



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANA BORTHOLAZZI ALMEIDA

**USO DO BIOMARCADOR MALONDIALDEÍDO EM
ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM DIVERSOS
MODELOS EXPERIMENTAIS**

MARIANA BORTHOLAZZI ALMEIDA

**USO DO BIOMARCADOR MALONDIALDEÍDO EM
ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM DIVERSOS
MODELOS EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Química da Universidade Estadual de Londrina
para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A447u Almeida, Mariana Bortholazzi.
Uso do biomarcador malondialdeído em análises de estresse oxidativo em diversos modelos experimentais / Mariana Bortholazzi Almeida. – Londrina, 2014.
71 f. : il.

Orientador: Suzana Lucy Nixdorf.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014. Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Stress oxidativo – Teses. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses 4. Leucemia linfoblástica – Teses. 5. Marcadores biológicos de tumor – Teses. I. Nixdorf, Suzana Lucy. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 543

MARIANA BORTHOLAZZI ALMEIDA

**USO DO BIOMARCADOR MALONDIALDEÍDO EM ANÁLISES DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM DIVERSOS MODELOS EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Química da Universidade Estadual de Londrina
para obtenção do Título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Maria Josefa Santos Yabe
UEL – Londrina – PR

Londrina, 11 de fevereiro de 2014.

A arte de viver consiste em tirar o maior bem do maior mal.

Machado de Assis

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de iniciar os agradecimentos, sem este ser à minha querida orientadora Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf, pela orientação durante estes dois anos, pela acolhida, demonstração de carinho, atenção, ensinamento e paciência! Por ensinar a sermos profissionais, mas acima de tudo humanos. A superar as dificuldades de cabeça erguida e vencer as batalhas com persistência. Obrigada pela confiança e oportunidade concedida!

A meus pais, Humberto e Salete, por toda oportunidade que me deram na vida. Ao meu irmão Humberto Lucas pelo companheirismo. Vocês são as pessoas que mais me apoiaram, em todos os momentos.

A CAPES pelo apoio financeiro e bolsa cedida durante este período.

Aos amigos do grupo DIA, pela companhia e momentos de descontração durante esse período.

À Chiara Cristina Bortolasci e Prof. Tiago Severo Peixe pelo auxílio no início dessa pesquisa ao repassarem a metodologia.

À Mirela Fulgêncio Rabito por todos os trabalhos que realizamos juntas e especialmente pelo auxílio na reta final das análises.

À Marla Karine Amarante, pela oportunidade de trabalharmos em parceria, pelas amostras cedidas gentilmente, pelo conhecimento passado e pela disponibilidade.

À Profa. Dra. Maria Angélica E. Watanabe pela participação na banca examinadora e constante disponibilidade, inclusive do seu grupo de pesquisa e trabalhos realizados em parceria.

À Profa. Dra. Maria Josefa por aceitar fazer parte da banca examinadora e pelos momentos de descontração e auxílio durante as análises estatísticas.

Aos amigos que sempre se fizeram presentes, até mesmo com a distância. Pela paciência, carinho e preocupação, mesmo com a minha ausência durante alguns períodos.

Muito obrigada!

ALMEIDA, Mariana Bortholazzi. **Uso do biomarcador malondialdeído em análises de estresse oxidativo em diversos modelos experimentais**. 2014. 71f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Os organismos aeróbicos, devido aos processos metabólicos, apresentam a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), podendo acarretar em estresse oxidativo, sendo este um dos principais responsáveis pelos processos de envelhecimento, mutação e morte celular, e por doenças como diabetes, mal de Parkinson, aterosclerose e câncer. O estresse oxidativo gera produtos de oxidação lipídica, sendo o malondialdeído (MDA), produto secundário dessa oxidação, o mais estudado na avaliação da peroxidação. A quantidade de MDA é mensurada através da obtenção de um cromógeno de alta absorvidade molar quando complexado com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo esta técnica conhecida como TBARS. Dentre as técnicas de análise utilizadas para MDA a que apresenta maior especificidade e sensibilidade é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Entretanto, a escolha do protocolo extrativo também deve proporcionar seletividade ao analito, o que justifica os estudos realizados em busca de melhorias, e a comparação de eficiência entre dois protocolos. A possibilidade de determinação quantitativa das variações metabólicas relacionadas às doenças através de biomarcadores faz-se necessária, tanto para o aprimoramento das técnicas analíticas, quanto para obtenção de faixa de valores que diferencie indivíduos saudáveis (controle) de doentes, a fim de verificar o envolvimento do MDA na fisiopatologia, permitindo o entendimento da progressão das doenças. Neste trabalho 3 modelos experimentais foram utilizados para a avaliação do MDA como biomarcador de estresse oxidativo a fim de determinar: a eficiência do tratamento utilizando fitofármaco em animais com leishmaniose; a relação entre a peroxidação lipídica e a ingestão de inulina como droga alternativa para controle e prevenção do câncer de cólon; e a correlação entre a alteração dos níveis de MDA e a leucemia linfoblástica aguda (LLA). A utilização da análise estatística multivariada proporcionou a distinção não só dos grupos existentes em cada modelo isolado, como também entre os três modelos experimentais, leishmaniose, inulina e leucemia. Isto indica que os níveis de MDA dependem diretamente do tipo de doença ou dano biológico investigado, e ao modelo utilizado, humano ou animal.

Palavras-chave: Peroxidação lipídica. Malondialdeído. Plasma. HPLC. 7

ALMEIDA, Mariana Bortholazzi. **Use of malondialdehyde biomarker at analysis of oxidative stress in divers experimental models**. 2014. 71 fls. Dissertation (Master in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Aerobic organisms, due to its metabolic processes, present formation of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS). These can result in oxidative stress, which is the major contributor to the aging process, mutation and cell death, and even to diseases such as diabetes, Parkinson's disease, atherosclerosis and cancer. Oxidative stress generates products of lipid oxidation, being the malondialdehyde (MDA) a secondary product of this oxidation, one of the most studied in the evaluation of peroxidation. The amount of MDA is measured by obtaining a chromogenic product, with high molar absorptivity that complexes with thiobarbituric acid (TBA), technique nominated as TBARS. Among the analytical techniques used for MDA determination, high performance liquid chromatography (HPLC) has the highest specificity and sensitivity. However, the choice of the extraction protocol must also provide selectivity to the analyte, which justifies the studies in search of improvements, by comparison the efficiency of two distinct protocols. The possibility of quantitatively determining metabolic changes, related to illness through biomarkers, is necessary to the improvement of analytical techniques, and for obtaining a range of values that distinguish healthy individuals (control) from patients with some disease, in order to verify the involvement of MDA in the pathophysiology, allowing the understanding of the progression of the disease. In this study three experimental models were used to evaluate the MDA as a biomarker of oxidative stress in order to determine: the efficiency of the treatment using phytochemical leishmaniasis in animals; the relationship between lipid peroxidation and ingestion of inulin, using as alternative drug control for prevention of colon cancer; and correlation between changes in MDA levels in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). The use of multivariate statistical analysis provided the distinction not only of existing isolated groups in each model, as well as between the three experimental models: leishmaniasis, inulin and leukemia. This indicates that MDA levels directly depend on the type of disease or biological damage investigated, and on animal or human model adopted.

Keywords: Lipid peroxidation. Malondialdehyde. Plasma. HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Esquema reacional da peroxidação lipídica	17
Figura 1.2 - Estrutura molecular do 1,3-dicarbonil, malondialdeído	21
Figura 2.1 - Cromatogramas da análise de MDA feita em diferentes concentrações na fase móvel do tampão fosfato pH 7,0.....	29
Figura 2.2 - Cromatograma típico e espectro UV do MDA: (MEG) Método adaptado de Grotto et al., 2008; (MEB) Método adaptado de Bastos et al., 2012	30
Figura 2.3 - Curva de calibração analítica na faixa dinâmica de trabalho de 0,25 a 2,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e análise de resíduos, respectivamente, para os métodos MEG e MEB.....	32
Figura 2.4 - (a) Dendrograma obtido pela análise agrupamento hierárquico, (b) projeção das variáveis, obtidos pela análise de componentes principais, considerando os níveis de MDA obtidos para os protocolos de extração MEG (verde) e MEB (preto).....	34
Figura 3.1 - Dendrograma (a) e análise de componentes principais (b) de acordo com os níveis de MDA obtidos para os grupos: G1 (preto), G2 (vermelho), G3 (verde), G4 (azul), G5 (laranja), G6 (roxo), G7 (amarelo).....	42
Figura 4.1 - Dendrograma obtido pela análise de agrupamento hierárquico (a), projeção das variáveis (b) pela análise de componentes principais, considerando os níveis de MDA obtidos para os grupos: Controle (preto), 24 horas (azul), 48 horas (verde) e 72 horas (laranja)	48
Figura 5.1 - Variação dos níveis de MDA no grupo controle (n=18).....	54
Figura 5.2 - Variação dos níveis de MDA no grupo diagnosticado com LLA (n=29).....	54
Figura 5.3 - Dendrograma obtido pela análise agrupamento hierárquico I (a), projeção das variáveis (b) pela análise de componentes principais, considerando os níveis de MDA obtidos para os grupos crianças controle (CC) e crianças diagnosticadas com LLA (L)	55

Figura 5.4 - Dendrograma obtido pela análise de agrupamento hierárquico utilizando os prontuários completos do grupo LLA.....	58
Figura 5.5 - Distribuição das variáveis de acordo com os componentes principais em superfície 2D utilizando os prontuários completos do grupo LLA.....	59
Figura 5.6 - Análise de componentes principais em superfície 3D utilizando os prontuários completos do grupo LLA.....	60
Figura 6.1 - Dendrograma obtido pela análise hierárquica de agrupamentos dos níveis de MDA estudados em 3 tratamentos: leishmaniose (azul), inulina (verde) e leucemia (vermelho)	62
Figura 6.2 - Análise de componentes principais para níveis de MDA nos modelos leishmaniose (azul), inulina (verde) e LLA (vermelho).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Biomarcadores associados a patologias	19
Tabela 2.1 - Valores médios de MDA relatados na literatura para diferentes protocolos experimentais	24
Tabela 2.2 - Protocolo experimental para extração de MDA em plasma	26
Tabela 2.3 - Parâmetros obtidos na validação cromatográfica dos 2 métodos	31
Tabela 2.4 - Níveis de MDA em amostras de plasma humano mensurados pelas 2 metodologias avaliadas	33
Tabela 3.1 - Planejamento do experimento animal	37
Tabela 3.2 - Teor de MDA ($\mu\text{mol L}^{-1}$) de acordo com o indivíduo e o tratamento aplicado a cada grupo (n=3)	41
Tabela 4.1 - Parâmetros obtidos na validação parcial do método.....	47
Tabela 4.2 - Níveis de MDA de ratos Wistar tratados com inulina	47
Tabela 5.1 - Validação do método de MDA em pacientes de LLA	53
Tabela 5.2 - Valores de referência para hemogramas de acordo com o sexo	56
Tabela 5.3 - Valores de MDA e dados obtidos do hemograma dos pacientes do grupo LLA.....	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CP	Componente principal
CV	Coefficiente de variação
DAN	Diaminonaftaleno
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ER	Espécie reativa
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FD	Fração diclorometano
FMOG	9-fluorenilmetoxi carbomil
GBTLI	Grupo brasileiro de tratamento de leucemia infantil
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HPLC	High performance liquid chromatography
IC	Inclinação da curva
INCA	Instituto Nacional do Câncer
HI	Iodeto de potássio
LD	Limite de detecção
LH	Hidroperóxido lipídico
LLA	Leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda
LQ	Limite de quantificação
MDA	Malondialdeído
MEB	Método extrativo Bastos
MEG	Método extrativo Grotto
MeOH	Metanol
MO	Medula óssea
NaOH	Hidróxido de sódio

OMS	Organização mundial da saúde
PDA	Photodiode array
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato salino pH 7,0)
RL	Radicais livres
RPM	Rotações por minuto
DPR	Desvio padrão relativo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TR	Tempo de retenção

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – ASPECTOS GERAIS	14
1.1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	14
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.2.1 Estresse Oxidativo.....	16
1.2.2 Biomarcadores.....	18
1.2.3 Malondialdeído – MDA	20
1.3 OBJETIVOS GERAIS	22
CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DE BIOMARCADOR DE ESTRESSE OXIDATIVO EM AMOSTRAS PLASMÁTICAS	23
2.1 INTRODUÇÃO	23
2.2 OBJETIVOS	24
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.3.1 Método Cromatográfico	25
2.3.2 Amostras de Plasma.....	25
2.3.3 Métodos de Extração.....	26
2.3.4 Preparo da Solução Padrão de MDA.....	26
2.3.5 Validação Analítica	27
2.3.6 Análise Estatística	27
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
2.5 CONCLUSÃO	35
CAPÍTULO 3 – MDA EM SORO SANGUÍNEO DE CAMUDONGOS INFECTADOS COM LEISHIMANIA AMAZONENSIS APÓS TRATAMENTO COM FITOFÁRMACO DE TANACETUM PARTHENIUM	36
3.1 INTRODUÇÃO	36
3.2 OBJETIVO	37
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.5 CONCLUSÃO	43

