

c - Solução de nitrito de sódio a 0,7%

nitrito de sódio 0,7 gramas(g)
água destilada 100 mililitros (ml)

Conserva-se esta solução em frasco escuro, a 4°C. A dose utilizada nos experimentos foi de 10 microlitros (μ l) da solução para cada 200 microlitros (μ l) de hemácias lavadas.

d - Solução de cistamina a 0,1 molar (M)

cistamina 225,2 miligramas (mg)
solução de tampão
tris (item h) 10 mililitros (ml)

Esta solução é conservada a 4°C. A dose utilizada nos experimentos foi de 20 microlitros (μ l) da solução para cada 200 microlitros (μ l) de hemácias lavadas.

e - Solução de tampão fosfato, pH 6,8

fosfato de potássio
monobásico 34,6 gramas (g)
fosfato de sódio di
básico 36,1 gramas (g)
água destilada 250 mililitros(ml)

Ajusta-se o pH desta solução estoque para 6,8
com ácido clorídrico 1 normal e conserva-se a 4°C.

f - Solução de tampão fosfato, pH 6,8

solução de tampão
fosfato (item e) 10 mililitros(ml)
água destilada 500 mililitros(ml)

Conserva-se esta solução de trabalho a 4°C. A
dose utilizada foi de 10 mililitros (ml) para cada leitura.

g - Solução de saponina a 2%

saponina branca 2 gramas (g)
água destilada 100 mililitros(ml)

Foram utilizadas 2 gotas da solução para hemolizar 200 microlitros (μ l) de hemácias lavadas. Conserva-se a 4°C.

h - Solução de tampão Tris, NaCl, glicose,
pH 7,45

Tris	6,057 gramas(g)
Cloreto de sódio	2,922 gramas(g)
Glicose	0,9 gramas(g)
Água destilada	1000 mililitros (ml)

Ajusta-se o pH desta solução para 7,45 com ácido
clorídrico 1 normal e conserva-se a 4°C.

i - Solução glico-fisiológica a 5%

glicose	5,0gramas (g)
cloreto de sódio	0,9 gramas (g)
água destilada	100 mililitros (ml)

j - Ferricianeto de potássio na forma de cris-
tais.

l - Cianeto de potássio na forma de cristais.

2.2 - MATERIAL DE ESTUDO

2.2.1 - MATERIAL UTILIZADO NA PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DO PROPOSTO

Foram utilizadas hemácias lavadas, com a finalidade de avaliar a redução da metahemoglobina pela cistamina, em três procedimentos, a saber: avaliação da quantidade ideal de cistamina, avaliação do tempo ideal de incubação e padronização dos valores normais.

- Avaliação da quantidade ideal de cistamina

Foram estudados seis indivíduos adultos, normais, da raça branca, não deficientes em glicose-6-fosfato desidrogenase, sendo três do sexo masculino e três do feminino, com idades que variavam de 20 a 30 anos, todos escolhidos entre estudantes da Faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP, que se apresentaram como voluntários. De todos foram colhidos 20 ml de sangue por flebopunção, em tubos heparinizados com 10 gotas de heparina, equivalentes a 500 unidades, para posterior determinação da taxa de hemoglobina, obtenção do valor do volume globular e dosagem da quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio e redução desta pela cistamina, pelo método proposto. O sangue assim obtido foi mantido em banho de gelo a 4°C até a execução do método (59).

- Avaliação do tempo ideal de incubação

Foram estudados os mesmos indivíduos que participaram do procedimento anterior. Deles foram colhidos 20 ml de sangue por flebopunção, em tubos heparinizados com 10 gotas de heparina, equivalentes a 500 unidades, para posterior determinação da taxa de hemoglobina, obtenção do valor do volume globular e dosagem da quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio e redução desta pela cistamina, pelo método proposto. O sangue assim obtido foi mantido em banho de gelo a 4°C, até a execução do método ⁽⁵⁹⁾.

- Padronização dos valores normais do método

Foram estudados 26 indivíduos normais, da raça branca, não deficientes em G6PD, escolhidos entre os estudantes que se apresentaram como voluntários, da Faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP, sendo 13 do sexo masculino e 13 do feminino, com idades que variavam de 20 a 30 anos. De todos foram colhidos 10 ml de sangue por flebopunção, em tubos heparinizados com cinco gotas de heparina, equivalentes a 250 unidades, para posterior determinação da taxa de hemoglobina, obtenção do valor do volume globular e dosagem da quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio e redução desta pela cistamina, pelo método proposto. O sangue assim obtido foi mantido em banho de gelo a 4°C, até execução do método ⁽⁵⁹⁾.

2.2.2 - ESTUDO DA REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELA CISTAMINA EM ÁREA ENDEÊMICA DE MALÁRIA

A área endêmica de malária selecionada para o presente estudo, foi a região de Humaitá, localizada na Amazônia Sul-Occidental, no Estado do Amazonas. A escolha recaiu sobre Humaitá pois, por um lado, é nesta localidade que a Faculdade de Medicina de Botucatu, pela Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, participa do "Campus Avançado" da Fundação Projeto Rondon, em convênio com a UNESP, desenvolvendo pesquisas sobre a malária desde 1976 (53,54). Por outro lado, porque o município de Humaitá está incluído entre os sete do Estado do Amazonas e os 15 de toda a região Amazônica em que se tem observado maior transmissão de malária (50,53,54).

Foram estudados 11 indivíduos adultos normais, todos do sexo masculino, não deficientes em G6PD, com idades que variavam de 18 a 25 anos, selecionados pelo Corpo de Saúde, entre voluntários do 54º Batalhão de Infantaria de Selva.

Foram estudados, também, 31 doentes com diagnóstico etiológico de malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, atendidos no Posto da SUCAM e no Hospital de Humaitá. Todos eram do sexo masculino com idades variando entre 12 e 47 anos. Os indivíduos incluídos no estudo, bem como os doentes, foram submetidos à avaliação clínica de acordo com os anexos 1 e 2. Todos os indivíduos incluídos no estudo consentiram em dele participar, após explicação minuciosa dos seus objetivos.

Foram constituídos os seguintes grupos de estudo:

GRUPO 1 - Amazônides normais: constituídos de 11 indivíduos, nascidos na região Amazônica, sem antecedentes de surtos prévios de malária e sem queixas clínicas;

GRUPO 2 - Amazônides com diagnóstico etiológico de malária: constituído de 20 doentes, todos nascidos na região Amazônica, com diagnóstico atual de malária causada pelo *Plasmodium falciparum*;

GRUPO 3 - Doentes não amazônides com malária: formando por 11 doentes com diagnóstico etiológico de malária atual, causada pelo *Plasmodium falciparum*, nascidos em outros Estados do país, não pertencentes à região Amazônica.

2.2.3 - ESTUDO DA REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELA CISTAMINA EM ÁREA NÃO ENDÊMICA DE MALÁRIA

A área não endêmica de malária selecionada para o presente estudo foi o município de Anhembi, localizado à margem esquerda do Rio Tietê, no Estado de São Paulo, distando aproximadamente 200 km da capital do Estado.

A escolha recaiu sobre Anhembi pois, por um lado, é nesta localidade que a Faculdade de Medicina de Botucatu participa do Centro de Saúde da Secretaria da Saúde, em convênio com a UNESP, dando atendimento médico à população havendo, por esta razão, maior facilidade e apoio para realização de pesquisa. Por outro lado, porque o município de Anhembi não apresenta caso autóctone de malária desde 1960 (80).

Foram estudados 91 indivíduos, sendo 19 do sexo masculino e 72 do feminino, com idades variando de 11 a 43 anos, atendidos no Centro de Saúde Anhembi. Todos os indivíduos incluídos no presente trabalho eram normais, tendo sido previamente convidados a participar do estudo, após explicação minuciosa dos seus objetivos.

2.3 - MÉTODOS DE ESTUDO

2.3.1 - PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELA CISTAMINA EM HEMÁCIAS LAVADAS

O método proposto, com a finalidade de avaliar a redução da metahemoglobina pela cistamina, baseou-se na adição de nitrito de sódio a amostras de hemácias lavadas, com a finalidade de produzir metahemoglobina, procedendo-se à estimulação da via das pentoses pela cistamina em presença de glicose. A seguir, foi feita a avaliação da quantidade de metahemoglobina formada, pela leitura em espectrofotômetro, de acordo com o método de EVELYN & MALLOY ⁽³⁰⁾.

A metodologia proposta incluiu a avaliação da quantidade de metahemoglobina, pela leitura em espectrofotômetro de duplo feixe SPECORD-UV-VIS, a avaliação da quantidade ideal de cistamina, a avaliação do tempo ideal de incubação e, com base nos resultados obtidos, foi estabelecida a padroniza-

ção dos valores normais do método para hemácias lavadas.

2.3.1.1 - Interpretação da leitura em espectrofotômetro de duplo feixe SPECORD-UV-VIS

A leitura no espectrofotômetro foi realizada utilizando-se o hemolisado de cada experimento, após diluição em tampão fosfato (item f, página 11), subdividindo-o em 2 alíquotas. O resultado foi apresentado por intermédio de 4 curvas, de acordo com o Gráfico 1.

A leitura é realizada em densidade óptica, calculada em milímetros, pois, o gráfico descrito pelo aparelho é referido segundo a relação de 1 milímetro equivalente a 0,01 da densidade óptica.

A diferença entre as curvas 3 e 4 corresponde à 100% de metahemoglobina e, entre as curvas 1 e 2, à quantidade desconhecida de metahemoglobina.

Desta maneira, a porcentagem desconhecida de metahemoglobina é dada de acordo com a seguinte relação:

$$\begin{array}{l} \text{Porcentagem (\%)} \\ \text{desconhecida de} \\ \text{metahemoglobina} \end{array} = \frac{\text{diferença entre as curvas 1 e 2}}{\text{diferença entre as curvas 3 e 4}} \times 100$$

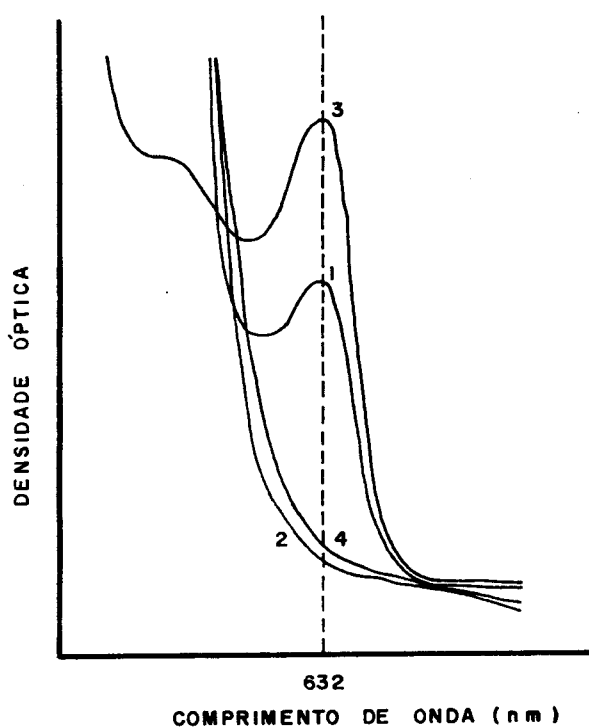


GRÁFICO 1 - Curvas obtidas no espectrofotômetro de duplo feixe SPECORD-UV-VIS.

PRIMEIRA ALÍQUOTA:

Curva 1 - espectro da metahemoglobina no material hemolisado;

Curva 2 - espectro da cianometahemoglobina e cianohe-
moglobina, formada após adição de cristais
de cianeto de potássio ao material com que
se obteve a curva 1.

SEGUNDA ALÍQUOTA:

Curva 3 - espectro do total de metahemoglobina forma-
da pela adição de cristais de ferricianeto
de potássio;

Curva 4 - espectro da cianometahemoglobina, pela adi-
ção de cristais de cianeto de potássio.

A quantidade de metahemoglobina formada é calculada em miligrama, a partir do conhecimento da quantidade total de hemoglobina e da porcentagem de metahemoglobina observada.

2.3.1.2 - Avaliação da quantidade ideal de cistamina e do tempo ideal de incubação

As concentrações de glicose e nitrito de sódio são bem determinadas ⁽⁶⁾ porém, a quantidade de cistamina é desconhecida.

A variável testada neste experimento foi a concentração ideal de cistamina, mantendo-se constantes as concentrações de glicose e nitrito de sódio. Para tanto, foram utilizadas hemácias lavadas, em virtude da melhor interação entre estas e as drogas utilizadas ⁽⁶⁾.

Para retirada do plasma e lavagem das hemácias, centrifugou-se o sangue total a 1500 rotações por minuto, durante 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado e as hemácias ressuspensas com solução glicofisiológica a 5%, repetindo-se este procedimento três vezes. Ao final, as hemácias lavadas foram ressuspensas com solução de tampão Tris, NaCl, glicose, pH 7,45, na proporção de um para um, após o que foi feita nova determinação do volume globular e das taxas de hemoglobina.

A seguir, foram utilizados 200 µl de hemácias lavadas, 10 µl de glicose a 5%, 10 µl de solução de nitrito de

sódio a 0,7% e 20 μ l de solução de cistamina nas seguintes concentrações, a saber: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,7 molar.

Os testes foram realizados em duplicata, sendo utilizados dois tubos de ensaio, para cada concentração de cistamina de acordo com o esquema a seguir:

M A T E R I A L	T U B O S	
	1	2
Hemácias lavadas	200 μ l	200 μ l
Glicose a 5%	10 μ l	10 μ l
Nitrito de sódio a 0,7%	10 μ l	10 μ l
Cistamina em diferentes concentrações	-	20 μ l

O material assim distribuído foi homogeneizado por inversão, arrolhado com papel parafilme e incubado em banho maria a 37°C. A seguir, procedeu-se à hemólise com duas gotas de saponina a 2% nos seguintes momentos de incubação: 60, 120, 180 e 240 minutos. Adicionaram-se 10 ml de tampão fosfato, pH 6,8 e procedeu-se à leitura da quantidade de metahemoglobina em espectrofotômetro SPECORD-UV-VIS.

Após a estimulação da via das pentoses pela cis

tamina, realizou-se a leitura da quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio, e da quantidade residual de metahemoglobina e efetuou-se o cálculo da redução da metahemoglobina pela cistamina. Este cálculo baseia-se na quantidade de metahemoglobina reduzida por minuto, de acordo com a seguinte relação:

$$\begin{array}{lcl} \text{REDUÇÃO DA} & & \text{quantidade de meta} \\ \text{METAHEMOGLOBINA} & = & \text{hemoglobina produ-} \\ & & \text{zida no tubo 1 em} \\ & & \text{microgramas } (\mu\text{g}) \end{array} - \begin{array}{l} \text{quantidade de meta} \\ \text{hemoglobina resi-} \\ \text{dual no tubo 2 em} \\ \text{microgramas } (\mu\text{g}) \end{array}$$

$$\begin{array}{l} (\mu\text{g}/\text{min}) \\ \text{(tempo de incubação em minutos (min))} \end{array}$$

2.3.1.3 - Padronização dos valores normais do método

Para a realização destes experimentos foi aplicado o método proposto como descrito em 2.3.1.2, utilizando - se 0,01 molar de concentração final de cistamina e procedendo - se à hemólise do material após 180 minutos de incubação em banho maria a 37°C. Os testes foram realizados em duplicata e a leitura da quantidade de metahemoglobina foi obtida em espectrofotômetro SPECORD UV-VIS, calculando-se a seguir, a redução da metahemoglobina pela cistamina.

2.3.2 - MÉTODOS UTILIZADOS PARA VERIFICAÇÃO DOS VALORES DO VOLUME GLOBULAR E TAXAS DE HEMOGLOBINA

O método utilizado para a dosagem das taxas de hemoglobina foi o da cianometahemoglobina ⁽⁵⁸⁾. Para a determinação do volume globular em Botucatu foi utilizado o método do microhematócrito e para os estudos de campo realizados em Humaitá e Anhembi, o método escolhido foi o do macrohematócrito ⁽⁵⁸⁾.

2.3.3 - MÉTODO UTILIZADO PARA A AVALIAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DE G6PD

Em todos os indivíduos normais de Botucatu, Humaitá e Anhembi e nos doentes estudados foi feita a verificação da deficiência de G6PD, pela avaliação da redução da metahemoglobina pela via das pentoses ⁽⁶⁾.

Este método, padronizado por BARRAVIERA ⁽⁶⁾, consiste na utilização de hemácias lavadas, glicose, nitrito de sódio e azul de metileno. O nitrito de sódio no interior dos eritrócitos transforma a hemoglobina em metahemoglobina. Esta última, em indivíduos não deficientes em G6PD, e sob o estímulo do azul de metileno, transforma-se novamente em hemoglobina. Para tanto, deve-se incubar o material em banho maria a 37°C, pelo tempo de 90 minutos, após o que é obtida a hemólise com saponina a 2%, procedendo-se à leitura da quantidade de me

tahemoglobina em espectrofotômetro SPECORD UV-VIS, conforme descrito anteriormente. Ao final calcula-se a redução da meta hemoglobina pelo azul de metileno, de acordo com o descrito em 2.3.1.2.

2.3.4 - ESQUEMAS DE TRATAMENTO DA MALÁRIA UTILIZADOS NOS DOENTES

Os doentes com diagnóstico etiológico de malária causada pelo *Plasmodium falciparum* foram submetidos a dois esquemas de tratamento ⁽⁵⁵⁾, expressos na Tabela 1.

TABELA 1 - Distribuição dos doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, de acordo com o tratamento recebido.

ESQUE MAS	D R O G A	DOENTES TRATADOS nº	DOSE mg/kg/dia	VIA	INTERVALO horas	DURAÇÃO dias
a	clindamicina	18	20	EV	12	3
	cloroquina		10	IM	12	1
			7,5	VO	12	2
b	clindamicina	13	20	EV	12	5

EV = endovenoso

IM = intramuscular

VO = via oral

Todos os doentes, antes e após o tratamento, foram submetidos aos seguintes exames subsidiários: dosagem do volume globular, avaliação das taxas de hemoglobina e avaliação da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno ⁽⁶⁾.

