

BENEDITO BARRAVIERA

MALÁRIA CAUSADA PELO *Plasmodium falciparum* E A
REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELA
VIA DAS PENTOSE.

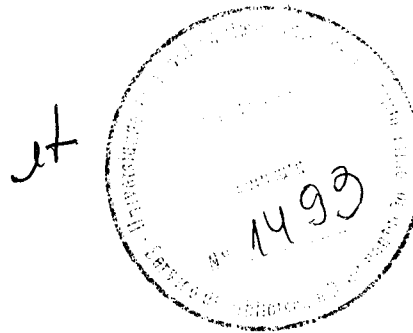
— Estudo «in vitro», em hemácias de indivíduos normais e de doentes tratados pela clindamicina.

Dissertação 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 Mestre.

MALÁRIA CAUSADA PELO *Plasmodium falciparum* E A
REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA PELA
VIA DAS PENTOSE.

— Estudo «in vitro», em hemácias de indivíduos normais e de doentes tratados pela clindamicina.

Dissertação 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 Mestre.



Orientador:

DR. PAULO EDUARDO DE ABREU MACHADO

Dedico este trabalho à

SILVIA e à ANA SÍLVIA,

pelo amor que juntos desfrutamos.

Aos meus pais,

as minhas irmãs,

por toda compreensão e
amor que me dedicam.

AGRADECIMENTOS

Desejo testemunhar minha homenagem e profunda gratidão àqueles que, direta ou indiretamente, permitiram a realização deste trabalho e auxiliaram a minha formação profissional.

- Ao Dr. Domingos Alves Meira, modelo de médico e pesquisador que, com sabedoria, inteligência e espírito devotado à ciência, contribuiu de modo inestimável para a concretização deste estudo.
- Ao Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado, capaz, dedicado, e infatigável colaborador, que me acompanhou incansavelmente durante o desenrolar desta pesquisa.
- 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.
- À Fundação Projeto Rondon, pelas facilidades criadas durante o estudo de campo, sem as quais não teria sido possível a concretização deste trabalho.
- Aos Técnicos da SUCAM de Humaitá, incansáveis batalhadores no combate à malária, pela cessão de parte de suas instalações para o atendimento aos doentes.
- Ao Hospital de Humaitá, pela ajuda prestada no atendimento e internação dos doentes graves.
- Ao 54º Batalhão de Infantaria de Selva (54º BIS), pelo envio de indivíduos para a padronização dos valores normais do método.
- Ao Diretor e aos Funcionários do Campus Avançado de Humaitá, pelo carinho com que sempre me receberam.
- À equipe do Projeto Malária de 1983 (Bianca, Elinda, Jussara, Meira e Teresa), pelo estímulo e apoio sempre presente.
- À CELM, pelo empréstimo de aparelhos.

- À UpJOHN, pelo fornecimento da clindamicina.
- 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.
- Ao pessoal do Laboratório de Hematologia (Jair, Eide e Tsieko), pela ajuda e orientação na pesagem do material utilizado.
- Aos colegas da Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, que souberam compatibilizar comigo as responsabilidades diárias.
- À Bibliotecária Sidelma D. Leite de Souza, pela orientação na organização das referências bibliográficas.
- À Professora Miriam Celi Pimentel Porto Foresti, pelo auxílio na correção deste texto.
- Ao Nivalde A. Basso, pelos serviços de datilografia.
- Aos doentes que se dispuseram voluntariamente participar deste estudo.
- À Faculdade de Medicina de Botucatu, que tornou exequível este trabalho.

Este trabalho recebeu auxílio financeiro do CNPq, Processo nº 40.3705/82.

"A VITÓRIA FOI DE QUEM SEMPRE ACREDITOU"

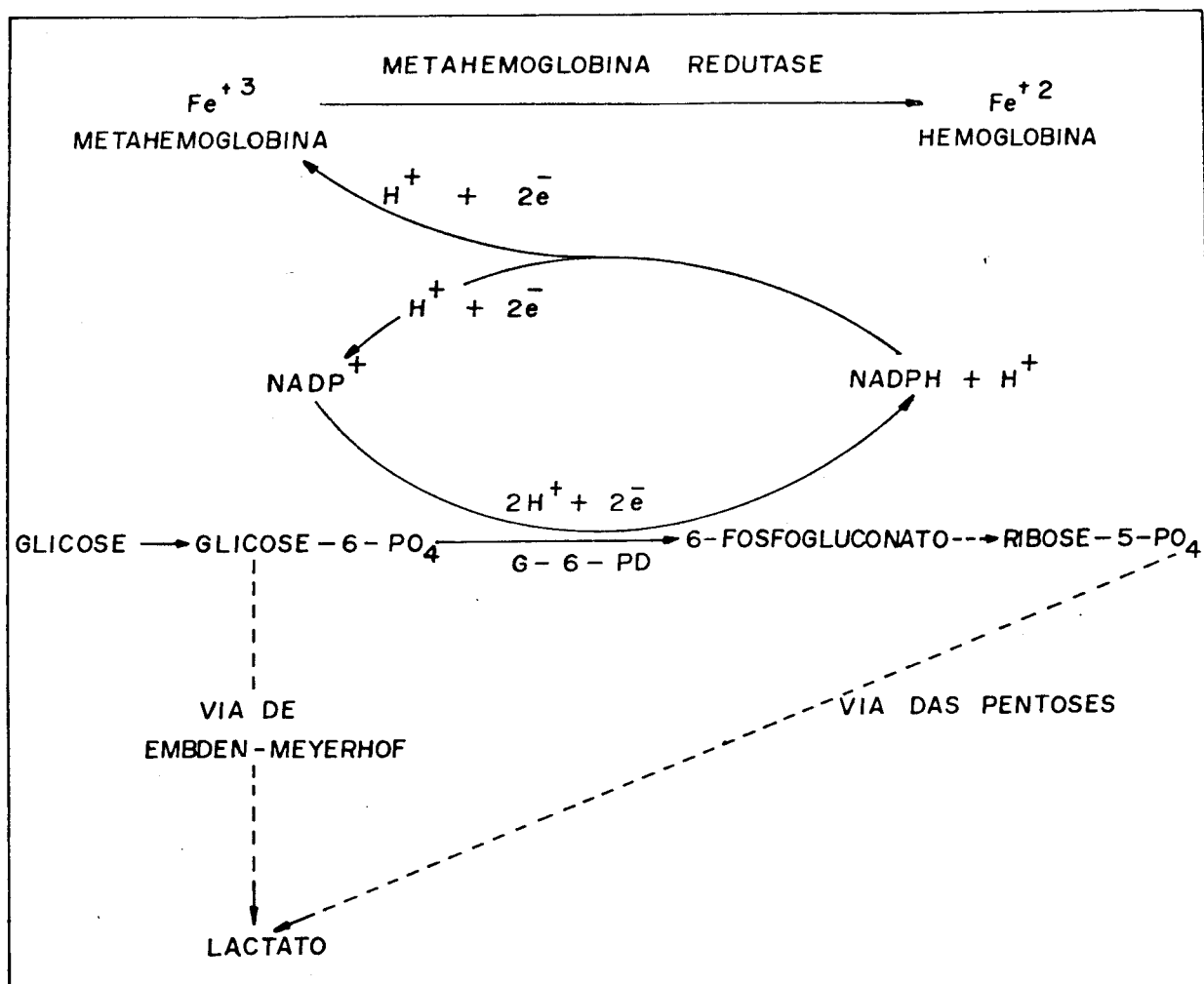
SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	01
2. Material e Métodos	07
3. Resultados	31
4. Discussão	59
5. Resumo e Conclusões	74
6. Summary and Conclusions	77
7. Referências Bibliográficas	80
8. Apêndice	89

1. INTRODUÇÃO

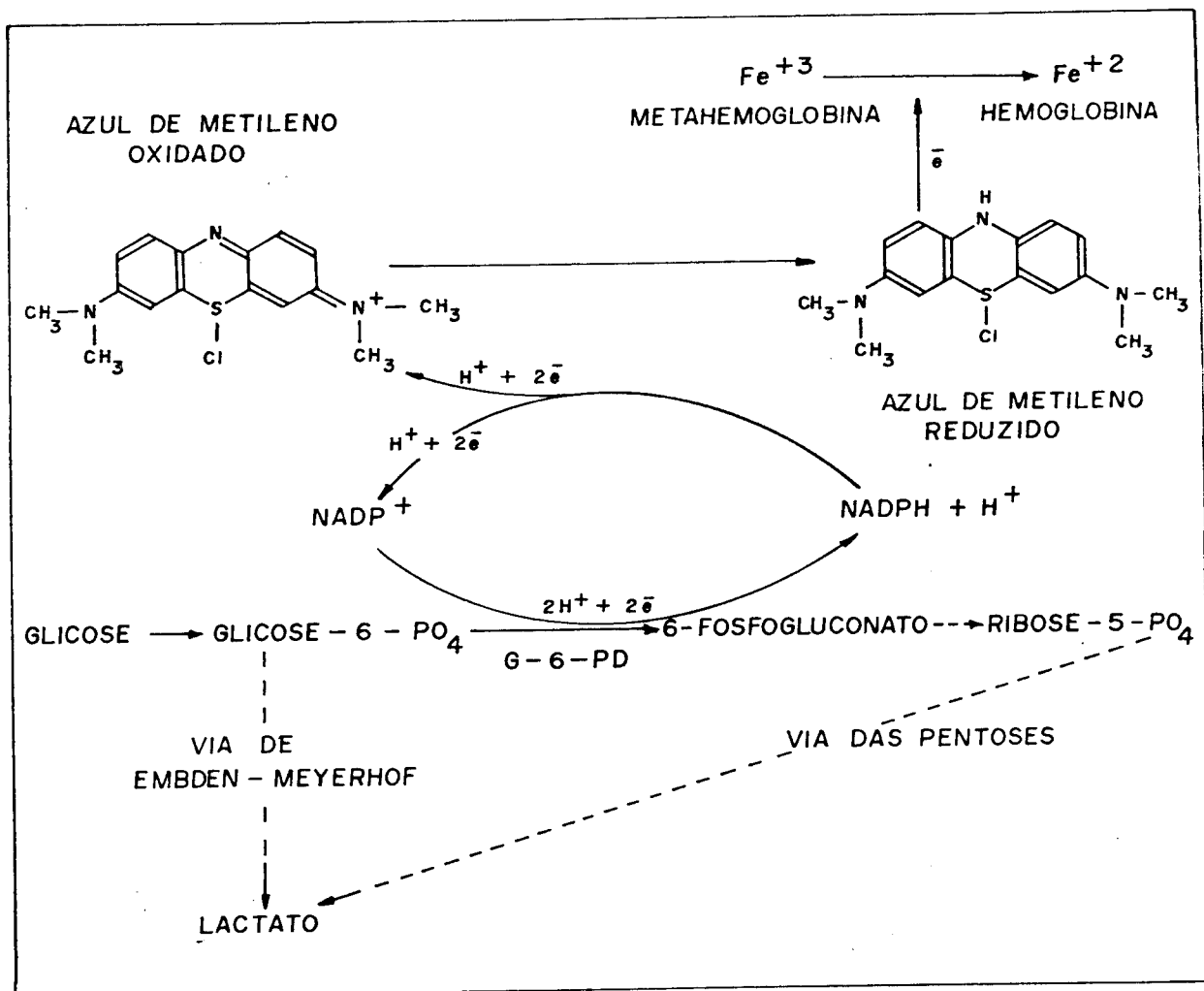
O transporte de oxigênio é função indispensável exercida pelo eritrócito^{25,51}, que possui hemoglobina e vias metabólicas da glicose como constituintes principais. A integridade da hemoglobina e da membrana celular é mantida pelas vias metabólicas da glicose^{13,25}.

A hemoglobina pode sofrer oxidação, transformando-se em metahemoglobina^{16,17,23,52}, em decorrência de alterações metabólicas oxidativas^{13,25} pela interação com drogas, entre elas o nitrito de sódio^{16,17,23,52}. A metahemoglobina, por sua vez, não tem capacidade de transporte de oxigênio, podendo ser revertida à hemoglobina por intermédio das vias metabólicas da glicose^{13,25}. O sistema metahemoglobina redutase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), em condições fisiológicas, participa com 5% da reversão metabólica da metahemoglobina. Este sistema é dependente da via da glicólise oxidativa, ou via das pentoses, com função importante na manutenção dos níveis adequados de NADPH, que atua como doador de hidrogênio em vários processos enzimáticos e na formação de ribose para o metabolismo dos ácidos nucleicos²⁵, de acordo com o seguinte esquema:



Esquema de redução da metahemoglobina pelo sistema metahemoglobina redutase NADPH dependente^{13,25}.

O sistema metahemoglobina redutase NADPH dependente pode ser estimulado por várias drogas, entre elas o azul de metileno^{25,48,52}. Sob a ação desta droga, o NADPH transfere hidrogênio e elétrons para o azul de metileno na forma oxidada, transformando-o em branco de metileno na forma reduzida, que adquire a capacidade de transferir elétrons para a metahemoglobina, revertendo-a para hemoglobina^{16,17,25}, de acordo com o seguinte esquema:



Esquema de redução da metahemoglobina pelo azul de metileno^{13,25}.

Esta reação pode ser obtida de modo adequado com os eritrócitos de indivíduos normais. Nos indivíduos com deficiência total de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), entretanto, esta estimulação não ocorre quando se adiciona o azul de metileno, não havendo redução da metahemoglobina como resultado da reação^{16,17,25,52}.

A G6PD, entre as várias enzimas que participam da via das pentoses, é a primeira e a única capaz de modular a formação do NADPH. O NADPH, uma vez formado, tem a função de transportar hidrogênio e elétrons, atuando como redutor final

nos processos metabólicos dependentes desta via enzimática. A deficiência de G6PD acarretará, portanto, igual deficiência de NADPH.

A verificação da deficiência de G6PD pode ser feita por vários métodos. Um deles é o de BREWER et alii¹⁷, que se baseia na formação artificial da metahemoglobina pelo nitrito de sódio, acompanhado pela estimulação da via das pentoses com azul de metileno, que poderá ou não revertê-la em hemoglobina^{16,17,25,52}.

O estudo do comportamento da via das pentoses está estreitamente relacionado com os processos fisiopatológicos da malária, pois nesta doença, o eritrócito desempenha importante papel^{2,53,57}. Assim, vários autores^{35,39,40,50,66} têm procurado demonstrar as relações existentes entre determinadas hemoglobinopatias e deficiências enzimáticas e a resistência à infecção. A hemoglobinopatia S, por exemplo, tem sido associada a maior resistência à infecção pelo *Plasmodium falciparum*^{35,50,66}. Por outro lado, a deficiência em G6PD também tem sido apontada como capaz de conferir graus variados de proteção, para individuos expostos à malária causada pelo *Plasmodium falciparum*^{10,14,22,26,35,36}. Estes 2 fatores, isto é, hemoglobinopatia e deficiência enzimática, são defeitos genéticos e têm sido referidos como mais frequentes nas populações que habitam regiões endêmicas de malária a longo tempo^{2,14,21,26,28,35,50,69}.

A deficiência enzimática de G6PD tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores, sobretudo a partir de 1960^{14,16,17,26,35,36}. Os mecanismos de resistência à infecção pelo *Plasmodium falciparum*, em indivíduos com deficiência desta enzima, não são ainda perfeitamente conhecidos. Um dos aspectos as

sinalados em estudos "in vitro"^{64,67,68} refere-se ao fato de se ter demonstrada a inexistência de G6PD no *Plasmodium falciparum* e em outros plasmódios parasitas de animais. Neste sentido, SHAKESPEARE et alii⁶⁴ observaram aumento da atividade da via das pentoses nos eritrócitos de macacos infectados por *Plasmodium knowlesi*. Admite-se, portanto, que o plasmódio utiliza esta via metabólica do hospedeiro para o desenvolvimento de seu ciclo biológico^{22,62,64,67,68}. Dessa forma, nos indivíduos com deficiência de G6PD, tudo se passaria como se o parasita tivesse dificuldade para completar seu ciclo, em função das alterações do metabolismo desta via enzimática^{14,26,35,36,62,64,67,68}.

O metabolismo da via das pentoses pode também ser afetado pela ação de certos medicamentos, entre os quais vários antimaláricos^{25,30,52}. Tem sido assinalada a indução da anemia hemolítica importante em doentes com malária e deficiência de G6PD tratados por essas drogas^{2,16,17,19,30,52,59}. Por este motivo, a verificação dos efeitos sobre o metabolismo da via das pentoses é um dos testes obrigatórios que se realizam com antimaláricos ainda não liberados para uso clínico. Este procedimento foi feito com a clindamicina*, antibiótico derivado halogenado da lincomicina, que mostrou ser eficiente "in vitro"³³ e "in vivo"⁴⁹ no tratamento da malária. PEREIRA et alii⁵⁵, empregando a clindamicina no tratamento de doentes com infecção causada pelo *Plasmodium falciparum*, chamaram atenção, pela primeira vez, para a diminuição acentuada dos valores do volume globular e das taxas de hemoglobina após o tratamento. BARRAVIERA et alii⁹

*BREWER, G.J. et alii. Investigation of effect of clindamycin-2- phosphate on red blood cells. In: ———. Physicians brochure for clindamycin malaria program. Michigan, The UpJohn, 1981. (trabalho realizado pelo autor na University of Michigan Medical School).

procederam à comparação do comportamento de doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, tratados pelo esquema clássico¹⁸ e pela clindamicina e observaram anemia mais acentuada, após o tratamento com esta droga.

Existe, portanto, pontos ainda não esclarecidos nas relações existentes entre o metabolismo da via das pentoses e a ação de drogas em doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*.

Os objetivos do presente trabalho são:

- propor método para a pesquisa da atividade da via das pentoses menos dispendioso, menos lesivo para os eritrócitos e tão eficiente quanto o de BREWER et alii¹⁷, com a finalidade de ser aplicado em estudo de campo;
- estudar "in vitro", com o emprego do método proposto, a ação da clindamicina em hemácias humanas normais;
- proceder a inquérito com a finalidade de avaliar a prevalência de deficiência de G6PD, em amostra de habitantes da área endêmica de malária;
- estudar os eventuais efeitos da clindamicina sobre a via das pentoses, em doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, submetidos ao tratamento por esta droga.

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
Cloreto de azul de metileno triidratado	MERCK
Cloreto de sódio	MERCK
Cloroquina	WINTHROP
Ferricianeto de potássio	MERCK
Fosfato de clindamicina	UpJOHN
Fosfato de potássio monobásico	REAGEN
Fosfato de sódio dibásico	BAKER
Glicose	MERCK
Heparina	ROCHE
Nitrito de sódio	BAKER
Saponina branca	MERCK
Tris	MERCK

2.1.2. Equipamentos e vidrarias

Agitador magnético	BIOMATIC
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 JENNA
Espectrofotômetro SPECTRONIC -70 com conversor digital LD-100	BAUSCH & LOMB
Potenciômetro	CELM
Micropipetas automáticas	OXFORD
Micropipetas descartáveis	DUPOND
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 (μ l) da solução para cada 200 microlitros (μ l) de sangue.

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

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

Esta solução é conservada a 4°C. A dose utilizada nos ex
 perimentos foi de 10 microlitros (μ l) da solução para ca
 da 200 microlitros (μ l) de sangue.

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 sangue.

d) Solução de nitrito de sódio a 1,25%

nitrito de sódio 1,25 gramas (g)
 água destilada 100 mililitros(ml)

Esta solução é preconizada quando se utiliza o método de BREWER et alii¹⁷. Conserva-se em frasco escuro, a 4°C.

e) Solução de tampão fosfato, pH 6,8

fosfato de potássio mono
 básico 34,6 gramas (g)
 fosfato de sódio dibásico .. 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 utilizados 2 gotas da solução para hemolisar 200 microlitros (μ l) de sangue. 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	5,0 gramas (g)
cloreto de sódio	0,9 gramas (g)
água destilada	100 mililitros (ml)

j) Solução de clindamicina a 0,3%

fosfato de clindamicina ...	150 miligramas (mg)
glicose	2,5 gramas (g)
água destilada	50 mililitros (ml)

A dose utilizada foi a necessária para se obter concentração final de clindamicina igual a 0,03 miligramas (mg) para cada 200 microlitros (μ l) de sangue (0,15 miligramas por mililitro de sangue).

l) Ferricianeto de potássio na forma de cristais

m) Cianeto de potássio na forma de cristais

2.2. Material de Estudo

2.2.1. Material utilizado para a padronização do método proposto

Sangue total e hemácias lavadas foram utilizadas para o desenvolvimento do método proposto, com a finalidade de avaliar a redução da metahemoglobina pela via das pentoses.

a) Sangue total

O sangue total foi utilizado em 3 procedimentos, a saber: avaliação da quantidade ideal de nitrito de sódio; avaliação do tempo ideal de incubação; e padronização dos valores normais do método.