CAPÍTULO 4 – DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MDA EM RATOS APÓS INGESTÃO DE INULINA	45
4.1 INTRODUÇÃO	45
4.2 OBJETIVO	46
4.3 METODOLOGIA	46
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.5 CONCLUSÃO	49
CAPÍTULO 5 – NÍVEIS DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA OBSERVADOS EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	50
5.1 INTRODUÇÃO	50
5.2 OBJETIVOS	52
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS	52
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.5 CONCLUSÃO	58
CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS	65
ANEXO 1	71

Capítulo 1

ASPECTOS GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Compostos oxidantes são produzidos pelo metabolismo normal do organismo e, se não controlados, podem provocar maior incidência de doenças crônicas e degenerativas. Os organismos aeróbicos podem apresentar um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e as espécies reativas, ocasionando assim o que chamamos de estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007). O estresse oxidativo é uma condição biológica ocasionada quando há um desequilíbrio entre a formação e a remoção de espécies reativas no organismo, podendo induzir a peroxidação lipídica e a geração de certa variedade de moléculas caracteristicamente eletrofílicas, como por exemplo, o malondialdeído (MDA), que reage com o DNA e proteínas, resultando em produtos tóxicos e mutagênicos. Moléculas com essas características podem ser utilizadas como biomarcadores em análises de danos oxidativos no organismo, com possível ação patológica (KARATAS, KARATEPE, BAYSAR, 2002; MARNETT, 1999; VASCONCELOS et al., 2007).

Biomarcadores em sistemas biológicos podem indicar alterações no organismo e são possíveis de monitoramento experimental. O MDA é um dos biomarcadores mais estudados, podendo ser considerado um marcador de dano oxidativo geral. A sua molécula é pequena, de característica polar e altamente solúvel em água, dificultando sua extração. A molécula de MDA não contém grupos eletróforos, cromóforos ou fluoróforos que permitiriam a detecção sensível para estudos biológicos, além de ser relativamente instável, entretanto a sua derivatização proporciona as condições adequadas para sua análise (MATEOS et al., 2005).

Uma técnica cuja determinação seja mais específica e sensível ao biomarcador MDA proporciona maior credibilidade à identificação e quantificação da peroxidação lipídica em amostras biológicas, podendo auxiliar no entendimento da fisiopatologia e na progressão de neoplasias e outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Ao utilizar um biomarcador de estresse oxidativo para determinar a presença de alguma doença, se faz necessário também a obtenção de uma faixa de valores dos níveis de MDA em pacientes saudáveis, visto que há poucos dados na literatura para serem comparados. Em estudo anterior Scheel (2011) obteve boa relação entre pacientes com leucemia e a análise do teor de MDA. Entretanto, deve-se considerar que a variação nos níveis de MDA depende de inúmeros fatores, não sendo relacionada apenas a patologia estudada, já que o MDA é visado como um biomarcador geral para danos oxidativos (VASCONCELOS et al., 2007).

Diversos grupos de pesquisa na Universidade Estadual de Londrina realizam estudos sobre estresse oxidativo em humanos e animais através da análise de MDA. Assim, a realização de estudos que comparem diferentes metodologias extrativas, com o uso preferencial da cromatografia líquida de alta eficiência, para agregar maior seletividade à análise e melhorias na metodologia devem ser propostas a serem investigadas, a fim de garantir a aplicabilidade e eficácia do método.

Para fins didáticos, esta dissertação foi dividida em Capítulos para melhor compreensão do leitor.

O Capítulo 1 traz de forma geral a contextualização desta dissertação através de uma breve revisão bibliográfica, contendo também os objetivos deste trabalho.

O Capítulo 2 apresenta a abordagem sobre os diversos métodos de análise de MDA existentes e a diferença de resultados que os protocolos extrativos resultam, mostrando a necessidade de se escolher um método que garanta uma boa diferenciação entre os indivíduos estudados.

O início da abordagem sobre a aplicabilidade do ensaio de estresse oxidativo utilizando o MDA frente aos diversos tipos de patologia se dá no Capítulo 3. Neste capítulo será discutida a viabilidade do uso do MDA para estudos de peroxidação lipídica em modelo animal, acometidos por leishmaniose e tratados através de um fitofármaco.

O Capítulo 4 apresenta também um ensaio realizado em modelo animal que visa investigar a ação da inulina, nutracêutico anticarcinogênico, no metabolismo dos animais através da alteração dos níveis de oxidação lipídica no organismo.

O Capítulo 5 por sua vez traz o estudo dos níveis de MDA em modelo humano. A doença investigada foi a leucemia linfoblástica aguda (LLA), um tipo de câncer que atinge principalmente crianças e adolescentes.

As conclusões gerais sobre essa dissertação estão contidas no Capítulo 6.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Estresse oxidativo

Desde o final do século XIX tem-se conhecimento dos efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes celulares (LIMA e ABDALLA, 2001). Os organismos aeróbicos apresentam durante o seu metabolismo a formação de espécies reativas (ER) de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) e de radicais livres (RL), que possuem funções benéficas quando produzidos em equilíbrio, como no caso da fagocitose de agentes patogênicos, no controle da pressão sanguínea, no amadurecimento de frutos, entre outros. Entretanto, quando produzidas de forma descontrolada, o sistema antioxidante do organismo tenta restabelecer o equilíbrio com as espécies reativas. O não restabelecimento acarreta dano celular, mais conhecido como estresse oxidativo (ANTUNES et al., 2008; LIMA e ABDALLA, 2001; VASCONCELOS et al., 2007).

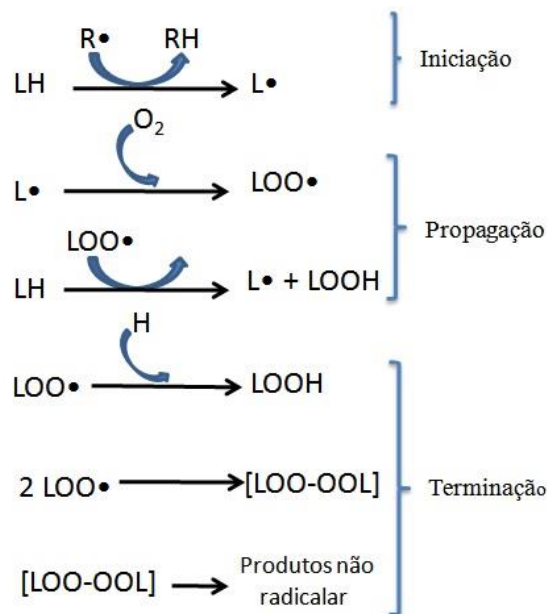
Estudos com animais confirmam que o estresse oxidativo é um dos responsáveis pelos processos de envelhecimento, mutações e morte celular, bem como o aparecimento de várias doenças, dentre elas o diabetes, mal de Parkinson, aterosclerose, além de diversos tipos de câncer (FENG et al., 2006; GRIGNON e CHIANETTA, 2007; KARATAS, KARATEPE, KAYSAR, 2002; VASCONCELOS et al., 2007).

A membrana presente nas células e organelas celulares é composta por ácidos graxos poli-insaturados, sendo estes os componentes mais atacados pelas EROs através de um processo em cadeia (Figura 1.1) conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (MONTEIRO, 2007). A peroxidação lipídica ocasionada devido às ERs gera uma variedade de produtos com características eletrofílicas, incluindo os aldeídos, que podem reagir com o DNA e proteínas, resultando em produtos tóxicos e mutagênicos (FENG et al.,

2006; FERGUSON, 2010; LIMA e ABDALLA, 2001; MARNETT, 1999). O processo oxidativo, pode resultar em modulação das vias metabólicas e pode levar à destruição e à falência do metabolismo celular (LIMA e ABDALLA, 2001).

A peroxidação lipídica pode ocorrer de duas formas nos sistemas biológicos: via enzimática, envolvendo as ciclooxygenases e lipoxigenases; e não enzimática, que envolve a participação de EROs e ERNs, metais de transição e radicais livres. Em membranas fosfolipídicas, a redução dos radicais peroxil a hidroperóxido lipídico (LH), é realizada a partir da incorporação de um oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado ou vitamina E, sob o mecanismo de propagação radicalar (Figura 1.1) afetando desta forma as inúmeras moléculas (LIMA e ABDALLA, 2001; MARNETT, 1999).

Figura 1.1 Esquema reacional da peroxidação lipídica



LH: hidroperóxido lipídico; $R\cdot$: radical livre; $L\cdot$: radical lipídico; $LOO\cdot$: radical peroxila; $LOOH$: hidroperóxido orgânico

O estresse oxidativo induzido pela peroxidação lipídica da membrana tende a ser prejudicial, pois leva a alterações nas propriedades biológicas da membrana, tais como o grau de fluidez, além de levar a inativação dos receptores ligados à membrana ou enzimas, que por sua vez pode

comprometer a função celular normal e aumentar a permeabilidade do tecido. Além disso, a peroxidação lipídica pode contribuir para amplificar o dano celular resultando na geração novos produtos de oxidação, que podem ser quimicamente reativos (DALLE-DONNE et al., 2006).

A avaliação do estresse oxidativo depende da capacidade de aferição das espécies reativas, podendo ser medidas diretamente na célula pela quantidade de radicais livres, ou indiretamente através do dano causado nos tecidos podendo resultar em alterações detectáveis pela análise de fluidos biológicos. Outra possibilidade é pela medida da capacidade antioxidante (BARBOSA et al., 2008). A medida direta das ERs é dificultada devido à baixa concentração em sistemas biológicos, na ordem de 10^{-11} mol L⁻¹, e também pela elevada velocidade de reação e consequente instabilidade (BARBOSA et al., 2008; MONTEIRO, 2007).

O estudo do estresse oxidativo está geralmente associado ao uso de marcadores, ou biomarcadores, que podem relacionar com mais segurança o processo metabólico com o dano ou doença de interesse, sendo as substâncias mais estudadas pelos métodos indiretos os hidroperóxidos, dienos conjugados, aldeídos e os isoprostanos (DALLE-DONNE et al., 2006; MONTEIRO, 2007).

1.2.2 Biomarcadores

Marcadores, de modo geral, são substâncias que podem ser monitoradas experimentalmente para diversos tipos de eventos ou propósitos, seja em amostras biológicas ou ambientais. Os indicadores biológicos (biomarcadores), especificamente, apontam não somente respostas de agentes farmacológicos, mas também a ocorrência de uma determinada função normal em um organismo sadio ou anormal em indivíduo doente.

A escolha do biomarcador a ser estudado deve levar em consideração: a especificidade para o efeito de interesse refletido desde o início do processo, podendo ser relacionado também à gravidade do processo; ser passível de determinação através de análises de baixo custo e alta sensibilidade a partir de um fluido biológico, desde que este apresente relação com o dano patológico

investigado, apresentar produtos de oxidação estáveis e que se acumulem em concentrações detectáveis (DALLE-DONNE et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007). Atualmente são conhecidos diversos biomarcadores, que podem ser classificados como de exposição ou de susceptibilidade, e ambas as classes podem ser utilizadas para estudos de doenças específicas, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1.1 - Biomarcadores de estresse oxidativo associados a doenças

Doenças	Biomarcadores de dano
Câncer	MDA, razão GSH/GSSG, NO ₂ -Tyr, 8-OH-dG
Doença cardiovascular	HNE, razão GSH/GSSG, acroleína, NO ₂ -Tyr, F ₂ -isoprostano
Artrite reumatóide	razão GSH/GSSG, F ₂ -isoprostano
Doença de Alzheimer	MDA, HNE, razão GSH/GSSG, acroleína, NO ₂ -Tyr, F ₂ -isoprostano, AGE
Doença de Parkinson	HNE, razão GSH/GSSG, proteínas carboniladas, nível de ferro
Isquemia reperfusão	razão GSH/GSSG, F ₂ -isoprostano
Aterosclerose	MDA, HNE, acroleína, NO ₂ -Tyr, F ₂ -isoprostano, NO ₂ -Tyr
<i>Diabetes mellitus</i>	MDA, razão GSH/GSSG, proteínas S-glutationadas, NO ₂ -Tyr, F ₂ -isoprostano, AGE.