2.3.5 - AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELA CISTAMINA NOS INDIVÍDUOS NORMAIS DE HUMAITÁ, DOENTES COM MALÁRIA E INDIVÍDUOS NORMAIS DE ANHEMBI

Nos indivíduos normais de Humaitá, nos doentes com diagnóstico etiológico de malária causada pelo *Plasmodium falciparum* e nos indivíduos normais de Anhembi, procedeu-se à avaliação da redução da metahemoglobina pela cistamina, empregando-se o método padronizado.

A leitura das dosagens da metahemoglobina foi realizada aos 180 minutos de incubação em espectrofotômetro SPECTRONIC 70, com conversor digital LD 100, de acordo com o método de EVELYN & MALLOY ⁽³⁰⁾. Ao final foi calculada a redução da metahemoglobina pela cistamina e comparados os resultados obtidos, de acordo com o sexo.

2.3.6 - ESQUEMA DE TRATAMENTO COM RIBOFLAVINA NOS INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO DE ANHEMBI

Dos indivíduos estudados na população de Anhem-

bi, foram escolhidos 14 adultos do sexo feminino, com idades que variavam de 18 a 32 anos para serem tratados com 10 mg de riboflavina por dia, durante oito dias.

Esta escolha foi feita porquanto dois desses indivíduos haviam tido alteração na redução da metahemoglobina pela cistamina. Os demais, apesar de não apresentarem alteração na redução da metahemoglobina pela cistamina, ofereceram-se como voluntários, após explicação minuciosa dos objetivos do estudo.

Os exames subsidiários, realizados antes e após o tratamento, foram os seguintes: verificação do valor do volume globular, avaliação das taxas de hemoglobina, avaliação da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno ⁽⁶⁾ e avaliação da redução da metahemoglobina pela cistamina.

2.3.7 - COMPARAÇÃO EM INDIVÍDUOS DO MESMO SEXO, DO VOLUME GLOBULAR, DA HEMOGLOBINA, DA QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA E DA REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELO AZUL DE METILENO E CISTAMINA, EM INDIVÍDUOS NORMAIS DE BOTUCATU, AMAZÔNIA E ANHEMBI E EM DOENTES COM MALÁRIA, AMAZÔNIDES E NÃO AMAZÔNIDES

Nos indivíduos do mesmo sexo, normais de Botucatu, Amazônia e Anhembi e nos doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, procedeu-se à comparação dos valores

do volume globular, das taxas de hemoglobina, da quantidade de metahemoglobina e da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno e cistamina de acordo com o método padronizado.

2.3.8 - AVALIAÇÃO DOS INDIVÍDUOS DEFICIENTES EM G6PD PELO MÉTODO PADRONIZADO

Na amostra estudada, os eventuais encontros de indivíduos com deficiência em G6PD como resultado da utilização do método descrito em 2.3.3, foram também submetidos à avaliação da redução da metahemoglobina pela cistamina, de acordo com o método padronizado.

2.3.9 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS

A análise estatística foi efetuada para verificar a comparação entre duas amostras. Estas comparações foram realizadas em duas situações, a saber:

- a - para amostras dependentes: quando os indivíduos foram avaliados antes e após o tratamento. Neste caso, foram verificados os seguintes efeitos:
 - do tratamento com clindamicina e clindamicina e cloroquina nos doentes amazônides (Tabela 7),
 - do tratamento com clindamicina e clindamicina e cloroquina nos doentes não amazônides (Tabela 10),

- do tratamento com riboflavina nos indivíduos de Anhembi (Tabela 16).

b - Para amostras independentes: quando se objetivou a comparação entre dois grupos não relacionados. Foi realizado o teste preliminar de homogeneidade de variâncias e quando estas resultaram heterogêneas, o cálculo da estatística "t" foi modificado, bem como ⁽¹²⁾ os graus de liberdade corrigidos. Neste caso, efetuaram-se:

- a verificação do efeito do sexo (Tabelas 3 e 13),
- a comparação entre grupos distintos do mesmo sexo (Tabela 20).

Em ambos os casos foi determinado o nível de significância (p) associado à estatística calculada.

Para a comparação de mais de duas médias, a análise estatística foi feita utilizando-se o programa computacional em BASIC (ANOVA.EIA), no serviço de computação da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Preliminarmente, foi testada a homogeneidade das variâncias nos grupos. A análise de variância para experimento inteiramente aleatorizado ⁽⁷⁹⁾ possibilitou a obtenção da estatística F para o teste da hipótese de nulidade,

Ho: não existe diferença entre os grupos.

A estatística calculada teve seu valor comparado

com o respectivo F crítico para $\alpha = 0,05$, sendo significativo (caso em que se rejeitou H_0) quando o F calculado foi maior que o F crítico. Neste caso, foram efetuados os contrastes entre pares de médias pelo método de TUKEY *apud* SNEDECOR & COCHRAN⁽⁷⁹⁾, calculando-se a diferença mínima significativa.

Esta análise foi empregada para:

- verificação do efeito do volume globular, da hemoglobina, da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno e pela cistamina, em indivíduos normais da Amazônia e doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum* (Tabela 5).
- verificação do efeito do volume globular, da hemoglobina, da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno e pela cistamina, em indivíduos normais de Botucatu, Amazônia e Anhembi e em doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum* (Tabela 18).

3 - R E S U L T A D O S

3.1 - PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELA CISTAMINA

3.1.1 - AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE IDEAL DE CISTAMINA E DO TEMPO IDEAL DE INCUBAÇÃO

Os seis indivíduos estudados apresentaram média de volume globular e taxa de hemoglobina de $47,33 \pm 2,73\%$ e $15,25 \pm 1,79 \text{ g/\%}$, antes da retirada total do plasma e $49,33 \pm 3,07\%$ e $14,61 \pm 1,10 \text{ g/\%}$, após a mesma.

A quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio, aos 90 minutos de incubação na ausência do azul de metileno, foi de $20,12 \pm 1,56 \text{ mg/200 } \mu\text{l}$ e $1,35 \pm 0,30 \text{ mg/200 } \mu\text{l}$ na presença do mesmo, correspondendo a uma redução de metahemoglobina equivalente a $208,51 \pm 19,14 \text{ } \mu\text{g/min}$.

As quantidades de metahemoglobina produzidas pelo nitrito de sódio aos 60, 120, 180 e 240 minutos de incubação foram as seguintes: $19,63 \pm 1,75$; $20,41 \pm 1,98$; $19,84 \pm 3,02$ e $18,91 \pm 2,24 \text{ mg/200 } \mu\text{l}$.

Os resultados da quantidade residual de metahemoglobina, após a ativação da via das pentoses pela cistamina e a redução da metahemoglobina, acham-se expressos na Tabela 2 e Gráficos 2 e 3, cuja análise permite tecer as considerações que se seguem:

- Aos 60 minutos de incubação, a quantidade residual de metahemoglobina, após a ativação da via das pentoses com cistamina, diminuiu de 19,63 mg/200 μ l para 13,73 mg/200 μ l, para a concentração de 0,03 molar de cistamina. A partir desta concentração, os valores de metahemoglobina aumentaram para 14,64 mg/200 μ l, na concentração 0,07 molar de cistamina. A redução da metahemoglobina cresceu de 4,89 μ g/min, na concentração de 0,002 molar de cistamina, para 98,33 μ g/min, na concentração de 0,03 molar. A partir daí, houve decréscimo dos valores que atingiram 76,94 μ g/min, na concentração molar de 0,07.

- Aos 120 minutos de incubação, a quantidade residual de metahemoglobina, após ativação da via das pentoses pela cistamina, diminuiu de 20,41 mg/200 μ l para 8,26 mg/200 μ l na concentração 0,01 molar. A seguir, os valores cresceram, atingindo 14,19 mg/200 μ l na concentração de 0,07 molar de cistamina. A redução da metahemoglobina cresceu de 16,81 μ g/min, na concentração 0,002 molar de cistamina, para 99,24 μ g/min na concentração 0,02 molar. A partir daí, houve decréscimo, atingindo 51,77 μ g/min na concentração 0,07 molar.

- Aos 180 minutos de incubação, a quantidade residual de metahemoglobina diminuiu de 19,84 mg/200 μ l para 4,92 mg/200 μ l, na concentração de 0,01 molar de cistamina. Em seguida, a quantidade de metahemoglobina cresceu, atingindo 14,56 mg/200 μ l na concentração de 0,07. A redução da metahemoglobina aumentou de 30,04 μ g/min, na concentração 0,002 molar de cistamina, para 82,87 μ g/min na concentração 0,01 molar. A seguir, os valores diminuíram, atingindo 29,35 μ g/min na concentração de 0,07 molar de cistamina.

- Aos 240 minutos de incubação, a quantidade residual de metahemoglobina diminuiu de 18,91 mg/200 μ l para 2,90 mg/200 μ l, na concentração 0,01 molar de cistamina. A partir daí, os valores cresceram até 14,61 mg/200 μ l, na concentração 0,07. A redução da metahemoglobina cresceu de 20,38 μ g/min na concentração 0,002 molar de cistamina, para 66,73 μ g/min na concentração 0,01 molar. Em seguida, os valores diminuíram, atingindo 17,93 μ g/min na concentração 0,07 molar de cistamina.

- Na comparação da quantidade de metahemoglobina residual, aos 60, 120, 180 e 240 minutos de incubação, verificou-se diminuição de 19,02 mg/200 μ l, aos 60 minutos de incubação, para 14,02 mg/200 μ l, aos 240 minutos de incubação, na concentração 0,002 molar de cistamina. Esta diminuição foi mais intensa na concentração 0,01 e variou de 15,28 mg/200 μ l, aos 60 minutos de incubação, para 2,90 mg/200 μ l aos 240 minutos. A partir de 0,04 molar de concentração de cistamina, praticamente não houve redução de metahemoglobina.

- Na comparação da redução de metahemoglobina, aos 60, 120, 180 e 240 minutos de incubação verificou-se que, nas concentrações 0,002, 0,004, 0,006 e 0,008 molar, a maior redução foi observada aos 180 minutos. Para as concentrações 0,01 e 0,02 molar, a maior redução de metahemoglobina foi observada aos 120 minutos de incubação. Nas demais concentrações, a maior redução da metahemoglobina foi verificada aos 60 minutos de incubação.

TABELA 2 - Avaliação da concentração ideal de cistamina em hemácias lavadas de 6 indivíduos normais de Botucatu, de acordo com a quantidade residual de metahemoglobina e a redução da metahemoglobina após 60, 120, 180 e 240 minutos de incubação.

CONCENTRAÇÃO FINAL DE CISTAMINA (MOLAR)	QUANTIDADE RESIDUAL DE METAHEMOGLOBINA (mg/200 µl)				REDUÇÃO DE METAHEMOGLOBINA (µg/min)			
	TEMPO DE INCUBAÇÃO (MINUTOS)				TEMPO DE INCUBAÇÃO (MINUTOS)			
	60	120	180	240	60	120	180	240
0,002	19,02 ± 2,82	18,39 ± 2,78	14,43 ± 1,54	14,02 ± 2,41	4,89 ± 20,71	16,81 ± 8,32	30,04 ± 15,62	20,38 ± 3,22
0,004	17,62 ± 1,87	14,97 ± 2,17	11,05 ± 1,61	9,49 ± 2,04	33,38 ± 13,33	45,30 ± 10,63	48,85 ± 16,43	39,25 ± 12,88
0,006	17,09 ± 2,62	12,73 ± 3,21	7,48 ± 1,45	5,30 ± 1,51	42,58 ± 32,29	63,94 ± 17,29	68,67 ± 14,64	56,72 ± 8,49
0,008	15,90 ± 1,63	10,90 ± 2,67	5,70 ± 0,99	3,66 ± 0,70	62,24 ± 21,66	77,83 ± 15,30	78,55 ± 18,66	63,55 ± 9,44
0,01	15,28 ± 0,58	8,26 ± 1,88	4,92 ± 0,88	2,90 ± 0,64	72,52 ± 20,43	88,70 ± 12,86	82,87 ± 14,87	66,73 ± 8,70
0,02	14,15 ± 3,41	8,50 ± 2,41	4,96 ± 1,34	4,57 ± 1,09	91,38 ± 39,86	99,24 ± 11,36	82,69 ± 15,29	59,76 ± 7,30
0,03	13,73 ± 2,97	9,25 ± 3,02	8,44 ± 1,91	8,42 ± 1,85	98,33 ± 43,43	92,96 ± 12,54	63,32 ± 13,79	43,73 ± 11,26
0,04	14,05 ± 3,96	12,03 ± 2,83	10,74 ± 2,14	11,60 ± 1,76	93,05 ± 62,61	69,78 ± 10,47	50,57 ± 13,30	30,47 ± 5,38
0,07	14,64 ± 3,33	14,19 ± 2,27	14,56 ± 1,83	14,61 ± 1,49	76,94 ± 52,59	51,77 ± 10,39	29,35 ± 14,03	17,93 ± 7,63

QUANTIDADE RESIDUAL DE METAHEMOGLOBINA
(mg/200 μ l)

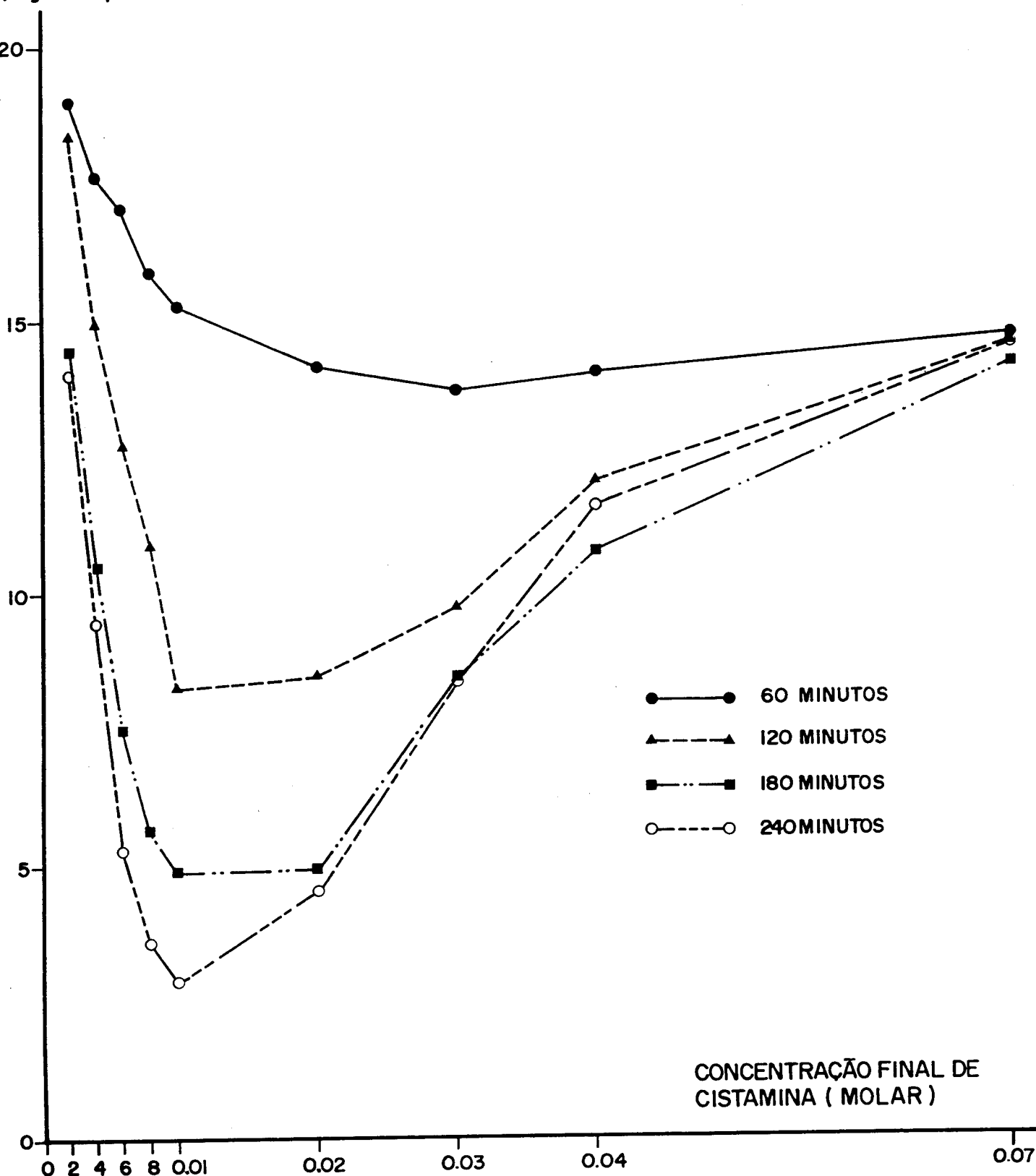


GRÁFICO 2 - Avaliação da quantidade residual de metahemoglobina em hemácias lavadas de 6 indivíduos normais de Botucatu, de acordo com a concentração de cistamina e o tempo de incubação.