Avaliação da quantidade ideal de nitrito de sódio - Foram estudados 4 indivíduos adultos normais, da raça branca, sendo 2 do sexo masculino e 2 do feminino, todos escolhidos entre estudantes da Faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP, que se apresentaram como voluntários, com idades que variavam de 20 a 30 anos. De todos eles 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 para a dosagem da quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio e redução desta pelo azul de metileno, pelo método proposto. O sangue assim obtido foi mantido em banho de gelo a 4°C, até a execução do método⁵².

Avaliação do tempo ideal de incubação - Foram estudados 2 dos 4 indivíduos escolhidos para o procedimento anterior, sendo 1 do sexo masculino e o outro do feminino, com idades respectivamente de 28 e 24 anos. 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 para a dosagem da quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio e redução desta pelo azul de metileno, pelo método proposto. O sangue assim obtido foi mantido em banho de gelo a 4°C, até a execução do método⁵².

Padronização dos valores normais do método - Foram estudados 44 indivíduos normais, da raça branca, escolhidos entre estudantes que se apresentaram como voluntários, da Faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP, sendo 22 do sexo masculino e 22 do feminino, com idades que variavam de 20 a 30 anos. De todos eles foram colhidos 10 ml de sangue por flebopunção, em tubos heparinizados com 5 gotas de heparina, equivalentes a 250 unidades para posterior determinação da taxa de hemoglobina, obtenção do valor do volume globular e para a dosagem da quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio e redução desta pelo azul de metileno, pelo método proposto. O sangue assim obtido foi mantido em banho de gelo a 4°C, até a execução do método⁵².

b) Hemácias lavadas

As hemácias lavadas foram utilizadas em 2 procede

dimentos, a saber: avaliação do tempo ideal de incubação; e padronização dos valores normais do método.

Avaliação do tempo ideal de incubação - Foram estudados 2 indivíduos adultos selecionados entre os 44 incluídos na padronização do método, sendo 1 do sexo masculino e o outro do feminino, com idades respectivamente de 28 e 24 anos. Deles foram colhidos 10 ml de sangue por flebopunção, em tubos heparinizados com 5 gotas de heparina, equivalentes a 250 unidades, para posterior determinação da taxa de hemoglobina, obtenção do valor do volume globular e para dosagem da quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio e redução desta pelo azul de metileno, pelo método proposto. O sangue assim obtido foi mantido em banho de gelo a 4°C, até a execução do método⁵².

Padronização dos valores normais do método - Foram estudados 12 indivíduos escolhidos entre os 44 que participaram da padronização do método com emprego de sangue total, sendo 6 do sexo masculino e 6 do feminino, com idades que variavam de 20 a 30 anos. De todos eles 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 para dosagem da quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio e redução desta pelo azul de metileno, pelo método proposto. O sangue assim obtido foi mantido em banho de gelo a 4°C, até a execução do método⁵².

2.2.2. *Material utilizado para estudo "in vitro" da ação da clindamicina sobre hemácias humanas normais*

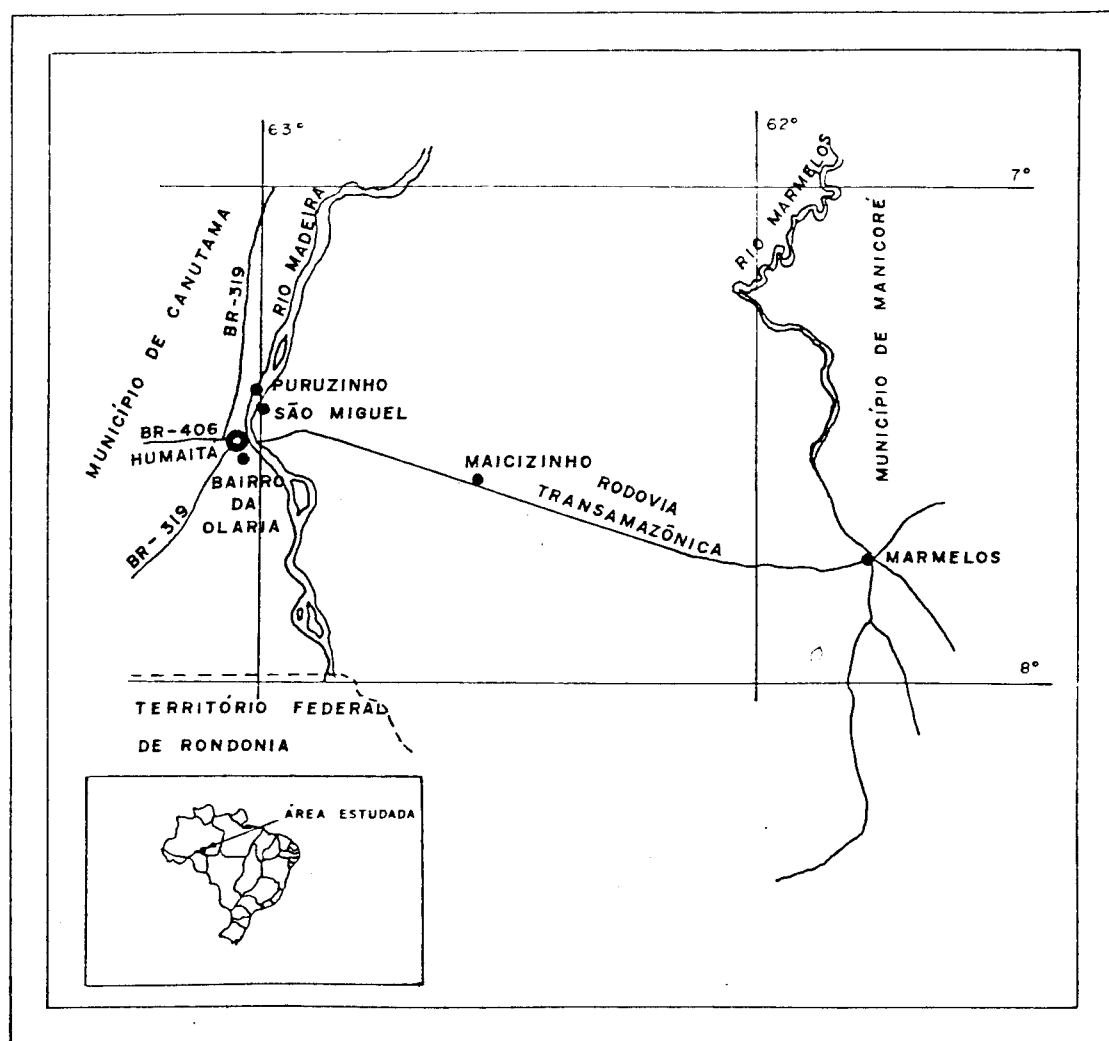
Foram escolhidos 6 indivíduos normais, dos 44 envolvidos na padronização do método com emprego de sangue total, dos quais 3 eram do sexo masculino e 3 do feminino, com idades que variavam de 20 a 30 anos. De todos eles foram obtidos 20 ml de sangue por flebopunção, coletados em tubos heparinizados com 10 gotas de heparina equivalentes a 500 unidades, para posterior determinação da taxa de hemoglobina, obtenção do valor do volume globular e aplicação do método proposto com hemácias pré-incubadas com a clindamicina. O sangue assim obtido foi mantido em banho de gelo a 4°C, até a execução do método⁵².

2.2.3. *Amostra estudada em área endêmica de malária para avaliar a prevalência da deficiência de G6PD*

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 participa do Campus Avançado da Fundação Projeto Rondon, em convênio com a UNESP, havendo, por esta razão, maior facilidade e apoio para a realização de pesquisa de campo. E, por outro lado, porque o município de Humaitá está incluído entre os 7 do Estado do Amazonas e os 46 de toda a região Amazônica em que se tem observada maior transmissão de malária⁴³.

A cidade de Humaitá é atravessada pelo Rio Madeira, em cuja margem esquerda se situa. O município também é atra

vessado por 3 rodovias, que lhe conferem enorme importância estratégica: a Porto Velho-Manaus (BR-319), a Transamazônica e a Humaitã-Lábrea (BR-406), como apresentado no mapa a seguir.



Mapa do Município de Humaitã, Estado do Amazonas, indicando as localidades estudadas ao longo do Rio Madeira e rodovias.

Em agosto de 1983 a população do município era estimada em 25.000 habitantes, dos quais 18.000 residiam na sede e 7.000 na zona rural*.

A maioria dos habitantes da zona rural vive nas localidades existentes ao longo do Rio Madeira, seus afluentes e igarapês. Essas localidades, conhecidas na região como "beiradão", são mais antigas e relativamente mais povoadas.

As rodovias são de construção mais recente e suas margens menos povoadas. A Transamazônica, que não é pavimentada, percorre o município de Humaitá por 126 km, da sede até a localidade de Marmelos, situada às margens do rio do mesmo nome. Nesse trecho da rodovia há um pequeno povoado no km 57, denominado Maicizinho, formado por casas esparsas às margens da estrada, próximas da floresta.

A cidade de Humaitá, construída na parte alta da margem esquerda do Rio Madeira, possui casas de alvenaria na zona central e na periferia, principalmente ao longo do rio, casas do tipo "tapiri", muitas vezes em contacto com a floresta, em tudo semelhantes às do "beiradão" e das estradas, onde há falta de saneamento básico. Um dos exemplos dessa situação é o que ocorre com o bairro da Olaria. As condições epidemiológicas desse bairro são bastante semelhantes às encontradas nos povados da zona rural.

A amostra escolhida em agosto de 1983, para avaliar a prevalência da deficiência de G6PD incluiu 121 indivíduos, habitantes do município de Humaitá, 52 dos quais residiam em povoados situados ao longo do Rio Madeira, 41 na zona urbana,

*SUCAM de Humaitá - MINISTÉRIO DA SAÚDE - Informação Pessoal, 1983.

no bairro da Olaria e 28 na localidade de Maicizinho. Destes, 56 eram do sexo masculino e 65 do feminino, variando as idades de 3 a 70 anos. Foram também incluídos para a avaliação da deficiência de G6PD 20 doentes com diagnóstico etiológico de malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, atendidos no Posto da SUCAM de Humaitá. Todos eram do sexo masculino e as idades variavam de 12 a 47 anos. Os indivíduos incluídos na amostra, bem como os doentes, foram submetidos à avaliação clínica, inclusive para determinação do grau de esplenomegalia^{15,27}, além da coleta de sangue para realização de exame parasitológico^{54,57} e reação de hemaglutinação passiva, realizada com antígeno de plasmódio⁴⁴. A avaliação clínica foi diferente para os indivíduos (Anexo 1) e para os doentes (Anexo 2). Todos os indivíduos incluídos no estudo consentiram em dele participar, após explicação minuciosa dos objetivos do mesmo.

Foram constituídos os seguintes grupos de estudo:

GRUPO 1 - Amazonenses normais: integrado por 67 indivíduos nascidos na região amazônica, sem antecedentes de surtos prévios de malária, sem queixas clínicas, sem esplenomegalia, com exame parasitológico de sangue e hemaglutinação passiva para o diagnóstico de malária negativos.

GRUPO 2 - Amazonenses com antecedente de malária ou com malária atual: constituído por 54 indivíduos com antecedentes de surtos prévios de malária e/ou esplenomegalia, e/ou reação de hemaglutinação passiva para o diagnóstico de malária positiva; e 7 doentes com diagnóstico etiológico de malária atual, causada pelo *Plasmodium falciparum*. Todos eram nascidos na Região Amazônica.

GRUPO 3 - Doentes com malária não amazonenses: formado por 13 doentes com diagnóstico etiológico de malária atual, causada pelo *Plasmodium falciparum*, nascidos em outros Estados do país, não pertencentes à Região Amazônica.

2.2.4. *Amostra utilizada para a padronização dos valores normais de volume globular, hemoglobina e avaliação da redução da metahemoglobina pela via das pentoses*

Para a padronização dos valores normais do volume globular e das taxas de hemoglobina foram coletadas amostras de sangue de 24 indivíduos adultos do sexo masculino, com idades que variavam de 19 a 31 anos, nativos da região, que nunca haviam tido malária, com ausência de esplenomegalia, exame parasitológico de sangue e reação de hemaglutinação passiva negativos. Entre estes, 6 também foram escolhidos para a avaliação da redução da metahemoglobina pela via das pentoses pelo método proposto para hemácias lavadas.

2.3. *Métodos de Estudo*

Para atingir os objetivos desta pesquisa foram utilizados vários procedimentos.

2.3.1. *Padronização do método para avaliação da redução da metahemoglobina pela via das pentoses em sangue total e hemácias lavadas*

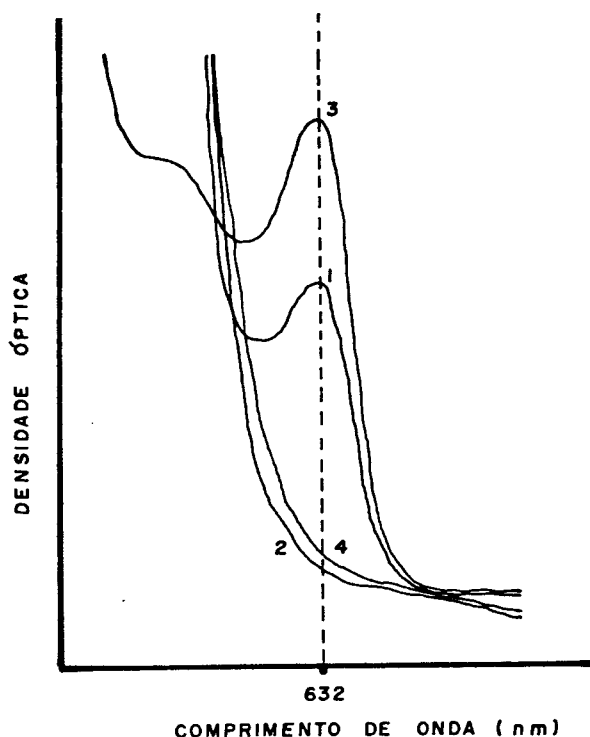
O método proposto, com a finalidade de avaliar a

via das pentoses, baseia-se na utilização do método de BREWER et alii¹⁷, associado ao de EVELYN & MALLOY²³.

Adicionou-se nitrito de sódio à amostras de sangue total ou hemácias lavadas, com a finalidade de produzir metahemoglobina, procedendo-se, a seguir, à estimulação da via das pentoses com azul de metileno em presença da glicose, segundo o método de BREWER et alii¹⁷. A seguir, procedeu-se à avaliação da quantidade de metahemoglobina formada, pela leitura em espectrofotômetro, de acordo com o método de EVELYN & MALLOY²³.

O método proposto inclui: avaliação da quantidade de metahemoglobina formada, pela leitura em espectrofotômetro de duplo feixe SPECORD UV-VIS; avaliação da quantidade ideal de nitrito de sódio para sangue total; avaliação do tempo ideal de incubação para sangue total e hemácias lavadas; e, com base nos resultados obtidos, foi estabelecida a padronização dos valores normais do método para sangue total e 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", pág. 09), subdividindo-o em 2 alíquotas. O resultado é apresentado por intermédio de 4 curvas, de acordo com a Figura a seguir.



Nota-se na Figura acima:

Primeira alíquota

- curva 1 - espectro da metahemoglobina no material hemolisado;
- curva 2 - espectro da cianometahemoglobina e cianohemoglobina 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 formada pela adição de cristais de ferricianeto de potássio;
- curva 4 - espectro da cianometahemoglobina pela adição de cristais de cianeto de potássio.

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 a 100% de metahemoglobina e, entre as curvas 1 e 2 corresponde à quantidade desconhecida de metahemoglobina.

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

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

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

2.3.1.2. *Avaliação da quantidade ideal de nitrito de sódio em sangue total.* As concentrações de glicose e azul de metileno, utilizadas no método de BREWER et alii¹⁷ são bem determinadas porém, a quantidade de nitrito de sódio pode promover oxidação irreversível, impedindo a redução da metahemoglobina em indivíduos deficientes em G6PD^{16,17,52}. A variável testada neste experimento foi a concentração ideal de nitrito de sódio, mantendo-se constantes as concentrações de glicose e azul de metileno. Para tanto foram utilizados para cada 200 µl de sangue total, 10 µl de glicose a 5%, 10 µl de azul de metileno a 0,015% e 10 µl de solução de nitrito de sódio nas seguintes concentrações, a saber: 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%; 0,7%; 0,8%; 0,9%; 1,0%; 1,1%; 1,2%; 1,3%; 1,4%; 1,5%; e 2,0%. Os testes foram realizados em duplicata, sendo utilizados para cada concentração de nitrito de sódio 2 tubos de ensaio, de acordo

com o esquema a seguir:

MATERIAL	TUBOS	
	1	2
Sangue total	200 µl	200 µl
Glicose a 5%	10 µl	10 µl
Nitrito de sódio em diferentes concentrações	10 µl	10 µl
Azul de metileno a 0,015%	H	10 µl

O material assim distribuído foi homogeneizado por inversão, arrolhado com papel parafilme e incubado em banho maria a 37°C durante 3 horas. A seguir, procedeu-se à hemólise, com 2 gotas de saponina a 2% e adicionou-se 10 ml de tampão fosfato, pH 6,8, para leitura em espectrofotômetro SPECORD UV-VIS.

Após a leitura da quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio e da quantidade residual de metahemoglobina, depois da estimulação da via das pentoses com o azul de metileno, foi feito o cálculo da capacidade de redução pelo azul de metileno. Este cálculo baseia-se na quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio e na quantidade residual de metahemoglobina após redução pelo azul de metileno, de acordo com a seguinte relação:

$$\text{Capacidade de redução pelo azul de metileno (\%)} = \frac{\left(\begin{array}{l} \text{Quantidade de meta} \\ \text{hemoglobina produ} \\ \text{zida pelo nitrito} \\ \text{de sódio no tubo 1} \end{array} - \begin{array}{l} \text{Quantidade de meta} \\ \text{hemoglobina produ} \\ \text{zida pelo nitrito} \\ \text{de sódio no tubo 2} \end{array} \right)}{\left(\begin{array}{l} \text{Quantidade de metahemoglobina produzida} \\ \text{pelo nitrito de sódio no tubo 1} \end{array} \right)} \times 100$$

2.3.1.3. *Avaliação do tempo ideal de incubação em sangue total.* Para a realização deste experimento, foram utilizados os mesmos reagentes descritos em 2.3.1.2, fixando-se a concentração do nitrito de sódio em 0,7%. Os testes foram realizados em duplicata, de acordo com o esquema descrito em 2.3.1.2, procedendo-se à hemólise do material nos seguintes minutos de incubação: 0; 15; 30; 45; 60; 75; 90; 105; 120; 135; 150; 165; 180; 195 e 210. A leitura da quantidade de metahemoglobina foi realizada em espectrofotômetro SPECORD UV-VIS, procedendo-se, a seguir, ao cálculo da capacidade de redução pelo azul de metileno.

2.3.1.4. *Avaliação do tempo ideal de incubação em hemácias lavadas.* A finalidade deste experimento foi verificar a influência do plasma sobre a quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio e redução desta pelo azul de metileno, além de verificar o tempo mais adequado de incubação. Para a 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 foram ressuspensas com solução glico-fisiológica a 5%, repetindo-se este procedimento por 3 vezes. No final, as hemácias lavadas foram ressuspensas com solução de tampão Tris, NaCl, glicose, pH 7,45, na proporção de 1 para 1, após o que foi feita nova determinação do volume globular e das taxas de hemoglobina. Para a realização deste experimento, foram utilizados os mesmos reagentes descritos em 2.3.1.2, fixando-se a concentração de nitrito de sódio em 0,7%, tendo-se realizado os testes em duplicata. Depois da incubação do material em banho-maria a 37°C, foi obtida a hemó

lise com saponina, a partir dos seguintes minutos de incubação: 0; 15; 30; 45; 60; 75; 90 e 120. A leitura da quantidade de metahemoglobina foi realizada em espectrofotômetro SPECORD UV-VIS, procedendo-se, a seguir, ao cálculo da capacidade de redução pelo azul de metileno.

2.3.1.5. *Padronização dos valores normais do mē*
todo para sangue total. Para a realização destes experimentos foi aplicado o método proposto para sangue total como descrito em 2.3.1.2, utilizando-se 0,7% de concentração de nitrito de sódio e procedendo-se à hemólise do material após incubação em banho maria a 37°C, pelos períodos de 90 e 120 minutos. 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 capacidade de redução pelo azul de metileno.

2.3.1.6. *Padronização dos valores normais do mē*
todo para hemácias lavadas. Para a realização deste experimento foi aplicado o método proposto para hemácias lavadas tal como foi descrito em 2.3.1.4, utilizando-se o nitrito de sódio na concentração de 0,7% e procedendo-se à hemólise do material após incubação em banho-maria a 37°C, pelos períodos de 60, 90 e 120 minutos. 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 capacidade de redução pelo azul de metileno.