MDA: malondialdeído; HNE: 4-hidroxi-2-nonenal; AGE: produtos finais da glicosilação avançada; 8-OH-dG: 8-hidroxi-20-deoxiguanosina; GSH: glutationa reduzida; GSSG: glutationa oxidada; NO₂-Tyr: 3-nitro-tirosina.

Fonte: VASCONCELOS et al., 2007

Estudos direcionados ao estresse oxidativo vem apresentando relevância significativa, visto que este pode ser relacionado não só aos processos biológicos normais, mas também a doenças crônicas e degenerativas. Quando realizados através do uso de biomarcadores, como ferramentas de elucidação do mecanismo e processo biológico, os estudos em questão possibilitam o planejamento de ações eficazes no controle da progressão da doença pela prevenção de danos ao organismo (BARBOSA et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2007).

Se por um lado as ERs apresentam baixas concentrações, pela alta reatividade devido ao baixo tempo de meia vida, dificultando sua quantificação

(BARBOSA et al., 2008; MONTEIRO, 2007); por outro lado, os radicais livres após reações biológicas tornam-se estáveis, pelo fato de serem produtos de oxidação secundária, o que possibilita, inclusive, a utilização de técnicas de ressonância magnética de *spin* eletrônico (BARBOSA et al., 2008). Entretanto, o alto valor agregado da análise por ressonância magnética a torna inviável. Portanto, métodos empregando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês HPLC) acoplada ao UV ou fluorescência vêm sendo estudadas e aprimoradas, a fim de melhorar a sensibilidade e seletividade da análise (MAO et al., 2006).

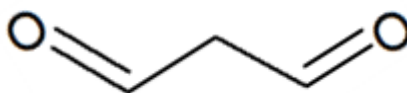
Os métodos utilizados na avaliação da peroxidação lipídica por meio de biomarcadores devem: considerar a especificidade e a seletividade na identificação e quantificação das substâncias geradas durante o processo de peroxidação; apresentar um baixo coeficiente de variação dentre as diferentes análises da mesma amostra; utilizar técnicas robustas e confiáveis com sensibilidade para mensurar níveis basais; e ser passível de determinação através de análises fáceis, não dispendiosas e não invasivas (LIMA e ABDALLA, 2001; VASCONCELOS et al., 2007).

1.2.3 Malondialdeído – MDA

Os aldeídos se destacam como os principais produtos do metabolismo secundário da oxidação lipídica (BARBOSA et al., 2008). Dentre eles o mais estudado é o MDA (Figura 1.2). O MDA é um dialdeído, volátil de baixa massa molar ($C_3H_4O_2$, M.M. = $72,07 \text{ g mol}^{-1}$), possui uma cadeia curta 1,3-dicarbonil, e é um ácido moderadamente fraco ($pK_a = 4,46$) (JANERO, 1990; BENZIE, 1996), produto da decomposição peroxidativa de lipídios insaturados como um subproduto do metabolismo do araquidonato (DALLE-DONNE et al., 2006).

O uso do MDA como biomarcador é descrito em diversos modelos experimentais, humanos, animais e até mesmo vegetais. Este biomarcador apresenta efeitos mutagênicos e citotóxicos no organismo, e por ser um produto de danos provocados por radicais livres, a sua quantificação se torna interessante, do ponto de vista da avaliação da lipoperoxidação (BARBOSA et al., 2008).

Figura 1.2. Estrutura molecular do 1,3-dicarbonil, malondialdeído (MDA).



O método mais aplicado padronizado para se quantificar o MDA é o colorimétrico, empregando o TBARS, já que a substância reativa ao se complexar com o ácido tiobarbitúrico (TBA) gera um cromógeno de elevada absorvidade molar no espectro visível. Apesar da simplicidade de execução do TBARS é um método inespecífico para o aldeído de interesse, já que o TBA pode reagir ainda com vários outros compostos, como carboidratos, aminoácidos, proteínas e bilirrubina (BARBOSA et al., 2008; GROTTTO et al., 2007; MATEOS et al., 2005; STEGHENS et al., 2001; TÜKÖZKAN, N.; YAGI, 1976). A desvantagem de se realizar a derivatização utilizando o TBA é que a reação, além de demorada, exige um meio altamente ácido e temperatura elevada, o que pode acarretar na oxidação dos compostos da matriz analisada, mesmo na presença de agentes antioxidantes como o butil-hidroxi-tolueno (BHT) (MATEOS et al., 2005). Outro agente nucleofílico menos utilizado para análise de MDA é o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (ANTUNES et al, 2008).

Um método específico e sensível de detecção do MDA utiliza separação cromatográfica com coluna de fase reversa e detecção por fluorescência ou no UV-Vis. Este apresenta-se mais seletivo, sendo capaz de separar e quantificar o aduto 2TBA-MDA isoladamente (MATEOS et al., 2005).

1.3 OBJETIVOS GERAIS

Selecionar o protocolo experimental mais eficiente para determinação do MDA, considerando processo extrativo, sensibilidade, especificidade e confiabilidade dos dados gerados, verificando a viabilidade de utilização como biomarcador para estudos de dano oxidativo, em modelos experimentais animal e humano.

Capítulo 2

ANÁLISE DE BIOMARCADOR DE ESTRESSE OXIDATIVO EM AMOSTRAS PLASMÁTICAS

2.1 INTRODUÇÃO

Diversos estudos apontam as EROs, as ERNs e os radicais livres, como indutores de danos ao organismo através da lipoperoxidação. Estes danos podem estar envolvidos na fisiopatologia de doenças, dentre elas o diabetes, a aterosclerose, diversos tipos de câncer e até mesmo a doença de Parkinson (KARATAS, KARATEPE, BAYSAR, 2002.)

Como a determinação direta dos radicais livres *in vivo* não é possível devido a sua instabilidade se faz necessário a utilização de métodos para determinar os produtos das reações secundárias com as proteínas, lipídios e DNA modificados (BARBOSA et al., 2008).

O malondialdeído (MDA) é um dos produtos da peroxidação lipídica mais empregado como biomarcador do dano celular em amostras plasmáticas, e muitos métodos são descritos na literatura para a sua determinação. A maioria desses métodos utiliza o ácido tiobarbitúrico (TBA) como agente cromogênico, onde o aduto 2TBA-MDA formado é analisado por espectrofotometria. Porém a especificidade da análise é garantida apenas quando há separação por HPLC (MATEOS et al., 2005).

De modo geral, nos protocolos descritos na literatura, para analisar o MDA plasmático é necessária a realização de hidrólise ácida, a fim de precipitar as proteínas e romper a ligação existente entre elas e amino compostos com a molécula de MDA, deixando o aldeído livre para reagir com o TBA e formar o aduto MDA-TBA que será posteriormente detectado (KARATEPE, 2004).

A meta final de toda extração deve ser a obtenção de uma sub-fração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico. Na literatura, há métodos que divergem quanto ao uso de solvente orgânico ou aquoso na última etapa de extração do MDA, considerando que a escolha deve

levar em conta as características do analito para assegurar uma boa recuperação (QUEIROZ, COLLINS e JARDIM, 2001).

Valores de referência são relatados usualmente na literatura para análises em diversos ramos. Entretanto, os níveis de MDA médios de humanos saudáveis descritos na literatura, apresentam grande variabilidade quando aplicados diferentes derivatizantes e solventes extratores, portanto, diretamente relacionados às condições experimentais do protocolo empregado (ANTUNES et al., 2008), conforme mostra a Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Valores médios de MDA em humanos saudáveis de acordo com diversos protocolos experimentais

Autor	MDA de referência para indivíduos saudáveis (μM)	Derivatizante	Solvente de extração	Método de Análise - Detector
Bastos et al. (2012)	$0,0415 \pm 0,0082$	TBA	n-butanol	HPLC - PDA
Londero e Greco (1996)	$0,85 \pm 0,25$	TBA	MeOH	HPLC - Fluorescência
Mao et al. (2006)	$0,426 \pm 0,029$	FMOC-hidrazina	ACN	HPLC - Fluorescência
Pilz, Meineke e Gleiter (2000)	$2,16 \pm 0,29$	DNPH	hexano	HPLC - PDA
Sim et al. (2003)	$13,8 \pm 1,32$	DNPH	hexano	HPLC - UV-vis
Steghens et al. (2001)	$0,138 \pm 0,028$	DAN	formaldeído e acetaldeído	HPLC - PDA

ACN: acetonitrila; DAN: diaminonaftaleno; DNPH: 2,4 dinitrofenilhidrazina; FMOC-hidrazina: 9-fluorenilmetoxi-carbonilhidrazina; MeOH: metanol; PDA: detector de arranjo de diodos; TBA: ácido tiobarbitúrico; UV-Vis: ultra-violeta-visível.

As variações entre os valores médios de MDA para indivíduos saudáveis mostram, portanto, a necessidade de se estabelecer intervalos seguros e individualizados para cada método extrativo. A escolha do protocolo a ser empregado deve garantir que haja uma boa diferenciação entre os indivíduos estudados, possibilitando a distinção dos grupos sadios dos que apresentam algum tipo de doença.

2.2 OBJETIVOS

Esta etapa do estudo teve como objetivo avaliar a possibilidade de redução da concentração do tampão fosfato, utilizado como fase móvel na determinação do MDA. Pretende-se desta forma, reduzir a quantidade de reagentes químicos e do descarte de efluentes, assim como preservar o

sistema cromatográfico sem, contudo comprometer a resolução e eficiência analítica. Pretendeu-se ainda, testar o desempenho de dois protocolos de extração descritos na literatura, buscando o mais adequado quanto à sensibilidade e à capacidade de diferenciação entre pacientes, considerando a aplicação do MDA como biomarcador do estresse oxidativo, em estudos futuros.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Método cromatográfico

A análise utilizou um cromatógrafo líquido Alliance e-2695 (Waters, Milford, MA, EUA), composto por bomba com gerenciador de solventes quaternário com degaseificador, injetor automático acoplado a detector de arranjo de fotodiodos UV-Vis/PAD 2998 com varredura ajustada de 400 a 600 nm, selecionando um comprimento de onda fixo em 532 nm. A fase móvel foi metanol: tampão fosfato (pH 7,0) na proporção de 35:65 (v/v) a uma vazão de 0,7 mL min⁻¹, com volume de injeção de 20,0 µL. Utilizou-se pré-coluna e coluna Eclipse XDB-C18 (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm, Agilent Technologies, EUA) a 30°C, com tempo de corrida de 10 min. Os dados foram adquiridos pelo *software* Empower 2.0.

Preliminarmente, foi efetuada a escolha da concentração do tampão fosfato no método cromatográfico, sendo as concentrações testadas iguais a 2,5; 5,0; 10,0 e 30,0 mmol L⁻¹.

2.3.2 Amostras de plasma

As amostras de sangue humano de 18 pacientes foram coletadas em tubos contendo EDTA e cedidas pelo setor de Hematologia do Hospital Universitário (H.U.) da Universidade Estadual de Londrina. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 10 minutos) e armazenado em congelador a -12°C até sua utilização.

2.3.3 Métodos de extração

A extração do MDA plasmático foi realizada a partir de adaptações, referentes às alíquotas tomadas e as concentrações dos reagentes utilizados, de duas diferentes metodologias, descritas por Bastos et al. (2012) e Grotto et al. (2008). Os protocolos adaptados estão expostos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Protocolo experimental para extração de MDA em plasma

Etapa	MEG¹	MEB²
I	Em eppendorf de 2,0 mL adicionar 100 µL de plasma + 33.3 µL água + 33.3 µL NaOH 3M	Em eppendorf de 2,0 mL adicionar 250 µL de plasma + 36 µL BHT 0.2% (m/v)+ 6.25 µL NaOH 10 M
II	Agitação em vortex seguida por 30 min de incubação a 60 °C.	
III	Adicionar 166,7 µL H ₃ PO ₄ 6% (v/v) + 166,7 µL TBA 0,6% (v/v)	Adicionar 1500 µL da solução (TCA 7,2% + KI 1%) (m/v)
IV	Incubar por 45 min a 90 °C.	Agitar em vortex e centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos
V	Adicionar 66.6 µL de SDS 10% (m/v) + 300 µL de n-butanol	1000 µL do sobrenadante devem ser transferidos para um criotubo com tampa de rosca e a este será adicionado 500 µL de TBA 0,6 %
VI	Homogeneizar a mistura e centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos	Incubar por 45 min a 90 °C.
VII	A fase orgânica, n-butanol, é transferida para um vial e injetada no sistema HPLC	Após a incubação e resfriamento a solução resultante é transferida para um vial e injetada no sistema HPLC

1- MEG: Método extrativo Grotto, adaptado de Grotto et al., 2008³.

2- MEB: Método extrativo Bastos, adaptado de Bastos et al., 2012⁴.