REDUÇÃO DA
METAHEMOGLOBINA
($\mu\text{g}/\text{min}$)

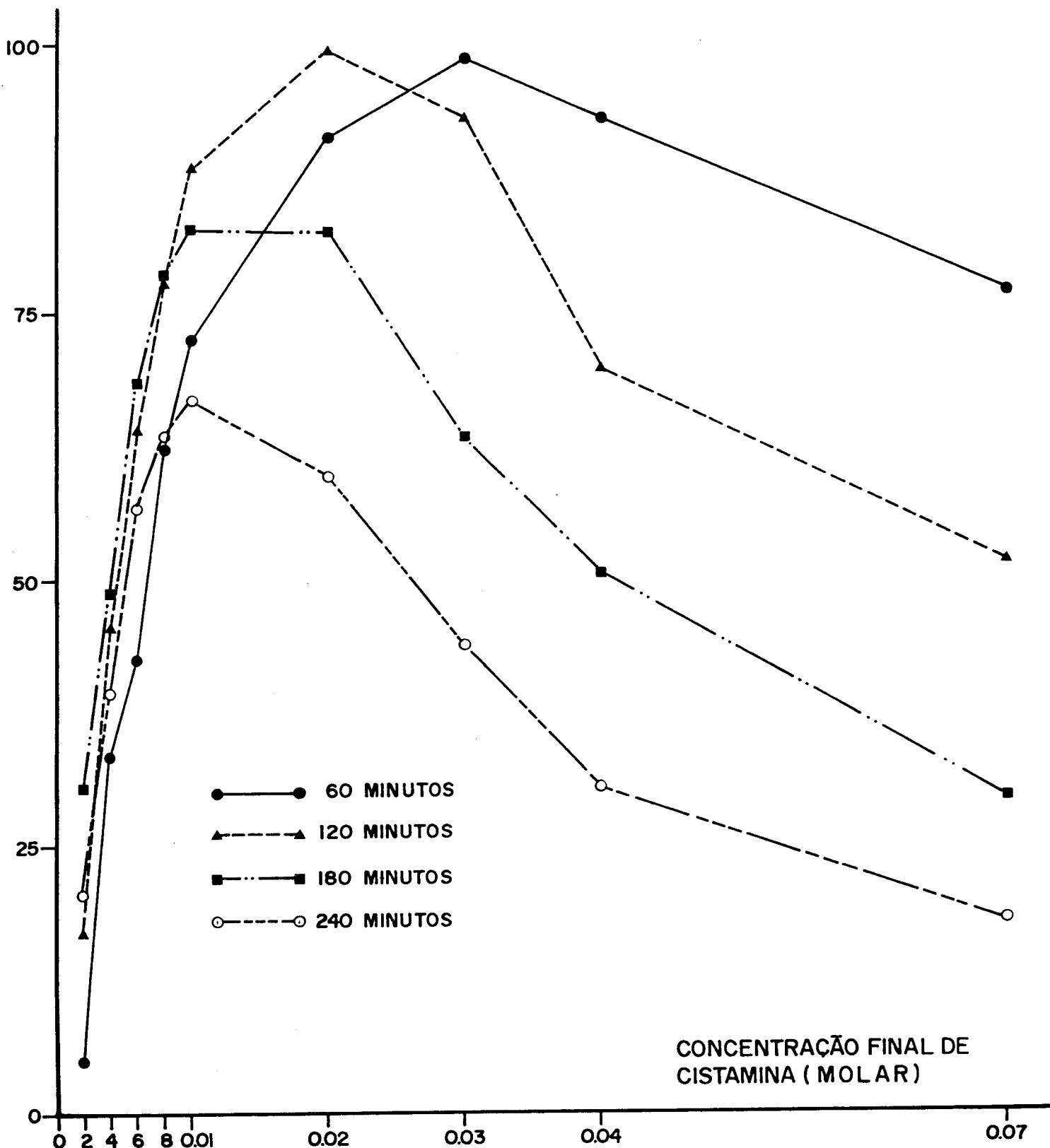


GRÁFICO 3 - Avaliação da concentração ideal de cistamina em hemácias lavadas de 6 indivíduos normais de Botucatu, de acordo com a redução da metahemoglobina e o tempo de incubação.

3.1.2 - PADRONIZAÇÃO DOS VALORES NORMAIS DO MÉTODO

Os resultados dos 26 indivíduos escolhidos para a padronização do método encontram-se nas Tabelas 3 e 4, cuja análise permite considerar que:

- O volume globular e as taxas de hemoglobina, antes e após a retirada do plasma, foram maiores nos indivíduos do sexo masculino, quando comparados com os do feminino.

- A quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio aos 90 minutos de incubação, bem como a quantidade residual de metahemoglobina após ativação da via das pentoses com azul de metileno e a redução da metahemoglobina pelo azul de metileno foram semelhantes, quando comparados os indivíduos do sexo masculino com os do feminino.

- A quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio aos 180 minutos de incubação e a redução de metahemoglobina pela cistamina foram maiores nos indivíduos do sexo feminino, quando comparados com os do masculino. Não houve diferença na quantidade residual de metahemoglobina, após a ativação da via das pentoses pela cistamina, na comparação dos indivíduos pelo sexo.

TABELA 3 - Distribuição do volume globular, da hemoglobina, da quantidade de metahemoglobina e da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno e cistamina, em hemácias lavadas de 26 indivíduos normais de Botucatu, de acordo com o sexo.

S E X O	SANGUE TOTAL		HEMÁCIAS LAVADAS		T E M P O			I N C U B A Ç Ã O		
	(A)	(B)	(C)	(D)	90 minutos (E)			180 minutos (F)		
	VOLUME GLOBULAR	HEMOGLO BINA	VOLUME GLOBULAR	HEMOGLO BINA	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA (mg/200 µl)		RM	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA (mg/200 µl)		RM
	(%)	(g/%)	(%)	(g/%)	NS	AZ	(µg/min)	NS	Ci	(µg/min)
MASCULINO	49,84 ±	15,82 ±	51,92 ±	15,05 ±	20,61 ±	1,05 ±	216,91 ±	19,46 ±	4,83 ±	81,27 ±
(I)	3,07	1,03	2,25	0,91	1,85	0,28	20,50	2,08	1,29	9,54
FEMININO	44,46 ±	14,12 ±	47,92 ±	13,86 ±	19,40 ±	1,09 ±	203,39 ±	21,42 ±	5,02 ±	91,13 ±
(II)	5,04	1,21	3,49	0,78	1,77	0,31	18,67	1,69	0,80	6,90

NS = nitrito de sódio AZ = azul de metileno Ci = Cistamina RM = redução da metahemoglobina
 I = n: 13 indivíduos II = n: 13 indivíduos

TABELA 4 - Análise estatística, pelo teste "t", dos resultados expressos na Tabela 3.

TESTE "t" INDEPENDENTE I x II	ESTATÍSTICA	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA	COMENTÁRIOS
A I x A II	t = 3,28*	p < 0,01	A I > A II
B I x B II	t = 3,87*	p < 0,01	B I > B II
C I x C II	t = 3,43*	p < 0,01	C I > C II
D I x D II	t = 3,56*	p < 0,01	D I > D II
ENS I x ENS II	t = 1,70	p = 0,10	ENS I = ENS II
EAZ I x EAZ II	t = 0,34	p > 0,50	EAZ I = EAZ II
ERM I x ERM II	t = 1,75	0,05 < p < 0,10	ERM I = ERM II
FNS I x FNS II	t = 2,63*	p < 0,01	FNS I < FNS II
FCi I x FCi II	t = 0,45	p > 0,50	FCi I = FCi II
FRM I x FRM II	t = 3,02*	p < 0,001	FRM I < FRM II

* Significativo para $\alpha = 0,05$

3.2 - ESTUDOS REALIZADOS NA REGIÃO DE HUMAITÁ

3.2.1 - AVALIAÇÃO DOS VALORES DO VOLUME GLOBULAR, TAXAS DE HEMOGLOBINA, REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELO AZUL DE METILENO E PELA CISTAMINA, EM AMAZÔNIDES NORMAIS E DOENTES COM MALÁRIA

A comparação entre os amazônides normais e os doentes com malária revelou que, tanto os valores do volume globular, quanto as taxas de hemoglobina foram maiores nos primeiros. Entre os últimos não houve diferença na comparação.

Os resultados deste estudo encontram-se nas Tabelas 5 e 6, cuja análise permite tecer os comentários:

- A quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio, tanto aos 90, quanto aos 180 minutos de incubação, foi menor nos amazônides normais. Não houve diferença na quantidade de metahemoglobina entre os doentes estudados.

- Quando se ativou a via das pentoses com azul de metileno, a quantidade residual de metahemoglobina foi semelhante na comparação entre os amazônides normais e os doentes com malária. Entre estes últimos não houve diferença nos resultados obtidos.

- Quando se ativou a via das pentoses com a cistamina, não houve diferença na quantidade residual de metahemoglobina na comparação entre os amazônides normais e os amazônides doentes. A quantidade residual de metahemoglobina foi menor nos doentes não amazônides, quando comparada com a dos indivíduos normais e a dos demais doentes.

- A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno foi menor nos amazônides normais, quando comparada com a dos doentes. Entre estes últimos não houve diferença.

- A redução da metahemoglobina pela cistamina foi maior nos doentes não amazônides, quando comparada com a dos indivíduos normais e a dos doentes amazônides. Os resultados foram semelhantes na comparação entre amazônides normais e amazônides doentes.

TABELA 5 - Distribuição do volume globular, da hemoglobina, da quantidade de metahemoglobina e da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno e cistamina, em hemácias lavadas de 41 indivíduos do sexo masculino: 11 amazônides normais (I) e 30 doentes, com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, dos quais 19 amazônides (II) e 11 não amazônides (III).

GRUPOS ESTUDA DOS	SANGUE TOTAL		HEMÁCIAS LAVADAS		TEMPO DE			INCUBAÇÃO		
	(A)	(B)	(C)	(D)	.90 minutos (E)			180 minutos (F)		
	VOLUME GLOBULAR	HEMOGLO BINA	VOLUME GLOBULAR	HEMOGLO BINA	QUANTIDADE DE METAHE- MOGLOBINA (mg/200 µl)		RM	QUANTIDADE DE METAHE- MOGLOBINA (mg/200 µl)		RM
	(%)	(g/%)	(%)	(g/%)	NS	AZ	(µg/min)	NS	Ci	(µg/min)
(I)	45,09 ±	14,02 ±	38,27 ±	12,06 ±	16,23 ±	1,35 ±	165,43 ±	16,62 ±	10,06 ±	36,46 ±
	4,39	1,29	4,64	1,47	1,49	0,31	18,39	0,92	4,75	28,13
(II)	35,42 ±	11,21 ±	40,52 ±	12,69 ±	18,20 ±	1,10 ±	189,94 ±	18,45 ±	11,84 ±	36,56 ±
	7,52	2,12	3,02	1,13	1,93	0,31	21,01	1,68	5,72	26,90
(III)	37,18 ±	11,47 ±	41,81 ±	13,48 ±	18,33 ±	1,08 ±	191,61 ±	18,23 ±	4,61 ±	75,69 ±
	6,19	2,04	4,46	1,69	1,27	0,42	12,03	1,57	2,54	14,07

NS = nitrito de sódio

AZ = azul de metileno

Ci = Cistamina

RM = redução da metahemoglobina

TABELA 6 - Análise estatística, pelo teste "F", dos resultados expressos na Tabela 5.

TESTE "F" (F crit. = 3,25)	ESTATÍSTICA	COMENTÁRIOS
I x II x III		
A I x A II x A III	F = 8,06*	A I > (A II = A III)
B I x B II x B III	F = 8,10*	B I > (B II = B III)
C I x C II x C III	F = 2,34	C I = C II = C III
D I x D II x D III	F = 2,87	D I = D II = D III
ENS I x ENS II x ENS III	F = 5,87*	ENS I < (ENS II = ENS III)
EAZ I x EAZ II x EAZ III	F = 2,08	EAZ I = EAZ II = EAZ III
ERM I x ERM II x ERM III	F = 7,58*	ERM I < (ERM II = ERM III)
FNS I x FNS II x FNS III	F = 5,59*	FNS I < (FNS II = FNS III)
FCi I x FCi II x FCi III	F = 7,97*	(FCi I = FCi II) > FCi III
FRM I x FRM II x FRM III	F = 10,25*	(FRM I = FRM II) < FRM III

* Significativo para $\alpha = 0,05$

3.2.2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO DA MALÁRIA SOBRE VOLUME GLOBULAR, TAXAS DE HEMOGLOBINA, E REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELO AZUL DE METILENO E PELA CISTAMINA, NOS DOENTES AMAZÔNIDES

O volume globular e as taxas de hemoglobina foram maiores antes do tratamento, tanto no grupo que recebeu clindamicina, quanto no que foi tratado pela associação clindamicina e cloroquina. A estatística, porém, foi significativa apenas no grupo dos doentes tratados pela associação cloroquina e clindamicina.

Os resultados dos 17 doentes amazônides estudados encontram-se nas Tabelas 7, 8 e 9 e sua análise revela:

- Não houve diferença na quantidade de metahemoglobina formada pelo nitrito de sódio, tanto aos 90 quanto aos 180 minutos de incubação. Também não houve diferença na quantidade residual de metahemoglobina, após a estimulação da via das pentoses pelo azul de metileno, nem quando se estimulou a via das pentoses pela cistamina.

- A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno foi semelhante na comparação entre os valores pré e pós tratamento. O mesmo aconteceu com a redução da metahemoglobina pela cistamina.

TABELA 7 - Distribuição do volume globular, da hemoglobina, da quantidade de metahemoglobina e da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno e cistamina, antes e após o tratamento de 17 doentes amazônides do sexo masculino, com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, dos quais 6 foram tratados pela clindamicina e 11 pela associação clindamicina e cloroquina.

TRATAMENTO		SANGUE TOTAL		HEMÁCIAS LAVADAS		TEMPO		DE	INCUBAÇÃO			
		(A)	(B)	(C)	(D)	90 minutos (E)			180 minutos (F)			
		VOLUME GLOBULAR	HEMOGLOBINA	VOLUME GLOBULAR	HEMOGLOBINA	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA (mg/200 µl)			RM	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA (mg/200 µl)		RM
		(%)	(g/%)	(%)	(g/%)	NS	AZ		(µg/min)	NS	CI	(µg/min)
CLINDAMICINA	(I) ANTES	33,16 ± 5,77	10,41 ± 1,50	41,00 ± 3,16	12,53 ± 1,37	17,78 ± 1,37	0,93 ± 0,22	187,27 ± 16,08	17,77 ± 1,28	10,25 ± 4,38	41,77 ± 26,70	
	(II) APÓS	31,00 ± 6,48	9,66 ± 1,41	39,50 ± 2,34	12,22 ± 1,58	16,98 ± 0,90	0,91 ± 0,25	178,56 ± 9,83	17,24 ± 1,55	7,13 ± 3,76	56,16 ± 28,81	
CLINDAMICINA E CLO-ROQUINA	(III) ANTES	37,36 ± 6,20	11,65 ± 2,25	40,00 ± 3,25	12,79 ± 1,04	18,18 ± 2,06	1,15 ± 0,34	189,28 ± 22,21	18,45 ± 2,00	13,04 ± 5,47	30,04 ± 22,39	
	(IV) APÓS	34,36 ± 4,75	10,61 ± 1,54	41,18 ± 3,02	12,81 ± 1,45	18,10 ± 2,53	0,97 ± 0,32	190,39 ± 26,89	18,00 ± 2,77	12,00 ± 6,79	33,83 ± 29,12	

NS = nitrito de sódio

AZ = azul de metileno

CI = Cistamina

RM = redução da metahemoglobina

TABELA 8 - Análise estatística dos resultados expressos na Tabela 7, correspondentes aos doentes amazônides tratados pela clindamicina.

TESTE "t" DEPENDENTE I x II	ESTATÍSTICA	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA	COMENTÁRIOS
A I x A II	t = 0,80	p > 0,40	A I = A II
B I x B II	t = 0,90	p > 0,40	B I = B II
C I x C II	t = 0,93	p > 0,30	C I = C II
D I x D II	t = 0,47	p > 0,50	D I = D II
ENS I x ENS II	t = 1,09	p > 0,30	ENS I = ENS II
EAZ I x EAZ II	t = 0,12	p > 0,50	EAZ I = EAZ II
ERM I x ERM II	t = 1,05	p > 0,30	ERM I = ERM II
FNS I x FNS II	t = 1,15	p = 0,30	FNS I = FNS II
FCi I x FCi II	t = 2,02	p = 0,10	FCi I = FCi II
FRM I x FRM II	t = 1,48	p = 0,20	FRM I = FRM II

* Significativo para α = 0,05

TABELA 9 - Análise estatística dos resultados expressos na Tabela 7, correspondentes aos doentes amazônides tratados pela associação clindamicina e cloroquina.

TESTE "t" DEPENDENTE III x IV	ESTATÍSTICA	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA	COMENTÁRIOS
A III x A IV	t = 2,28*	p < 0,05	A III > A IV
B III x B IV	t = 2,65*	p < 0,05	B III > B IV
C III x C IV	t = 1,13	p > 0,20	C III = C IV
D III x D IV	t = 0,04	p > 0,50	D III = D IV
ENS III x ENS IV	t = 0,18	p > 0,50	ENS III = ENS IV
EAZ III x EAZ IV	t = 1,24	p > 0,20	EAZ III = EAZ IV
ERM III x ERM IV	t = 0,24	p > 0,50	ERM III = ERM IV
FNS III x FNS IV	t = 0,44	p > 0,50	FNS III = FNS IV
FCi III x FCi IV	t = 0,77	p > 0,40	FCi III = FCi IV
FRM III x FRM IV	t = 0,55	p > 0,50	FRM III = FRM IV

* Significativo para α = 0,05

3.2.3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO DA MALÁRIA SOBRE VOLUME GLOBULAR, TAXAS DE HEMOGLOBINA, E REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELO AZUL DE METILENO E PELA CISTAMINA, NOS DOENTES NÃO AMAZÔNIDES.

O volume globular e as taxas de hemoglobina foram maiores antes do tratamento, tanto no grupo que recebeu a clindamicina, quanto no que foi tratado pela associação clindamicina e cloroquina. A análise estatística foi significativa apenas para o grupo dos doentes tratados pela clindamicina.

Os resultados dos nove doentes não amazônides estudados encontram-se nas Tabelas 10, 11 e 12, de cuja análise de preende-se que:

- Não houve diferença na quantidade de metahemoglobina formada pelo nitrito de sódio, tanto aos 90 quanto aos 180 minutos de incubação. Também não houve diferença na quantidade residual de metahemoglobina, após estimulação da via das pentoses, nem pelo azul de metileno, nem pela cistamina.