2.3.2. Estudo "in vitro" da ação da clindamicina sobre hemácias humanas normais

A finalidade deste experimento foi verificar o possível efeito da clindamicina quando pré-incubada com hemácias humanas normais lavadas, sobre a quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio e pela capacidade de redução do azul de metileno.

Após a coleta do sangue, a determinação do volume globular e das taxas de hemoglobina, antes e depois da retirada do plasma, lavagem das hemácias e ressuspensão em tampão Tris, NaCl, glicose, pH 7,45, foram diluídos 9,5 ml de hemácias lavadas para 0,5 ml de solução de clindamicina a 0,3% utilizando-se, para o controle, solução de glicose a 5%.

Os tubos de controle e os com clindamicina foram pré-incubados em banho-maria a 37°C durante 1, 3 e 5 horas, respectivamente. Após cada período de pré-incubação, foi aplicado o método padronizado para hemácias lavadas, determinando-se a quantidade de metahemoglobina e a capacidade de redução pelo azul de metileno aos 60, 90 e 120 minutos de incubação, em espectrofotômetro SPECORD UV-VIS, tanto nos tubos de controle quanto nos tubos com clindamicina.

2.3.3. Avaliação da prevalência da deficiência de G6PD em amostra da população de Humaitã

A pesquisa de deficiência de G6PD na amostra da população de Humaitã foi realizada pelo método de BREWER et alii¹⁷.

2.3.4. Métodos utilizados para padronização dos valores normais do volume globular, das taxas de hemoglobina e avaliação da redução da metahemoglobina pela via das pentoses.

O método utilizado para a dosagem das taxas de hemoglobina foi o da cianometahemoglobina⁵¹. Para a determinação do volume globular foi utilizado o método do microhematócrito⁵¹ e nos estudos de campo em Humaitã o método escolhido foi o do macrohematócrito⁵¹. A avaliação da redução da metahemoglobina pela via das pentoses foi realizada pelo método proposto para hemácias lavadas.

2.3.5. Esquemas de tratamento da malária utilizados nos doentes

Os doentes com diagnóstico etiológico de malária causada pelo *Plasmodium falciparum* foram submetidos a 2 esquemas de tratamento⁴⁶, que se acham expressos na Tabela 1.

TABELA 1. Distribuição dos doentes tratados pelos esquemas terapêuticos utilizados

ESQUEMAS	DROGA	DOENTES TRATADOS nº	DOSE mg/kg/dia	VIA	INTERVALO horas	DURAÇÃO dias
a	Clindamicina	10	20	EV	12	3
	Cloroquina		10	IM	12	1
			7,5	VO	12	2
b	Clindamicina	10	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 globular⁵¹, avaliação das taxas de hemoglobina⁵¹ e contagem de reticulócitos pelo método do azul cresil brilhante⁵¹.

2.3.6. Avaliação da deficiência de G6PD nos doentes com malária

A avaliação da deficiência de G6PD nos doentes com diagnóstico etiológico de malária causada pelo *Plasmodium falciparum* e tratados por ambos os esquemas terapêuticos foi feita pelo método de BREWER et alii¹⁷, antes do tratamento.

2.3.7. Avaliação da redução da metahemoglobina pela via das pentoses nos doentes com malária

Nos doentes com diagnóstico etiológico de malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, tratados por ambos os esquemas, procedeu-se à avaliação da redução da metahemoglobina pela via das pentoses pelo método padronizado para hemácias lavadas, antes e após o tratamento.

A leitura das dosagens de metahemoglobina foi realizada aos 60, 120, 180 e 240 minutos de incubação, em espectrofotômetro SPECTRONIC 70, com conversor digital LD 100. No final foi calculada a capacidade de redução pelo azul de metileno e comparado em relação aos esquemas terapêuticos.

2.3.8. Métodos estatísticos

A análise estatística foi efetuada para verifi

car a comparação de 2 médias, usando-se o teste "t", cuja estatística calculada foi apresentada acompanhada de seu respectivo nível de significância (p), em 2 situações:

a) Para amostras independentes:

- verificação do efeito do sexo: Tabelas 5 e 7;
- verificação do efeito do volume globular e da hemoglobina no pós-tratamento: Tabela 12;
- verificação do efeito do pré e pós-tratamento em relação aos reticulócitos: Tabela 12;
- verificação do efeito do esquema de tratamento em relação aos tempos de incubação no pós-tratamento: Tabelas 14, 16 e 18.

b) Para amostras dependentes:

- verificação do efeito dos tempos de incubação: Tabelas 5 e 7;
- verificação do efeito do tratamento em relação com volume globular, hemoglobina e reticulócitos: Tabela 12;
- verificação do efeito do tratamento em relação aos tempos de incubação: Tabelas 14, 16 e 18.

Para a comparação de mais de 2 médias, considerou-se experimento inteiramente casualizado, utilizando a análise de variância, cuja estatística "F" foi confrontada com seu respectivo valor crítico para $\alpha = 0,05$. No caso desta estatística resultar significativa calculou-se o contraste entre pares de média, cuja significância foi verificada determinando a diferença mínima significativa (Δ) pelo método de Tukey. Esta análise foi empregada para:

- verificação do efeito do volume globular e da hemoglobina em indivíduos normais e doentes antes dos tratamentos a e b: Tabela 12;
- verificação do efeito do tempo de incubação em indivíduos normais e doentes antes dos tratamentos a e b: Tabelas 14, 16 e 18.

Para verificar a prevalência de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase nos indivíduos normais e doentes com malária, foi calculada a estatística χ^2 para a hipótese H_0 : não existe associação entre malária e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (Tabela 11).

O efeito da clindamicina "in vitro" sobre hemácias humanas normais foi analisado estatisticamente, considerando-se um fatorial inteiramente casualizado, onde os fatores são:

Fator A: tratamento - grupo controle e clindamicina.

Fator B: tempo de pré-incubação: 1 hora, 3 horas e 5 horas.

Fator C: tempo de incubação: 60 minutos, 90 minutos e 120 minutos.

Foram estudadas 6 repetições em cada combinação de tratamento.

Na análise foram verificados os efeitos de interações triplas, interações duplas e efeitos principais dos fatores. A estatística "F" calculada em cada caso foi comparada com seu respectivo valor crítico para $\alpha = 0,05$. No caso de resultar efeito significativo, a análise de variância foi complementada com as comparações entre as médias efetuadas pelo processo de Tukey, calculando-se a diferença mínima significativa (Δ) (Tabela 9).

Para verificar a dependência entre 2 variáveis foi efetuado o estudo de regressão linear obtendo-se a equação ajustada, o coeficiente de correlação linear (r) e o coeficiente de determinação (r^2). Este estudo foi realizado para:

- quantidade de metahemoglobina (Y), como função da quantidade de hemoglobina (X) em sangue total (Gráfico 6);
- quantidade de metahemoglobina (Y), como função da quantidade de hemoglobina (X) em hemácias lavadas (Gráfico 6);
- quantidade de hemoglobina (Y), como função do tipo de baço (X). Neste caso, foi efetuado o estudo com a transformação logarítmica da variável dependente ($\ln_Y$) (Gráfico 7).

Os testes estatísticos foram efetuados de acordo com SNEDECOR & COCHRAN⁶⁵.

3. RESULTADOS

3.1. Padronização do Método para Avaliação da Redução da Metahemoglobina pela Via das Pentoses

3.1.1. Avaliação da quantidade ideal de nitrato de sódio

Os 4 indivíduos estudados apresentaram média de volume globular de $44,75 \pm 4,5\%$ e taxa de hemoglobina total média de $13,74 \pm 2,52$ g%, correspondente a $27,48 \pm 5,04$ mg/200 microlitros.

Os resultados da quantidade de metahemoglobina e da capacidade de redução do azul de metileno acham-se expressos na Tabela 2 e no Gráfico 1. A análise dessa tabela e do gráfico respectivo permite tecer as seguintes considerações:

TABELA 2. Avaliação da concentração ideal de nitrato de sódio, em função da quantidade de metahemoglobina e capacidade de redução pelo azul de metileno, no sangue total de 4 indivíduos, após 3 horas de incubação.

CONCENTRAÇÃO DE NITRITO DE SÓDIO g%	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA				CAPACIDADE DE REDUÇÃO %
	NS + G		NS + G + A2		
	%	mg/200 µl	%	mg/200 µl	
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,1	4,83	1,33 ± 0,17	3,49	0,96 ± 0,06	27,81 ± 5,92
0,2	13,17	3,62 ± 0,78	3,71	1,02 ± 0,15	71,82 ± 5,80
0,3	21,87	6,01 ± 1,31	3,71	1,02 ± 0,22	83,02 ± 3,67
0,4	33,44	9,19 ± 2,88	4,36	1,20 ± 0,24	86,94 ± 3,18
0,5	41,37	11,37 ± 2,76	4,36	1,20 ± 0,17	89,44 ± 1,66
0,6	46,36	12,74 ± 2,33	4,25	1,17 ± 0,21	90,81 ± 1,81
0,7	55,45	15,24 ± 3,25	4,94	1,36 ± 0,26	91,07 ± 1,12
0,8	58,55	16,09 ± 2,90	4,80	1,32 ± 0,36	91,79 ± 1,75
0,9	70,08	19,26 ± 3,28	6,44	1,77 ± 0,39	90,80 ± 1,35
1,0	70,19	19,29 ± 3,71	6,91	1,90 ± 0,65	90,15 ± 1,80
1,1	73,28	20,14 ± 3,49	7,67	2,11 ± 0,77	89,52 ± 2,81
1,2	76,96	21,15 ± 4,26	10,84	2,98 ± 1,17	85,91 ± 4,16
1,3	86,09	23,66 ± 4,56	17,13	4,71 ± 2,12	80,09 ± 9,86
1,4	86,57	23,79 ± 4,84	18,30	5,03 ± 2,17	78,85 ± 5,78
1,5	87,00	23,91 ± 4,47	23,83	6,55 ± 2,90	72,60 ± 12,25
2,0	93,15	25,60 ± 5,30	56,51	15,53 ± 5,04	39,06 ± 17,12

NS = Nitrato de sódio ; G = Glicose ; AZ = Azul de metileno

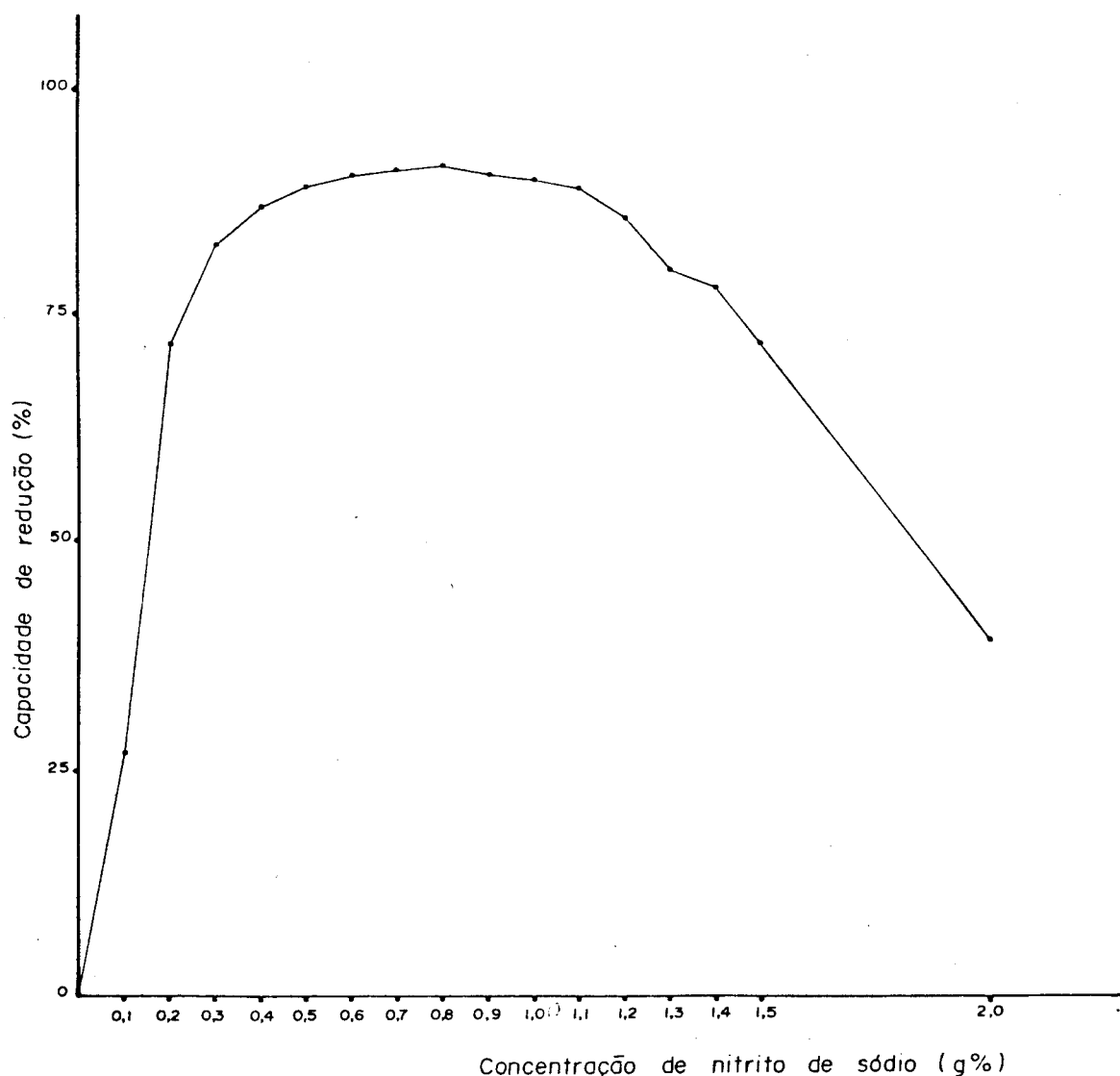


Gráfico 1 : Avaliação da concentração ideal de nitrito de sódio, em função da capacidade de redução da metahemoglobina pelo azul de metileno, no sangue total de 4 indivíduos estudados.

A quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio aumentou de 1,33 mg/200 μ l com concentração de 0,1% de nitrito de sódio, para 25,60 mg/200 μ l com concentração de 2,0% de nitrito de sódio. Quando se ativou a via das pentoses com azul de metileno, a quantidade de metahemoglobina apresentou valor de 0,96 mg/200 μ l para a concentração de 0,1% de nitrito de sódio, crescendo até 15,53 mg/200 μ l para a concentração de 2,0% de nitrito de sódio.

A capacidade de redução pelo azul de metileno

apresentou valor inicial de 27,81% para 0,1% de concentração de nitrito de sódio. Os valores cresceram até atingirem a concentração de 0,5% de nitrito de sódio, equivalentes à capacidade de redução pelo azul de metileno de 89,44%, mantendo-se, a seguir, constante até a concentração de 1,1% de nitrito de sódio. A partir de 1,2% de concentração de nitrito de sódio houve de crêscimo dos valores, atingindo 39,06% de capacidade de redução pelo azul de metileno e 2,0% de concentração de nitrito de sódio.

3.1.2. Avaliação do tempo ideal de incubação no sangue total

Os 2 indivíduos estudados apresentaram média de volume globular de $43,50 \pm 2,12\%$ e taxa de hemoglobina total média de $12,22 \pm 2,94 \text{ g\%}$, correspondente a $24,44 \pm 5,88 \text{ mg/200 } \mu\text{l}$.

Os resultados da quantidade de metahemoglobina e da capacidade de redução pelo azul de metileno encontram-se expressos na Tabela 3 e Gráficos 2 e 3. A análise desta tabela e dos gráficos respectivos permite considerar que a quantidade de

TABELA 3. Cinética de formação de metahemoglobina pelo nitrito de sódio e redução desta pelo azul de metileno, no sangue total de 2 indivíduos.

TEMPO DE INCUBAÇÃO (minutos)	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA				CAPACIDADE DE REDUÇÃO %
	NS + G		NS + G + AZ		
	%	mg/200 µl	%	mg/200 µl	
0	14,70	3,60	14,44	3,52	2,22
15	30,99	7,72	27,85	6,99	9,45
30	36,19	9,20	27,09	6,57	28,58
45	44,37	11,11	20,52	4,89	44,01
60	45,52	11,30	12,95	2,99	73,53
75	50,50	12,22	9,34	2,13	82,56
90	51,75	12,65	6,37	1,44	88,61
105	53,28	12,99	4,84	1,11	91,45
120	54,67	13,50	4,57	1,07	92,07
135	56,96	13,86	4,24	0,95	92,85
150	57,21	13,87	4,30	1,00	92,79
165	57,18	13,87	3,55	0,86	93,79
180	57,54	14,02	3,74	0,90	93,58
195	56,99	13,80	3,27	0,78	94,34
210	57,99	13,95	4,16	1,00	92,83

NS = Nitrito de sódio; G = Glicose ; AZ = Azul de metileno

metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio foi de 3,60 mg/200 μ l no tempo zero. Este valor cresceu até 90 minutos de incubação e manteve-se constante até 210 minutos, equivalente a 13,95 mg/200 μ l. Quando a via das pentoses foi ativada com azul de metileno, no tempo zero observou-se 3,52 mg/200 μ l de metahemoglobina, havendo aumento do valor até 30 minutos da incubação, quando a metahemoglobina atingiu a taxa de 6,57 mg/200 μ l. A partir daí houve decréscimo e a partir de 90 minutos de incubação a quantidade de metahemoglobina tornou-se praticamente constante.

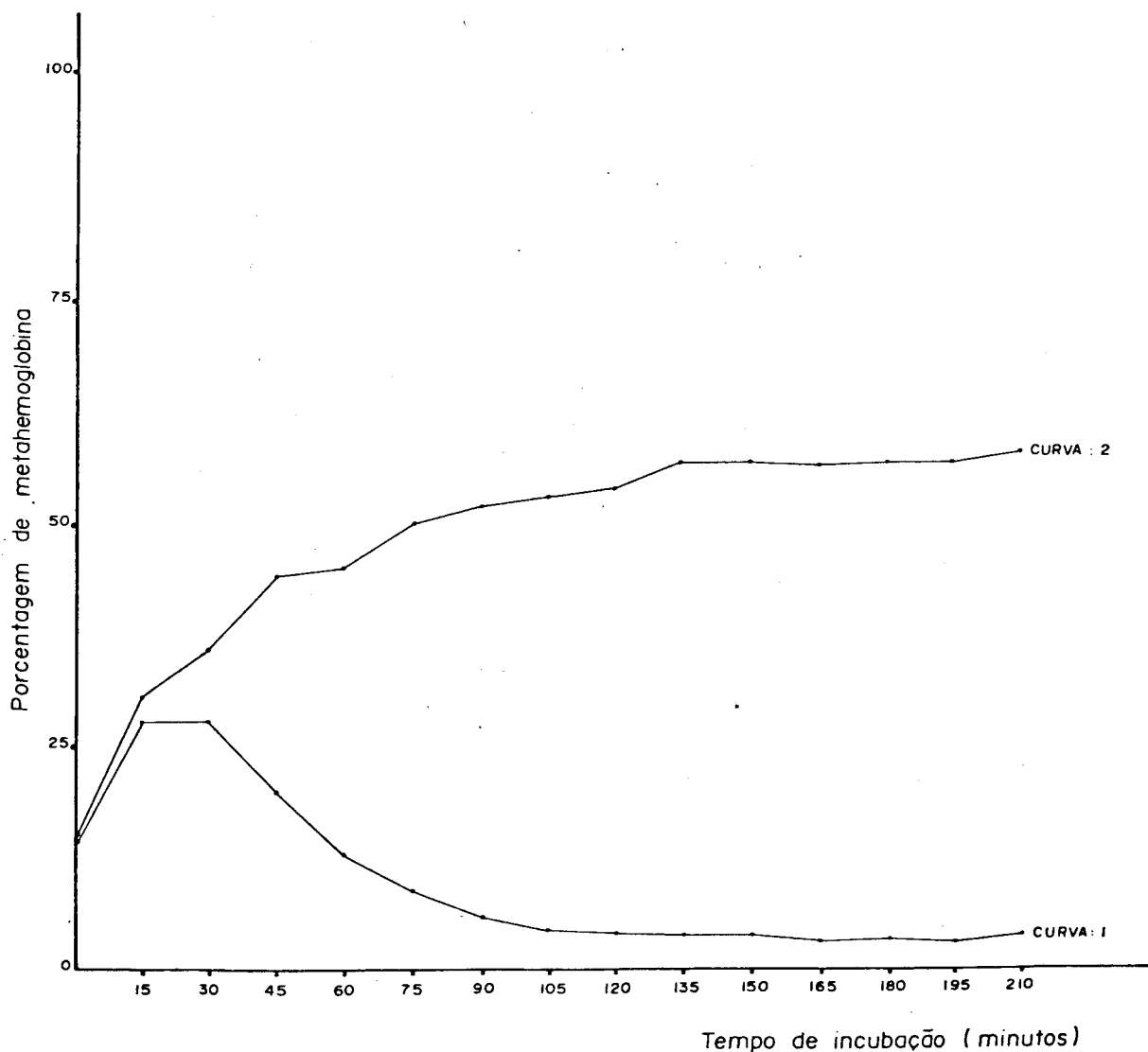


Gráfico 2 : Cinética da formação de metahemoglobina pelo nitrito de sódio (curva 2) e da redução desta pelo azul de metileno (curva 1) no sangue total.