2.3.4 Preparo da solução padrão de MDA

A solução padrão de MDA foi preparada a partir de 22,0 µL do 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma Aldrich) diluídos em 10,0 mL solução de ácido sulfúrico 1% (v/v). Esta solução, chamada de estoque foi mantida ao abrigo da luz por 2 horas a temperatura ambiente. Após este período, 5 µL da solução estoque foi diluída em 1495 µL de H₂SO₄ 1% (v/v) e sua absorvância foi

medida em espectrofotômetro UV-Vis (UVmini 1240, Shimadzu) a 245 nm. A concentração da solução foi determinada através da Lei de Lambert-Beer, considerando a absorvidade molar de $\epsilon_{245\text{nm}} = 13700 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.5 Validação analítica

Para a validação analítica foi preparado um *pool* do plasma de 6 indivíduos, para minimizar o efeito de matriz e a este foi adicionado o padrão. Todas as etapas da validação seguiram o mesmo protocolo de preparo que as amostras.

A linearidade foi avaliada através da curva de calibração analítica na faixa dinâmica de trabalho de 0,05 a 2,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$, por meio da análise de regressão simples. A exatidão foi realizada através do ensaio de recuperação em dois níveis de concentração, alto e baixo. A precisão do método foi avaliada pela repetitividade. A especificidade do método foi avaliada pela comparação de cromatogramas do padrão e da amostra, a fim de avaliar a presença de interferentes.

A determinação dos limites de detecção e de quantificação foi estabelecida pela regressão linear através das Equações 2.1 e 2.2 respectivamente, onde DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y e IC é a inclinação da curva analítica.

$$LD = \frac{DP}{IC} \times 10 \quad (2.1)$$

$$LQ = \frac{DP}{IC} \times 3 \quad (2.2)$$

A robustez foi determinada por ligeiras modificações na vazão da fase móvel (0,8 e 1,2 mL min^{-1}), na composição da fase móvel (30% e 40% de MeOH) e na temperatura da coluna (25 °C e 40 °C).

2.3.6 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à ANOVA, considerando-se a amostra como causa de variação, e teste de médias de Tukey ($p \leq 0,05$), modificado

para número desigual de repetições (Unequal N HSD), utilizando o programa Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007). Utilizando o mesmo programa foi realizada a análise multivariada de componentes principais.

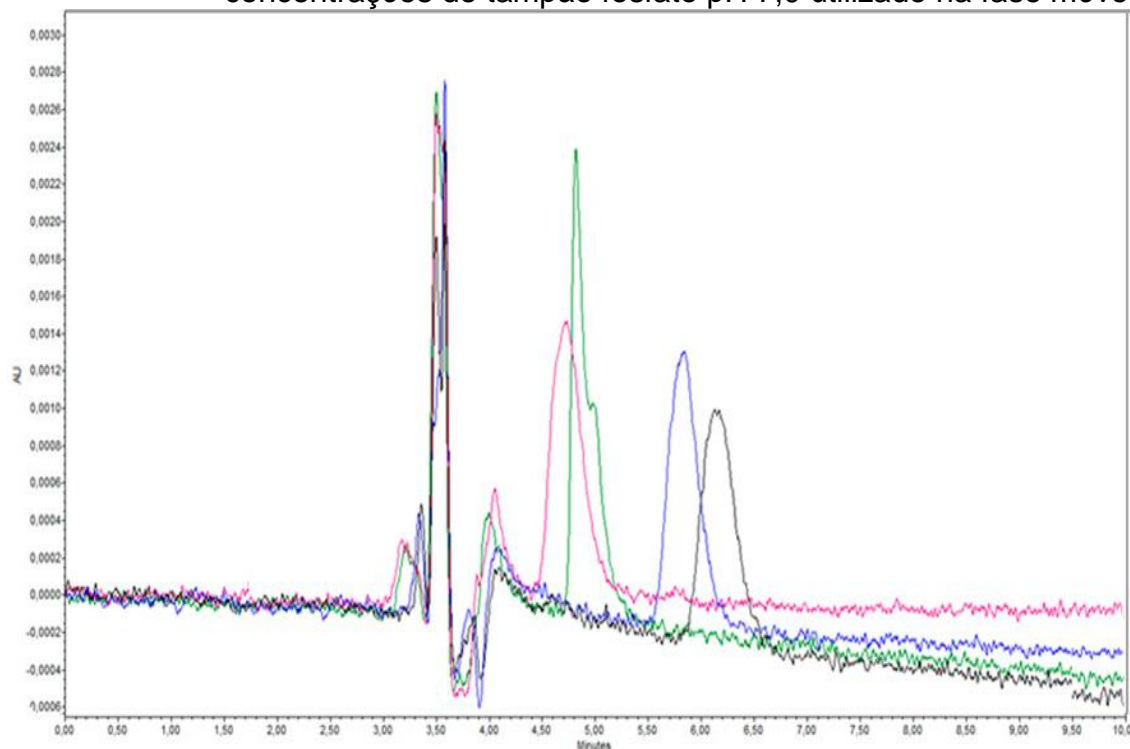
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos cromatográficos descritos na literatura (BASTOS et al., 2012; GROTTTO et al., 2008) para a análise do MDA utilizam o tampão fosfato pH 7,0 como fase móvel, na concentração de 50,0 mmol L⁻¹. Entretanto, sabe-se que o uso de tampão inorgânico, implica em uma série de cuidados por parte do analista, tanto com o sistema quanto com as colunas cromatográficas, uma vez que pode haver precipitação desses sais no seu interior, devido à sua não eliminação, o que diminui significativamente o tempo de vida operacional do sistema (MALDANER, COLLINS, JARDIM, 2010), problema agravado com o aumento na concentração do tampão utilizado. Sendo assim, a redução da concentração do tampão no método se mostra adequada para garantir uma maior vida útil do sistema de HPLC e da coluna cromatográfica.

Foram avaliadas, preliminarmente, quatro concentrações da fase móvel tampão fosfato pH 7,0: 2,5; 5,0; 10,0 e 30,0 mmol L⁻¹. A sobreposição dos cromatogramas obtidos (Figura 2.1) ilustra a variação no tempo de retenção do analito de interesse, mas sem comprometimento na quantificação, visto que a variação da área dos picos foi de apenas 1,19%.

Apesar do MDA utilizando o tampão 2,5 mmol L⁻¹ ter eluído antes, implicando em uma corrida cromatográfica mais rápida, e como a matriz biológica é complexa e apresenta uma série de interferentes no início da análise, optou-se pela concentração de 10,0 mmol L⁻¹.

Figura 2.1. Cromatogramas da análise de MDA feita em diferentes concentrações de tampão fosfato pH 7,0 utilizado na fase móvel



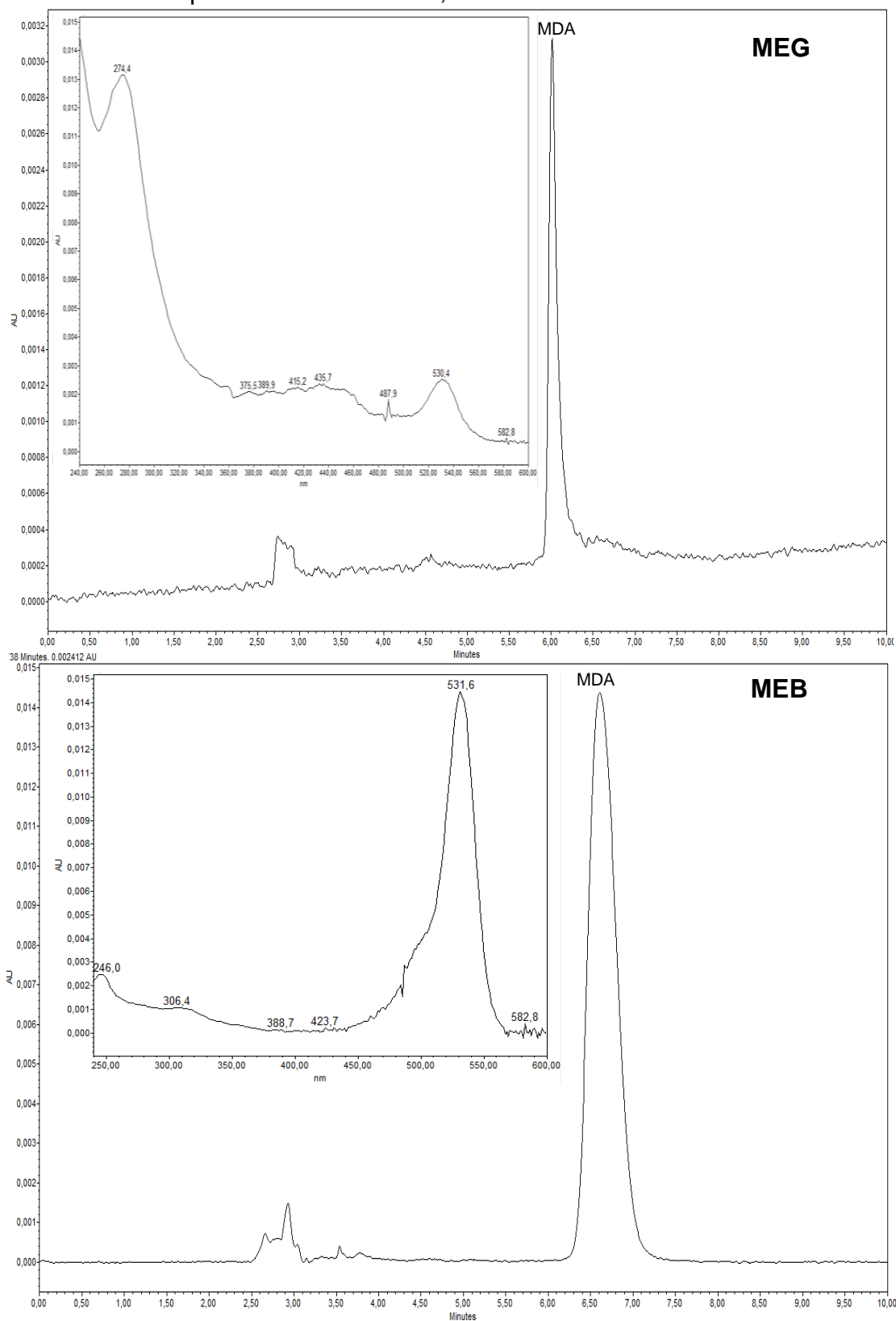
-- 2,5 mmol L⁻¹ (TR: 4,7 min); -- 5,0 mmol L⁻¹ (TR: 4,9 min); -- 10,0 mmol L⁻¹ (TR: 5,9 min);
-- 30,0 mmol L⁻¹ (TR: 6,2 min)

Fase móvel: MeOH: tampão fosfato pH 7,0 10,0 mmol L⁻¹ (35:65 v/v); Vazão: 0,7 mL min⁻¹;
Volume de injeção: 20,0 µL; Coluna: Eclipse XDB-C18, mantida a 30°C; λ= 532 nm.

Escolhida a concentração do tampão a ser utilizada na fase móvel, procedeu-se com a validação para os métodos extrativos. O cromatograma típico obtido para cada método extrativo, MEG e MEB, pode ser observado na Figura 2.2.

Uma boa resolução dos picos foi obtida para ambos os métodos estudados e não foram observados picos interferentes no tempo de retenção do analito de interesse no cromatograma (Figura 2.2), o que garante a seletividade dos métodos para a análise do MDA. A comparação do espectro UV para os picos do padrão e do analito na amostra indicaram pureza espectral, confirmando a especificidade do método.

Figura 2.2. Cromatograma típico e espectro UV do MDA padrão em plasma: **(MEG)** Método adaptado de Grotto et al., 2008. **(MEB)** Método adaptado de Bastos et al., 2012.



Fase móvel: MeOH: tampão fosfato pH 7,0 10,0 mmol L⁻¹ (35:65 v/v); Vazão: 0,7 mL min⁻¹; Volume de injeção: 20,0 µL; Coluna: Eclipse XDB-C18, mantida a 30°C; λ= 532 nm.

Os parâmetros cromatográficos obtidos para os métodos estudados estão apresentados na Tabela 2.3. Ambos os métodos apresentaram os requisitos para serem considerados validados de acordo com a RE 899/2003.

Os dois métodos apresentaram respostas semelhantes de acordo com os parâmetros cromatográficos obtidos (Tab. 2.3). A curva de calibração analítica e a análise de resíduos para cada método estão apresentadas na Fig. 2.3. A análise de resíduos não demonstrou tendências em nenhum dos métodos utilizados.