- A redução de metahemoglobina pelo azul de metileno foi maior antes do tratamento no grupo dos doentes que recebeu a associação clindamicina e cloroquina. A redução da metahemoglobina pela cistamina foi semelhante, tanto no grupo tratado pela clindamicina quanto naquele que recebeu a associação.

3.3 - ESTUDOS REALIZADOS NO MUNICÍPIO DE ANHEMBI

3.3.1 - AVALIAÇÃO DO VOLUME GLOBULAR, TAXAS DE HE MOGLOBINA, E REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELO AZUL DE METILENO E PELA CISTAMINA, EM AMOSU TRA DA POPULAÇÃO NORMAL DE ANHEMBI

Os indivíduos do sexo masculino apresentaram va
lores de volume globular e taxas de hemoglobina maiores do que
os do feminino.

Os resultados deste estudo encontram-se nas Tab
las 13 e 14 e sua análise revela que:

- A quantidade de metahemoglobina produzida pelo ni
trito de sódio, tanto aos 90 quanto aos 180 minutos de incuba
ção, foi maior nos indivíduos do sexo masculino. Ao se estimu
lar a via das pentoses com azul de metileno, a quantidade resi
dual de metahemoglobina foi semelhante e independente do sexo
considerado.

- Não houve diferença na comparação entre os se
xos para a quantidade residual de metahemoglobina, após estimu
lação da via das pentoses pela cistamina.

- A redução da metahemoglobina, tanto pelo azul
de metileno quanto pela cistamina, foi maior nos indivíduos do
sexo masculino.

TABELA 13 - Distribuição do volume globular, da hemoglobina, da quantidade de metahemoglobina e da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno e cistamina, em hemácias lavadas de 90 indivíduos normais de Anhembi, de acordo com o sexo.

S E X O	SANGUE	TOTAL	HEMÁCIAS	LAVADAS	T E M P O			D E	I N C U B A Ç Ã O		
	(A)	(B)	(C)	(D)	90 minutos (E)			180 minutos (F)			
	VOLUME GLOBULAR	HEMOGLO-BINA	VOLUME GLOBULAR	HEMOGLO-BINA	QUANTIDADE DE METAHE-MOGLOBINA (mg/200 µl)			RM	QUANTIDADE DE METAHE-MOGLOBINA (mg/200 µl)		RM
	(%)	(g/%)	(%)	(g/%)	NS	AZ	(µg/min)	NS	Ci	(µg/min)	
MASCULINO	48,20 ±	14,80 ±	49,01 ±	14,04 ±	20,74 ±	1,37 ±	215,19 ±	19,82 ±	2,76 ±	94,81 ±	
(I)	4,23	1,74	1,74	6,15	1,96	0,33	20,97	2,88	0,87	16,04	
FEMININO	40,21 ±	11,83 ±	50,14 ±	13,63 ±	18,84 ±	1,15 ±	196,53 ±	18,49 ±	3,24 ±	84,77 ±	
(II)	4,14	2,32	5,86	2,25	2,40	0,49	26,41	2,55	1,63	15,23	

NS = nitrito de sódio
I = n: 19 indivíduos

AZ = azul de metileno
II = n: 71 indivíduos

Ci = Cistamina

RM = redução da metahemoglobina

TABELA 14 - Análise estatística, pelo teste "t", dos resultados expressos na Tabela 13.

TESTE "t" INDEPENDENTE I x II	ESTATÍSTICA	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA	COMENTÁRIOS
A I x A II	t = 7,43*	p < 0,001	A I > A II
B I x B II	t = 5,21*	p < 0,001	B I > B II
C I x C II	t = 1,40	p > 0,10	C I = C II
D I x D II	t = 0,28	p > 0,50	D I = D II
ENS I x ENS II	t = 3,17*	p < 0,01	ENS I > ENS II
EAZ I x EAZ II	t = 1,85	0,05 < p < 0,10	EAZ I = EAZ II
ERM I x ERM II	t = 2,84*	p < 0,01	ERM I > ERM II
FNS I x FNS II	t = 1,96*	p = 0,05	FNS I > FNS II
FCI I x FCI II	t = 1,23	p > 0,20	FCI I = FCI II
FRM I x FRM II	t = 2,52*	p < 0,02	FRM I > FRM II

* Significativo para $\alpha = 0,05$

3.3.2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RIBOFLAVINA EM INDIVÍDUOS NÃO DEFICIENTES EM G6PD E NÃO REDUTORES DA METAHEMOGLOBINA PELA CISTAMINA, DE ACORDO COM VOLUME GLOBULAR, TAXAS DE HEMOGLOBINA E REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA

Os resultados dos dois indivíduos adultos do sexo feminino, residentes no município de Anhembi, encontram-se na Tabela 15. A análise feita indica que:

- Os valores do volume globular, taxas de hemoglobina, quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio e quantidade residual de metahemoglobina, após estimulação da via das pentoses pelo azul de metileno, foram semelhantes aos dos indivíduos normais de Botucatu. Estes resultados foram semelhantes, antes e após o tratamento pelo riboflavina.

- A quantidade residual de metahemoglobina, após estimulação da via das pentoses pela cistamina, foi maior em ambos os casos estudados, do que nos indivíduos normais de Botucatu. Estes valores normalizaram-se após o tratamento pela riboflavina.

- A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno não variou quando foram comparados os resultados obtidos, antes e após o tratamento com riboflavina.

- A redução da metahemoglobina pela cistamina nos dois indivíduos estudados foi menor do que o valor normal encontrado na população de Anhembi, à qual eles pertencem. Estes valores normalizaram-se após o tratamento pela riboflavina.

TABELA 15 - Avaliação do volume globular, da hemoglobina, da quantidade de metahemoglobina e da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno e cistamina, em 2 indivíduos do sexo feminino, residentes no município de Anhembi, não deficientes em G6PD, não redutores da metahemoglobina pela cistamina e tratados pela riboflavina.

TRATA MENTO		SANGUE	TOTAL	HEMÁCIAS	LAVADAS	TEMPO		DE	INCUBAÇÃO		
		VOLUME	HEMOGLO	VOLUME	HEMOGLO	90 minutos			180 minutos		
		GLOBULAR	BINA	GLOBULAR	BINA	QUANTIDADE	DE METAHE-	RM	QUANTIDADE	DE METAHE-	RM
		(%)	(g/%)	(%)	(g/%)	MOGLOBINA	(mg/200 µl)	(µg/min)	MOGLOBINA	(mg/200 µl)	(µg/min)
						NS	AZ		NS	Ci	
INDIV DUO 1	ANTES	36,00	11,00	40,00	11,70	20,09	0,97	212,44	18,46	10,01	46,94
	APÓS	37,00	11,20	49,00	14,20	21,37	1,17	224,44	19,07	1,07	100,00
INDIV DUO 2	ANTES	43,00	11,00	53,00	12,10	18,36	1,74	184,11	15,17	7,18	44,38
	APÓS	44,00	12,85	49,00	12,42	18,45	1,70	186,11	19,95	5,54	80,05
NS = nitrito de sódio				AZ = azul de metileno		Ci = Cistamina				RM = redução da metahemoglobina	

3.3.3 - COMPARAÇÃO ENTRE VOLUME GLOBULAR, TAXAS DE HEMOGLOBINA, REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELO AZUL DE METILENO E CISTAMINA, ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM RIBOFLAVINA EM INDIVÍDUOS DE ANHEMBI

Os resultados encontram-se expressos nas Tabelas 16 e 17, cuja análise permite considerar que:

- Os valores do volume globular foram semelhantes, antes e após o tratamento. As taxas de hemoglobina foram maiores após o tratamento com riboflavina.

- A quantidade de metahemoglobina produzida por nitrito de sódio foi maior após o tratamento, tanto aos 90 quanto aos 180 minutos de incubação.

- A quantidade residual de metahemoglobina, após estimulação da via das pentoses pelo azul de metileno, foi maior após o tratamento. Não houve diferença na quantidade residual de metahemoglobina pela estimulação da via das pentoses pela cistamina.

- A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno e pela cistamina foi maior após o tratamento com ribofla-vina.

TABELA 16 - Distribuição do volume globular, da hemoglobina, da quantidade de metahemoglobina e da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno e cistamina, em 14 indivíduos do sexo feminino residentes no município de Anhembi, antes e após o tratamento pela riboflavina.

TRATAMENTO	SANGUE TOTAL		HEMÁCIAS LAVADAS		TEMPO DE		INCUBAÇÃO			
	(A)	(B)	(C)	(D)	90 minutos (E)		180 minutos (F)			
	VOLUME GLOBULAR	HEMOGLOBINA	VOLUME GLOBULAR	HEMOGLOBINA	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA (mg/200 µl)		RM		QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA (mg/200 µl)	
	(%)	(g/%)	(%)	(g/%)	NS	AZ	(µg/min)		NS	Ci
ANTES (I)	43,78 ± 3,11	11,07 ± 0,91	55,92 ± 6,15	13,85 ± 2,53	17,92 ± 2,90	0,96 ± 0,39	188,46 ± 31,03		17,40 ± 3,03	4,13 ± 2,10
APÓS (II)	42,78 ± 3,76	12,92 ± 1,18	50,50 ± 2,82	13,55 ± 1,01	21,88 ± 1,96	1,76 ± 0,34	223,80 ± 21,79		21,45 ± 2,57	4,48 ± 1,61

NS = nitrito de sódio AZ = azul de metileno Ci = Cistamina RM = redução da metahemoglobina

TABELA 17 - Análise estatística, pelo teste "t", dos resultados expressos na Tabela 16.

TESTE "t" DEPENDENTE I x II	ESTATÍSTICA	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA	COMENTÁRIOS
A I x A II	t = 1,68	p > 0,10	A I = A II
B I x B II	t = 5,08*	p < 0,001	B I < B II
C I x C II	t = 3,99*	p < 0,001	C I > C II
D I x D II	t = 0,53	p > 0,50	D I = D II
ENS I x ENS II	t = 4,93*	p < 0,001	ENS I < ENS II
EAZ I x EAZ II	t = 4,70*	p < 0,001	EAZ I < EAZ II
ERM I x ERM II	t = 4,05*	p < 0,001	ERM I < ERM II
FNS I x FNS II	t = 3,90*	p < 0,001	FNS I < FNS II
FCi I x FCi II	t = 0,42	p > 0,50	FCi I = FCi II
FRM I x FRM II	t = 3,58*	p < 0,001	FRM I < FRM II

* Significativo para α = 0,05

3.4 - COMPARAÇÃO DO VOLUME GLOBULAR, TAXAS DE HEMOGLOBINA, E REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELO AZUL DE METILENO E CISTAMINA, ENTRE OS INDIVÍDUOS NORMAIS E DO SEXO MASCULINO, DE BOTUCATU, AMAZÔNIA E ANHEMBI E NOS DOENTES COM MALÁRIA

Os resultados deste estudo encontram-se nas Tabelas 18 e 19, e sua análise revela:

- Os valores do volume globular não diferiram nos indivíduos de Botucatu e de Anhembi, porém, foram maiores que nos doentes com malária, tanto nos amazônides quanto nos não amazônides. Os amazônides normais apresentaram valores intermediários de volume globular, não diferindo estatisticamente dos demais indivíduos normais e dos doentes.

- As taxas de hemoglobina foram maiores nos indivíduos normais de Botucatu. Os amazônides normais não diferiram dos indivíduos normais de Anhembi. Os doentes com malária apresentaram as menores taxas de hemoglobina, porém, não diferiram quando foram comparados os amazônides e os não amazônides.

- Os valores do volume globular, quando retirado o plasma e lavadas as hemácias, não diferiram nos indivíduos normais de Botucatu e de Anhembi, porém, foram maiores que nos doentes com malária e nos amazônides normais. As taxas de hemoglobina foram semelhantes entre os indivíduos normais de Botucatu e de Anhembi, porém, maiores que nos amazônides normais e nos amazônides doentes. Os doentes não amazônides não dife

riram dos demais grupos, por apresentarem valores intermediários de taxas de hemoglobina.

- A quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio foi semelhante na comparação entre os indivíduos normais de Botucatu e os de Anhembi, tanto aos 90 quanto aos 180 minutos de incubação, embora tenham sido estes os maiores valores registrados. Aos 90 minutos de incubação, os valores de metahemoglobina não diferiram nos doentes com malária, mas foram maiores que os dos amazônides normais. Aos 180 minutos de incubação, os amazônides normais e os doentes apresentaram valores que não diferiram, porém, menores que os dos indivíduos normais de Botucatu e de Anhembi.

- A quantidade residual de metahemoglobina, após estímulo da via das pentoses com azul de metileno, foi semelhante entre os indivíduos normais de Botucatu e os doentes com malária. Os indivíduos normais de Anhembi apresentaram os maiores valores residuais de metahemoglobina. Os amazônides normais apresentaram valores intermediários, não diferindo dos demais grupos.

- A quantidade residual de metahemoglobina, após estímulo da via das pentoses pela cistamina foi semelhante entre os amazônides normais e os amazônides com malária, porém, maior que nos indivíduos normais de Botucatu, de Anhembi e nos doentes não amazônides. Estes últimos apresentaram valores que não diferiram entre si.

- A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno foi semelhante entre os indivíduos normais de Botucatu e de Anhembi, tendo sido estes os maiores valores registrados. O menor valor de redução foi observado nos amazônides normais. Os doentes apresentaram valores que não diferiram entre si e intermediários entre os indivíduos normais de Botucatu e de Anhembi e os amazônides normais.

- A redução da metahemoglobina pela cistamina foi semelhante entre os indivíduos normais de Botucatu, de Anhembi e nos doentes não amazônides, tendo sido estes os maiores valores observados. Os amazônides normais e os amazônides doentes apresentaram valores que não diferiram entre si.

TABELA 18 - Distribuição do volume globular, da hemoglobina, da quantidade de metahemoglobina e da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno e cistamina, em indivíduos normais do sexo masculino de Botucatu (I), Amazônia (II) e Anhembi (III) e em doentes com malária, amazônides (IV) e não amazônides (V).

GRUPOS ESTUDA DOS	SANGUE	TOTAL	HEMÁCIAS	LAVADAS	T E M P O		D E	I N C U B A Ç Ã O		
	(A)	(B)	(C)	(D)	90 minutos (E)			180 minutos (F)		
	VOLUME GLOBULAR	HEMOGLO BINA	VOLUME GLOBULAR	HEMOGLO BINA	QUANTIDADE DE METAHE- MOGLOBINA (mg/200 µl)		RM	QUANTIDADE DE METAHE- MOGLOBINA (mg/200 µl)		RM
	(%)	(g/%)	(%)	(g/%)	NS	AZ	(µg/min)	NS	Ci	(µg/min)
(I)	49,84 ±	15,82 ±	51,92 ±	15,05 ±	20,61 ±	1,05 ±	216,91 ±	19,46 ±	4,83 ±	81,27 ±
	3,07	1,03	2,25	0,91	1,85	0,28	20,50	2,08	1,29	9,54
(II)	45,09 ±	14,02 ±	38,27 ±	12,06 ±	16,23 ±	1,35 ±	165,43 ±	16,62 ±	10,06±	36,46 ±
	4,39	1,29	4,64	1,47	1,49	0,31	18,39	0,92	4,74	28,13
(III)	48,20 ±	14,80 ±	49,01 ±	14,04 ±	20,74 ±	1,37 ±	215,19 ±	19,82 ±	2,76 ±	94,81 ±
	4,23	1,74	1,74	6,15	1,96	0,33	20,97	2,88	0,87	16,04
(IV)	35,42 ±	11,21 ±	40,52 ±	12,69 ±	18,20 ±	1,10 ±	189,94 ±	18,45 ±	11,84 ±	36,56 ±
	7,52	2,12	3,02	1,13	1,93	0,31	21,01	1,68	5,72	26,90
(V)	37,18 ±	11,74 ±	41,81 ±	13,48 ±	18,33 ±	1,08 ±	191,61 ±	18,23 ±	4,61 ±	75,69 ±
	6,19	2,04	4,46	1,69	1,27	0,42	12,03	1,57	2,54	14,07

NS = nitrito de sódio

AZ = azul de metileno

Ci = Cistamina

RM = redução da metahemoglobina

TABELA 19 - Análise estatística, pelo teste "F", dos resultados expressos na Tabela 18.

TESTE "F" (F crit. = 2,52)	ESTATÍSTICA		C O M E N T Á R I O S	
I x II x III x IV x V				
A I x A II x A III x A IV x A V	F = 25,49*	(A I = A III) > (A IV = A V)	A II = não difere dos demais	
B I x B II x B III x B IV x B V	F = 23,04*	B I > (B II = B III) > (B IV = B V)		
C I x C II x C III x C IV x C V	F = 30,52*	(C I = C III) > (C II = C IV = C V)		
D I x D II x D III x D IV x D V	F = 7,58*	(D I = D III) > (D II = D IV)	D V = não difere dos demais	
ENS I x ENS II x ENS III x ENS IV x ENS V	F = 15,10*	(ENS I = ENS III) > (ENS IV = ENS V) > ENS II		
EAZ I x EAZ II x EAZ III x EAZ IV x EAZ V	F = 3,10*	(EAZ I = EAZ IV = EAZ V) < EAZ III	EAZ II = não difere dos demais	
ERM I x ERM II x ERM III x ERM IV x ERM V	F = 15,59*	(ERM I = ERM III) > (ERM IV = ERM V) > ERM II		
FNS I x FNS II x FNS III x FNS IV x FNS V	F = 4,89*	(FNS I = FNS III) > (FNS II = FNS IV = FNS V)		
FCi I x FCi II x FCi III x FCi IV x FCi V	F = 18,74*	(FCi II = FCi IV) > (FCi I = FCi III = FCi V)		
FRM I x FRM II x FRM III x FRM IV x FRM V	F = 27,76*	(FRM I = FRM III = FRM V) > (FRM II = FRM IV)		

* Significativo para α = 0,05

3.5 - COMPARAÇÃO DO VOLUME GLOBULAR, TAXAS DE HEMOGLOBINA, REDUÇÃO DE METAHEMOGLOBINA PELO AZUL DE METILENO E PELA CISTAMINA, ENTRE OS INDIVÍDUOS DO SEXO FEMININO NORMAIS DE BOTUCATU E DE ANHEMBI

Os resultados deste estudo encontram-se expressos nas Tabelas 20 e 21. A análise das mesmas permite considerar que:

- Tanto o volume globular quanto as taxas de hemoglobina foram maiores nos indivíduos normais de Botucatu. Após a retirada do plasma e a lavagem das hemácias, não houve diferença significativa na comparação entre valores de volume globular e das taxas de hemoglobina.