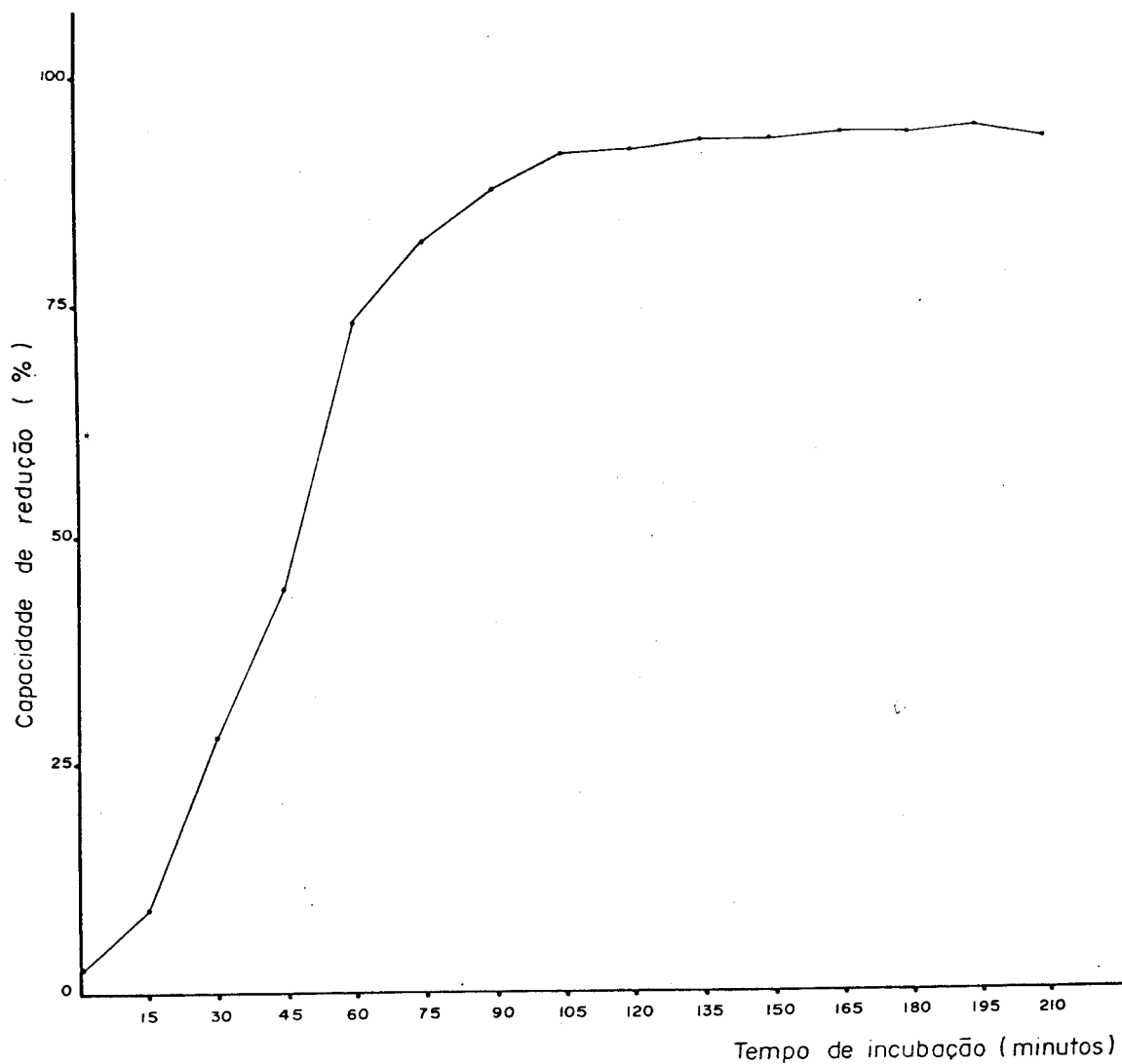


Gráfico 3 : Cinética da capacidade de redução da metahemoglobina pelo azul de metileno no sangue total.

A capacidade de redução pelo azul de metileno no tempo zero foi 2,22%. A partir dos 90 minutos de tempo de incubação a capacidade de redução manteve-se praticamente constante, registrando-se 92,83% aos 210 minutos de incubação.

3.1.3. Avaliação do tempo ideal de incubação em hemácias lavadas

Os 2 indivíduos estudados apresentaram, antes de proceder à retirada total do plasma, média de volume globular de $45,50 \pm 2,12\%$ e após, $46,50 \pm 0,70\%$. A hemoglobina total média e a hemoglobina média referida em 200 μl , apresentaram valores respectivamente de $14,20 \pm 0,84 \text{ g\%}$ e $28,40 \pm 1,69 \text{ mg/200 } \mu\text{l}$, antes e após a retirada total do plasma.

Os resultados deste experimento encontram-se na Tabela 4 e gráficos 4 e 5. A análise da tabela e dos gráficos

TABELA 4. Cinética da formação de metahemoglobina pelo nitrito de sódio e redução desta pelo azul de metileno, em hemácias lavadas de 2 indivíduos.

TEMPO DE INCUBAÇÃO (minutos)	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA				CAPACIDADE DE REDUÇÃO %
	NS + G		NS + G + AZ		
	%	mg/200 µl	%	mg/200 µl	
0	22,60	6,44	22,44	6,39	0,77
15	48,69	10,12	31,83	9,09	10,17
30	53,82	15,31	41,55	11,84	22,66
45	60,47	17,21	28,70	8,18	52,46
60	64,66	18,41	8,85	2,52	86,31
75	67,00	19,08	2,26	0,64	96,64
90	69,86	19,75	3,03	0,86	95,64
120	67,22	19,15	3,74	1,34	93,00

NS = Nitrito de sódio ; G = Glicose ; AZ = Azul de metileno

respectivos permite considerar que a quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio no tempo zero foi de 6,44 mg/200 μl . Este valor cresceu até 75 minutos de incubação, ocasião em que se registrou 19,08 mg/200 μl , mantendo-se constante até 120 minutos, quando se obteve o valor de 19,15 mg/200 μl . Ativada a via das pentoses com azul de metileno, a quantidade de metahemoglobina no tempo zero foi de 6,39 mg/200 μl , crescendo até os 30 minutos de incubação, quando se obteve o valor de 11,84 mg/200 μl havendo, a seguir, queda, registrando-se aos 60 minutos 2,52 mg/200 μl e aos 120 minutos, 1,34 mg/200 μl .

A capacidade de redução pelo azul de metileno observada no tempo zero foi de 0,77%, cresceu até atingir 86,31%

em 60 minutos de incubação e estabilizou a partir dos 75 minutos, quando foi registrado 96,64%.

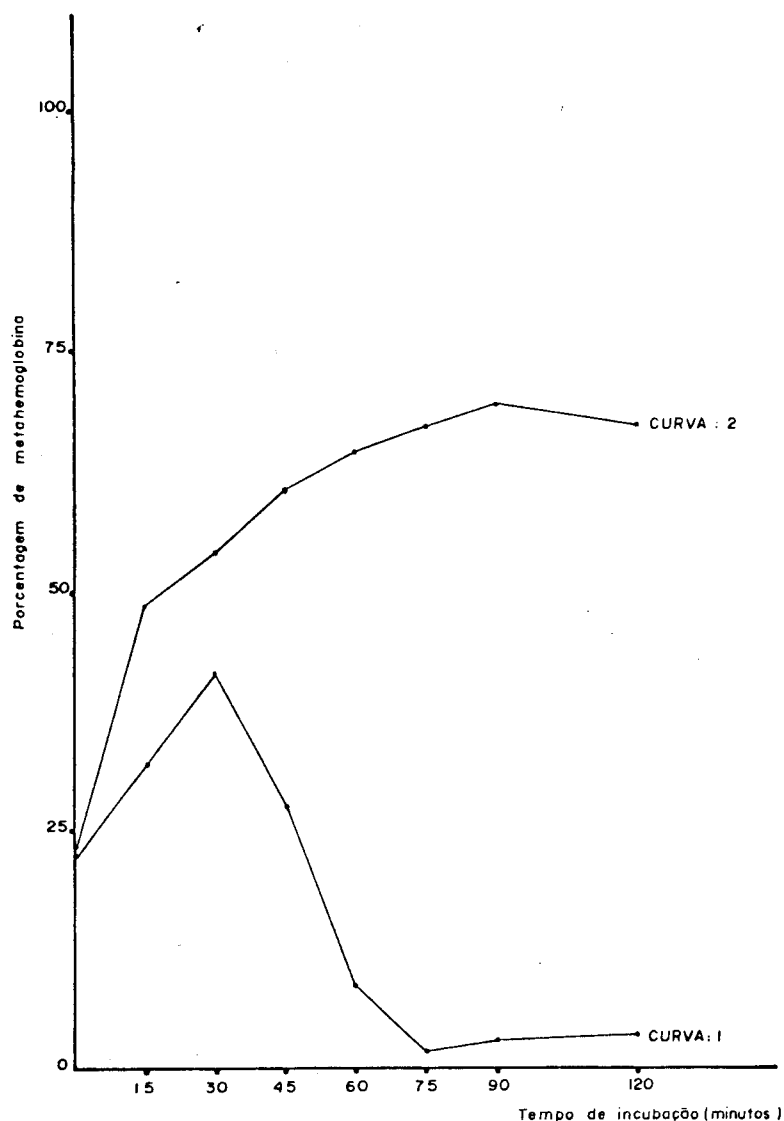


Gráfico 4 : Cinética da formação de metahemoglobina pelo nitrito de sódio (curva 2) e da redução desta pelo azul de metileno (curva 1) em hemácias lavadas.

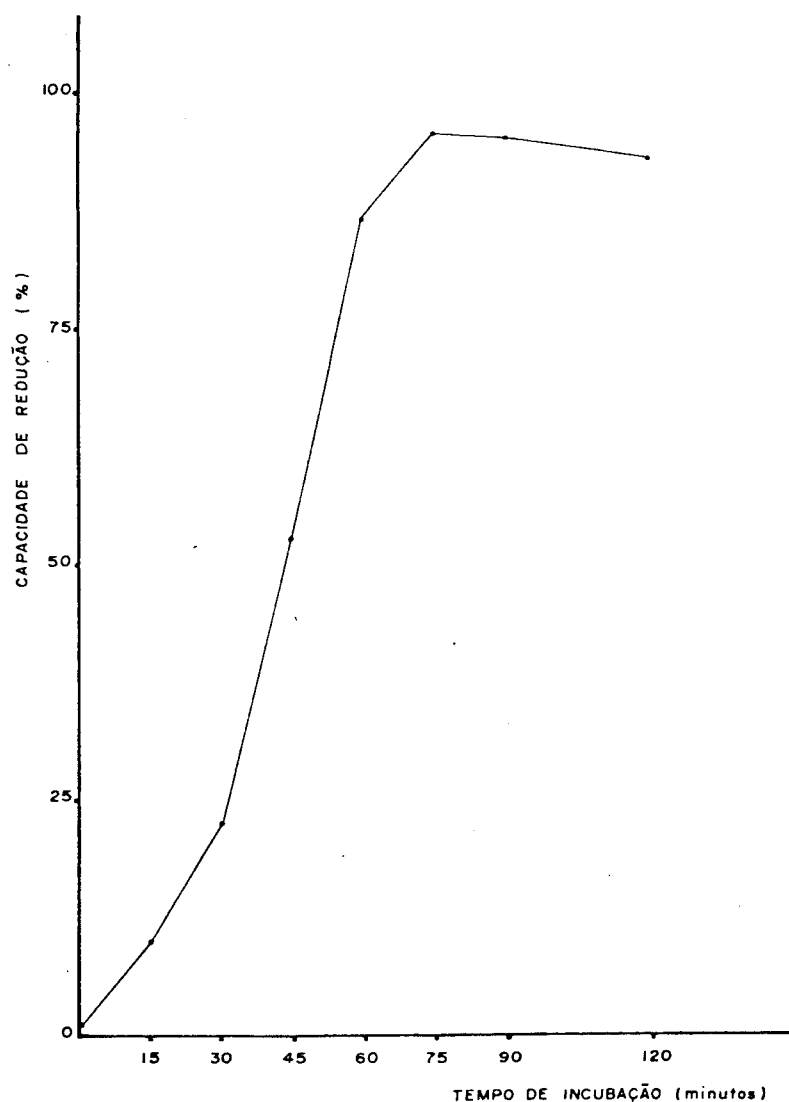


Gráfico 5 : Cinética da capacidade de redução da metahemoglobina pelo azul de metileno em hemácias lavadas.

3.1.4. Padronização dos valores normais do método para sangue total

Os resultados dos 44 indivíduos estudados encontram-se nas Tabelas 5 e 6. A análise destas tabelas permite considerar que o volume globular, a hemoglobina total e a hemoglobina referida em 200 μ l foram maiores nos indivíduos do sexo masculino, quando comparados com os do sexo feminino.

TABELA 5. Distribuição do volume globular, hemoglobina, quantidade de metahemoglobina e capacidade de redução pelo azul de metileno, no sangue total de 44 indivíduos normais de acordo com o sexo.

SEXO	A VOLUME GLOBULAR %	B HEMOGLOBINA TOTAL g%	HEMOGLOBINA em mg/200µl	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA								E CAPACIDADE DE REDUÇÃO	
				C NS + G				D NS + G + AZ				TEMPO DE INCUBAÇÃO	
				TEMPO DE INCUBAÇÃO				TEMPO DE INCUBAÇÃO				TEMPO DE INCUBAÇÃO	
				90 minutos		120 minutos		90 minutos		120 minutos		90 minutos	120 minutos
				%	mg/200µl	%	mg/200µl	%	mg/200µl	%	mg/200µl	%	%
MASCULINO													
I	46,68±2,12	14,33±1,10	28,66±2,20	53,16	15,19±1,84	55,75	15,98±1,94	4,57	1,30±0,32	4,70	1,32±0,19	91,37±2,01	91,48±1,50
FEMININO													
II	42,45±1,99	12,37±1,26	24,74±2,52	56,41	13,93±1,47	58,38	14,46±2,01	6,20	1,52±0,54	5,71	1,40±0,28	89,02±3,64	90,20±1,76

NS = Nitrito de sódio ; G = Glicose ; AZ = Azul de metileno

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

Teste "t" independente I x II	AI x AII t = 6,81*	BI x BII t = 5,54*	C90I x C90II t = 2,54*	C120I x C120II t = 2,57*	D90I x D90II t = 1,71	D120I x D120II t = 1,13	E90I x E90II t = 2,77*	E120I x E120II t = 2,62*
Nível de significância	p < 0,01	p < 0,01	0,01 < p < 0,05	0,01 < p < 0,05	0,05 < p < 0,10	0,20 < p < 0,30	p = 0,01	0,01 < p < 0,05
Comentários	AI > AII	BI > BII	C90I > C90II	C120I > C120II	D90I = D90II	D120I = D120II	E90I > E90II	E120I > E120II

Teste "t" dependente 90 x 120	C90I x C120I t = 4,25*	C90II x C120II t = 2,19*	D90I x D120I t = 0,42	D90II x D120II t = 1,31	E90I x E120I t = 0,35	E90II x E120II t = 1,82
Nível de significância	p < 0,01	0,01 < p < 0,05	p > 0,50	0,30 < p < 0,20	p > 0,50	0,05 < p < 0,10
Comentários	C90I < C120I	C90II < C120II	D90I = D120I	D90II = D120II	E90I = E120I	E90II = E120II

*significativo para $\alpha = 0,05$.

A quantidade de metahemoglobina, produzida pelo nitrito de sódio aos 90 e aos 120 minutos de tempo de incubação, foi maior nos indivíduos do sexo masculino, em relação aos do sexo feminino. Quando se comparou o tempo de incubação em relação ao sexo, a quantidade de metahemoglobina foi maior aos 120 minutos, tanto nos indivíduos do sexo masculino quanto nos do feminino. Houve correlação positiva ($r = 0,72$) quando se comparou a quantidade de metahemoglobina formada aos 90 minutos de incubação com a quantidade inicial de hemoglobina (Gráfico 6). Quando se ativou a via das pentoses com azul de metileno não houve diferença estatisticamente significativa, quer aos 90 minutos, quer aos 120 minutos de incubação, comparando-se o sexo masculino com o feminino. Também não houve diferença estatística quando se comparou o tempo de incubação, tanto nos indivíduos do sexo masculino, quanto nos do feminino.

A capacidade de redução pelo azul de metileno, aos 90 minutos e aos 120 minutos de incubação foi maior nos indivíduos do sexo masculino. Quando se comparou o tempo de incubação, não houve diferença estatisticamente significativa, tanto no sexo masculino, quanto no feminino.

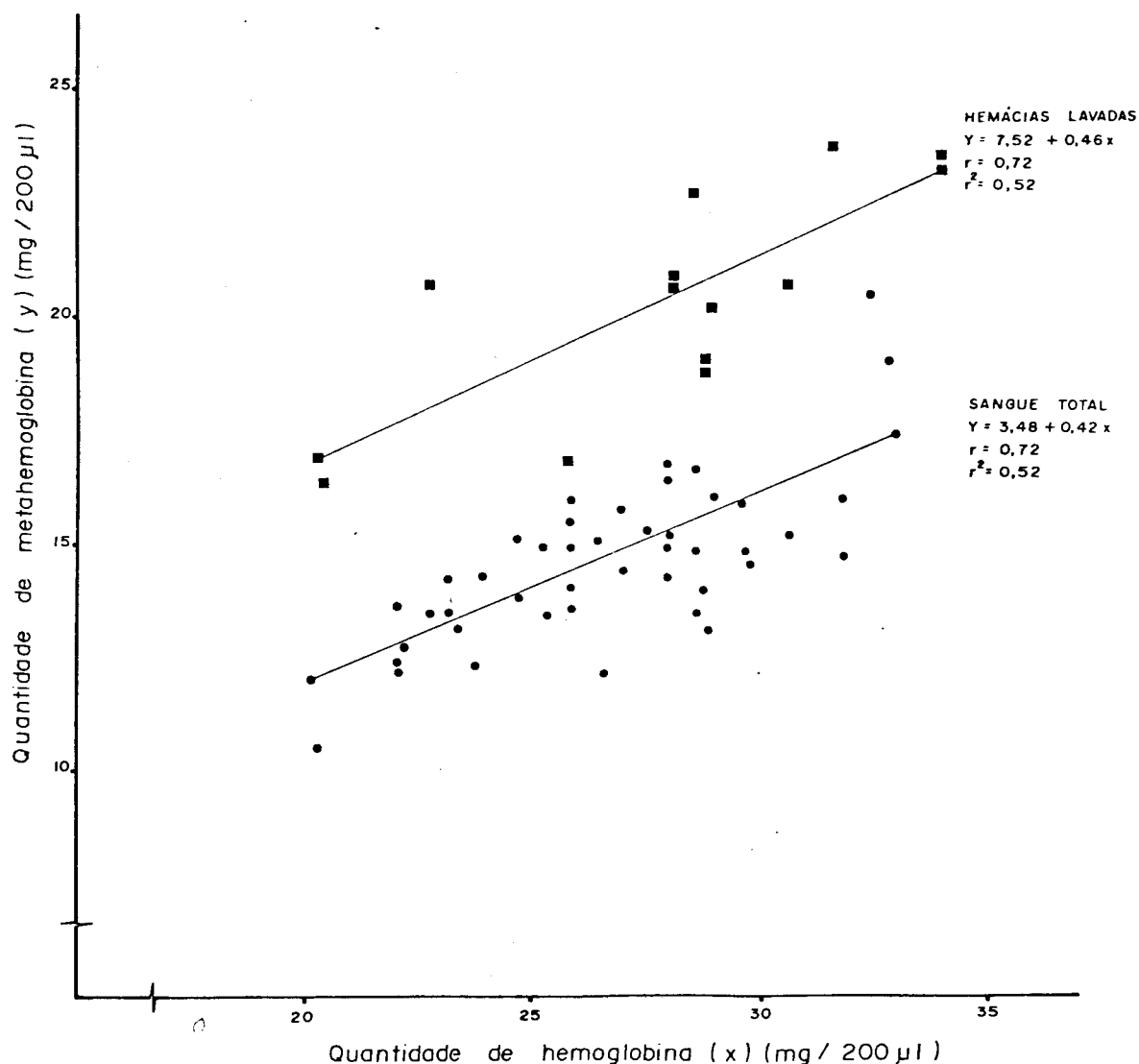


Gráfico 6 : Correlação entre a quantidade de metahemoglobina formada pelo nitrito de sódio aos 90 minutos de incubação, como função da quantidade de hemoglobina no sangue total de 44 indivíduos normais e em hemácias lavadas de 12 indivíduos normais.