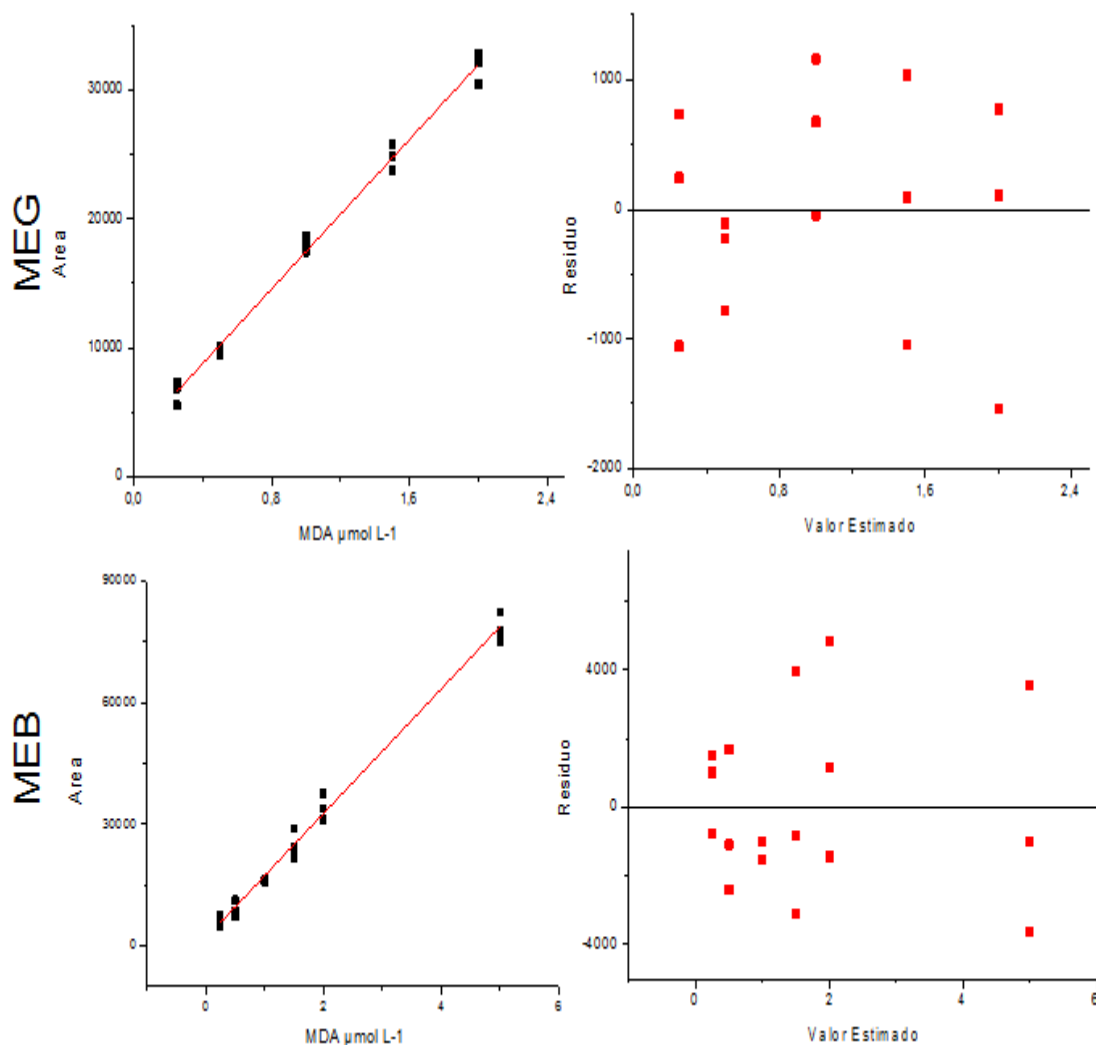
Tabela 2.3. Parâmetros obtidos na validação cromatográfica dos 2 métodos

Parâmetro	[MDA] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	MEG	MEB
Teste de recuperação (%)	0,25	97,29	99,15
	2,00	108,02	100,59
Faixa dinâmica de trabalho ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		0,25 a 2,00	0,25 a 5,00
Linearidade (R^2)		0,9928	0,9951
Equação da reta		$y=14483x + 2983,8$	$y=11838x + 6464,3$
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		0,12	0,13
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		0,38	0,48
Repetitividade ($n=6$) DPR (%)		1,91	3,77

[MDA]: Concentração do MDA; MEG: Método de extração de Grotto et al., 2008; MEB: Método de extração de Bastos et al., 2012; R^2 : Coeficiente de determinação; LD : Limite de detecção; LQ : Limite de quantificação; n : Número de observações; DPR : Desvio padrão relativo.

Ao se avaliar a robustez do método observou-se que não houve mudanças significativas no cromatograma, exceto quando a variação da composição da fase móvel foi de MeOH: tampão fosfato pH=7,0 (35:65, v/v) para MeOH: tampão fosfato pH=7,0 (30:70, v/v), sendo considerado portanto, um método robusto.

Figura 2.3 Curva de calibração analítica e análise de resíduos, respectivamente, para os métodos MEG e MEB



MEG: 0,25 a 2,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$; **MEB:** 0,25 a 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$

Ao avaliar a robustez do método observou-se que não houve mudanças significativas no cromatograma, exceto quando a variação da composição da fase móvel foi de MeOH: tampão fosfato pH=7,0 (35:65, v/v) para MeOH: tampão fosfato pH=7,0 (30:70, v/v), sendo considerado portanto, um método robusto.

A aplicação dos métodos propostos para a extração do MDA foi realizada em amostras de 5 pacientes de prontuário médico desconhecido, a fim de se verificar a capacidade de distinção dos pacientes. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Níveis de MDA em amostras de plasma humano mensurados por 2 protocolos distintos (MEG e MEB)

Amostra	[MDA] ($\mu\text{mol L}^{-1}$) *	
	Pacientes	
	MEG (n=2)**	MEB (n=2)**
PA	0,28 ^b \pm 0,01	1,97 ^a \pm 0,09
PB	0,37 ^b \pm 0,07	1,59 ^b \pm 0,01
PC	3,11 ^a \pm 0,06	3,21 ^d \pm 0,02
PD	0,32 ^b \pm 0,18	0,72 ^c \pm 0,08
PE	0,50 ^b \pm 0,03	3,11 ^d \pm 0,06

* Média de duas repetições \pm desvio padrão (DP)

** Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey, $p \leq 0,05$)

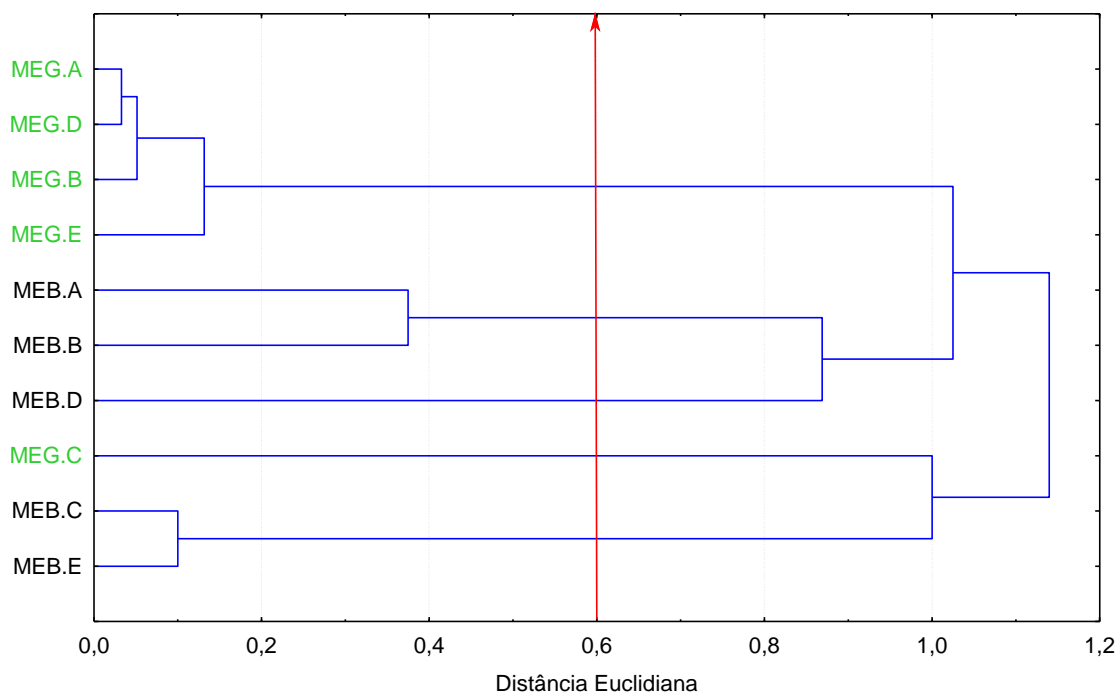
[MDA]: Concentração do MDA; MEG: Método de extração de Grotto et al., 2008; MEB: Método de extração de Bastos et al., 2012; *n*: Número de observações.

Os maiores níveis de MDA foram encontrados para o paciente C (PC), que indicam um maior nível de oxidação lipídica no organismo do indivíduo doador, empregando ambos os métodos de extração. Observa-se ainda que as amostras PA, PB, PD e PE não apresentaram diferenças significativas em nível de 5% com o protocolo MEG, enquanto para o protocolo MEB, as mesmas amostras apresentaram um maior número de diferenças significativas, sugerindo haver diferentes níveis de estresse oxidativos entre elas.

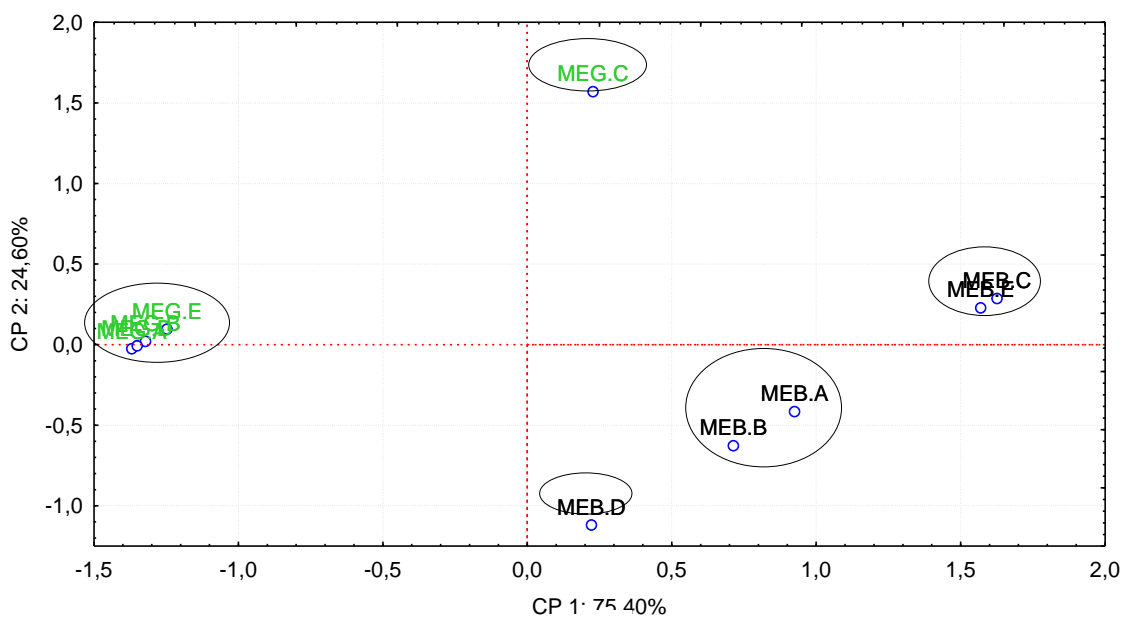
Complementarmente, ao utilizar a análise estatística multivariada para analisar os níveis de MDA obtidos pelos dois protocolos de extração, podemos observar através do dendrograma a existência de cinco grupos amostrais, quando considerada a maior distância Euclidiana (Figura 2.4). Observa-se ainda, que as amostras analisadas pelo método MEG apresentam menor dispersão na componente principal (CP) 1, confirmando o predito pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A causa de variabilidade das respostas obtidas pode ser explicada pela etapa de extração do MDA. A principal diferença entre os dois protocolos está na etapa final, na qual o MDA no MEG permanece no solvente orgânico (*n*-butanol), enquanto no MEB está em meio aquoso.