- A quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio foi maior nos indivíduos de Botucatu, mas estes resultados foram significativos apenas aos 180 minutos de incubação.

- Ao se estimular a via das pentoses com azul de metileno, as quantidades residuais de metahemoglobina não diferiram na comparação entre os dois grupos.

- A quantidade residual de metahemoglobina, após a estimulação da via das pentoses com cistamina, foi maior nos indivíduos normais de Botucatu.

- A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno não diferiu na comparação entre os grupos, porém, a redução da metahemoglobina pela cistamina foi maior nos indivíduos normais de Botucatu.

TABELA 20 - Distribuição do volume globular, da hemoglobina, da quantidade de metahemoglobina e da redução de metahemoglobina pelo azul de metileno e cistamina, em indivíduos normais do sexo feminino de Botucatu (I) e Anhembi (II).

INDIVÍDUOS	SANGUE TOTAL		HEMÁCIAS LAVADAS		TEMPO DE		INCUBAÇÃO			
	(A)	(B)	(C)	(D)	90 minutos (E)		180 minutos (F)			
	VOLUME GLOBULAR	HEMOGLOBINA	VOLUME GLOBULAR	HEMOGLOBINA	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA (mg/200 µl)		RM		QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA (mg/200 µl)	
	(%)	(g/%)	(%)	(g/%)	NS	AZ	(µg/min)		NS	Ci
(I)	44,46 ±	14,12 ±	47,92 ±	13,86 ±	19,40 ±	1,09 ±	203,39 ±	21,42 ±	5,02 ±	91,13 ±
	5,04	1,21	3,49	0,78	1,77	0,31	18,67	1,69	0,80	6,90
(II)	40,21 ±	11,83 ±	50,14 ±	13,63 ±	18,84 ±	1,15 ±	196,53 ±	18,49 ±	3,24 ±	84,77 ±
	4,14	2,32	5,86	2,25	2,40	0,49	26,41	2,55	1,63	15,23

NS = nitrito de sódio AZ = azul de metileno Ci = Cistamina RM = redução da metahemoglobina
 I = n: 13 indivíduos II = n: 71 indivíduos

TABELA 21 - Análise estatística, pelo teste "t", dos resultados expressos na Tabela 20.

TESTE "t" INDEPENDENTE I x II	ESTATÍSTICA	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA	COMENTÁRIOS
A I x A II	t = 3,29*	p < 0,01	A I > A II
B I x B II	t = 5,29*	p < 0,001	B I > B II
C I x C II	t = 1,32	p > 0,10	C I = C II
D I x D II	t = 0,67	p > 0,50	D I = D II
ENS I x ENS II	t = 0,80	p > 0,40	ENS I = ENS II
EAZ I x EAZ II	t = 0,42	p > 0,50	EAZ I = EAZ II
ERM I x ERM II	t = 0,89	p > 0,30	ERM I = ERM II
FNS I x FNS II	t = 3,97*	p < 0,001	FNS I > FNS II
FCi I x FCi II	t = 6,07*	p < 0,001	FCi I > FCi II
FRM I x FRM II	t = 2,43*	p < 0,05	FRM I > FRM II

* Significativo para α = 0,05

3.6 - AVALIAÇÃO DO VOLUME GLOBULAR, TAXAS DE HEMOGLOBINA E REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELO AZUL DE METILENO E CISTAMINA, EM INDIVÍDUOS DEFICIENTES EM G6PD

O único doente com malária causada pelo *Plasmodium falciparum* que apresentou deficiência em G6PD, era do sexo masculino, com 24 anos de idade, natural do Estado do Acre e garimpeiro. Do ponto de vista clínico, foi considerado com forma leve da doença, tendo sido tratado pela clindamicina, com remissão da sintomatologia e desaparecimento da parasitemia as sexuada no 3º dia. Os resultados deste estudo encontram-se na Tabela 22, permitindo tecer as seguintes considerações:

- O volume globular e as taxas de hemoglobina foram maiores antes do tratamento com clindamicina. Os resultados do volume globular e taxas de hemoglobina não diferiram após a lavagem das hemácias e a retirada do plasma.

- A quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio, tanto aos 90 quanto aos 180 minutos de incubação, não diferiu tanto no pré, quanto no pós tratamento. Estes valores foram semelhantes aos dos demais indivíduos normais estudados.

- Ao se estimular a via das pentoses com azul de metileno, a quantidade residual de metahemoglobina foi de 14,13 mg/200 µl e 12,80 mg/200 µl, respectivamente, no pré e pós tratamento. Estes resultados foram diferentes dos encontrados nos demais indivíduos normais estudados.

- Os valores encontrados da quantidade residual de metahemoglobina, após estimulação da via das pentoses pela cistamina, foram de 16,88 mg/200 μ l e 15,70 mg/200 μ l, respectivamente, no pré e pós tratamento. Estes resultados foram diferentes dos obtidos nos demais indivíduos normais estudados.

- A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno foi de 40,66 μ g/min e 63,33 μ g/min, respectivamente, no pré e pós tratamento. Estes resultados foram diferentes daqueles observados nos demais indivíduos normais e doentes estudados.

- A redução da metahemoglobina pela cistamina também não diferiu quando se considerou o pré e o pós tratamento, porém, os valores encontrados foram diferentes daqueles obtidos nos indivíduos normais de Botucatu.

Foi estudado, também, outro indivíduo com deficiência de G6PD, do sexo feminino, natural do município de Anhembi, com 28 anos de idade. Em relação a este indivíduo e com base nos resultados apresentados na Tabela 22 pode-se considerar que:

- Os valores do volume globular e das taxas de hemoglobina foram menores neste indivíduo, quando comparados aos do doente com malária e deficiente em G6PD.

- A quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio neste indivíduo foi semelhante à do doente, tanto aos 90 quanto aos 180 minutos de incubação.

- Ao se estimular a via das pentoses com azul de metileno a quantidade residual de metahemoglobina foi de 7,06 mg/200 μ l. Este valor foi menor que o observado no doente com deficiência de G6PD, porém, maior do que nos demais indivíduos normais estudados.

- Ao se estimular a via das pentoses pela cistamina, a quantidade residual de metahemoglobina encontrada foi de 9,42 mg/200 μ l. Este valor foi menor que o verificado no doente deficiente em G6PD, contudo, maior do que nos indivíduos normais de Botucatu.

- A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno foi maior que o verificado no doente deficiente em G6PD, porém, menor que o observado nos indivíduos normais e nos demais doentes.

- A redução da metahemoglobina pela cistamina também foi maior que a verificada no doente deficiente em G6PD, porém, menor que nos indivíduos normais e nos demais doentes.

TABELA 22 - Avaliação do volume globular, da hemoglobina, da quantidade de metahemoglobina e da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno e cistamina em um doente amazônide do sexo masculino, com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, tratado pela clindamicina (I) e em um indivíduo do sexo feminino, residente no município de Anhembi (II), deficientes em G6PD.

DEFI CIEN TES EM	TRATA MENTO	SANGUE TOTAL		HEMÁCIAS LAVADAS		TEMPO		DE	INCUBAÇÃO		
		VOLUME GLOBULAR (%)	HEMOGLO BINA (g/%)	VOLUME GLOBULAR (%)	HEMOGLO BINA (g/%)	90 minutos		RM (µg/min)	180 minutos		RM (µg/min)
						QUANTIDADE DE METAHE- MOGLOBINA (mg/200 µl)			QUANTIDADE DE METAHE- MOGLOBINA (mg/200 µl)		
						NS	AZ		NS	Ci	
G6PD											
(I)	PRÉ	44,00	13,20	39,00	12,73	17,79	14,13	40,66	18,91	16,88	11,27
	PÓS	33,00	11,90	40,00	14,16	18,50	12,80	63,33	18,50	15,70	15,55
(II)	-	42,00	10,00	64,00	15,70	17,78	7,06	119,11	17,69	9,42	45,94
NS = nitrito de sódio		AZ = azul de metileno		Ci = Cistamina		RM = redução da metahemoglobina					

4 - D I S C U S S Ã O

As pesquisas sobre a ação da cistamina na molécula de hemoglobina desenvolveram-se muito na área das hemoglobinopatias S (15,16,45). A cistamina interage com a molécula de hemoglobina, ligando-se aos grupos SH da cisteína 93 das cadeias beta. A partir daí ocorrem modificações importantes na molécula de hemoglobina, tais como: aumento da afinidade pelo oxigênio, alteração na mobilidade eletroforética da hemoglobina modificada e formação de complexos. Em última análise, este agente tiol tem a capacidade de atuar "in vitro", evitando que os eritrócitos de doentes com hemoglobina S se tornem falciformes (15,16,45).

Os complexos formados pela cistamina, denominados S-etil-amina hemoglobina (15,16,45), são revertidos pela ação indireta da glutathione redutase, em presença da glutathione reduzida e NADPH (15,16,45). A glutathione redutase, por sua vez, necessita de quantidades adequadas da coenzima flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), derivada da riboflavina, para o seu funcionamento completo (13,34,65,66,85,90). Ainda assim, é necessário que o meio de estudo possua glicose em quantidade suficiente e que a hemácia não seja deficiente em glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (8,13,15,16,20,21,34,45,56,83,90). Uma das funções importantes da G6PD é a manutenção de níveis adequados de NADPH, para o bom funcionamento da via das pentoses e da glutathione redutase (13,34,75).

A redução da metahemoglobina tem sido muito estudada com a finalidade de se avaliar a atividade da via das pentoses, utilizando-se o azul de metileno como agente estimulante (6,13,20,21,34,56,59). Esta redução da metahemoglobina pela via das pentoses está bem estabelecida e permite verificar a atividade da G6PD (6,13,20,21,34,56,59). A ausência desta enzima é capaz de alterar o funcionamento de todo sistema enzimático dependente da via das pentoses (6,13,20,21,34,56,59).

Entre as vias de redução da metahemoglobina, a glutathiona redutase e a glutathiona reduzida contribuem com 12% desta atividade (13,34). Apesar disto, a principal função da glutathiona redutase no interior dos eritrócitos é a manutenção da integridade dos grupos SH das proteínas (13,15,16,34,45,49,64,77,78,90).

Os métodos empregados para estudar a atuação da glutathiona redutase "in vitro", além de complexos, são bastante dispendiosos. Assim é que, um dos objetivos deste trabalho foi o de padronizar novo método, ainda que indireto, pouco dispendioso e que pudesse ser aplicado em estudo de campo, a fim de poder verificar a atividade desta enzima. Para tanto, foi utilizada a cistamina como agente estimulante da via das pentoses. Esta é capaz de, "in vitro", oxidar a glutathiona reduzida que, por sua vez, é substrato para a glutathiona redutase.

O método padronizado em indivíduos normais de Botucatu e não deficientes em G6PD permitiu verificar que a cistamina tem capacidade de reduzir metahemoglobina para hemoglobina. Como todo sistema enzimático, há necessidade de se ava

liar a faixa ideal de atuação da cistamina, na qual a intera
ção entre substrato e enzima estejam dentro dos limites ideais.

Para tanto, foi necessário verificar as concen
trações ideais de cistamina, observando-se que, entre 0,008 e 0,03 molar, o sistema apresentou os pontos ideais de concentra
ção desta droga. Nesta faixa de concentração foram verificados os maiores valores de redução da metahemoglobina pela cistami
na.

Outro fator importante no estudo foi o tempo ideal de incubação. Utilizando-se quatro tempos, a saber: 60, 120, 180 e 240 minutos, verificou-se que, na concentração 0,03 molar, o tempo ideal de incubação foi de 60 minutos; na de 0,02 molar, 120 minutos e na de 0,01 molar, 180 e 240 minutos de incubação.

As menores concentrações residuais de metahemo globina, após o estímulo com cistamina, foram verificadas na concentração 0,01 molar, tanto aos 120, quanto aos 180 e aos 240 minutos de incubação. Os valores observados de metahemo globina residual aos 180 e 240 minutos de incubação foram seme
lhantes. É importante ressaltar que, na concentração 0,01 mo
lar, foi verificado o menor valor de desvio padrão, para qual quer tempo de incubação estudado. Optou-se, então, pela padro
nização do método na concentração final de 0,01 molar de cista
mina e no tempo de 180 minutos de incubação.

O método foi padronizado em estudantes normais da Faculdade de Medicina de Botucatu e os valores do volume

globular e das taxas de hemoglobina foram maiores nos indivíduos do sexo masculino. Estes dados concordam com os de outros autores (6,58,83) e são considerados clássicos.

A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno aos 90 minutos de incubação, de acordo com o método de BREWER et alii (20,21) e modificado por BARRAVIERA (6), revelou que não houve diferença estatisticamente significativa quando se considerou o sexo, confirmando os achados preliminares do autor (6).

A redução da metahemoglobina pela cistamina nos indivíduos do sexo feminino foi maior que nos do masculino. Este achado correspondeu provavelmente à maior formação inicial de metahemoglobina nos indivíduos do sexo feminino.

BARRAVIERA, em estudo anterior (6), demonstrou haver correlação positiva entre quantidade inicial de hemoglobina e formação de metahemoglobina pelo nitrito de sódio. Dessa maneira, os indivíduos do sexo masculino formam maior quantidade de metahemoglobina após incubação com o nitrito de sódio, por apresentarem concentrações mais elevadas de hemoglobina.

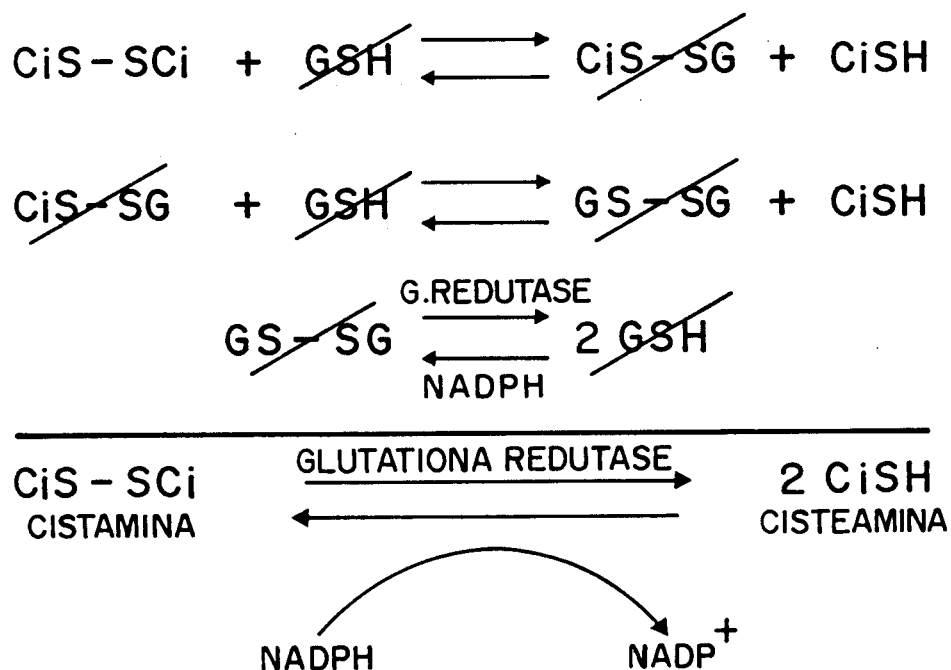
Estes resultados discordaram dos achados anteriormente descritos (6), provavelmente porque os indivíduos do sexo feminino agora estudados, apresentaram taxas de hemoglobina muito próximas às dos do sexo masculino.