3.1.5. Padronização dos valores normais do método para hemácias lavadas

Os resultados dos 12 indivíduos estudados encontram-se nas Tabelas 7 e 8. A análise destas tabelas permite considerar que o volume globular, a hemoglobina total e a hemoglobina referida em 200 µl, após a retirada do plasma, foram maiores nos indivíduos do sexo masculino, quando comparados com os do feminino.

TABELA 7. Distribuição do volume globular, hemoglobina, quantidade de metahemoglobina e capacidade de redução pelo azul de metileno, em hemácias lavadas de 12 indivíduos normais de acordo com o sexo.

SEXO	A VOLUME GLOBULAR %	B HEMOGLOBINA TOTAL g%	HEMOGLOBINA em mg/200µl	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA												E CAPACIDADE DE REDUÇÃO		
				C NS + G						D NS + G + AZ								
				TEMPO DE INCUBAÇÃO						TEMPO DE INCUBAÇÃO						TEMPO DE INCUBAÇÃO		
				60 minutos		90 minutos		120 minutos		60 minutos		90 minutos		120 minutos		60 minutos	90 minutos	120 minutos
				%	mg/200µl	%	mg/200µl	%	mg/200µl	%	mg/200µl	%	mg/200µl	%	mg/200µl	%	%	%
MASCULINO																		
I	47,16±2,56	15,13±0,85	30,56±1,74	60,40	18,46±0,90	69,85	21,34±2,11	68,09	20,81±0,94	5,66	1,73±0,59	3,35	1,04±0,44	3,43	1,05±0,43	90,62±3,22	95,17±1,73	95,00±1,84
FEMININO																		
II	40,50±4,50	12,72±1,70	25,56±3,80	64,00	16,36±2,19	77,67	19,42±2,72	73,04	18,67±1,78	10,48	2,68±1,16	3,90	0,95±0,12	4,30	1,10±0,67	83,41±9,02	94,96±1,05	94,18±3,10

NS = Nitrito de sódio ; G = Glicose ; AZ = Azul de metileno

TABELA 8. Análise estatística, pelo teste "t" dos resultados expressos na Tabela 7.

Teste "t" independente I x II	AI x AII t = 2,89*	BI x BII t = 3,69*	C60I x C60II t = 2,29*	C90I x C90II t = 1,36	C120I x C120II t = 2,58*	D60I x D60II t = 1,94	D90I x D90II t = 0,48	D120I x D120II t = 0,15	E60I x E60II t = 2,29*	E90I x E90II t = 0,25	E120I x E120II t = 0,55
Nível de significância	0,01 < p < 0,05	p < 0,01	p = 0,05	0,20 < p < 0,30	0,01 < p < 0,05	0,05 < p < 0,10	p > 0,50	p > 0,80	0,05 < p < 0,10	p > 0,80	p > 0,80
Comentários	AI > AII	BI > BII	C60I > C60II	C90I = C90II	C120I > C120II	D60I = D60II	D90I = D90II	D120I = D120II	E60I > E60II	E90I = E90II	E120I = E120II

Teste "t" dependente 50x90x120	CI	CII	OI	OII	EI	EII
Comentários	60 < (90 = 120)	60 < (90 = 120)	60 = 90 = 120	60 > (90 = 120)	60 < (90 = 120)	60 < (90 = 120)

*significativo para $\alpha = 0,05$

As quantidades de metahemoglobina produzidas pelo nitrito de sódio, aos 60 minutos e aos 120 minutos de tempo de incubação, foram maiores nos indivíduos do sexo masculino em relação aos do feminino. Não houve diferença significativa, aos 90 minutos de incubação. Quando se comparou o tempo de incubação em relação ao sexo, os valores aos 90 minutos e 120 minutos foram semelhantes, tanto no sexo masculino quanto no feminino porém, ambos foram maiores que o obtido aos 60 minutos. Houve correlação positiva ($r = 0,72$), quando se comparou a quantidade de metahemoglobina formada aos 90 minutos de incubação, com a quantidade inicial de hemoglobina (Gráfico 6). Quando se ativou a via das pentoses com azul de metileno, as quantidades de metahemoglobina aos 60, 90 e 120 minutos de incubação foram semelhantes, comparando-se os indivíduos do sexo masculino com os do feminino. Por outro lado, quando se comparou o tempo de incubação, no sexo masculino não houve diferença dos valores aos 60, 90 e 120 minutos de incubação porém, no sexo feminino, aos 60 minutos de incubação a quantidade de metahemoglobina foi maior que a obtida aos 90 e 120 minutos. Os valores aos 90 e 120 minutos de incubação foram semelhantes.

Os valores para a capacidade de redução pelo azul de metileno aos 60 minutos foram maiores nos indivíduos do sexo masculino, entretanto, aos 90 e 120 minutos foram semelhantes para ambos os sexos. Quando se comparou o tempo de incubação, a capacidade de redução foi menor aos 60 minutos, tanto no sexo masculino, quanto no feminino. Aos 90 e aos 120 minutos de incubação, os valores foram semelhantes em ambos os sexos.

3.2. Estudo "in vitro" da ação da Clindamicina sobre Hemácias Humanas Normais

Os resultados obtidos nos 6 indivíduos normais revelaram os seguintes valores médios de volume globular e de taxa de hemoglobina, antes e após a retirada total do plasma:

EXAME	RETIRADA TOTAL DO PLASMA	
	Antes	Após
Volume globular (%)	44,40±4,15	47,40±2,60
Hemoglobina total (g%)	13,96±1,61	14,01±1,60
Hemoglobina em mg/200 µl	27,92±3,23	28,02±3,21

Os resultados deste estudo encontram-se expressos nas Tabelas 9 e 10. A análise destas tabelas permite considerar que a clindamicina, independente do tempo de pré-incubação, não exerceu efeito significativo sobre a quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio, quer aos 60, quer aos 90, quer aos 120 minutos de incubação.

Em relação ao tempo de incubação, verificou-se que a quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio foi menor aos 60 minutos, quando comparada com as obtidas aos 90 e 120 minutos, qualquer que tenha sido o tempo de pré-incubação, isto é, 1, 3 ou 5 horas. As quantidades de metahemoglobina, obtidas aos 90 e aos 120 minutos de incubação, foram semelhantes.

Quando se ativou a via das pentoses com azul de metileno, não houve diferença na quantidade de metahemoglobina, tanto no grupo controle, quanto nas hemácias pré-incubadas com clindamicina. A quantidade de metahemoglobina, em relação ao tem

TABELA 9. Efeito da clindamicina pré-incubada com hemácias lavadas de 6 indivíduos normais, sobre a quantidade de metahemoglobina e capacidade de redução pelo azul de metileno.

TEMPO DE INCUBAÇÃO		TEMPO DE PRÉ-INCUBAÇÃO								
		1 hora			3 horas			5 horas		
		QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA		CAPACIDADE DE REDUÇÃO %	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA		CAPACIDADE DE REDUÇÃO %	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA		CAPACIDADE DE REDUÇÃO %
		NS + G mg/200 µl	NS + G + AZ mg/200µl		NS + G mg/200 µl	NS + G + AZ mg/200 µl		NS + G mg/200 µl	NS + G + AZ mg/200 µl	
60 minutos	Controle	17,74±1,36	2,90±1,66	83,10±10,72	17,49±2,20	3,01±2,66	81,54±17,90	18,82±1,56	4,06±1,98	77,82±11,95
	Clindamicina	18,32±0,72	3,39±1,80	81,04±10,81	17,52±2,18	3,45±2,53	79,37±15,65	18,37±1,41	4,93±2,10	72,26±13,91
90 minutos	Controle	19,22±2,54	1,02±0,57	95,99±2,03	19,61±1,83	1,16±1,01	96,19± 1,90	19,07±2,36	1,44±1,20	95,17± 0,43
	Clindamicina	18,53±1,73	0,91±0,25	95,08±1,20	19,73±2,73	1,04±0,10	94,85± 0,73	20,11±2,61	1,01±0,16	94,94± 0,41
120 minutos	Controle	19,37±2,23	1,43±0,76	94,53±1,92	20,15±1,93	1,23±0,40	95,11± 1,82	19,96±2,34	1,41±1,23	95,54± 1,13
	Clindamicina	20,15±1,89	1,05±0,04	94,70±0,53	20,63±2,57	0,98±0,35	95,18± 1,63	20,29±2,75	0,85±0,21	95,80± 0,86

NS = Nitrito de sódio ; G = Glicose ; AZ = Azul de metileno

TABELA 10. Análise estatística, pelo teste "F" dos resultados, expressos na Tabela 9.

FATORES DE VARIAÇÃO E INTERAÇÕES	F CALCULADO			F crítico	COMENTÁRIOS
	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA NS + G	NS + G + AZ	CAPACIDADE DE REDUÇÃO		
Efeito da Clindamicina A	0,31	0,01	0,82	3,84	(1) Não ocorre interações significativas entre os fatores.
Efeito do tempo de pré-incubação B	0,51	1,26	0,72	2,99	(2) Existe efeito significativo do tempo de incubação
Efeito do tempo de incubação C	7,19*	33,68*	40,28*	2,99	
Interação A x B	0,01	0,03	0,08	2,99	2.1. Quantidade de metahemoglobina
Interação A x C	0,11	1,15	0,24	2,99	2.1.1. NS + G
Interação B x C	0,40	0,97	0,73	2,37	60 < (90 = 120)
Interação A x B x C	0,27	0,07	0,12	2,37	2.1.2. NS + G + AZ
					60 > (90 = 120)
					2.2. Capacidade da redução
					60 < (90 = 120)
					(3) Não existe efeito significativo da clindamicina e do tempo de pré-incubação.

*significativo para $\alpha = 0,05$

po de incubação, foi maior aos 60 minutos, quando comparada com as obtidas aos 90 e 120 minutos. A quantidade de metahemoglobina aos 90 minutos foi semelhante à obtida aos 120 minutos de incubação. O tempo de pré-incubação não apresentou efeito significativo sobre a quantidade de metahemoglobina, tanto no grupo controle quanto no grupo pré-incubado com a clindamicina.

A capacidade de redução pelo azul de metileno não sofreu efeito da clindamicina. Esta foi menor aos 60 minutos de incubação, entretanto, aos 90 e 120 minutos os valores foram semelhantes. Não houve efeito do tempo de pré-incubação, tanto no grupo controle quanto no grupo pré-incubado com a clindamicina.

3.3. Avaliação da Prevalência da Deficiência de G6PD em Amostra da População de Humaitã e em Doentes com Malária

A pesquisa da deficiência de G6PD na amostra da população de Humaitã e nos doentes revelou que 7 (4,96%) eram deficientes (Tabela 11). Destes, 5 eram do sexo feminino e 2 do

TABELA 11. Prevalência da deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), em amostra da população de Humaitã, constituída de indivíduos normais e doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, de acordo com a procedência.

PROCEDÊNCIA	G6PD	Nº	NÃO DEFICIENTES (%)	Nº	DEFICIENTES (%)	Nº	TOTAL (%)
AMAZONENSES	Que nunca tiveram malária	63	(94,03)	4	(5,97)	67	(100,00)
	Que tiveram ou estão tendo malária	58	(95,08)	3	(4,92)	61	(100,00)
NÃO AMAZONENSES	Que estão tendo malária	13	(100,00)	0	(0,00)	13	(100,00)
TOTAL		134	(95,04)	7	(4,96)	141	(100,00)

masculino. Em todos os doentes do sexo feminino o teste de BREWER et alii¹⁷ foi positivo, com comportamento do tipo heterozigoto. Dos indivíduos deficientes, 4 eram amazonenses que nunca tiveram malária; dos outros 3, 2 apresentavam a reação de hemaglutinação positiva com título 1/16 e o outro estava tendo malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, pela primeira vez, com hemaglutinação passiva positiva, com título de 1/64. Nenhum dos 13 doentes não amazonenses apresentou deficiência de G6PD.

3.4. Padronização dos Valores Normais de Volume Globular e Taxas de Hemoglobina

Os resultados expressos na Tabela 12 permitem considerar que os indivíduos adultos do sexo masculino apresentaram valores médios de volume globular de $48,91 \pm 4,40\%$ e taxas de hemoglobina de $15,09 \pm 1,61 \text{ g\%}$

3.5. Estudo Clínico e Evolutivo dos Doentes com Malária

A esplenomegalia foi encontrada em 19 dos 20 doentes estudados. Houve predomínio de esplenomegalia de grau 2, na classificação de HACKETT^{15,27}. A evolução clínica foi considerada boa, com desaparecimento da sintomatologia no final do tratamento para ambos os esquemas utilizados. A parasitemia assexuada porém, desapareceu mais rapidamente nos indivíduos tratados pelo esquema a, o que aconteceu por volta do terceiro dia. Houve, entretanto, neste grupo, um doente que persistiu com parasitemia assexuada até o quinto dia, isto é, por mais 2 dias além do término do tratamento. Em relação ao esquema b, o desapareci

TABELA 12. Distribuição dos valores do volume globular, das taxas de hemoglobina e quantidade de reticulócitos em indivíduos do sexo masculino normais e doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, antes e após o tratamento.

INDIVÍDUOS	TRATAMENTO	PRÉ-TRATAMENTO A			PÓS-TRATAMENTO B		
		1	2	3	1	2	3
		VOLUME GLOBULAR %	HEMOGLOBINA TOTAL g%	RETICULÓCITOS %	VOLUME GLOBULAR %	HEMOGLOBINA TOTAL g%	RETICULÓCITOS %
NORMAIS I	H	48,91 ± 4,40	15,09 ± 1,61	H	H	H	H
DOENTES COM MALÁRIA	ESQUEMA II	36,90 ± 6,93	11,60 ± 2,45	1,18 ± 1,03	33,90 ± 5,89	10,51 ± 1,88	0,84 ± 0,53
	ESQUEMA III	36,30 ± 4,76	11,52 ± 1,68	0,84 ± 0,80	33,30 ± 7,00	10,13 ± 2,11	0,82 ± 0,49

TABELA 13. Análise estatística pelos testes "F" e "t" dos resultados expressos na Tabela 12.

Teste "F" Fcrítico = 3,23 AI x AII x AIII	A1I x A1II x A1III Fcalc. = 31,36*	A2I x A2II x A2III Fcalc. = 19,97*
Comentários	A1I > (A1II = A1III)	A2I > (A2II = A2III)

Teste "t" dependente A x B	A1II x B1II t = 2,20	A2II x B2II t = 2,85*	A3II x B3II t = 0,82	A1III x B1III t = 1,25	A2III x B2III t = 2,87*	A3III x B3III t = 1,05
Nível de Significância	p > 0,05	p < 0,02	p > 0,40	p > 0,20	p < 0,02	p > 0,30
Comentários	A1II = B1II	A2II > B2II	A3II = B3II	A1III = B1III	A2III > B2III	A3III = B3III

Teste "t" independente II x III	A3II x A3III t = 0,09	B1II x B1III t = 0,21	B2II x B2III t = 0,42	B3II x B3III t = 0,09
Nível de significância	p > 0,50	p > 0,50	p > 0,50	p > 0,50
Comentários	A3II = A3III	B1II = B1III	B2II = B2III	B3II = B3III

(*) significativo para $\alpha = 0,05$

mento da parasitemia foi mais demorado porém, estava ausente no quinto dia, que coincide com o término do tratamento.

3.6. Comparação dos Valores do Volume Globular, das Taxas de Hemoglobina e Contagem de Reticulócitos nos Indivíduos Normais e nos Doentes com Malária

A comparação entre indivíduos normais de amostra da população de Humaitá e doentes com malária revelou que tanto os valores do volume globular quanto as taxas de hemoglobina foram maiores nos indivíduos normais. Entre os doentes não houve diferença na comparação dos valores do volume globular e da taxa de hemoglobina antes do tratamento, para os 2 esquemas utilizados (Tabelas 12 e 13).

Os valores do volume globular e as taxas de hemoglobina foram maiores antes do tratamento, quando comparados com os obtidos após o tratamento. Apenas a hemoglobina, entretanto, apresentou taxas com diferença significativa, sem relação com os esquemas utilizados.

Não houve diferença significativa na contagem de reticulócitos, antes e após o tratamento, qualquer que tenha sido o esquema utilizado.

O grau de esplenomegalia em relação à taxa de hemoglobina nos indivíduos da população normal e em doentes com malária está representado no Gráfico 7. A análise do Gráfico 7 revela que a correlação entre a taxa de hemoglobina e o grau de esplenomegalia foi negativa.

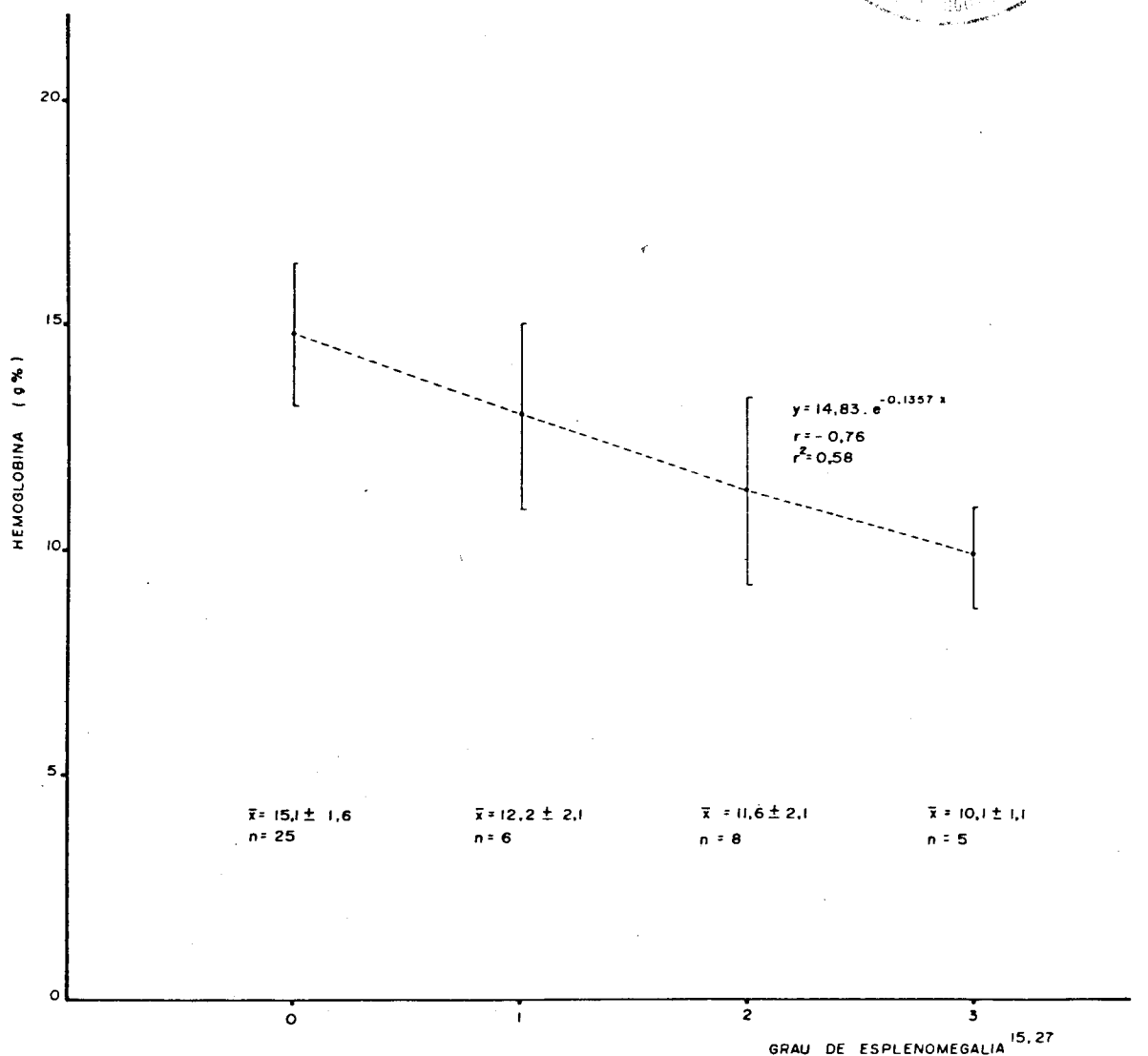


Gráfico 7 : Correlação entre a quantidade de hemoglobina em função do grau de esplenomegalia em indivíduos normais e nos doentes com malária..