Figura 2.4 (a) Dendrograma obtido pela análise agrupamento hierárquico, **(b)** projeção das variáveis, obtidos pela análise de componentes principais, considerando os níveis de MDA obtidos para os protocolos de extração MEG (verde) e MEB (preto).



a



b

De acordo com Wasowicz (1993) utilizando plasma humano, a extração do aduto MDA-TBA em *n*-butanol deve ocorrer em pH ácido, controlado entre 1,6 e 1,7 depois da reação com TBA e antes da extração, sendo este controle um pré-requisito para a eficiência desta análise. Isto poderia justificar o porquê

do protocolo MEG não se apresentar adequado, já que o pequeno volume de amostra impossibilitou o controle do pH. Considera-se ainda como fator crítico, o procedimento da agitação manual feita após a adição do *n*-butanol, que pela característica polar da molécula MDA teria sua partição dificultada no meio orgânico. Portanto, a agitação ineficiente, somada ao número de extração insuficiente, foram fatores considerados para a não utilização do método MEG.

Em contrapartida, apesar de ambos os protocolos de extração demandar tempo, o MEB não apresentou limitações críticas na extração, sendo este o protocolo escolhido para realizar a avaliação dos níveis de MDA nos estudos seguintes sobre estresse oxidativo.

2.5 CONCLUSÃO

O teste da influência da concentração do tampão na fase móvel do método cromatográfico mostrou que quanto menor sua concentração molar, menor a retenção do MDA. Apesar do tampão de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ não ser o de menor concentração entre os avaliados, este se mostrou o mais adequado, considerando a melhor resolução em relação aos interferentes da matriz plasma.

As metodologias extrativas estudadas apresentaram-se específicas e seletivas para a determinação do MDA quanto às figuras de mérito da validação. Entretanto, ao avaliá-las estatisticamente quanto à capacidade de distinção de pacientes, o protocolo MEB mostrou-se mais viável, pela ausência de requisitos críticos nas etapas de extração quanto ao pH e agitação, apresentando maior sensibilidade analítica.

Capítulo 3

MDA EM SORO SANGUÍNEO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *LEISHMANIA AMAZONENSIS* APÓS TRATAMENTO COM FITOFÁRMACO DE *Tanacetum parthenium*

3.1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose acomete cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países. Os seis países mais afetados pela leishmaniose são Bangladesh, Brasil, Índia, Etiópia, Quênia e Sudão, sendo que 90% dos novos casos na América Latina ocorrem no Brasil (FINEP, 2012).

A investigação do potencial antileishmania de plantas medicinais, como o *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip., justifica-se pelos resultados obtidos em pesquisas com frações de extratos de pó das partes aéreas frente ao protozoário. Os constituintes químicos majoritários do *T. parthenium* indicam a presença de óleos essenciais e lactonas sesquiterpênicas, principalmente do 11,13-dehidrocompressanolídeo um tipo de guaianolídeo e do partenolídeo (4 α ,5 β -epoxi-germacra-1-(10),11-(13)-dieno-12,6 α -olídeo), que já foram avaliados *in vitro* com relação ao seu potencial contra o parasita *Leishmania amazonensis* (TIUMAN et al., 2005; SILVA, 2008; SILVA et al., 2010).

A literatura apresenta poucos dados referentes às alterações metabólicas ocasionadas pela leishmaniose, principalmente em relação ao metabolismo lipídico (PONTE et al., 2010). Segundo Sen et al. (2005) o quadro clínico apresentado pelos pacientes infectados com leishmaniose é extenso, podendo ser relacionado também a uma anemia grave, o que pode vir a contribuir com o aumento do estresse oxidativo no organismo. Lembrando que o estresse oxidativo pode ser avaliado através do uso de biomarcadores (BARBOSA et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2007).

Considerando que: os biomarcadores possuem características que permitem avaliar e mensurar processos biológicos, normais, patogênicos e pós-tratamento farmacológico (DALLE-DONNE et al., 2006); o produto de oxidação lipídica mais utilizado como biomarcador é o malonaldeído (MDA), que

complexado com ácido tiobarbitúrico (TBA) gera um cromógeno capaz de absorver a 532 nm, que possibilita sua determinação; sendo assim, através da sua quantificação pode-se avaliar a alteração da oxidação lipídica em organismos vivos sob tratamento com fitofármaco a base de *T. parthenium*.

3.2 OBJETIVO

Avaliar a oxidação lipídica no soro de camundongos infectados com leishmaniose e tratados com fitofármaco à base de *T. parthenium* através do uso do biomarcador MDA.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

A experimentação animal e a obtenção do fitofármaco foi realizada na Universidade Estadual de Maringá (UEM) como parte integrante do projeto “Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de 11,13-deidrocompressanolídeo em extratos de *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip e em formulação para uso tópico e avaliação da atividade da antileishmania *in vitro* e *in vivo*, no Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, liderado pelo Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, sendo o projeto aprovado pelo comitê de ética da UEM (protocolo n. 092/2011).

A obtenção do fitofármaco seguiu procedimento descrito por Moreira (2011). A maceração do pó comercial das partes aéreas do *Tanacetum parthenium* (1000,0 g, lote 396253 Tanaceto®, Herbarium, Curitiba, Brasil) foi feita com etanol: água destilada (90:10 v/v) na proporção de droga: solvente (1:2 v/v), em frasco de 4,0 L mantido sob agitação em *shaker* a temperatura ambiente, deixando $\frac{1}{4}$ do frasco livre e trocando o solvente a cada 5 dias. A cada 5 dias o extrato hidroalcoólico (etanol: água 90:10, v/v) foi filtrado em papel qualitativo, sendo os filtrados coletados depois de 15 dias, evaporado sob vácuo à pressão de 175 mBar à temperatura de 35-40°C (Rotavapor R-114, Büchi, Flawil, Suíça) até eliminação completa do solvente orgânico, sendo em seguida liofilizado (Liofilizador Christ®, Alfa 1-2, Osterode, Alemanha) para eliminação da água. O extrato hidroalcoólico seco

(85,83 g) foi homogeneizado com 115,7 g de adsorvente sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck, Darmstadt, Alemanha) em pistilo. Este material foi utilizado como fase estacionária para o empacotamento de uma coluna preparativa de vidro (3.0 x 35.0 cm). As frações do extrato foram eluídas com 500 mL de solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, diclorometano: acetato de etila (1:1, v/v), acetato de etila e metanol) coletadas em Kitasatos. Estas 5 frações foram rotaevaporadas até a completa secura e mantidas à - 20°C. Uma alíquota de cada uma das frações foi analisada por cromatografia de camada delgada (CCD) em cromoplaças de sílica gel (Kieselgel 60 F254, 20x20 cm, 2 mm de espessura, Merck) usando como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila (6:4, v/v). A cromatoplaça foi revelada para visualização dos compostos com solução de vanilina-sulfúrica a 2%, depois aquecida em estufa a 100°C por 3 minutos. A fração de diclorometano obtida (9,63 g de FD) foi a que apresentou melhor perfil cromatográfico com respeito a abundância de lactona sesquiterpênicas e menor interferência na CCD, sendo esta escolhida para o uso como amostra. Assim, esta fração diclorometânica do extrato hidroalcoólico, obtida das partes aéreas do pó comercial de *T. parthenium* (L.) Schultz Bip foi denominada neste estudo como FD.

A infecção de camundongos BALB/c foi realizada por meio de inoculação, por via subcutânea, de *L. amazonensis* na forma promastigota metacíclica (1×10^7 células/25 µL tampão fosfato salino) no coxim plantar da pata esquerda dos animais. Após o desenvolvimento da lesão (40 dias), foi realizado tratamento diário com o extrato da fração diclorometano de *T. parthenium* e a droga de referência Glucantime®, por período de 30 dias, conforme a distribuição dos grupos (n=7), descritos na Tabela 3.1.

Ao final do tratamento (30 dias), os animais foram anestesiados por administração intraperitoneal do anestésico pentobarbital sódico (100 mg kg^{-1}), para coleta do sangue por punção cardíaca. Do sangue coletado foi obtido o soro, por centrifugação, e este foi mantido congelado até o momento da análise do MDA.

Tabela 3.1 Planejamento do experimento animal para tratamento da lesão por leishmaniose empregando extrato da FD de *T. parthenium*

Grupo	Tipo	Tratamento
1	Controle não infectado	Sem tratamento
2	Controle infectado	Sem tratamento
3	Controle infectado	Via tópica com base não iônica e DMSO (placebo)
4	Teste infectado	Via tópica, com 5% (m/v) de FD de <i>T. parthenium</i> dissolvido em DMSO e incluídos em base não iônica
5	Controle infectado	Via intramuscular a cada 3 dias, com DMSO
6	Controle infectado	Via intramuscular com a droga de referência Glucantime [®] (100 mg kg ⁻¹ dia ⁻¹) dissolvida em PBS
7	Teste infectado	Via intramuscular com FD de <i>T. parthenium</i> dissolvido em DMSO (30 mg kg ⁻¹ a cada 3 dias)

Base não iônica: cera auto-emulsificante não iônica, similar a Polawax[®]; DMSO: dimetilsulfóxido; FD: fração diclorometano; PBS (*phosphate buffered saline*): tampão salino fosfato pH 7,20

O protocolo de análise para MDA utilizado foi o MEB, descrito previamente no item 2.3.3. Por se tratar de um estudo realizado com camundongos, o volume de plasma obtido para as análises foi substancialmente menor do que o obtido de humanos, sendo necessárias pequenas adaptações nas alíquotas utilizadas no método de extração do protocolo, sendo estas, nesta análise especificamente, proporcional a 200 µL de plasma. Para o método cromatográfico, para o preparo de padrão e a validação do método procedeu-se da mesma forma que a indicada no item 2.3. A curva de calibração analítica foi obtida na faixa de 0,2; 0,5; 0,8; 1,6 e 6,4 µmol L⁻¹ e preparada da mesma forma que as amostras.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à necessidade de alterações nas alíquotas a serem tomadas em todo o procedimento de extração, foi realizada a validação parcial do método adotado. Este apresentou linearidade superior a 0,998 na faixa dinâmica de trabalho de 0,2 a 6,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, repetitividade (CV médio de 3,5% para seis injeções consecutivas), recuperação na faixa de 97% a 101%, limite detecção igual 0,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de quantificação 0,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$, podendo ser considerado validado. A equação da reta obtida foi $y = 22093,8x + 2135,98$.

Para a realização do trabalho, os animais foram divididos em grupos distintos de acordo com o tratamento recebido, sendo os indivíduos de cada grupo considerados como replicatas. Do plasma obtido do sangue dos camundongos foi realizada a extração do MDA. Dentre as 56 amostras, 7 delas encontravam-se hemolisadas. A hemólise, por definição, é a liberação dos constituintes das hemácias para o plasma devido à ruptura das células sanguíneas. Os constituintes liberados, como a hemoglobina, interferem nas determinações de alguns analitos, mesmo em baixas concentrações (ANDRIOLO et al., 2010), desta forma os dados de MDA gerados por estas amostras apresentaram comportamento diferenciado. Os teores de MDA obtidos estão apresentados na Tabela 3.2.

O teste de médias indicou pouca diferença significativa entre os grupos, porém observa-se que houve um aumento no nível de oxidação lipídica dos animais tratados (grupos G3-G7) em relação ao grupo controle (G1) e o G2 que não recebeu tratamento após a infecção.

Ao realizar a análise hierárquica e a análise de componentes principais (Fig. 3.1) observa-se, a distinção de 12 agrupamentos amostrais, quando cortado na maior distância Euclidiana. Para melhor ilustração, cada grupo apresentado na Tabela 3.1 recebeu uma cor diferente.