Os valores médios da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno obtidos pelo emprego do método anteriormente padronizado por BARRAVIERA (6) foram de $216,91 \pm 20,50 \mu\text{g/}$

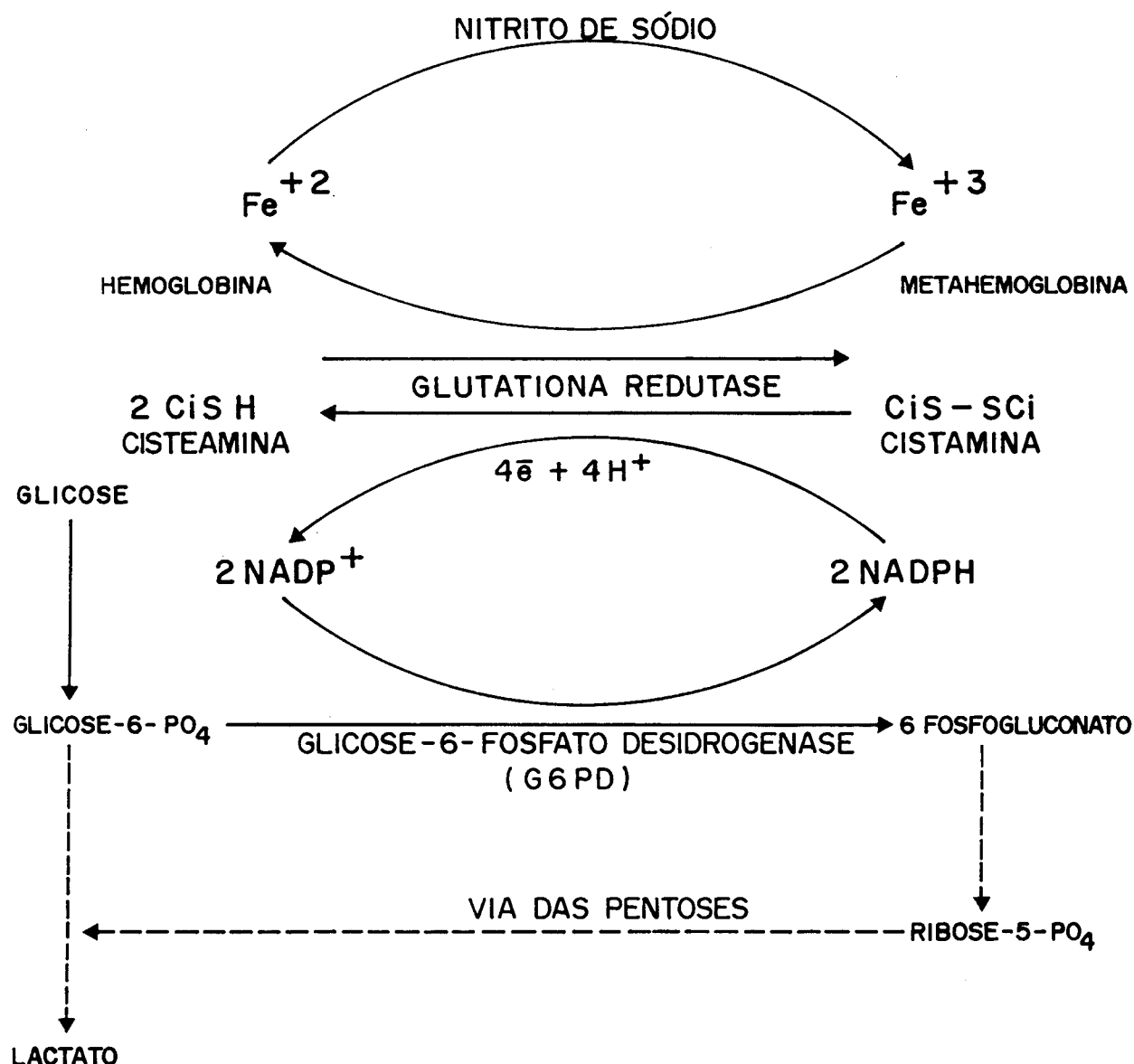
min, para os indivíduos do sexo masculino e de $203,39 \pm 18,67 \mu\text{g}/\text{min}$, para os do sexo feminino. Os valores médios da redução da metahemoglobina pela cistamina, obtidos no presente estudo, foram de $81,27 \pm 9,54 \mu\text{g}/\text{min}$ e de $91,13 \pm 6,90 \mu\text{g}/\text{min}$, respectivamente para os indivíduos do sexo masculino e feminino.

A comparação entre os resultados obtidos pelos dois métodos permite sugerir que o primeiro é cerca de três vezes mais eficaz que o segundo, na redução da metahemoglobina. Esta diferença é devida à maior capacidade de estimulação da via das pentoses pelo azul de metileno (13,34).

Deve ser realçado, entretanto, que as vias estudadas são diferentes, ou seja, o azul de metileno é estimulante direto da via das pentoses (6,13,34), enquanto a cistamina atua indiretamente através do sistema da glutathiona redutase, pela oxidação da glutathiona reduzida (15,16,45), de acordo com o esquema abaixo:



Essas observações, bem como as referidas por outros autores (15,16,45), permitem sugerir que a cistamina é capaz de reduzir a metahemoglobina à hemoglobina, pela glutathion redutase, permitindo postular-se que a reação que ocorre no interior do eritrócito obedece ao esquema proposto abaixo:



O método assim padronizado foi empregado em área endêmica de malária, com a finalidade de verificar possível efeito da malária sobre a redução da metahemoglobina pela cis-

tamina. O estudo foi realizado em indivíduos amazônides normais e doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*.

O estudo do volume globular e das taxas de hemoglobina revelou que os amazônides normais apresentaram valores maiores que os doentes com malária. Estes resultados estão de acordo com os observados por outros autores^(1,6,9,23,39,63,91).

Os amazônides normais apresentaram menor redução da metahemoglobina pela via das pentoses, quando esta foi estimulada pelo azul de metileno. É possível que estes resultados sejam decorrentes da menor formação de metahemoglobina pelo nitrito de sódio observado nesses indivíduos. Em favor desta hipótese, verificou-se que as taxas de hemoglobina, após a lavagem das hemácias, também foram menores naquele grupo. Esses achados em conjunto, isto é, menores taxas de hemoglobina e menor quantidade de metahemoglobina formada pelo nitrito de sódio, contribuíram sobremaneira para que se verificasse menor valor para a redução da metahemoglobina pelo azul de metileno. Tais resultados concordam com os verificados anteriormente por BARRAVIERA⁽⁶⁾.

Ainda em relação ao estudo da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno, deve ser destacado que, entre os doentes amazônides, foi encontrado um com deficiência em G6PD.

SWARUP-MITRA et alii⁽⁸²⁾, estudando doentes com malária causada pelo *Plasmodium vivax*, encontraram níveis menores de glutathiona reduzida, bem como atividade diminuída da

glutathione reductase. Verificaram ainda, que, após o tratamento com cloroquina, houve normalização dos valores da glutathione reductase e da atividade da glutathione reductase. Por esta razão, tentaram demonstrar, "in vivo", as possíveis alterações estabelecidas "in vitro" pelo *Plasmodium falciparum* no sistema da glutathione reductase.

SHAKESPEARE et alii ⁽⁷⁴⁾, estudando hemácias de macacos infectados pelo *Plasmodium knowlesi*, observaram aumento da atividade da via das pentoses nos eritrócitos parasitados. Além disso, tem sido demonstrado ^(25,71,72) que o *Plasmodium falciparum* utiliza NADPH para o seu metabolismo, sendo esta uma coenzima reduzida na via das pentoses. O consumo de NADPH gera, no interior do eritrócito, um estado oxidativo importante ^(25,71,72,84) diminuindo a redução da glutathione oxidada pela glutathione reductase. Assim sendo, ocorre acúmulo de glutathione oxidada no interior da hemácia ⁽⁵⁷⁾.

Por outro lado, o indivíduo deficiente em G6PD produz quantidades diminuídas de NADPH ^(6,13,20,21,34,56,59). Quando estes eritrócitos são parasitados pelos plasmódios, o parasita compete com a hemácia na utilização do NADPH ^(26,60), resultando, em última análise, acúmulo de glutathione oxidada ⁽²⁶⁾. A oxidação dos grupos SH intraeritrocitários, por sua vez, é capaz de inibir "in vitro" a síntese protéica ^(26,29,38,57).

É possível que o conjunto de fatores, isto é, a diminuição do NADPH e o aumento da glutathione oxidada, contribuam para a inibição do crescimento e desenvolvimento do parasita no interior do eritrócito deficiente em G6PD.

É importante ressaltar que, "in vitro", em cultura contínua, consegue-se parasitar até 80% dos eritrócitos presentes no meio de estudo (71,88). Com essa densidade parasitária é possível evidenciar alterações significativas na via das pentoses e na glutationala redutase. Porém, nos doentes que apresentam formas graves de malária, com as maiores taxas de parasitemia, não se observam densidades tão elevadas. Nos doentes é difícil verificar-se alterações na via das pentoses e na glutationala redutase, pois, as hemácias não parasitadas no sangue superam em muito as parasitadas.

SWARUP-MITRA et alii (82), além de não terem observado doentes com infecção causada pelo *Plasmodium falciparum*, escolheram grupo controle de indivíduos não residentes em área endêmica de malária. Por esta razão, suas conclusões foram prejudicadas, embora tenham sugerido alterações na quantidade de glutationala reduzida e na atividade de glutationala redutase, que interpretaram como sendo devidas à malária. Nessas condições, é possível que outros fatores tenham influído nos resultados obtidos pelos autores (82).

Ao contrário, os resultados do presente trabalho permitem concluir que a malária não foi responsável por alterações na redução da metahemoglobina pela cistamina. Permitiram, ainda, demonstrar que os amazônides doentes ou normais comportam-se de maneira diferente dos doentes não amazônides, em relação à redução da metahemoglobina pela cistamina.

Não houve interferência do esquema terapêutico utilizado nos doentes com malária, em relação à redução da me

tahemoglobina pelo azul de metileno e pela cistamina. Não houve, portanto, variação dessa redução após o emprego da clindamicina como única droga, ou quando associada à cloroquina. BARRAVIERA ⁽⁶⁾ em estudo anterior, já havia assinalado que o uso desses mesmos esquemas terapêuticos não influenciavam a via das pentoses, quando estimulada pelo azul de metileno. Os resultados aqui apresentados também demonstram não ter havido alteração na atividade da glutathione reductase, quando se estimulou a redução da metahemoglobina pela cistamina em doentes tratados pelos mesmos esquemas terapêuticos.

Portanto, é possível sugerir que nem a malária, nem as drogas utilizadas no tratamento da doença exerceram efeito importante na redução da metahemoglobina pela cistamina.

O método padronizado foi também aplicado em amostra de população residente em área não endêmica de malária, com a finalidade de verificar o comportamento do método em indivíduos não expostos a essa doença. Para isso, foi escolhida amostra de população residente no município de Anhembi, no Estado de São Paulo. As dosagens do volume globular e das taxas de hemoglobina realizadas neste estudo foram maiores nos indivíduos do sexo masculino, concordando com os relatos de outros autores ^(6,58,83). A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno apresentou redução maior nos indivíduos do sexo masculino. De acordo com estudo anterior ⁽⁶⁾, esta redução foi conseqüente da maior formação de metahemoglobina pelo nitrito de sódio. A redução da metahemoglobina pela cistamina foi também maior nos indivíduos do sexo masculino. Estes resultados discordam

dos obtidos quando da padronização do método. É possível que a maior formação de metahemoglobina pelo nitrito de sódio nos indivíduos do sexo masculino tenha influenciado no cálculo da redução da metahemoglobina, uma vez que este baseia-se na relação entre a quantidade inicial e final de metahemoglobina e no tempo de incubação.

No presente estudo foi encontrado um indivíduo do sexo feminino deficiente em G6PD, que será discutido posteriormente e dois com G6PD normal, porém não redutores da metahemoglobina pela cistamina. Estes últimos eram adultos, ambos do sexo feminino e foram tratados com riboflavina. Não houve diferença de comportamento, antes e após o tratamento, quando se considerou o volume globular, as taxas de hemoglobina e a redução da metahemoglobina pelo azul de metileno. A redução da metahemoglobina e a quantidade residual de metahemoglobina após o estímulo pela cistamina apresentaram diferença de comportamento depois do tratamento. Em um deles a redução aumentou de 46,94 $\mu\text{g}/\text{min}$ para 100,00 $\mu\text{g}/\text{min}$, enquanto no outro foi de 44,38 $\mu\text{g}/\text{min}$ para 80,05 $\mu\text{g}/\text{min}$.

Vários autores (11,13,28,34,65,66,87,90) têm demonstrado que, para a atividade da glutathione reductase ser completa, há necessidade de quantidades ideais de FAD, que é derivada da riboflavina.

Por outro lado, a deficiência hereditária de glutathione reductase é muito rara (13,20,28,34,90) sendo freqüente, entretanto, a deficiência da coenzima FAD, que atua de forma conjunta com a glutathione reductase (11,13,28,34,65,66,87,90).

Assim sendo, os dois indivíduos que não reduziram a metahemoglobina pela cistamina apresentaram-se de forma deficiente em glutathione redutase, não pela ausência hereditária da enzima, mas por deficiência da coenzima FAD.

Esses resultados evidenciam, portanto, que a cistamina reduz a metahemoglobina pela ação do sistema da glutathione redutase.

WILSON et alii (92,93,94), estudando crianças de orfanatos de São Paulo, verificaram que cerca de 50% delas exibiam sinais clínicos de arriboflavinose, apesar de apresentarem excreção urinária normal desta vitamina. Estes mesmos autores (93), estudando habitantes de 11 cidades do interior do Estado de São Paulo, constataram que 30,8% dos indivíduos examinados apresentavam pelo menos um sinal clínico de deficiência de riboflavina, enquanto 41% tinham níveis de excreção urinária abaixo da normalidade e 50% das famílias observadas consumiam riboflavina abaixo das necessidades recomendadas.

No presente trabalho foram tratados com riboflavina 14 indivíduos, todos voluntários e do sexo feminino. Após o tratamento não houve variação nos valores do volume globular e das taxas de hemoglobina. Entretanto, a quantidade de metahemoglobina formada pelo nitrito de sódio tanto aos 90, quanto aos 180 minutos de incubação, foi maior após o tratamento por esta vitamina. A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno aumentou de forma significativa, porém, aos 90 minutos de incubação, a quantidade residual de metahemoglobina não era ainda normal. A maior formação inicial de metahemoglobina obser-

vada nestes resultados sugere que o tempo ideal de leitura da quantidade residual de metahemoglobina, após estimulação pelo azul de metileno e tratamento com riboflavina, deve ser superior a 90 minutos de incubação. A redução da metahemoglobina pela cistamina aumentou significativamente, apesar de ter crescido a quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio. As quantidades residuais de metahemoglobina após o estímulo com cistamina foram semelhantes, o que sugere ter havido estímulo da glutathione reductase.

Esses resultados permitem sugerir que a oferta de riboflavina, mesmo para indivíduos normais, isto é, que reduzem a metahemoglobina pela cistamina, é capaz de aumentar a atividade da glutathione reductase.

A fim de verificar possíveis diferenças entre indivíduos do mesmo sexo, foram comparados os resultados obtidos nos indivíduos normais residentes em Botucatu, Amazônia e Anhembi, bem como nos doentes com malária observados em Humaitá.

Em relação às taxas de hemoglobina e ao volume globular verificou-se que a anemia ocorreu apenas nos doentes com malária (6,9,39,63,91).

No que diz respeito à redução da metahemoglobina pelo azul de metileno nos indivíduos normais de Botucatu e Anhembi, houve acordo com estudo anterior (6). Assim é que os que apresentaram maiores taxas de hemoglobina formaram mais metahemoglobina pelo nitrito de sódio e, conseqüentemente, ti-

veram maior redução da metahemoglobina pelo azul de metileno.

A redução da metahemoglobina pela cistamina foi semelhante, tanto nos indivíduos normais de Botucatu e de Anhembi, quanto em doentes com malária não amazônides.

Os amazônides, doentes ou não, se comportaram de forma semelhante aos dois indivíduos de Anhembi, que não reduziram a metahemoglobina pela cistamina.

SHRIMPTON & GIUGLIANO ⁽⁷⁶⁾ procederam a estudo epidemiológico dirigido para a avaliação alimentar e nutricional em 1200 famílias residentes em Manaus e constataram que a dieta lá utilizada é caracterizada pelo baixo consumo de verduras, legumes, frutas e leguminosas secas e alto consumo de peixe e farinha de mandioca. Em termos qualitativos, esses autores ⁽⁷⁶⁾ encontraram deficiência de vitamina A, riboflavina e tiamina. GIUGLIANO et alii ⁽³²⁾, estudando escolares da cidade de Manaus, encontraram 66,7% com características clínicas de deficiência de vitaminas do complexo B. GIUGLIANO et alii ⁽³¹⁾, trabalhando com populações situadas ao longo dos Rios Solimões e Negro, observaram o uso de dieta carente em riboflavina.

Por outro lado, BLUMENTHAL & SCHULTZ ⁽¹⁹⁾, estudando crianças infestadas pelo *Ascaris lumbricoides*, demonstraram, de maneira bastante convincente, o consumo de albumina, vitamina C e riboflavina por esse parasita.

MARCONDES et alii ⁽⁴⁷⁾ em inquérito coprológico realizado no município de Humaitá em 1981, verificaram que o

parasita mais freqüentemente encontrado na população estudada foi o *Ascaris lumbricoides* (38,3%). BARRAVIERA et alii ⁽⁷⁾, estudando 34 doentes com malária no município de Humaitá, verificaram que o *Ascaris lumbricoides* esteve presente em 38,2% dos doentes estudados. Em 1982, MARCONDES et alii ⁽⁴⁸⁾, trabalhando com 236 indivíduos do município de Humaitá, encontraram 44,4% infestados por este verme.

SEELER & OTT, em 1944 ⁽⁷³⁾, demonstraram que galinhas previamente alimentadas com dieta carente em riboflavina, inoculadas com *Plasmodium lophurae*, apresentam infecção atenuada e baixa parasitemia. A administração de riboflavina durante o curso da infecção aumentava a gravidade da malária e a parasitemia. Estudos recentes ^(37,68,86) têm demonstrado que o desenvolvimento do *Plasmodium berghei* no sangue de ratos infectados fica prejudicado, desde que esses animais sejam alimentados previamente com dietas deficientes em riboflavina.

Trabalhos realizados em zonas endêmicas de malária ^(11,68,85,86) têm revelado, concomitantemente, deficiência de riboflavina em crianças.

Com base no conjunto de observações, ou seja: a ingestão de dieta carente em riboflavina, a freqüência elevada de infestações pelo *Ascaris lumbricoides*, a incidência de alterações observadas pelo emprêgo do método padronizado e considerando as observações de outros autores ^(11,68,85,86) é possível sugerir que a maioria dos indivíduos amazônides, normais ou doentes com malária podem ter deficiência de riboflavina.

THURNHAM ⁽⁸⁶⁾, que encontrou deficiência de riboflavina em crianças de regiões endêmicas de malária, sugeriu que esses resultados, apesar de poderem ser interpretados como coincidência geográfica, podem também refletir, nessas condições, uma adaptação fisiológica, que resultaria na diminuição da gravidade da malária.