3.6. Aplicação do Método Padronizado em Indivíduos Normais e em Doentes com Malária Antes e Após o Tratamento

Os resultados da aplicação do método padronizado em indivíduos normais e doentes com malária acham-se expressos nas Tabelas 14, 15, 16, 17, 18 e 19. A Análise das Tabelas 14 e 15 permite tecer os seguintes comentários:

TABELA 14. Distribuição da quantidade de metahemoglobina produzida pela adição de nitrato de sódio em hemácias lavadas de indivíduos do sexo masculino, normais e doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, antes e após o tratamento.

INDIVÍDUOS	TRATAMENTO	PRÉ-TRATAMENTO A					PÓS-TRATAMENTO B				
		HEMOGLOBINA em mg/200µl	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA (mg/200µl e %)				HEMOGLOBINA em mg/200µl	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA (mg/200µl e %)			
			TEMPO DE INCUBAÇÃO (minutos)					TEMPO DE INCUBAÇÃO (minutos)			
			60	120	180	240		60	120	180	240
NORMAIS I	H	22,82±1,75 (100,00%)	13,90±1,91 (60,91%)	15,01±1,07 (65,77%)	16,68±1,26 (73,09%)	16,21±1,42 (71,03%)	H	H	H	H	H
DOENTES COM MALÁRIA	ESQUEMA II	25,77±2,37 (100,00%)	16,30±1,20 (63,25%)	17,11±2,44 (66,39%)	18,76±1,21 (72,79%)	17,91±1,66 (69,49%)	25,47±3,51 (100,00%)	14,84±2,94 (58,26%)	16,37±2,57 (64,27%)	15,77±2,22 (61,91%)	14,85±1,43 (58,30%)
	ESQUEMA III	26,59±3,74 (100,00%)	15,72±1,62 (59,11%)	17,48±1,58 (65,73%)	17,05±2,13 (64,12%)	16,60±2,39 (62,42%)	25,48±2,92 (100,00%)	14,95±2,33 (58,67%)	16,15±3,04 (63,38%)	15,03±3,94 (58,98%)	15,33±3,28 (60,16%)

TABELA 15. Análise estatística pelos testes "F" e "t" dos resultados expressos na Tabela 14.

Teste "F" Fcrítico = 3,44 AI x AII x AIII	A60I x A60II x A60III Fcalc = 4,66*	A120I x A120II x A120III Fcalc = 3,07	A180I x A180II x A180III Fcalc = 3,82*	A240I x A240II x A240III Fcalc = 1,76
Comentários	A60II > A60I	A120II = A120III	A180II > A180I	A240II = A240III

Teste "t" dependente AII x BII e AIII x BIII	A60II x B60II t = 1,61	A60III x B60III t = 1,08	A120II x B120II t = 0,72	A120III x B120III t = 1,43	A180II x B180II t = 4,33*	A180III x B180III t = 1,56	A240II x B240II t = 4,05*	A240III x B240III t = 0,94
Nível de significância	p > 0,10	p > 0,30	p > 0,40	p > 0,20	p < 0,001	p > 0,20	p < 0,001	p > 0,30
Comentários	A60II = B60II	A60III = B60III	A120II = B120II	A120III = B120III	A180II > B180II	A180III = B180III	A240II > B240II	A240III = B240III

Teste "t" independente BII x BIII	B60II x B60III t = 0,09	B120II x B120III t = 0,17	B180II x B180III t = 0,50	B240II x B240III t = 0,41
Nível de significância	p > 0,50	p > 0,50	p > 0,50	p > 0,50
Comentários	B60II = B60III	B120II = B120III	B180II = B180III	B240II = B240III

*significativo para $\alpha = 0,05$.

TABELA 16. Distribuição da quantidade de metahemoglobina após incubação com nitrito de sódio, glicose e azul de metileno, em hemácias lavadas de indivíduos do sexo masculino, normais e doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, antes e após o tratamento.

INDIVÍDUOS	TRATAMENTO	PRÉ-TRATAMENTO A					PÓS-TRATAMENTO B				
		HEMOGLOBINA em mg/200µl	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA (mg/200µl e %)				HEMOGLOBINA em mg/200µl	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA (mg/200µl e %)			
			TEMPO DE INCUBAÇÃO (minutos)					TEMPO DE INCUBAÇÃO (minutos)			
			60	120	180	240		60	120	180	240
NORMAIS I	H	22,82±1,75 (100,00%)	2,39±1,24 (10,47%)	1,45±0,25 (6,35%)	1,43±0,51 (6,26%)	1,54±0,50 (6,74%)	H	H	H	H	H
DOENTES COM MALÁRIA	ESQUEMA II a	25,77±2,37 (100,00%)	1,78±0,99 (6,90%)	1,46±0,66 (5,66%)	1,54±0,52 (5,97%)	1,77±0,92 (6,86%)	25,47±3,51 (100,00%)	1,62±0,85 (6,36%)	1,09±0,33 (4,27%)	1,36±0,52 (5,33%)	1,45±0,56 (5,69%)
	ESQUEMA III b	26,59±3,74 (100,00%)	2,25±1,54 (8,46%)	1,47±0,75 (5,52%)	1,66±0,53 (6,24%)	1,41±0,47 (5,30%)	25,48±2,92 (100,00%)	1,59±1,03 (6,24%)	1,26±0,38 (4,94%)	1,53±0,61 (6,00%)	1,76±0,77 (6,90%)

TABELA 17. Análise estatística pelos testes "F" e "t" dos resultados expressos na Tabela 16

Teste "F" Fcrítico = 3,44 AI x AII x AIII	A60I x A60II x A60III Fcalc = 0,65	A120I x A120II x A120III Fcalc = 0,06	A180I x A180II x A180III Fcalc = 0,53	A240I x A240II x A240III Fcalc = 0,91
Comentários	A60I = A60II = A60III	A120I = A120II = A120III	A180I = A180II = A180III	A240I = A240II = A240III

Teste "t" dependente AIIxBII e AIIIxBIII	A60II x B60II t = 0,40	A60III x B60III t = 1,33	A120II x B120II t = 1,88	A120III x B120III t = 0,87	A180II x B180II t = 0,95	A180III x B180III t = 0,46	A240II x B240II t = 0,94	A240III x B240III t = 1,07
Nível de significância	p > 0,50	p > 0,20	0,05 < p < 0,10	p = 0,40	p > 0,40	p > 0,50	p > 0,30	p > 0,30
Comentários	A60II = B60II	A60III = B60III	A120II = B120II	A120III = B120III	A180II = B180II	A180III = B180III	A240II = B240II	A240III = B240III

Teste "t" independente BII x BIII	B60II x B60III t = 0,07	B120II x B120III t = 1,06	B180II x B180III t = 0,66	B240II x B240III t = 1,01
Nível de significância	p > 0,50	p = 0,30	p > 0,50	p > 0,50
Comentários	B60II = B60III	B120II = B120III	B180II = B180III	B240II = B240III

TABELA 18. Distribuição da capacidade de redução da metahemoglobina pelo azul de metileno em hemácias lavadas, de indivíduos do sexo masculino, normais e doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, antes e após o tratamento.

INDIVÍDUOS	TRATAMENTO	CAPACIDADE DE REDUÇÃO %							
		PRÉ-TRATAMENTO A				PÓS-TRATAMENTO B			
		TEMPO DE INCUBAÇÃO (minutos)				TEMPO DE INCUBAÇÃO (minutos)			
		60	120	180	240	60	120	180	240
NORMAIS I	H	82,54±10,04	89,49±1,54	89,84±2,78	88,65±3,89	H	H	H	H
DOENTES COM MALÁRIA	ESQUEMA a II	88,77± 7,11	90,86±4,42	90,58±3,03	89,06±6,00	87,44±10,17	92,61±1,80	90,62±3,42	90,17±3,68
	ESQUEMA b III	85,27±10,59	90,49±4,95	89,18±3,99	91,04±2,76	89,20± 6,92	91,30±2,91	89,44±4,42	89,38±5,03

TABELA 19. Análise estatística pelos testes "F" e "t" dos resultados expressos na Tabela 18.

Teste "F" Fcrítico = 3,44 AI x AII x AIII	A60I x A60II x A60III Fcal = 0,99	A120I x A120II x A120III Fcalc = 0,23	A180I x A180II x A180III Fcalc = 0,69	A240I x A240II x A240III Fcalc = 0,83
Comentários	A60I = A60II = A60III	A120I = A120II = A120III	A180I = A180II = A180III	A240I = A240II = A240III

Teste "t" dependente AII x BII e AIII x BIII	A60II x B60II t = 0,36	A60III x B60III t = 1,12	A120II x B120II t = 1,23	A120III x B120III t = 0,46	A180II x B180II t = 0,49	A180III x B180III t = 0,12	A240II x B240II t = 0,45	A240III x B240III t = 1,41
Nível de significância	p > 0,50	p > 0,20	p > 0,20	p > 0,50	p > 0,50	p > 0,50	p > 0,50	p > 0,10
Comentário	A60II = B60II	A60III = B60III	A120II = B120II	A120III = B120III	A180II = B180II	A180III = B180III	A240II = B240II	A240III = B240III

Teste "t" independente BII x BIII	B60II x B60III t = 0,44	B120II x B120III t = 1,19	B180II x B180III t = 0,66	B240II x B240III t = 0,39
Nível de significância	p > 0,50	p > 0,20	p > 0,50	p > 0,50
Comentário	B60II = B60III	B120II = B120III	B180II = B180III	B240II = B240III

Na comparação entre indivíduos normais e doentes, verificou-se que os primeiros apresentaram menor quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio, aos 60, 120, 180 e 240 minutos de incubação; porém, apenas aos 60 e 180 minutos estes resultados foram significativos. Não houve diferença na quantidade de metahemoglobina entre os doentes do esquema a e do esquema b, quando comparados antes do tratamento. Nos doentes de ambos os esquemas terapêuticos a quantidade de metahemoglobina foi maior antes, quando comparada com a obtida após o tratamento, qualquer que tenha sido o tempo de incubação. Essa diferença, porém, foi significativa apenas aos 180 e 240 minutos, para os doentes do esquema a. A comparação entre os esquemas terapêuticos depois do tratamento não revelou diferença na quantidade de metahemoglobina.

Os dados contidos nas Tabelas 16 e 17 permitem destacar:

Quando se ativou a via das pentoses com azul de metileno, não houve diferença na comparação dos indivíduos normais com os doentes de malária, qualquer que tenha sido o esquema terapêutico. A comparação entre os doentes dos esquemas a e b não revelou diferença nos resultados obtidos, antes e após o tratamento.

Os resultados expressos nas Tabelas 18 e 19 permitem comentar que a capacidade de redução pelo azul de metileno não apresentou diferença quando foram comparados indivíduos normais com os doentes de malária. Na comparação antes e após o tratamento, tanto os doentes do esquema a quanto os do esquema b não apresentaram diferença na capacidade de redução. Os doentes dos esquemas a e b não diferiram após o tratamento em relação à capacidade de redução.

3.7. Avaliação do Efeito da Clindamicina em um Doente com Ma lária e Deficiente em G6PD

O único doente com malária causada pelo *Plasmo*
dium falciparum, que apresentou deficiência de G6PD, era do se
xo masculino, com 24 anos de idade, natural do Estado do Acre e
garimpeiro. Há um ano trabalhava em garimpo, situado às margens
da rodovia Transamazônica e estava apresentando o primeiro sur
to de malária. Do ponto de vista clínico, foi considerado com
forma leve da doença, parasitemia de ++ e esplenomegalia de grau
1^{15,27}. Respondeu bem ao tratamento pela clindamicina (esquema
b), com remissão da sintomatologia e desaparecimento da parasi
temia assexuada no terceiro dia. Antes do tratamento apresenta
va volume globular e taxa de hemoglobina respectivamente de
44,00% e 13,20 g% e após o mesmo esses valores foram 39,00% e
11,90 g%.

Os resultados da aplicação do método padronizado
neste doente estão expressos na Tabela 20 e Gráficos 8 e 9. A

TABELA 20. Distribuição da quantidade de metahemoglobina e da capacidade de redução pelo azul de metileno em hemácias lavadas do doente com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase antes e após o tratamento com clindamicina.

TRATAMENTO	HEMOGLOBINA mg/200 µl %	TEMPO DE INCUBAÇÃO minutos	QUANTIDADE DE METAHEMOGLOBINA				CAPACIDADE DE REDUÇÃO %
			NS + G		NS + G + AZ		
			%	mg/200 µl	%	mg/200 µl	
ANTES	25,46 (100,0%)	60	67,04	17,07	58,20	14,82	13,18
		120	69,87	17,79	55,49	14,13	17,22
		180	70,03	17,83	43,83	11,16	34,62
		240	68,46	17,43	12,60	3,21	81,19
APÓS	28,32 (100,0%)	60	50,88	14,41	46,78	13,25	8,04
		120	65,32	18,50	45,19	12,60	11,17
		180	66,77	16,91	36,29	10,28	28,68
		240	60,24	17,06	15,71	4,45	69,11

NS = Nitrito de sódio ; G = Glicose ; AZ = Azul de metileno

análise da tabela e dos gráficos permite realçar que a quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio antes do tratamento foi semelhante à obtida nos outros doentes estudados. Quando a via das pentoses foi estimulada com azul de metileno, o doente apresentou: aos 60 minutos de incubação 14,82 mg/200 μ l (58,20%) de metahemoglobina; aos 120 minutos, 14,13 mg/200 μ l; e aos 180 minutos, 11,16 mg/200 μ l. Foi só aos 240 minutos que a quantidade de metahemoglobina se aproximou do normal, com taxa de 3,21 mg/200 μ l.

Os valores da capacidade de redução aos 60 e 120 minutos foram, respectivamente, 13,18% e 17,22%. Estes valores aumentaram para 34,62%, aos 180 minutos e 81,19%, aos 240 minutos.

Depois do tratamento, a quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio foi semelhante àquelas obtidas nos outros doentes estudados. Quando a via das pentoses foi estimulada com azul de metileno, o resultado aos 60 minutos de incubação revelou 13,25 mg/200 μ l de metahemoglobina. Este valor decresceu com o aumento do tempo de incubação, atingindo 4,45 mg/200 μ l de metahemoglobina aos 240 minutos.

A capacidade de redução aumentou de 8,04% aos 60 minutos, para 69,11% aos 240 minutos de incubação.

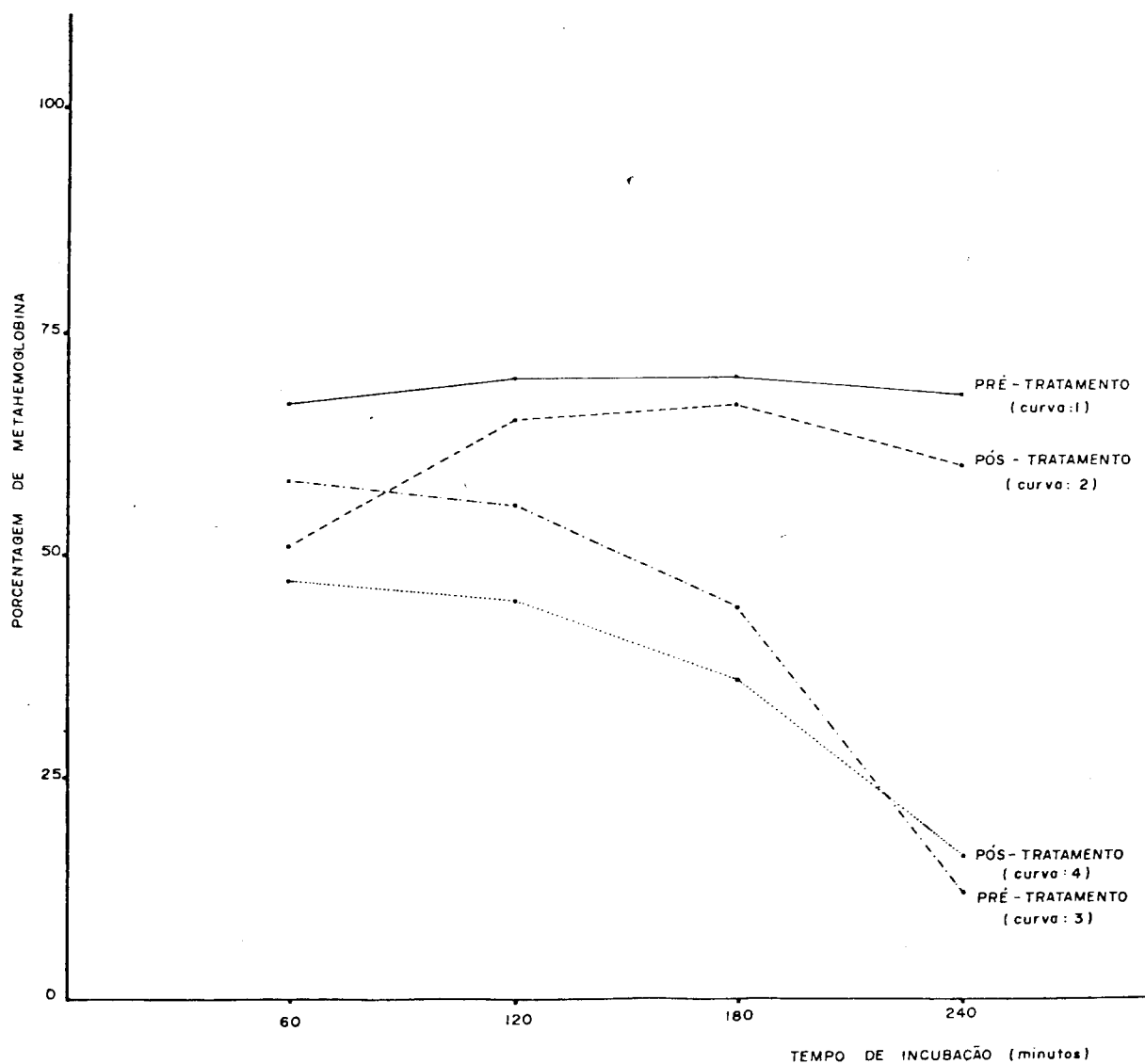


Gráfico 8 : Cinética da formação de metahemoglobina pelo nitrito de sódio (curvas 1 e 2) e redução desta pelo azul de metileno (curvas 3 e 4), em hemácias lavadas, de um doente de malária com deficiência de G6PD, antes e após o tratamento com a clindamicina.

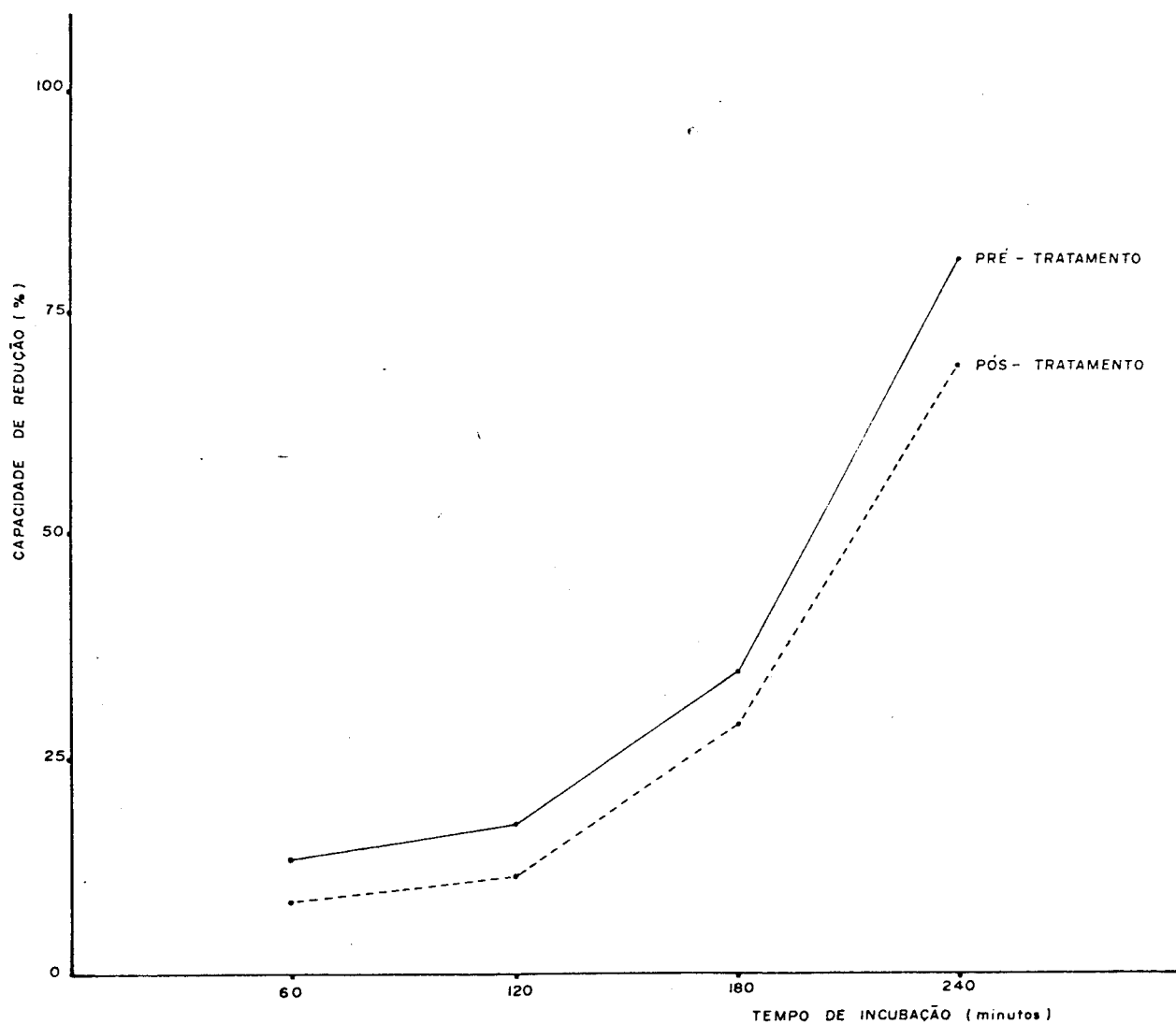


Gráfico 9 : Cinética da capacidade de redução da metahemoglobina pelo azul de metileno, em hemácias lavadas obtidas de um doente de malária e deficiente em G6PD, antes e após o tratamento com clindamicina.