Tabela 3.2. Níveis de MDA ($\mu\text{mol L}^{-1}$) em camundongos BALB/c no estudo de inoculação subcutânea de *Leishmania amazonensis* em diferentes tratamentos para cada grupo ($n=3$), dentre eles a aplicação do fitofármaco de extrato da fração diclorometano de *T. parthenium* em lesões

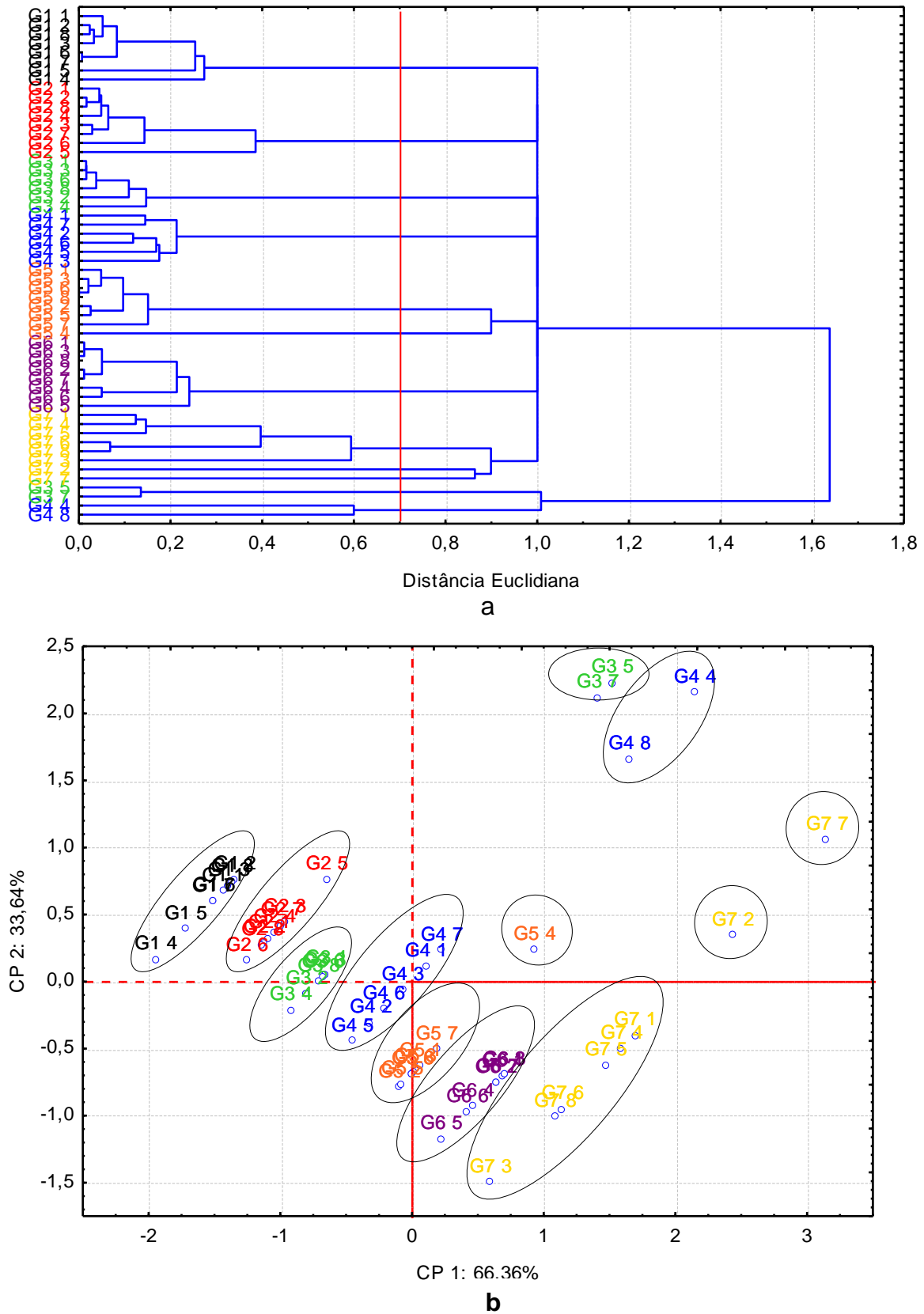
Animal	Grupo 1 ^{1,2}	Grupo 2 ^{1,2}	Grupo 3 ^{1,2}	Grupo 4 ^{1,2}	Grupo 5 ^{1,2}	Grupo 6 ^{1,2}	Grupo 7 ^{1,2}
1	1,19±0,02	1,19±0,02	1,29±0,03	1,78±0,01	1,31±0,01	1,64±0,02	2,43±0,06 ³
2	1,30±0,01	1,14±0,02	1,11±0,03	1,27±0,04	1,11±0,05	1,58±0,03	3,33±0,02 ³
3	1,24±0,01	1,33±0,01	1,27±0,01	1,57±0,01	1,26±0,02	1,65±0,03	1,10±0,03
4	0,57±0,01	1,24±0,02	0,96±0,03	4,25±0,03 ³	2,36±0,02	1,36±0,01	2,31±0,04
5	0,84±0,06	1,72±0,02	3,92±0,04 ³	1,11±0,04	1,14±0,04	1,07±0,04	2,16±0,02
6	1,10 ±0,01	0,98±0,02	1,26±0,03	1,39±0,04	1,24±0,02	1,31±0,01	1,77±0,03
7	1,10±0,01	1,30±0,03	3,78±0,03 ³	1,93±0,03	1,46±0,02	1,59±0,01	4,20±0,04 ³
8	1,27±0,06	1,13±0,03	1,22±0,03	3,65±0,01 ³	1,24±0,03	1,65±0,02	1,70±0,04
Média±DP ⁴	1,08±0,25 ^b	1,25±0,22 ^{a,b}	1,19±0,13 ^b	1,51±0,31 ^{a,b}	1,39±0,41 ^{a,b}	1,48±0,21 ^{a,b}	1,81±0,47 ^a

¹ Média de triplicatas \pm desvio padrão (DP); ² Grupo 1: animais sadios; Grupo 2: animais infectados sem tratamento; Grupo 3: animais infectados e tratados via tópico com base; Grupo 4: animais infectados e tratados tópico com base + FD; Grupo 5: animais infectados e tratados intramuscular com DMSO; Grupo 6: animais infectados e tratados intramuscular com Glucantime[®]; Grupo 7: animais infectados e tratados intramuscular com FD; ³ Valores riscados indicam amostras excluídas devido hemólise; ⁴ Média do grupo \pm DP. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Unequal, $p \leq 0,05$). DMSO: dimetilsulfóxido; FD: fração diclorometano; PBS: tampão salino fosfato pH 7,20

A discrepância entre o número de agrupamentos (12) indicado pelo dendrograma, quando utilizada a maior distância Euclidiana, em relação aos 7 grupos reais estudados neste modelo é justificada pela não exclusão dos dados das amostras hemolisadas (G3 5, G3 7, G4 4, G4 8, G7 2 E G7 7) durante a execução da análise multivariada, o que resultou em 4 agrupamentos adicionais. A amostra G7 1 apesar de hemolisada, não apresentou separação em grupo.

A análise de componentes principais explicou 100% da variabilidade dos dados (Fig. 3.1b). Conforme observado na Figura 3.1b, a CP1 possibilitou uma melhor distinção dos agrupamentos, de acordo com os 7 grupos de origem.

Figura 3.1 Dendrograma (a) e análise de componentes principais (b) de acordo com os níveis de MDA obtidos para os grupos do tratamento de Leishmaniose: G1 (preto), G2 (vermelho), G3 (verde), G4 (azul), G5 (laranja), G6 (roxo), G7 (amarelo).



Sem et al. (2005) em estudos com hamsters infectados com leishmaniose não obteve distinção entre os grupos controle, infectados e sob tratamento ao utilizar apenas o MDA como indicador de dano oxidativo, apesar deste marcador ser utilizado com sucesso em modelos humanos de leishmaniose (KOCYIGIT et al., 2005).

Segundo Vasconcelos et al. (2007), análise de peroxinitrito (ONOO^-) seria mais específica ao estudo de inflamação associada à leishmaniose e doenças vasculares, podendo ser este o biomarcador mais indicado em estudos futuros.

Por outro lado, estudos realizados por Wen e colaboradores (2002) indicaram que o partenólídeo, presente na FD administrada em animais, apresenta bons resultados não só no tratamento de inflamações, mas também no tratamento de células tumorais. A ação do partenólídeo se dá pela indução da apoptose celular, e durante esta indução há a produção de espécies reativas e radicais livres que ocasionam o estresse oxidativo, neste estudo, indicado pelos níveis de MDA. Entretanto o efeito citotóxico é observado apenas quando o partenólídeo encontra-se em concentrações acima de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Com base nesses estudos, pode-se inferir que o tratamento realizado nos animais a base de *T. parthenium* foi eficaz, já que os níveis de MDA sofreram elevação para o grupo G4, com concentração de partenólídeo na FD administrada de $113,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, com aumento ainda mais expressivo para o grupo G7 dos animais tratados com concentração de partenólídeo na FD administrada de $757,31 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Vale ressaltar que EROs e seus produtos são moléculas sinalizadoras, e a alteração nos níveis de alguns componentes indicam inibição ou ativação de vias importantes do tratamento realizado, portanto a inclusão de parâmetros clínicos se faz necessário para a inferência quanto à real eficácia do tratamento.

3.5 CONCLUSÃO

A utilização do biomarcador MDA indicou o aumento no nível de estresse oxidativo dos animais tratados com o fitofármaco proposto. Ao se utilizar a análise multivariada foi possível a distinção dos 7 agrupamentos

originais e adicionalmente, 5 grupos referentes a amostras hemolisadas, o que indica que amostras com essa características devem ser desconsideradas devido o seu comportamento diferenciado.

Em relação ao tratamento com fitofármaco, os níveis de MDA aumentados após o tratamento com FD podem indicar que o partenólídeo foi o responsável pelo aumento no estresse oxidativo que pode levar a apoptose, indicando que o tratamento nestas doses se mostra promissor.

Capítulo 4

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MDA EM RATOS APÓS INGESTÃO DE INULINA

4.1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais desempenham atualmente um papel relevante na terapia e prevenção do câncer, sendo obtidos a partir de plantas, animais e microrganismos (NOBILI et al., 2009).

Há cada vez mais evidências de que o risco no desenvolvimento de câncer é reduzido em populações cuja dieta apresenta um maior consumo de nutracêuticos (frutas, legumes e especiarias, por exemplo). A inulina, um polissacarídeo purificado a partir da raiz da *Chicorium intybus* L. é um nutracêutico pré-biótico, capaz de estimular o crescimento da microbiota do trato intestinal inferior (DE BRUYN et al., 1992; NOBILI et al., 2009).

As oligofrutoses resistentes ou os frutooligossacarídeos são formados a partir da hidrólise da inulina e desempenham diversas funções fisiológicas no organismo, como alteração do trânsito intestinal, promovendo: redução de metabólitos tóxicos, prevenção de câncer de cólon, redução do colesterol total plasmático e da hipertrigliceridemia, melhora da biodisponibilidade de minerais, além de contribuir para o aumento da concentração das bifidobactérias no cólon que reduzem a produção de metabólitos tóxicos relacionados ao estresse oxidativo e ao câncer (DENIPOTE et al., 2010; SOKIIC et al., 2009).

A produção de metabólitos tóxicos no organismo através da peroxidação lipídica contribui para aumentar o dano celular já existente, formando novos produtos de oxidação. Um dos produtos finais da peroxidação lipídica e de relativa estabilidade é o malondialdeído (MDA), conhecido por estar presente no plasma humano e por possuir propriedades biológicas que podem ser relevantes para a carcinogênese (DALLE-DONNE et al., 2006; TORUN et al., 1995).

A proposição de um tratamento a base de inulina objetiva a redução de agentes citotóxicos no organismo, desta forma, a análise do MDA permite

investigar se a inulina induz o aumento de estresse oxidativo em ratos tratados com a inulina.

4.2 OBJETIVO

Determinar os níveis de MDA no plasma obtido de ratos Wistar antes e após tratamento com inulina.

4.3 METODOLOGIA

O protocolo de experimentação animal foi aprovado previamente pelo Comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Estadual de Londrina CEEA No. 87/08.

Os ratos empregados no estudo foram Wistar (n=12) sadios, machos e com peso aproximado de 160 g. Os animais foram divididos em 2 grupos, o controle (sem tratamento) e o “Inulina” (com tratamento). Os ratos foram tratados via intraperitoneal com injeção salina contendo 100 mg de inulina por kg do peso corpóreo, administrados por gavagem em períodos de 24, 48 e 72 horas. Os animais foram mantidos para melhor aclimatação a temperatura de (22 ± 2°C), umidade relativa de 60% e ciclos de claro/escuro de 12 h, e receberam alimentação à vontade até uma semana antes do período do tratamento.

Após o período de tratamento, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e centrifugadas para obtenção do plasma. A extração do MDA plasmático foi realizada de acordo com adaptações do método descrito por Bastos et al. (2012). O protocolo experimental MEB está apresentado no item 2.3.3. O método cromatográfico, o preparo de padrão e a validação do método seguiram os procedimentos indicados no item 2.3.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foi realizada a validação parcial do método. Foram realizadas 3 curvas de calibração analítica por adição de padrão em um *pool*

de plasma na faixa dinâmica de trabalho de 0,2; 0,5; 0,8; 1,6; 6,4; 12,8; 20,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os demais parâmetros de validação foram obtidos a partir da curva de calibração e estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Parâmetros obtidos na validação parcial do método aplicado à ingestão de inulina em ratos Wistar

Parâmetro	[MDA]($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Resultado
Teste de Recuperação (%)	1,6	102,17
	12,8	103,99
Linearidade (R^2)		0,9938
Equação da reta		$y = 20247x + 6615,6$
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		0,14
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		0,46
Repetitividade ($n=6$) DPR (%)		3,45

[MDA]: Concentração do MDA; R^2 : Coeficiente de determinação; LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação; n : Número de observações; DPR: Desvio padrão relativo.