A comparação entre amazônides e habitantes de Anhembi mostrou diferença significativa em relação à deficiência de glutathione redutase, que foi importante entre os primeiros. Estes resultados concordam com os observados por BARRETO & NONOYAMA ⁽⁸⁾ que, estudando eritrócitos de indígenas do Estado de São Paulo, observaram, em alguns deles, que a atividade da glutathione redutase estava diminuída. Obtiveram, porém, a normalização dessa atividade pela adição de FAD ao meio de estudo. De acordo com os autores ⁽⁸⁾, essas observações podem ser decorrentes da carência de riboflavina na dieta dos indígenas estudados. Foi verificado, ainda, que, em um deles a atividade da glutathione redutase não se normalizou após a adição de FAD. Esses autores ⁽⁸⁾ sugerem que tudo se passaria como se essa população tivesse sido submetida à pressão seletiva pela malária, que teria levado a alterações intraeritrocitárias de natureza genética, dificultando o ciclo eritrocitário dos plasmódios.

A deficiência de glutathione redutase observada nos amazônides pode ser explicada pela carência de riboflavina. Contudo, estudos realizados por MEIRA et alii ^(51,52) na região de Humaitá concordam com as sugestões de BARRETO & NONOYAMA ⁽⁸⁾ e não permitem que se afaste por completo a possi

bilidade de ser essa deficiência resultante da pressão seletiva exercida pela malária nessa região.

O estudo foi complementado pela comparação dos resultados obtidos nos indivíduos do sexo feminino de Botucatu e de Anhembi.

Os resultados da redução da metahemoglobina pela via das pentoses, quando se estimulou com azul de metileno, foram semelhantes. Porém, os indivíduos normais de Botucatu apresentaram maior formação de metahemoglobina pelo nitrito de sódio e, conseqüentemente, maior redução da metahemoglobina, quando se estimulou a glutationala redutase pela cistamina. É possível que esta menor atividade da glutationala redutase na população de Anhembi esteja relacionada aos seus hábitos alimentares e à eventual infestação pelo *Ascaris lumbricoides*.

Finalmente, foram estudados dois indivíduos deficientes em G6PD, sendo um deles doente do sexo masculino com malária causada pelo *Plasmodium falciparum* e outro do sexo feminino, habitante de Anhembi.

O doente com deficiência de G6PD estava com forma benigna de malária e evoluiu para cura clínica e parasitológica no terceiro dia de tratamento com clindamicina (55,61,62). Este doente apresentou discreta anemia após a terapêutica, que pode ser decorrente da própria malária, não tendo sido possível constatar crises hemolíticas importantes durante a evolução. A quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio, tanto aos 90 quanto aos 180 minutos de incubação, foi semelhante à dos outros doentes com malária e à dos amazônides

normais. A quantidade de metahemoglobina residual observada após a estimulação da via das pentoses com azul de metileno foi diferente da encontrada nos amazônides normais e nos outros doentes com malária. Esta diferença pode ser explicada pela ausência de resposta ao estímulo do azul de metileno em indivíduos com deficiência de G6PD (3,4,5,13,20,21,34,59).

Ao se estimular a glutathione redutase pela cistamina, neste mesmo doente, a quantidade residual de metahemoglobina obtida foi semelhante à de alguns indivíduos amazônides normais e de doentes com malária, da população da Amazônia. Portanto, neste caso não houve redução adequada da metahemoglobina pela cistamina. Esta redução foi menor que a observada nos indivíduos normais de Botucatu.

Esses resultados podem ser explicados por um lado, pela dificuldade de redução do NADPH, pela via das pentoses, uma vez que a sua deficiência provoca menor atividade desta via metabólica; por outro lado, por ser o doente amazônide e estar sujeito a eventual carência de riboflavina.

O tratamento deste doente com clindamicina não alterou a redução da metahemoglobina, tanto pelo azul de metileno, quanto pela cistamina.

O outro indivíduo com deficiência de G6PD, da população de Anhembi, apresentou quantidade de metahemoglobina, produzida pelo nitrito de sódio, tanto aos 90, quanto aos 180 minutos de incubação semelhante à dos demais indivíduos normais estudados nessa população.

A redução da metahemoglobina pelo azul de metile no foi diferente da dos demais indivíduos estudados, com quantidades residuais de metahemoglobina acima dos valores normais, porém, ainda menores que às do doente deficiente em G6PD da Amazônia.

Sabe-se que o gene da G6PD, por localizar-se no cromossoma X (13,17,20,21,34,59), permite que o genótipo do sexo feminino se manifeste de duas maneiras, quer como homozigoto, quer como heterozigoto. De acordo com LYON (44), quando há dois cromossomos X, um deles está inativo. Assim sendo, o genótipo heterozigoto apresenta tanto hemácias normais, quanto deficientes em G6PD, em diferentes proporções, formando, em última análise, um mosaico de duas populações celulares com atividade enzimática intermediária (13,17,20,21,34,59). Dessa forma, é possível sugerir que esse indivíduo tenha tido comportamento heterozigoto para a deficiência de G6PD.

O mesmo se deu em relação à ativação da glutationa redutase pela cistamina. Houve ativação parcial, com redução da metahemoglobina semelhante à observada nos dois indivíduos de Anhembi, normais para G6PD, porém não redutores de metahemoglobina pela cistamina.

Os achados permitem considerar que a atividade da glutationa redutase é dependente da geração de NADPH pela via das pentoses. Esta última, porém, pode estar funcionando adequadamente e a glutationa redutase apresentar atividade diminuída. Outros fatores, entre eles a necessidade da coenzima FAD, são necessários para que o funcionamento desta enzima se

ja completo.

Esses resultados estão de acordo com os de PRENTICE et alii ⁽⁶⁷⁾, que encontraram correlação positiva entre a atividade da glutathione redutase e a atividade da G6PD. Por outro lado, tem sido encontrada ^(67,81) atividade diminuída da glutathione redutase em indivíduos com deficiência de G6PD. Esses dados vêm corroborar os observados no presente trabalho.

Por fim, a análise dos resultados em seu conjunto permite considerar que a cistamina foi capaz de reduzir a metahemoglobina à hemoglobina pela ação da glutathione redutase que, por sua vez, é dependente da via das pentoses geradora de NADPH. Além disso, há necessidade de adequado suprimento de riboflavina para o funcionamento completo da glutathione redutase, em concordância com o relato de vários autores ^(8,13,28,34,40,49,65,66,67,77,78,85,87,90).

Dessa forma, o método proposto mostrou ser eficiente para a avaliação indireta da atividade da glutathione redutase e da deficiência de riboflavina.

5 - R E S U M O E C O N C L U S Õ E S

Com o objetivo de contribuir para o esclarecimento de alguns pontos obscuros nas relações existentes entre a atividade da via das pentoses e a redução da metahemoglobina pela cistamina, em indivíduos normais e doentes com malária, causada pelo *Plasmodium falciparum*, bem como as relações entre a atividade da glutathione redutase e o efeito do tratamento pela riboflavina, foi proposto novo método de pesquisa pouco dispendioso, simples e que permitisse aplicação em estudo de campo. Com o método padronizado, foram estudados indivíduos normais de Botucatu, Amazônia e Anhembi e doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, atendidos em Humaitá; também foram verificados os eventuais efeitos da riboflavina em indivíduos não deficientes em G6PD, residentes em Anhembi, área não endêmica de malária.

A análise dos resultados permitiu as seguintes conclusões:

- Os indivíduos normais do sexo feminino de Botucatu apresentaram maior redução da metahemoglobina pela cistamina, provavelmente em decorrência da maior formação inicial de metahemoglobina, pelo nitrito de sódio.
- A redução da metahemoglobina pela cistamina foi semelhante quando foram comparados os amazônides normais com os amazônides doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*,

porém, estes valores foram menores que os dos indivíduos normais de Botucatu, de Anhembi e dos doentes não amazônides com a mesma infecção.

- A malária provavelmente não exerceu efeito significativo sobre a redução da metahemoglobina pela cistamina, uma vez que os doentes não amazônides se comportaram de maneira semelhante aos indivíduos normais de Botucatu e de Anhembi.
- A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno foi menor nos amazônides normais, possivelmente em decorrência da menor formação de metahemoglobina pelo nitrito de sódio.
- O tratamento dos doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, apenas pela clindamicina, ou associada à cloroquina, não exerceu efeito significativo na redução da metahemoglobina pela cistamina.
- Os indivíduos normais do sexo masculino de Anhembi apresentaram maior redução da metahemoglobina pela cistamina, e pelo azul de metileno, quando comparados com os do sexo feminino, provavelmente em decorrência da maior formação inicial de metahemoglobina pelo nitrito de sódio.
- Os indivíduos do sexo masculino e normais de Botucatu, Anhembi e doentes com malária não amazônides, apresentaram valores semelhantes de redução da metahemoglobina pela cistamina.
- Os indivíduos nôrmais do sexo feminino de Botucatu apresentaram valores de redução da metahemoglobina pela cistamina maio

res que os de Anhembi, possivelmente em decorrência da maior formação inicial de metahemoglobina pelo nitrito de sódio nos primeiros.

- Houve maior formação de metahemoglobina, pelo nitrito de sódio, após o tratamento dos indivíduos com riboflavina.
- A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno foi maior nos indivíduos voluntários de Anhembi que foram tratados pela riboflavina, após o tratamento, porém, a quantidade residual de metahemoglobina aos 90 minutos de incubação, ainda não havia normalizado.
- A redução da metahemoglobina pela cistamina foi maior nos indivíduos voluntários de Anhembi, que foram tratados pela riboflavina após o tratamento.
- Os indivíduos deficientes em G6PD reduziram parcialmente a metahemoglobina pela cistamina e pelo azul de metileno.
- O tratamento pela riboflavina aumentou a redução da metahemoglobina pela cistamina, nos indivíduos que reduziam parcialmente a metahemoglobina pela cistamina, antes do tratamento. É possível que a redução da metahemoglobina pela cistamina esteja relacionada à ingestão de riboflavina.
- É possível que a redução da metahemoglobina pela cistamina esteja relacionada aos níveis de glutathione redutase e, indiretamente, aos níveis de riboflavina intraeritrocitários.

- Os indivíduos com atividade diminuída da glutathione redutase podem ter malária causada pelo *Plasmodium falciparum*.

6 - SUMMARY AND CONCLUSIONS

The Author presented a new and less expensive indirect method to be developed mainly in field studies with the purpose of clarify some obscure concepts still found in the relations between pentose phosphate pathway activity and the reduction of methaemoglobin by cystamine, both in normal individuals and in *Plasmodium falciparum* malaria patients. The Author also presents the consequence of treatment with riboflavine on glutathione reductase activity.

Normal individuals from Botucatu, Amazon Region and Anhembi as well as falciparum malaria patients from Humaita were studied after standardization of the method. The Author also reports the eventual effects of riboflavine in individuals with no glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, all of them from Anhembi, where malaria is not endemic.

The analysis of the results allowed the following conclusions:

- normal female individuals from Botucatu showed higher reduction of methaemoglobin by cystamine probably due to a greater inicial production of methaemoglobin by sodium nitrite;
- reduction of methaemoglobin by cystamine was the same in normal individuals and in falciparum malaria patients from Amazon Region. However, there was smaller reduction of methaemoglobin by cystamine in normal individuals from

Botucatu and Anhembi as well as in non Amazonian patients with *Plasmodium falciparum* malaria;

- reduction of methaemoglobin by cystamine was probably not modified in a significant way by malaria, since the behavior of non Amazonian patients was the same of normal individuals from Botucatu and Anhembi;
- the reduction of methaemoglobin by methilene blue was less important in the normal Amazonians probably due to the smaller production of methaemoglobin by sodium nitrite;
- the treatment of falciparum malaria patients with clindamycin only or combined with chloroquine had no significant effect in the reduction of methaemoglobin by cystamine;
- normal male individuals from Anhembi showed greater reduction of methaemoglobin by cystamine and methilene blue when compared with normal female individuals, probably due to the greater inicial production of methaemoglobin by sodium nitrite;
- normal male individuals from Botucatu and Anhembi and non Amazonian malaria patients showed analogous results as for the reduction of methaemoglobin by cystamine;
- normal female individuals from Botucatu showed greater reduction of methaemoglobin by cystamine when compared with that of normal female individuals from Anhembi, probably due to the greater inicial production of methaemoglobin by sodium nitrite found in the former;

- production of methaemoglobin by sodium nitrite was greater after the treatment of the individuals with riboflavine;
- reduction of methaemoglobin by methylene blue was greater, after the treatment, in volunteers from Anhembi treated with riboflavine. However, the residual amount of methaemoglobin was still abnormal after 90 minute incubation period;
- reduction of methaemoglobin by cystamine was greater in the volunteers from Anhembi treated with riboflavine, after the treatment;
- reduction of methaemoglobin by cystamine and methylene blue was partial in the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient individuals;
- treatment with riboflavine increased the reduction of methaemoglobin by cystamine in the individuals in whom only partial reduction had taken place before the treatment. So, the reduction of methaemoglobin was probably related to riboflavine ingestion;
- reduction of methaemoglobin by cystamine is probably related to glutathione reductase levels and indirectly to intraerythrocyte riboflavine levels.
- individuals with decreased activity of glutathione reductase are prone to have *Plasmodium falciparum* malaria.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ALVARADO, C.A. & FERREIRA, M.S. Malária. In: VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 7.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. cap.81, p.753.79.
2. ANDERSON, B.B. & PERRY, G.M. Antimalarial effects of riboflavin deficiency. Lancet, 1:329-30, 1986.
3. AZEVEDO, E.S. O sistema genético das desidrogenases alcoólicas em mestiços da Bahia e em brancos europeus. Salvador, 1975. (Tese - Livre-docência - Faculdade de Medicina. Universidade Federal da Bahia).
4. AZEVEDO, E.S. & AZEVEDO, T.F.S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal jaundice in Bahia. Brazil. Ciênc. Cult. (S.Paulo), 26:1044-7, 1974.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Comissão de Estudos de Documentação. Referências Bibliográficas; NB-66. In: _____. Normas ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1978. p.13-30.

WORLD medical periodicals. 3.ed. London, World Medical Association, 1961. 407p.

WORLD medical periodicals. Supplement of 3.ed. London, World Medical Association, 1968. 68p.

5. AZEVEDO, W.C. et alii. Deficiência de glicose-6-fosfato de hidrogenase em pacientes de um hospital geral de Salvador, Bahia, Brasil. Rev. bras. Pesquisas Med. Biol., 11:49-52, 1978.
6. BARRAVIERA, B. Malária causada pelo *Plasmodium falciparum* e a redução da metahemoglobina pela via das pentoses. Estudo "in vitro", em hemácias de indivíduos normais e de doentes tratados pela clindamicina. Botucatu, 1984. 89p (Tese - Mestrado - Faculdade de Medicina. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho").
7. BARRAVIERA, B. et alii. Malária no município de Humaitã, Estado do Amazonas. III. Aspectos clínicos e evolutivos. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 23(supl.5):12-26, 1981.
8. BARRETO, O.C.O.P. & NONOYAMA, K. Pesquisa de polimorfismo malária dependente ligado à glicose-6-fosfato desidrogenase e à glutatona eritrocitárias em indígenas brasileiros. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo, 33:231-3, 1978.
9. BARUZZI, R.G. et alii. The association between splenomegaly and malaria in indians from the Alto Xingu, Central Brasil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 18:322-48, 1976.
10. BATES, C.J. et alii. Antimalarial effects of riboflavin deficiency. Lancet, 1:329, 1986.

11. BATES, C.J. et alii. Riboflavin status in infants born in rural Gambia, and the effect of a weaning food supplement. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 76:253-8, 1982.

12. BERQUÓ, E.S. et alii. Biestatística. 1.ed. São Paulo, Pedagógica e Universitária, 1980. 325p.

13. BEUTLER, E. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. In: STANBURY, J.B. et alii. Bases metabólicas das doenças hereditárias. 4.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1981. cap.60, p.1485-506.

14. BEUTLER, E. & SRIVASTAVA, S.K. Relationship between glutathione reductase activity and drug-induced haemolytic anaemia. Nature (Lond.), 226:759-60, 1970.

15. BEUZARD, Y. Inhibition of sickling by cystamine. In: CAUGHEY, W.S. Biochemical and clinical aspects of hemoglobin abnormalities. New York, Academic Press, 1978. p.237-50.

16. BEUZARD, Y. et alii. Antisickling effect of cystamine and its action on the biosynthesis of hemoglobin. In: BREWER, G.J. Progress in clinical and biological research. New York, A.R. Liss, 1977. v.21, p.109-28.

17. BIENZLE, U. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Part 1, tropical Africa. Clin. Haemat., 10:785-99, 1981.

18. BIENZLE, U. et alii. *Plasmodium falciparum* malaria and human red cells. I. A genetic and clinical study in children. Int. J. Epidemiol., 10:9-15, 1981.
19. BLUMENTHAL, D.S. & SCHULTZ, M.G. Effects of *Ascaris* infection on nutritional status in children. Amer. J. trop. Med. Hyg., 25:682-90, 1976.
20. BREWER, G.J. et alii. Methaemoglobin reduction test. A new simple, "in vitro" test for identifying primaquine-sensitivity. Bull. Wld Hlth Org., 22:633-40, 1960.
21. BREWER, G.J. et alii. The methaemoglobin reduction test for primaquine-type sensitivity of erythrocytes. J. Amer. med. Ass., 180:386-8, 1962.
22. COLAUTO, E.M.R. et alii. Malária no município de Humaitá, Estado do Amazonas. XII. Frequência de fatores de resistência eritrocitária na população geral e em doentes; hemoglobina S e sistema sanguíneo Duffy. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 23(supl.5):72-8, 1981.
23. CRANE, G.G. Hyperreactive malarious splenomegaly (tropical splenomegaly syndrome). Parasit. Today, 2:4-9, 1986.
24. DUTTA, P. et alii. Antimalarial effects of riboflavin deficiency. Lancet, 2:1040-2, 1985.

25. ECKMAN, J.R. Glutathione metabolism in malaria infected erythrocytes. Progr. clin. Biol. Res., 12:155-61, 1984.

26. ECKMAN, J.R. & EATON, J.W. Dependence of plasmodial glutathione metabolism on the host cell. Nature (Lond.), 278:754-6, 1979.