4. DISCUSSÃO

O método da redução da metahemoglobina descrito por BREWER et alii¹⁷ tem sido utilizado como teste de triagem na pesquisa de indivíduos deficientes em G6PD^{13,17,25,52}.

Este método, entretanto, nem sempre permite interpretação exata dos resultados, pela existência de fatores genéticos associados ao sexo que dificultam a sua leitura¹⁷. Isto porque o gene da G6PD localiza-se no cromossoma X^{13,17,25,52}, permitindo que o genótipo do sexo feminino se manifeste de 2 maneiras, quer como homozigoto, quer como heterozigoto. De acordo com LYON³⁷, quando há 2 cromossomas X, 1 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 com 2 populações celulares e com atividade enzimática intermediária^{13,17,25,52}.

Por esta razão, o método de BREWER et alii¹⁷ tem sua interpretação dificultada quando é aplicado em indivíduos heterozigotos do sexo feminino. Para contornar essa dificuldade, os autores¹⁶ acrescentaram ao método inicial a quantificação da metahemoglobina residual, pela leitura espectrofotométrica, preconizada pelo método de EVELYN & MALLOY²³. Dessa forma, observaram valores porcentuais de metahemoglobina que variavam de 5% a 80%, para os indivíduos deficientes do sexo feminino heterozigo

tos e até o máximo de 5%, para os não deficientes.

O método padronizado nesta pesquisa tem como peculiaridade o emprego do espectrofotômetro de duplo feixe, que o torna mais sensível à determinação da quantidade de metahemoglobina. O seu princípio geral baseia-se na estimulação da via das pentoses pelo azul de metileno⁴⁸, após a formação de metahemoglobina, pela adição de nitrito de sódio^{16,23,52}. Este último é a substância formadora do substrato, sobre o qual as enzimas da via das pentoses irão atuar. Assim sendo, é muito importante avaliar a quantidade ideal de substrato, isto é, de metahemoglobina, que será gerada pelo nitrito de sódio^{16,17,52}. Esta avaliação não foi realizada nos trabalhos de BREWER et alii^{16,17}.

O método padronizado permitiu avaliar qual é a faixa de máxima capacidade de redução pelo azul de metileno, frente a diferentes concentrações de nitrito de sódio. Ficou demonstrado que entre as concentrações de 0,6 g% e 0,9 g% de nitrito de sódio, a enzima age sobre quantidades ideais de substrato. As concentrações de nitrito de sódio acima de 0,9 g% e abaixo de 0,6 g% revelaram formação excessiva ou deficiente de substrato, sendo que os sistemas enzimáticos passaram a ter dificuldade em reverter a metahemoglobina formada.

BREWER et alii^{16,17} utilizaram 1,25 g% de concentração de nitrito de sódio, estando este valor localizado na faixa de excesso de substrato e fora dos valores ideais de máxima redução da metahemoglobina.

A concentração de nitrito de sódio, escolhida para a padronização do método utilizado no presente trabalho, correspondeu a 0,7 g%, uma vez que os resultados obtidos revelaram estar esta concentração contida na faixa de máxima capacidade

de redução e com o menor desvio padrão. Os resultados obtidos pela aplicação do método padronizado foram superiores aos assinalados por BREWER et alii^{16,17}.

A escolha do tempo de incubação para a padronização do método foi baseada em 2 momentos: um deles ocorria aos 90 minutos, início da estabilização da redução da metahemoglobina, quando se estimulava a via das pentoses pelo azul de metileno. O outro foi considerado a partir de 105 minutos, quando se observava a máxima estabilidade do processo. Dessa forma, os 2 pontos básicos, padronizados para a leitura, foram considerados aos 90 e aos 120 minutos de incubação.

O método de BREWER et alii¹⁷, por empregar concentração de nitrito de sódio fora da faixa de máxima capacidade de redução, recomenda tempo de incubação maior, isto é, de 180 minutos. Por outro lado, a comparação dos resultados permite considerar que, pelo método de BREWER et alii¹⁶, a formação de metahemoglobina foi mais elevada e a sua redução, pelo azul de metileno, foi menos eficaz que a obtida pelo método padronizado.

Assim, o emprego de concentrações ideais de substrato permite a atuação em ótimas condições do sistema enzimático, abreviando o tempo de leitura.

A influência do plasma sobre os resultados obtidos foi verificada pela repetição dos experimentos, com o emprego de hemácias lavadas. Nestas condições, houve maior formação de metahemoglobina pelo nitrito de sódio, na ausência de azul de metileno, com estabilização da reação a partir de 60 minutos de incubação.

A comparação dos resultados obtidos, com sangue

total e com hemácias lavadas, permite considerar que houve influência evidente do plasma na quantidade de metahemoglobina formada. Assim é que, com o sangue total, a quantidade obtida a partir dos 90 minutos de incubação variou entre 50% e 60%, enquanto com hemácias lavadas variou entre 60% e 70% a partir de 60 minutos de incubação. Esta diferença poderia ser atribuída a eventuais reações do nitrito de sódio, com substâncias do plasma. O mesmo aconteceu quando se compararam os resultados obtidos com sangue total e hemácias lavadas, na redução da metahemoglobina pelo azul de metileno. Assim é que, com hemácias lavadas, a redução da metahemoglobina pelo azul de metileno foi mais eficaz, encurtando o tempo de leitura para 60 minutos de incubação.

Dessa forma, a utilização de hemácias lavadas possibilitou, por um lado, a formação de maior quantidade de metahemoglobina e por outro lado, permitiu a diminuição do tempo de incubação. Esses resultados parecem sugerir que o nitrito de sódio e o azul de metileno interagem de modo mais fácil com a hemácia, na ausência do plasma.

De qualquer forma, deve ser destacado que o tempo de incubação ideal para a leitura é diferente. Assim, quando se utiliza sangue total, a leitura deve ser feita a partir de 105 minutos de incubação e quando se empregam hemácias lavadas, a partir de 75 minutos.

Uma vez estabelecidos os fatores que se relacionam com formação e redução da metahemoglobina, foram determinados os valores normais para o método, com emprego de sangue total e hemácias lavadas de indivíduos normais.

A análise dos resultados obtidos mostrou diferença de comportamento em relação ao sexo. Os valores do volume glo

bular e da taxa de hemoglobina foram maiores nos indivíduos do sexo masculino, concordando com os dados da literatura⁵¹. No tocante à formação de metahemoglobina na ausência do azul de metileno, houve também diferença de comportamento, com obtenção de maior quantidade nos indivíduos do sexo masculino. Por outro lado, verificou-se que a quantidade de metahemoglobina formada pelo nitrito de sódio está relacionada à quantidade de hemoglobina existente, tanto nos indivíduos do sexo masculino quanto nos do feminino, com sangue total ou hemácias lavadas.

A porcentagem de metahemoglobina formada, entre tanto, foi maior nos indivíduos do sexo feminino, apesar de terem eles apresentado menor taxa de hemoglobina. Nesses casos, o nitrito de sódio na concentração utilizada, equivalente a 0,7 g%, formou quantidade excessiva de substrato, dificultando a sua redução pelo azul de metileno.

Esses resultados, embora se comportem de modo paradoxal, devem ser analisados de acordo com os princípios que regem uma reação química em equilíbrio. Dessa forma, a hemoglobina e o nitrito de sódio seriam o primeiro membro da reação e a metahemoglobina o segundo. O aumento da quantidade de qualquer dos componentes do primeiro membro deslocará a reação química para a formação de metahemoglobina. Isto posto, forma-se maior quantidade de substrato nos indivíduos do sexo masculino, pela maior taxa de hemoglobina e nos do feminino, pelo excesso de nitrito de sódio.

A redução da metahemoglobina pelo azul de metileno foi mais eficiente nos indivíduos do sexo masculino, aos 90 minutos de incubação, quando se utilizou sangue total e aos 60 minutos, quando foram usadas hemácias lavadas. Estes dados são

coerentes, pois há maior formação porcentual de substrato nos indivíduos do sexo feminino, dificultando a sua redução pelo azul de metileno. Entretanto, quando se aumentou a quantidade de nitrito de sódio, ocorreu maior formação de substrato, havendo dificuldade na redução deste pelo azul de metileno.

Houve diferença, em relação ao sexo, na capacidade de redução pelo azul de metileno, quando se empregou sangue total. Essa diferença existiu também para hemácias lavadas, apenas aos 60 minutos de incubação.

O cálculo da capacidade de redução é feito com base na quantidade inicial e residual de metahemoglobina. Parece não haver diferença na capacidade de redução em relação ao sexo, pois quando se utilizaram hemácias lavadas, aos 90 e 120 minutos de incubação, os resultados foram os mesmos para ambos os sexos. Houve diferença, entretanto, quando se empregou sangue total. Esta diferença poderia ser explicada pelas reações químicas, que eventualmente ocorrem, entre o nitrito de sódio e o azul de metileno, com os constituintes plasmáticos.

O tempo de incubação influenciou na formação de metahemoglobina, tanto para o sangue total, quanto para as hemácias lavadas. A estabilidade da formação de metahemoglobina ocorreu aos 120 minutos de incubação, para o sangue total e aos 90 minutos, para as hemácias lavadas.

A capacidade de redução pelo azul de metileno sofreu influência do tempo de incubação apenas para as hemácias lavadas, o que se verificou aos 60 minutos de incubação.

A estabilidade da reação, com hemácias lavadas, ocorreu desde os 75 minutos de incubação, estando aos 60 minutos já em fase de estabilização. O tempo de leitura, portanto,

foi abreviado, quando se utilizaram hemácias lavadas, apesar de se formar maior quantidade de substrato. A redução pelo azul de metileno, com hemácias lavadas, também foi mais eficaz. Da mesma forma, este fenômeno poderia ser explicado em virtude das eventuais reações químicas entre o azul de metileno e os constituintes plasmáticos. Tudo se passaria como se, quando se utiliza sangue total, houvesse menor quantidade de azul de metileno no interior das hemácias, com conseqüente diminuição da sua capacidade de redução.

A análise dos resultados permite concluir, portanto, que o tempo de leitura da metahemoglobina residual para o método padronizado deve ser de 90 e 120 minutos, para o sangue total e de 60 e 90 minutos, para as hemácias lavadas.

Em 1891, Ehrlich *apud* ROLLO⁶¹ observou que o azul de metileno corava preferencialmente o plasmódio, sem impregnar outros tecidos. Este autor⁶¹ sugeriu possuir o azul de metileno fraca atividade plasmodicida. Mais tarde verificou-se, entretanto, que este corante tem a capacidade de estimular a via das pentoses⁴⁸. Vários autores^{2,16,17,19,30,32,52,59} assinalaram que alguns antimaláricos sintéticos, entre os quais a cloroquina e a primaquina, agem no metabolismo da via das pentoses, podendo causar anemia hemolítica importante em indivíduos com deficiência em G6PD.

Por outro lado, estudos "in vitro"^{22,64,67,68} demonstraram que o *Plasmodium falciparum* não possui a G6PD, necessitando, portanto, da enzima do eritrócito do hospedeiro para o seu metabolismo.

A clindamicina tem sido utilizada com bons resultados no tratamento de doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*^{1,46,55,56}. Este antibiótico tem sido recomenda

do sobretudo para o tratamento de doentes com formas graves causadas por plasmódios resistentes aos antimaláricos clássicos^{46, 55, 56}. PEREIRA et alii⁵⁵ e BARRAVIERA et alii^{8, 9} assinalaram maior grau de anemia nos doentes com malária tratados pela clindamicina, quando comparados com os que receberam outros antimaláricos. Apesar dos doentes tratados com clindamicina por esses autores^{9, 55} apresentarem formas clínicas mais graves, não se pode descartar a hipótese da ação deste antibiótico sobre a via das pentoses. Por esta razão, justificou-se o estudo do comportamento "in vitro" da clindamicina sobre a atividade da via das pentoses, pelo emprego do método padronizado.

Na aplicação deste método foram utilizadas apenas as hemácias lavadas, em virtude da clindamicina ter a propriedade de ligar-se às proteínas plasmáticas^{3, 24, 31}. A quantidade escolhida de clindamicina utilizada, para a incubação com as hemácias, foi semelhante à preconizada para o tratamento de doentes com malária^{46, 55, 56}.

A análise dos resultados demonstra não ter havido diferença estatisticamente significativa na redução da metahemoglobina. Dessa forma, tudo se passaria como se a clindamicina não alterasse a geração de NADPH, não comprometendo o funcionamento normal da via das pentoses. Estes resultados concordam com os obtidos por BREWER et alii*, que também não observaram efeito da clindamicina sobre a atividade da G6PD.

Outro aspecto importante, que merece ser destacado, relaciona-se à verificação do efeito da clindamicina em doen

*BREWER, G.J. et alii. Investigation of effect of clindamycin-2-phosphate on red blood cells. In:———. Physicians brochure for clindamycin malaria program. Michigan. The UpJohn, 1981. (trabalho realizado pelo autor na University of Michigan Medical School).

tes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, sobretudo naqueles com deficiência de G6PD. Para isso foi estudada a prevalência da deficiência desta enzima em indivíduos normais da população geral de Humaitá e em doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*.

A prevalência da deficiência de G6PD nos amazenses que nunca haviam tido malária foi de 5,97%, resultado semelhante ao observado entre os amazonenses, que tiveram ou estavam com a doença e que foi de 4,92%. A análise estatística revelou absoluta concordância entre os valores observados e esperados, sob a hipótese de que não existe associação entre procedência e G6PD. Como os valores esperados foram muito baixos, não se calculou a estatística χ^2 mas, mesmo assim, pode-se concluir pela ausência de associação.

A prevalência de indivíduos deficientes em G6PD, na população do Município de Humaitá foi de 4,96%, menor que a encontrada na população negróide do Brasil^{38,60,63} e maior que na população caucasóide^{60,63}. No Nordeste do Brasil, a frequência de deficientes desta enzima tem sido ao redor de 7% na população geral^{5,6,52}. Por outro lado, estudos realizados entre os índios não têm revelado a presença de indivíduos deficientes^{10,34,52}.

A prevalência encontrada na população de Humaitá situa-se entre a que tem sido assinalada na população nordestina^{5,6,52} e a verificada entre os índios^{10,34,52}, com valores mais próximos da primeira.

Estes resultados são compatíveis com estudos anteriores realizados no município de Humaitá^{20,21,41,42,45,47} e concordam com as afirmações de AZEVEDO⁴ sobre a contribuição

dos sertanejos do Nordeste na colonização da Amazônia.

Assim, MEIRA et alii⁴⁷, estudando a frequência de antígenos de histocompatibilidade na população geral do Município de Humaitá e em doentes com malária, encontraram taxa elevada de antígenos não determinados, ou de "blanks", entre os amazonenses. Estes autores⁴⁷, com base nas suas observações e nas de JOBIM et alii²⁹, que procederam à estudo com achados semelhantes, entre os índios Tukuna, atribuíram a elevada taxa de antígenos não determinados provavelmente à homozigose. Por outro lado, BARUZZI et alii¹² e COLAUTO et alii²⁰ assinalaram o comportamento homogêneo dos sistemas de grupamento sanguíneo em populações indígenas do Xingú e de Humaitá, prevalecendo o grupo O, Rh positivo. Estas observações contribuem para a interpretação do fenômeno da homozigose na região Amazônica.

COLAUTO et alii²¹ encontraram frequência semelhante, porém menor de hemoglobinopatia S entre os habitantes de povoados situados na calha do Rio Madeira, no município de Humaitá, quando comparada com a observada na população nordestina.

Tudo se passaria como se na gênese da população de Humaitá tivesse havido participação importante de sertanejos do Nordeste e de índios. O gene da deficiência de G6PD teria sido trazido pelos nordestinos e o aumento da prevalência desse defeito poderia estar relacionado à pressão seletiva exercida pela malária, em população submetida à homozigose^{29,47}.

Não houve diferença de comportamento na comparação da prevalência de deficientes em G6PD, entre os amazonenses que nunca tiveram malária e os que já tiveram ou estavam tendo a doença. Nesse sentido, é possível que a deficiência de G6PD não atue de acordo com a lei do tudo ou nada, isto é, este de

feito não seria um fator impediante da doença.

LUZZATO et alii³⁶, estudando doentes com malária, observaram que a taxa de eritrócitos parasitados era de 2 a 80 vezes maior nas hemácias normais, do que nas que tinham deficiência de G6PD. Estudos "in vitro"⁶² também demonstraram a inibição do crescimento do *Plasmodium falciparum* em eritrócitos com deficiência dessa enzima.

Dessa forma, parece haver proteção parcial, para os indivíduos com deficiência de G6PD, que apesar de poderem contrair a infecção pelo *Plasmodium falciparum*, quando doentes apresentariam forma clínica atenuada. Tal proteção seria ainda mais notável para os indivíduos heterozigotos do sexo feminino, que são portadores de 2 populações de hemácias, as normais e as deficientes em G6PD. O mosaico celular, nestes casos, evitaria hemólise de grande intensidade e o parasitismo seria sempre menor, em virtude da preferência pelas hemácias normais, protegendo estes indivíduos contra as formas fulminantes de malária^{22, 35, 62}.

Foi possível estabelecer diagnóstico de primo-infecção no único doente com malária causada pelo *Plasmodium fal*ciparum, em que se verificou deficiência de G6PD, apesar de estar residindo há um ano em área de alta endemicidade de malária. Por outro lado, este doente apresentou forma clínica benigna, com evolução para a cura após o tratamento pela clindamicina. Estas observações estão de acordo com as referências da literatura^{22, 26, 35, 36, 62, 66}.

Em relação aos valores do volume globular e das taxas de hemoglobina, não houve diferença na comparação entre os indivíduos normais do sexo masculino amazonenses e estudan

tes do mesmo sexo, da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Os valores do volume globular e das taxas de he moglobina, ao lado da contagem de reticulócitos, foram também estudados nos doentes tratados pela clindamicina, só ou associada à cloroquina. De acordo com MEIRA et alii⁴⁶, o emprego da clindamicina como único antimalárico foi superior ao uso associado à cloroquina.

Os resultados revelaram que a anemia foi constatada tanto nos doentes tratados só pela clindamicina quanto nos que receberam também a cloroquina. Houve acentuação da anemia após o tratamento, sem relação com o esquema terapêutico utilizado.

Não houve variação na contagem de reticulócitos antes e após o tratamento. Estas observações sugerem não ter havido, nestes casos, crises hemolíticas ou resposta medular importantes. Nesse sentido, tudo se passaria como se a acentuação da anemia decorresse sobretudo da própria doença e menos do efeito das drogas utilizadas no tratamento.

O estudo da fisiopatologia da anemia na malária tem implicado o baço como um dos fatores importantes³². Em observações epidemiológicas tem sido constatado que a anemia é mais acentuada em indivíduos com esplenomegalia^{11,58}.

Houve correlação negativa entre as taxas de hemoglobina e o grau de esplenomegalia. É possível que a esplenomegalia, além da sua atividade catabólica, influa na hemodiluição observada nesses casos.

O método proposto foi aplicado também em individuos normais da população de Humaitá e em doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*.

A quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio, na ausência do azul de metileno, foi menor nos indivíduos normais da amostra da população de Humaitã, quando comparada com a observada nos doentes com malária e também menor que a verificada nos estudantes da Faculdade de Medicina de Botucatu. Estes resultados estão de acordo com os observados na padronização do método, uma vez que, quando há menor quantidade inicial de hemoglobina, ocorre menor formação de metahemoglobina. Neste sentido, deve ser destacado que os indivíduos normais de Humaitã apresentaram menor quantidade de hemoglobina, ao se utilizarem hemácias lavadas.

Quando se estimulou a via das pentoses com azul de metileno, não houve diferença significativa na quantidade de metahemoglobina residual, na comparação entre os indivíduos normais de Humaitã e os doentes com malária. Porém, quando se compararam os indivíduos normais de Humaitã com os estudantes da Faculdade de Medicina de Botucatu, a quantidade de metahemoglobina residual foi maior nos primeiros.

A capacidade de redução pelo azul de metileno foi a mesma, quando se comparou a observada nos indivíduos normais de Humaitã com a dos doentes com malária; porém, os estudantes da Faculdade de Medicina de Botucatu apresentaram capacidade de redução maior.

As diferenças observadas entre os indivíduos normais de Humaitã e os de Botucatu podem ser explicadas pelo tipo de espectrofotômetro utilizado, já que o de duplo feixe é mais sensível, possibilitando a eliminação de erros de leitura. As leituras feitas nos exames realizados em Humaitã não empregaram esse tipo de espectrofotômetro, podendo ser esta eventualmente

a causa da obtenção de maior quantidade de metahemoglobina residual.

A quantidade de metahemoglobina formada pelo nitrito de sódio na ausência de azul de metileno foi menor nos doentes tratados pela associação da clindamicina com a cloroquina, quando comparada com a observada nos doentes tratados apenas pela clindamicina. É possível que a cloroquina possa estimular a via das pentoses, favorecendo a redução da metahemoglobina produzida pelo nitrito de sódio desde o início da reação. Esta droga é agente oxidante e, como tal, favorece consumo maior de NADPH, estimulando o aumento da quantidade de glicose metabolizada pela via das pentoses^{25,61}.

Os esquemas de tratamento utilizados não influíram na quantidade residual de metahemoglobina, após a estimulação da via das pentoses pelo azul de metileno. A capacidade de redução pelo azul de metileno também não sofreu influência do tratamento, qualquer que fosse o esquema utilizado.

Estes resultados permitem considerar que não houve efeito da clindamicina sobre a via das pentoses.

O doente com deficiência de G6PD estava com forma benigna de malária e evoluiu para a cura clínica e parasitológica, no terceiro dia de tratamento com a clindamicina. Deve ser destacado que a parasitemia pode persistir até o quinto dia após o início do tratamento, quando se emprega este antibiótico^{46,55,56}. O doente apresentou discreta anemia após a terapêutica, com ausência de reticulocitose. Estas observações podem ser explicadas pela evolução natural da doença, não tendo sido possível constatar crises hemolíticas importantes durante a evolução. A quantidade de metahemoglobina produzida pelo nitrito de

sódio, observada neste doente, foi semelhante à dos outros doentes com malária e à dos indivíduos normais da população de Humaitá. A quantidade de metahemoglobina residual observada após a estimulação da via das pentoses pelo azul de metileno foi diferente da encontrada nos indivíduos normais da população de Humaitá e nos outros doentes com malária. Esta diferença deve ser causada pela ausência de resposta ao estímulo do azul de metileno em indivíduos com deficiência de G6PD^{13,16,17,25,52}.

As características clínicas e a evolução deste doente se assemelham mais às observadas nos deficientes do tipo Africano, pois os do tipo Mediterrâneo têm, em geral, evolução mais grave^{5,6,7,25,52}. Por outro lado, ele apresentou aumento da capacidade de redução pelo azul de metileno, quando foi aumentado o tempo de incubação. E por fim, não houve diferença na capacidade de redução antes e após o tratamento com a clindamicina.

A análise dos resultados em seu conjunto permite considerar que a clindamicina não influiu na redução da metahemoglobina e na geração de NADPH tanto "in vitro" quanto em doentes com ou sem deficiência de G6PD. Dessa forma, a gênese da eventual anemia, que se possa observar em doentes com malária tratados por este antibiótico, deve ser atribuída a outros fatores.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de contribuir para o esclarecimento de alguns pontos ainda obscuros nas relações existentes entre o metabolismo da via das pentoses e a ação de drogas em doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, foi proposta a padronização do método para a pesquisa da atividade da via das pentoses, menos lesivo para os eritrócitos, menos dispendioso e que fosse tão eficiente quanto o de BREWER et alii¹⁷. Estudou-se "in vitro", com o método padronizado, a ação da clindamicina em hemácias humanas normais. Procedeu-se, ainda, à inquérito com a finalidade de avaliar a prevalência da deficiência de G6PD em habitantes de área endêmica de malária. E, finalmente, estudaram-se os eventuais efeitos da clindamicina sobre a via das pentoses em doentes com malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, tratados por esta droga.

A análise dos resultados obtidos permitiu as seguintes conclusões:

- Na padronização do método verificou-se que as concentrações de nitrito de sódio, baixas ou elevadas, interferem na capacidade de redução pelo azul de metileno, em virtude da produção diminuída ou aumentada de metahemoglobina, que é o substrato da reação.
- O plasma influencia a quantidade de metahemoglobina formada pelo nitrito de sódio e a capacidade de redução pelo a

zul de metileno, em decorrência, provavelmente, de reações químicas entre as drogas utilizadas e os constituintes plas máticos.

- Houve maior formação de metahemoglobina pelo nitrito de só dio e maior capacidade de redução pelo azul de metileno , com as hemácias lavadas.
- No método padronizado, a quantidade de metahemoglobina for mada relaciona-se à quantidade inicial de hemoglobina.
- A clindamicina não exerce efeito significativo "in vitro" sobre a quantidade de metahemoglobina formada pelo nitrito de sódio, nem altera a capacidade de redução pelo azul de metileno.
- Não houve diferença na prevalência da deficiência de G6PD em amazonenses que nunca tiveram malária e amazonenses que tiveram ou estavam tendo a doença. Portanto, os indivíduos deficientes em G6PD estão sujeitos às infecções pelo *Plas* modium *falciparum* na mesma proporção que os não deficientes.
- O aumento da prevalência da deficiência de G6PD, na amos tra estudada, poderia estar relacionado com a pressão seleti va exercida pela malária, em população submetida à homozi gose.
- Não houve diferença do grau de anemia nos doentes com malári a tratados pela clindamicina, só ou associada à cloroquina.
- O grau de esplenomegalia relaciona-se, provavelmente, com a intensidade da anemia observada nos doentes com malária.
- Não houve diferença na capacidade de redução pelo azul de metileno, quando se compararam os indivíduos normais com os doentes de malária, independente do esquema terapêutico utilizado.

- O doente com deficiência de G6PD não apresentou crise hemolítica importante durante o tratamento com a clindamicina. Esta droga, portanto, provavelmente não deve produzir hemólise nas dosagens utilizadas.

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The standardization of a new method which could be less injurious to the erythrocytes, less expensive and as efficient as BREWER's et alii¹⁷ was proposed for the investigation of the pentose phosphate pathway, for the purpose to contribute to the elucidation of some still unknown factors in the relations between pentose phosphate pathway and drug action in *Plasmodium falciparum* malaria. In this way "in vitro" studies to determine clindamycin action in normal human erythrocytes were accomplished. Furthermore a survey was carried out for the purpose to evaluate the prevalence of G6PD-deficiency in malaria endemic region inhabitants. And finally the eventual effects of clindamycin on the pentose phosphate pathway in *Plasmodium falciparum* malaria patients treated with this drug were studied.

The analysis of the results allowed the following conclusions:

- During the method standardization it was noticed that low or high sodium nitrite concentrations interfered with the reduction ability of methylene blue in view of diminished or enlarged methaemoglobin production.

- Plasma influences the amount of methaemoglobin formed by sodium nitrite and the reduction capacity by methylene blue as a probable consequence of chemical reactions among the used drugs and plasma constituents.
- There was formation of higher amounts of methaemoglobin by sodium nitrite and a higher reduction capacity by methylene blue with washed erythrocytes.
- In the standardized method, the amount of methaemoglobin formed was associated to the inicial amount of hemoglobin.
- Clindamycin does not exert any "in vitro" significant effect on the amount of methaemoglobin formed by sodium nitrite, nor alters the reduction capacity by methylene blue.
- Difference in the prevalence of G6PD-deficiency was not noticed in amazonian individuals who had never had malaria and in those who had had malaria in the past or had the disease at the moment of the survey. Therefore, individuals with G6PD deficiency are as prone to *Plasmodium falciparum* infection as those without it.
- The increase in the prevalence of G6PD deficiency in the studied population could be related to the selective pressure exerted by malaria in those populations submitted to homozygous process.
- There was no difference in the anemia level in malaria patients treated by clindamycin only or clindamycin associated to chloroquine.
- The degree of spleen enlargement was related to the anemia degree observed in malaria patients.
- There was no difference in the reduction capacity by methylene blue in the normal individuals when compared to malaria patients whatever was the drug used.

- The patient who had G6PD-deficiency had no important hemolysis during clindamycin treatment. Therefore this drug is not likely to produce hemolysis in the employed doses.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ALECRIM, M.G. et alii. Tratamento da malária (*Plasmodium falciparum*) com clindamicina. Rev. Inst. Med. trop. S Paulo, 23:86-91, 1981.
2. ALVARADO, C.A. & FERREIRA, M.S. Malária. In: VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 7.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. cap.81, 753-79.
3. AVANT, G.R. et alii. The effect of cirrhosis on the disposition and elimination of clindamycin. Amer. J. dig. Dis., 20:223-30, 1975.
4. AZEVEDO, A. Bases físicas, vida humana e vida econômica. In: ———. Geografia do Brasil. São Paulo, Editora Nacional, 1970. p.92-101.
5. AZEVEDO, E.S. O sistema genético das desidrogenases alcoólicas em mestiços da Bahia e em brancos europeus. Salvador, 1975. (Tese - Professor Titular - Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia).
6. AZEVEDO, E.S. & AZEVEDO, T.F.S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal jaundice in Bahia. Brazil. Ciênc. Cult., 26:1044-7, 1974.
7. AZEVEDO, W.C. et alii. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes de um hospital geral de

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Comissão de Estudos de Documentação, Rio de Janeiro. Referências bibliográficas. In: ———. Normas ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1978. p.13-30.

WORLD list of scientific periodicals published in the years 1900-1960. On don, Butterworths, 1963. 3v. e suplementos.

Salvador, Bahia, Brasil. Rev. bras. pesquisas Med. Biol., 11:49-52, 1978.

8. BARRAVIERA, B. et alii. Malária no Município de Humaitá, Estado do Amazonas. III. Aspectos clínicos e evolutivos. Rev. Inst. Med. trop. S Paulo, 23(supl.5):12-26, 1981.
9. BARRAVIERA, B. et alii. Malária no Município de Humaitá, Estado do Amazonas. XXVIII. Aspectos hematológicos em doentes. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 19, Rio de Janeiro, 1983. Anais... Rio de Janeiro, 1983. p.76.
10. BARRETO, O.C.O.P. & NONOYAMA, K. Pesquisa de polimorfismo malária dependente ligado à glicose-6-fosfato desidrogenase e a glutatona eritrocitárias em indígenas brasileiros. Rev. Hosp. Clin Fac. Med. Univ. S Paulo, 33:231-3, 1978.
11. 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.
12. BARUZZI, R.G. et alii. The Kren-Akorore: a recently contacted indigenous tribe. Ciba Fdn. Symp. n.s., (49):179-211, 1977.
13. BEUTLER, E. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. In: STANBURY, J.B.; WYNGAARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.S. Bases metabólicas das doenças hereditárias. 4.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1981. cap. 60, p.1485-506.
14. BIENZLE, U. et alii. *Plasmodium falciparum* malária and human red cells. I. A genetic and clinical study in children. Int. J. Epidemiol., 10:9-15, 1981.

15. BOYD, M.F. Epidemiology of malária: factors related to the intermediate host. In:———. Malariology. Philadelphia, W.B. Saunders, 1949. p.551-607.
16. BREWER, G.J. et alii. Methaemoglobin reduction test. A new simple, "in vitro" test for identifying primaquine-sensitivity. Bull. WHO, 22:633-40, 1960.
17. BREWER, G.J. et alii. The methaemoglobin reduction test for primaquine-type sensitivity of erythrocytes. J. Am. Med. Ass., 180:386-8, 1962.
18. BRUCE-CHWATT, L.J. et alii. Chemoterapy of malaria. 2.ed. Geneva, W.H.O., 1981. 261p. monograph. series nº 27.
19. CHOUDHRY, V.P. et alii. Chloroquine induced haemolysis and acute renal failure in subjects with G-6-PD deficiency. Trop. geogr. Med., 30:331-5, 1978.
20. COLAUTO, E.M.R. et alii. Malária no Município de Humaitá, Estado do Amazonas. IX. Frequência de sistemas de grupamentos sangüíneos em habitantes da região e em doentes. Rev. Inst. Med. trop. S Paulo, 23(supl.5):54-60, 1981a.
21. 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 sangüíneo Duffy. Rev. Inst. Med. trop. S Paulo, 23(supl.5):72-8, 1981b.
22. ECKMAN, I.R. & EATON, J.W. Dependence of plasmodial glutathione metabolism on the host cell. Nature, 278: 754-6, 1979.
23. 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.

24. GORDON, R.C. et alii. Serum protein binding of erythromycin, lincomycin and clindamycin. J. Pharm. Sci., 62:1074-77, 1973.
25. GRIMES, A.J. Human red cell metabolism. London, Blackwell, 1980. 384p.
26. GUGGENMOOS-HOLZMANN, I. et alii. *Plasmodium falciparum* malaria and human red cells. II. Red cell genetic traits and resistance against malaria. Int. J. Epidemiol., 10:16-22, 1981.
27. HACKETT, L.W. Spleen measurement in malaria. J. Nat. Mal. Soc., 3:121-33, 1944.
28. HUHEEY, J.E. & MARTIN, D.L. Malaria, favism and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Experientia, 31: 1145-7, 1975.
29. JOBIN, L.F. et alii. HLA antigens in Tukuna indians. Am. J. Phys. Anthropol., 56:285-90, 1981.
30. KHOO, K.K. The treatment of malaria in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients in Dabah. Ann. trop. Med. Parasit., 75:591-5, 1981.
31. KITAMOTO, O. et alii. Studies on pharmacokinetics of antimicrobial agents, clindamycin. Nippon Kagakuryoko Gakkai Zassui, 17:822-7, 1969.
32. KREIER, J.P. Malária. New York, Academic Press, 1980, 3v.
33. LEWIS, C. Antiplasmodial activity of 7-halogenated lincomycin. J. Parasitol., 54:169-70, 1968.
34. LEZENSZTAJN, B. Atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase em população indígena do Alto Xingu. São Paulo, 1970. (Tese - Professor Doutor - Escola Paulista de Medicina).

35. LUZZATO, L. Genetics of red cell and susceptibility to malaria. Blood, 54:961-76, 1979.
36. LUZZATO, L. et alii. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. Science, 164:839-41, 1969.
37. LYON, M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). Nature, 190:372-3, 1961.
38. MARQUES, J. & CAMPOS, J. de O. Incidência da deficiência de glicose-6-fosfato deidrogenase em negros de Minas Gerais. Rev. Ass. méd. bras., 21:111-2, 1975.
39. MARTIN, S.K. Modified G-6PD/malaria hypothesis. Lancet, 5:51, 1980.
40. MARTIN, S.K. et alii. Severe malaria and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a reappraisal of the malaria/G6-PD hypothesis. Lancet, 10:524-6, 1979.
41. 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.
42. MEIRA, D.A. et alii. Malária no Município de Humaitã, Estado do Amazonas. II. Alguns aspectos epidemiológicos comparativos entre 1976 e 1979. Rev. Inst. Med. trop. S Paulo, 23 (supl.5):5-11, 1981.
43. MEIRA, D.A. Malária at Humaitã County, Amazonas State, Brazil. Some aspects. Rev. Inst. Med. trop. S Paulo, 24 (supl.6):5-15, 1982.
44. MEIRA, D.A. et alii. Malária no Município de Humaitã, Estado do Amazonas. XXXVI. Comportamento da hemaglutinação passiva em doentes com *Plasmodium falciparum*. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 20 e CON-

GRESSO DA SOCIEDADE LATINO AMERICANA DE MEDICINA TROPICAL, 1, Salvador, 1984a. Anais... Salvador, 1984. p.37-8.

45. MEIRA, D.A. et alii. Malária no Município de Humaitá, Estado do Amazonas. XXX. Alguns aspectos epidemiológicos comparativos entre 1976, 1979 e 1983. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 20 e CONGRESSO DA SOCIEDADE LATINO AMERICANA DE MEDICINA TROPICAL, 1, Salvador, 1984b. Anais... Salvador, 1984. p.32-3.
46. 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 e CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MEDICINA TROPICAL, 1, Salvador, 1984c. Anais... Salvador, 1984. p.37.
47. MEIRA, D.A. et alii. Malária no Município de Humaitá, Estado do Amazonas. XXXVII. Frequência de antígenos HLA na população geral e em doentes. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 20 e CONGRESSO DA SOCIEDADE LATINO AMERICANA DE MEDICINA TROPICAL, 1, Salvador, 1984d. Anais... Salvador, 1984. p.36.
48. METZ, E.N. et alii. Mechanisms of methylene blue stimulation of the hexose monophosphate shunt in erythrocytes. J. Clin. Invest., 58:797-802, 1976..
49. MILLER, L.H. et alii. Evaluation of clindamycin in combination with quinine against multi-drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. Amer. J. trop. Med. Hyg., 23:565-9, 1974.
50. MOLINEAUX, L. & GRAMICIA, C. The Garki Project: research on the epidemiology and control of malaria in the Sudam Savanna of West Africa. Geneva, W.H.O., 1980, 311p.

51. MOURA, R.A.A. Técnicas de laboratório. 2.ed. São Paulo, Atheneu, 1982. 822p.
52. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Normalizacion de las técnicas de estudio de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Org. mund. Salud. Ser. Inf. técn., 366:1-57, 1967.
53. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Progressos en inmunologia del paludismo. Org. mund. Salud. Ser. Inf. técn., 579: 5-75, 1975.
54. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. The microscopic diagnosis of malaria. Scient. Publ., 276:1-96, 1973.
55. PEREIRA, P.C.M. et alii. Malária no Município de Humaitá, 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.
56. PEREIRA, P.C.M. et alii. Malária no Município de Humaitá, Estadò do Amazonas. XXV. Novos esquemas de tratamento pe la 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.
57. PESSOA, S.B. & MARTINS, A.V. Parasitologia médica. 10.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978. 986p.
58. PITNEY, W.R. The tropical splenomegaly syndrome. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 62:717-28, 1968.
59. PONNAMPALAM, J.T. Haemoglobinuria after a single dose treatment with dapsone and pyrimethamine for falciparum malaria in a patient with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Trop. geogr. med., 33:401-2, 1981.

60. RAMALHO, A.S. & BEIGUELMAN, B. Deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G6-PD) em doadores de sangue brasileiros. Rev. Ass. méd. bras., 23:259-60, 1977.
61. ROLLO, J.M. Medicamentos usados na quimioterapia da malária. In: GILMAN, A.; GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S. As bases farmacológicas da terapêutica. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983. cap.45, p.909-18.
62. ROTH, E.F. et alii. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits "in vitro" growth of *Plasmodium falciparum*. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 80:298-9, 1983.
63. SALDANHA, P.H. et alii. Distribution of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and electrophoretic variants among different racial groups in Brasil. Rev. bras. pesq. Med. Biol., 2:327, 1969.
64. 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.
65. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. Statistical methods. 7.ed. Ames, Iowa, The Iowa State University Press, 1980. 505p.
66. THARAVANI, J.S. Immunology of malaria. Southeast Asian J. trop. Med. Publi. Hlth., 12:308-18, 1981.
67. THEAKSTON, R.D.G. & FLETCHER, K.A. 6-phosphogluconate dehydrogenase activity in malaria-infected erythrocytes. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 67:16-7, 1973.

68. THEAKSTON, R.D.G. et alii. Glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities in human erythrocytes with *Plasmodium falciparum*. Ann. trop. Med. Parasit., 70:125-7, 1976.
69. TZONEVA, M. et alii. Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in relation to altitude: a malaria hypothesis. Bull. W.H.O., 58:659-62, 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*

☐ Rio Madeira

☐ *Plasmodium falciparum*

☐ Índios

☐ Negativo

☐ 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 Náuseas Vômitos Diarréia Icterícia 0 a ++++											
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 _____