27. EL-HAZMI, M.A.F. & WARSY, A.S. Aspects of sickle cell gene in Saudi Arabia; interaction with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Hum. Genet., 68:320-3, 1984.

28. EL-HAZMI, M.A.F. & WARSY, A.S. Glutathione reductase deficiency in association with sickle cell and thalassaemia genes in Saudi populations. Hum. Hered., 35:326-32, 1985.

29. ERNST, V. et alii. Inhibition of protein synthesis initiation by oxidized glutathione; activation of a protein kinase that phosphorylates the α subunit of eukaryotic initiation factor 2. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 75:4110-4, 1978.

30. EVELYN, K.A. & MALLOY, H.T. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin, and sulphemoglobin in a single sample of blood. J. biol. Chem., 126:655-62, 1938.

31. GIUGLIANO, R. et alii. Diagnóstico da realidade alimentar

e nutricional do Estado do Amazonas, 1978. Acta Amazôn., 8(supl.2):1-54, 1978.

32. GIUGLIANO, R. et alii. Estudo antropométrico, clínico e de padrões alimentares em um grupo de escolares de Manaus, 1976. Acta Amazôn., 8:75-82, 1978.
33. GOLENSER, J. et alii. Inhibitory effect of a fava bean component on the "in vitro" development of *Plasmodium falciparum* in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes. Blood, 61:507-10, 1983.
34. GRIMES, A.J. Human red cell metabolism. London, Blackwell, 1980. 384p.
35. GUGGENMOOS-HOLZMANN, I. et alii. *Plasmodium falciparum* malaria and human red cells. II. Red cell genetic traits and resistance against malaria. Int. J. Epidem., 10:16-22, 1981.
36. HUHEEY, J.E. & MARTIN, D.L. Malaria, favism and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Experimentia (Basel), 31:1145-7, 1975.
37. KAIKAI, P. & THURNHAM, D.I. The influence of riboflavin deficiency of *Plasmodium berghei* infection in rats. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 77:680-6, 1983.

38. KOSOWER, N.S. et alii. Glutathione 8. The effects of glutathione disulfide on initiation of protein synthesis. Biochim. biophys. Acta (Amst.), 272:623-37, 1972.
39. KREIER, J.P. Malária. New York, Academic Press, 1980. 3v.
40. LIE-INJO LUAN ENG, T.N. et alii. Stimulation of erythrocyte glutathione reductase activity by flavin adenine dinucleotide (FAD) in malaysian adults an newborns and their parents. Brit. J. Haemat., 31:337-42, 1975.
41. LUZZATO, L. Genetics of red cell and susceptibility to malaria. Blood, 54:961-76, 1979.
42. LUZZATO, L. et alii. Genetic variation in the host an adaptive phenomena in *Plasmodium falciparum* infection. Ciba Fdn Symp., 94:159-73, 1983.
43. LUZZATO, L. et alii. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells; resistance to infection by malariae parasites. Science, 164:839-41, 1969.
44. LYON, M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). Nature (Lond.), 190:372-3, 1961.
45. MACHADO, P.E.A. Cystamina, agente tiol com efeito antifal cizante, "in vitro". Estudo da redução do complexo hemo-

globina-cystamina pelo eritrócito, "in vitro". Estudo da ação da cystamina e glutathione oxidado sobre a tradução proteica, "in vitro". Botucatu, 1979. 95p. (Tese - Livre-Docência - Faculdade de Medicina. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho").

46. MANDULA, B. & BEUTLER, E. Synthesis of riboflavin nucleotides by native human erythrocytes. Blood, 36:491-9, 1970.
47. MARCONDES, J. et alii. Malária no município de Humaitá, Estado do Amazonas. XVI. Inquérito coprológico em habitantes da região em relação às taxas de hemoglobina. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 24(supl. 6):24-8, 1982.
48. MARCONDES, J. et alii. Tratamento das helmintíases intestinais com Albendazol em indivíduos habitantes do município de Humaitá, Estado do Amazonas. Folha méd., 88(supl. 1):241-5, 1984.
49. MAYES, P.A. Metabolism of carbohydrate. In: MARTIN JR., D.W. et alii. Harper's review of biochemistry. 19.ed. Los Altos, Lange Medical, 1983. cap.15, p.161-87.
50. MEIRA, D.A. Malaria at Humaita county, Amazonas State, Brazil. Some aspects. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 24(supl.6):5-15, 1982.

51. MEIRA, D.A. et alii. Malaria at Humaita county, Amazonas State, Brazil. XIII. Characterization of T Lymphocyte subsets in patients with *Plasmodium falciparum* according to the presence of gametocytes and the treatment with clindamycin or combined mefloquine-sulfadoxine-pyrimethamine. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MALARIA, 1, Rio de Janeiro, 1986. Anais ... Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 1986. p.16.
52. MEIRA, D.A. et alii. Malaria in Humaita county, Amazonas State, Brazil. XXXII. Frequency of the HLA antigen in the general population and patients. In: JAPAN-BRAZIL SYMPOSIUM ON SCIENCE AND TECHNOLOGY, 4, Botucatu, 1984. Anais ... Botucatu, Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1984. v.2, p.162.
53. MEIRA, D.A. et alii. Malária no município de Humaitã, Estado do Amazonas. I. Alguns aspectos epidemiológicos e clínicos. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 22:124-34, 1980.
54. MEIRA, D.A. et alii. Malária no município de Humaitã, Estado do Amazonas. XXX. Alguns aspectos epidemiológicos comparativos entre 1976, 1979 e 1983. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 20; CONGRESSO DA SOCIEDADE LATINO AMERICANA DE MEDICINA TROPICAL, 1, Salvador, 1984. Anais ... Salvador, 1984. p.32-3.

55. MEIRA, D.A. et alii. Malária no município de Humaitá, Estado do Amazonas. XXXII. Clindamicina e cloroquina no tratamento de doentes com infecção causada pelo *Plasmodium falciparum*. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 20; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MEDICINA TROPICAL, 1, Salvador, 1984. Anais ... Salvador, 1984. p.37.
56. METZ, E.N. et alii. Mechanisms of methylene blue stimulation of the hexose monophosphate shunt in erythrocytes. J. clin. Invest., 58:797-802, 1976.
57. MILLER, J. et alii. *Plasmodium falciparum*; thiol status and growth in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes. Exp. Parasit., 57:239-47, 1984.
58. MOURA, R.A.A. Técnicas de laboratório. 2.ed. São Paulo, Atheneu, 1982. 822p.
59. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Normalizacion de las técnicas de estudio de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa Org. mun. Salud. Ser. Inf. técn., 366:1-57, 1967.
60. PASVOL, G. & WILSON, R.J.M. The interaction of malaria parasites with red blood cells. Brit. med. Bull., 38:133-40, 1982.

61. PEREIRA, P.C.M. et alii. Malária no município de Humaitã, Estado do Amazonas. XXV. Novos esquemas de tratamento pela clindamicina em doentes com infecção causada pelo *Plasmodium falciparum*. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 19, Rio de Janeiro, 1983. Anais ... Rio de Janeiro, 1983. p.78.
62. PEREIRA, P.C.M. et alii. Malária no município de Humaitã, Estado do Amazonas. XIII. Uso da clindamicina no tratamento de doentes com infecção causada pelo *Plasmodium falciparum*. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 24(supl.6): 16-23, 1982.
63. PITNEY, W.R. The tropical splenomegaly syndrome. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 62:717-28, 1968.
64. POWERS, H.J. & THURNHAM, D.I. Riboflavin deficiency in man; effects on haemoglobin and reduced glutathione in erythrocytes of different ages. Brit. J. Nutr., 46:257-66, 1981.
65. PRENTICE, A.M. & BATES, C.J. A biochemical evaluation of the erythrocyte glutathione reductase (EC 1.6.4.2.) test for riboflavin status. Brit. J. Nutr., 45:37-52, 1981.
66. PRENTICE, A.M. & BATES, C.J. A biochemical evaluation of the erythrocyte glutathione reductase (EC 1.6.4.2) test for riboflavin status. 2. Dose - response relationships

- in chronic marginal deficiency. Brit. J. Nutr., 45:53-65, 1981.
67. PRENTICE, A.M. et alii. The influence of G-6-PD activity on the response of erythrocyte glutathione reductase to riboflavin deficiency. Int. J. vit. Nutr. Res., 51:2115, 1981.
68. RIBOFLAVIN deficiency inhibits multiplication of malarial parasitism. Nutr. Rev., 42:195-6, 1984.
69. RIVLIN, R.S. Riboflavin metabolism. New Engl. J. Med., 283:463-72, 1970.
70. ROTH, E.F. et alii. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits "in vitro" growth of *Plasmodium falciparum*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), Biol. Sci., 80:298-9, 1983.
71. ROTH, E.F. et alii. Glutathione stability and oxidative stress in *Plasmodium falciparum* infection "in vitro"; responses of normal and G6PD deficient cells. Biochem. biophys. Res. Commun., 109:355-62, 1982.
72. ROTH, E.F. et alii. Oxidative stress and falciparum malaria: a critical review of the evidence. Progr. clin. Biol. Res., 108:155-93, 1984.

73. SEELER, A.O. & OTT, H.W. Effect of riboflavin deficiency on the course of *Plasmodium lophurae* infection in chicks. J. infect. Dis., 75:175-8, 1944.
74. SHAKESPEARE, P.G. et alii. Glucose metabolism in the simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi*; activities of the glycolytic and pentose phosphate pathways during the intraerythrocyte cycle. Ann. trop. Med. Parasit., 73:407-15, 1979.
75. SHERMAN, I.W. Biochemistry of *Plasmodium* (malarial parasites). Microbiol. Rev., 43:453-95, 1979.
76. SHRIMPTON, R. & GIUGLIANO, R. Consumo de alimentos e alguns nutrientes em Manaus, Amazonas, 1973-4. Acta Amazon., 9:117-41, 1979.
77. SMITH, L.E. et alii. Bioquímica; aspectos gerais. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985. 785p.
78. SMITH, L.E. et alii. Bioquímica; mamíferos. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985. 620p.
79. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. Statistical methods. 7.ed Ames, Iowa State University, 1980. 505p.
80. SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS - SUCEN. 50 anos de luta. São Paulo, 1984. 27p.

81. SWARUP-MITRA, S. Activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase in G6PD deficient subjects. Indian J. med. Res., 66:253-9, 1977.
82. SWARUP-MITRA, S. et alii. Effect of malaria on erythrocytic reduced glutathione and activity of related enzymes. Indian J. med. Res., 76:668-73, 1982.
83. THOMPSON, R.B. Disorders of the blood; a textbook of clinical haematology. Edinburg, C. Livingstone, 1977. 851p.
84. THURNHAM, D.I. Antimalarial effects of riboflavin deficiency. Lancet, 2:1310-1, 1985.
85. THURNHAM, D.I. Influence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the glutathione reductase test for ariboflavinosis. Ann. trop. Med. Parasit., 66: 505-8, 1972.
86. THURNHAM, D.I. Riboflavin status and malaria in infants in Papua New Guinea. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 77:423-4, 1983.
87. THURNHAM, D.I. & RATHAKETTE, P. Incubation of NAD(P)H₂; glutathione oxidoreductase (EC 1.6.4.2) with flavin adenine dinucleotide for maximal stimulation in the measurement of riboflavin status. Brit. J. Nutr., 48: 459-66, 1982.

88. TRAGER, W. & JENSEN, J.B. Cultivation of erythrocytic and exoerythrocytic stages of Plasmodia. In: KREIER, J.P. Malária. New York, Academic Press, 1980. v.2, p.271.
89. TZONEVA, M. et alii. Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in relation to altitude; a malaria hypothesis. Bull. Wld Hlth Org., 58:659-62, 1980.
90. VALENTINE, W.N. & TANAKA, K.R. Piruvato cinase e outras anemias hemolíticas hereditárias com deficiência enzimática. In: STANBURY, J.B. et alii. Bases metabólicas das doenças hereditárias. 4.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1981. cap.59, p.1465-84.
91. WEATHERALL, R.J. & ABDALLA, S. The anaemia of *Plasmodium falciparum* malaria. Brit. med. Bull., 38:147-51, 1982.
92. WILSON, D. et alii. Arriboflavinose clínica em pré-escolares, filhos de migrantes em trânsito pela central de triagem e encaminhamento, na capital do Estado de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde públ. (S. Paulo), 12:351-5, 1978.
93. WILSON, D. et alii. Estudo da riboflavina; exames bioquímico e clínico em comunidades do Estado de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde públ. (S. Paulo), 11:13-26, 1977.

94. WILSON, D. et alii. Nutritional status of children, inmates of a small institution for homeless children in the capital of the State of S. Paulo, Brazil. Rev. Saúde públ. (S. Paulo), 14:300-9, 1980.

8 - A P Ê N D I C E

ANEXO 1 (MODELO DO PROTOCOLO Nº 1)

PROJETO MALÁRIA

(Estudo de campo - 1983)

Localidade: _____ Nº _____

☐ *Plasmodium vivax*
☐ *Plasmodium falciparum*
☐ Negativo

☐ Rio Madeira
☐ Índios
☐ Estrada
☐ Migrante
☐ Urbana

Data: _____

Nome: _____ Idade: _____

Sexo: _____ Naturalidade: _____

Raça: _____ Parentes: ☐ Nordestinos

☐ Índios

☐ Negros

Já teve malária e está tendo malária ☐

Já teve malária e não está tendo malária ☐

Nunca teve malária e está tendo malária ☐

Nunca teve malária e não está tendo malária ☐

Já teve: icterícia ☐

anemia ☐

dor articular ☐

Baço: _____

Resultado dos exames: _____

ANEXO 2 (MODELO DO PROTOCOLO Nº 2)

PROJETO MALÁRIA
(Estudo Clínico - 1983)

Nº _____

☐ *Plasmodium vivax*
☐ *Plasmodium falciparum*
☐ Negativo

☐ Rio Madeira
☐ Índios
☐ Estrada
☐ Migrante
☐ Urbana

Nome: _____ Idade: _____

Sexo: _____ Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____

Procedência: Remota: _____ Profissão: _____

Recente: _____ Raça: _____

Local de provável contágio: _____

Residência: _____

☐ Urbana

☐ Rural

Datas: 1a. consulta _____

Surtos ☐ 1º aos _____ anos

2a. consulta _____

Prévios ☐ 2º aos _____

3a. consulta _____

Malária ☐ 3º aos _____

4a. consulta _____

☐ 4º aos mais _____

☐ último há _____

H.M.A.

Duração da doença _____ Tipo de início ☐ Súbito ou abrupto

☐ Insidioso

Febre: ☐ Típica ☐ Atípica ☐ Ausente

Calafrios: ☐ Presente ☐ Ausente

Calor: ☐ Presente ☐ Ausente

Sudorese: ☐ Presente ☐ Ausente

Número de vezes que o doente já tratou de malária: _____

Tratou do último surto de malária: ☐ Sim ☐ Não

Drogas usadas: ☐ Cloroquina ☐ Quinino ☐ Fansidar
☐ Outros ☐ Não sabe referir

Data do tratamento: _____

SE O ÚLTIMO ATAQUE DE MALÁRIA OCORREU NOS ÚLTIMOS 30 DIAS

Quando começou: Dia _____ Mês _____ Ano _____

Foi tratado? ☐ Sim ☐ Não

Se tratado, quando iniciou o tratamento: Dia _____ Mês _____ Ano _____

Drogas usadas: ☐ Cloroquina ☐ Quinino ☐ Fansidar
☐ Outros ☐ Não sabe referir

Houve desaparecimento dos sintomas: ☐ Sim ☐ Não

Quando apareceram os primeiros sintomas atuais: ____/____/____

I.S.D.A.

☐ Náuseas	☐ Diarréia	☐ Dor precordial
☐ Vômitos	☐ Disenteria	☐ Falta de ar
☐ Cefaléia	☐ Torpor	☐ Icterícia
☐ Mal estar	☐ Confusão mental	☐ Colúria
☐ Dor articular	☐ Coma	☐ Hematúria
☐ Dor muscular	☐ Tosse	☐ Oligúria
☐ Anorexia	☐ Expectoração	

EXAME FÍSICO

T _____ P _____ FC _____ FR _____ PA _____
Estado geral: ☐ Bom ☐ Regular ☐ Mau
Consciente ☐ Inconsciente ☐ Icterícia ☐ Anemia ☐
Fígado _____ Baço _____
Peso _____

ANTECEDENTES MÓRBIDOS

TB ☐ Diabetes ☐ Hepatopatias ☐ Nefropatias ☐
Cardiopatias ☐ Alteração da musculatura ☐
Tem alguma doença aguda? _____
Está tomando alguma medicação? _____

ANTECEDENTES PESSOAIS

Tipo de habitação _____ Mosquitos ☐ Macacos ☐

DADOS DURANTE A TERAPIA E SEGUIMENTO

MEDICAÇÃO COM CLINDAMICINA		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	14º	21º	28º
Data											
Hora do dia											
Dose											
Via											
Outros medicamentos Dose e dia											
Sinais e sintomas											
	Hora do dia										
	Temperatura										
	Cefaléia	0 a ++++									
	Náuseas										
	Vômitos										
Diarréia											
	Icterícia										
Dados de laboratório											
	Hora do dia										
	Contagem de parasitos										

COMENTÁRIOS: _____

Efeitos colaterais da droga _____

EXAMES DE LABORATÓRIO	1º dia	7º dia		
Hemograma Hematócrito				
Hemoglobina				
Glóbulos vermelhos				
Glóbulos brancos				
Bastonetes				
Segmentados				
Linfócitos				
Monócitos				
Eosinófilos				
Basófilos				
Plaquetas				
V.H.S.				
URINA I Densidade				
pH				
Albumina				
Glicose				
Células de descamação				
Hemácias				
Leucócitos				
Cilindros				

Parasitológico de fezes _____

E.C.G. _____

Comentários _____