O estudo dos níveis de MDA, metabólito tóxico indicador da peroxidação lipídica, durante o tratamento de animais com a inulina, possibilitou verificar que o nutracêutico não proporcionou alteração significativa nos níveis de oxidação lipídica em relação ao organismo dos animais sadios (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Níveis de MDA de ratos Wistar tratados com inulina

Grupo	Período (h)	MDA* ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	MDA** ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Controle	-	3,92 \pm 0,15	
		4,05 \pm 0,15	
		4,72 \pm 0,18	4,54 \pm 0,43 ^a
Inulina	24	4,86 \pm 0,18	
		4,73 \pm 0,18	
		4,04 \pm 0,15	4,52 \pm 0,41 ^a
	48	4,78 \pm 0,18	
		3,75 \pm 0,14	
		4,30 \pm 0,16	3,93 \pm 0,32 ^a
72			

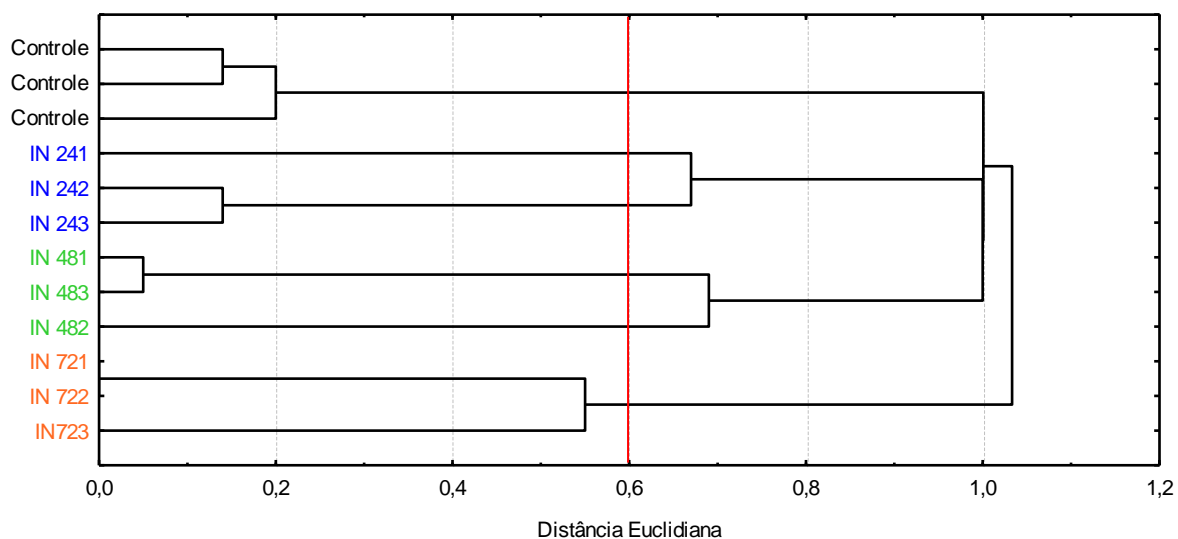
* Nível médio por amostra \pm Desvio padrão ($n=3$) ** MDA médio \pm Desvio padrão - Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa (Unequal, $p \leq 0,05$). *** A amostra continha volume insuficiente de plasma.

Os animais tratados obtiveram valores médios de MDA de 4,54 \pm 0,43 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o tratamento por 24 horas; 4,52 \pm 0,41 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o tratamento por 48 horas e 3,93 \pm 0,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o tratamento por 72 horas. Os valores

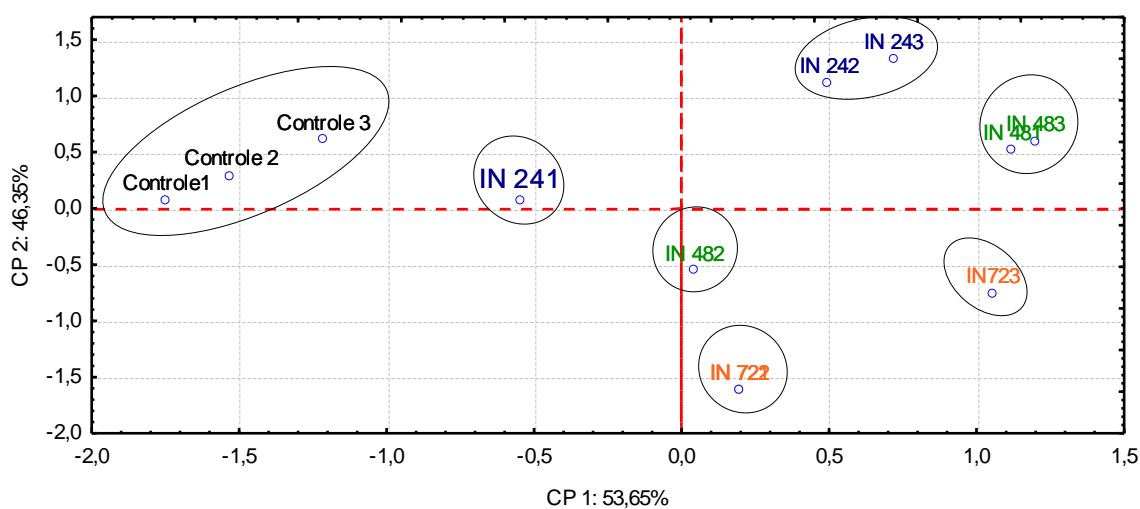
obtidos para os dois grupos (controle e inulina) não diferiram entre si (Unequal, $p < 0,05$).

A análise multivariada permitiu a distinção de 7 agrupamentos de acordo com o dendrograma cortado na maior distância Euclidiana (Figura 4.1).

Figura 4.1. Dendrograma obtido pela análise de agrupamento hierárquico **(a)**, projeção das variáveis **(b)** pela análise de componentes principais, considerando os níveis de MDA obtidos para os grupos de ratos Wistar tratados com inulina: Controle (preto), 24 horas (azul), 48 horas (verde) e 72 horas (laranja).



a



b

O tratamento dos animais sadios com inulina não ocasionou alteração significativa nos níveis de MDA. Embora não significativas observa-se variações na análise de componentes principais (Figura 4.1 b) entre animais do

mesmo grupo, os quais apresentam tendência de decaimento semelhantes, atribuídas ao fato das análises terem sido realizadas em dias diferentes.

Embora os resultados do trabalho indiquem que a ingestão deste nutracêutico possa ser utilizada na terapia e prevenção do câncer de cólon considerando os níveis de MDA, ressalta-se a importância da continuidade desta pesquisa, verificando a ação da inulina na variação dos níveis de oxidação lipídica no organismo de indivíduos saudáveis e diagnosticados com câncer de cólon por um período de tempo maior, já que em animais sadios houve uma ligeira diminuição do MDA no período de 72 horas em relação ao de 24 e 48 horas.

4.5 CONCLUSÃO

Os valores médios de MDA não apresentaram variação estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle. Entretanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a eficiência do uso do nutracêutico, em relação à variação da oxidação lipídica no organismo de animais doentes.

Capítulo 5

NÍVEIS DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA OBSERVADO EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

5.1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de manifestações patológicas, caracterizado pelo crescimento descontrolado das células, possibilitando a invasão a tecidos próximos, podendo espalhar-se para diversas regiões do corpo (metástase). As condições de determinação das neoplasias são multifatoriais, dividindo-se em fatores genéticos e psico-sócio-ambientais (BEDOR, 2008).

Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer) o Brasil apresenta grande relevância em relação ao caráter epidemiológico do câncer, o que incentiva estudos sobre sua incidência e fatores carcinogênicos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2030 a incidência de câncer seja de 27 milhões de casos, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas com algum tipo de câncer (INCA, 2012). Para o ano de 2014 espera-se 576 mil novos casos de câncer apenas no Brasil (INCA, 2014).

Um dos tipos de neoplasia com causas ainda não definidas é a leucemia. A leucemia apresentou uma perspectiva de taxa bruta de incidência de 100 mil homens para o ano de 2012, no Brasil, sendo os estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo os estados com maior índice de incidência: de 5,14 a 6,88 casos para cada 100 mil homens e de 4,22 a 5,2 casos para cada 100 mil mulheres, sendo o estado do Paraná detentor de 5,51 casos para homens e 4,43 para mulheres. Estes mesmos estados apresentaram, em geral, taxas elevadas para diferentes tipos de câncer (INCA, 2012). Para o ano de 2014 estima-se 5.050 novos casos de leucemia para homens e 4.320 para mulheres, sendo que a maior taxa de incidência de leucemia em homens é na região norte do País (3,57 casos por 100 mil habitantes). Na região sul espera-se 1.140 novos casos para homens e 920 para mulheres (INCA, 2014).

A leucemia é uma doença que afeta os leucócitos e sua principal característica é ocasionar o acúmulo de blastos, de característica linfoide, de modo anormal na medula óssea (MO). A medula óssea é a responsável pela formação das células sanguíneas, que são os glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e as plaquetas. O acúmulo dessas células na medula óssea faz que com que a produção destes elementos figurados seja interrompida, ocasionando no paciente anemia, infecções recorrentes e hemorragias (INCA, 2013). Podem ser de origem linfóides ou mielóides e, de acordo com a diferenciação celular, crônicas ou agudas. Nas leucemias agudas, é comum o achado de células jovens neoplásicas (blastos) nos exames morfológicos de sangue e medula óssea (MO). Estes blastos podem infiltrar órgãos, como fígado, baço, linfonodos, meninges, cérebro e pele. Na MO se proliferam e produzem sintomas associados à falência medular, como anemia, neutropenia e trombocitopenia (CRANS e SAKAMOTO, 2001; LOWENBERG 2001; FERRARA, 2004). A leucemia linfoide aguda (LLA) é diagnosticada quando os linfoblastos excedem 25% das células da medula óssea (LEMOS, 2013).

Apesar da leucemia não ser a neoplasia com maior número de incidência, ela corresponde à faixa de 25 a 30% dos casos de neoplasias malignas durante a infância, sendo que 80% dos casos diagnosticados são de LLA, nos adultos jovens e adolescentes a incidência diminui para 20%, e volta aumentar novamente após os 60 anos de idade, porém seu diagnóstico nem sempre é rápido e preciso (FARIAS e CASTRO, 2003; PERIM, et al., 2013; RODRIGUES, CAMARGO, 2003).

Muitos trabalhos relacionam elevados níveis de peroxidação lipídica a diversos tipos de câncer, inclusive a leucemia (BATISTI, 2008), e uma das formas de determinação é pelo biomarcador MDA (VASCONCELOS et al., 2007). A carcinogênese está relacionada a 3 estágios principais: iniciação, promoção e progressão do tumor, e estudos indicam que o estresse oxidativo participa dessas 3 etapas (KLAUNIG e KAMENDULIS, 2004). Adicionalmente, de acordo com Elias et al. (2010) é possível relacionar também a anemia ao aumento da oxidação lipídica no organismo.

A LLA é um tipo de leucemia agressiva e de rápida progressão, sendo necessário que seja realizado um diagnóstico precoce (LEMOS, 2013). Batisti e colaboradores (2008) concluíram em suas pesquisas que níveis elevados de

oxidação lipídica em pacientes recém diagnosticados com LLA sugerem que estas lesões oxidativas estejam relacionadas à patogenia e não ao tratamento quimioterápico, que é bastante agressivo ao organismo. Entretanto, o número de estudos sobre a oxidação lipídica na infância ainda é escasso.

5.2 OBJETIVOS

Verificar a variação do estresse oxidativo do organismo de pacientes infanto-juvenis saudáveis e de pacientes infanto-juvenis diagnosticados com LLA através do uso do biomarcador MDA.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil (nº 214/ 09 - CAAE n ° 0164.0.268.000-09), a inclusão dos indivíduos ao estudo foi condicionada por um formulário escrito de consentimento dos pais em relação a utilização das amostras de sangue de suas crianças e adolescentes para estudos de investigação de MDA. Os critérios de diagnóstico foram baseados nas diretrizes propostas pelo Departamento de Hematologia do Hospital Universitário (Londrina, Paraná). O risco de recorrência de todos os pacientes foi avaliado através do protocolo GBTLI (Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Infantil Protocolo - 99), o qual está baseado no Programa de Avaliação de Terapia do Câncer, proposto pelo Instituto Nacional do Câncer, e leva em conta a idade ao diagnóstico, contagem de leucócitos, imunofenotipagem, envolvimento de outros tecidos além da medula óssea, e capacidade de resposta ao tratamento.

O grupo LLA foi constituído de 27 pacientes com diagnóstico confirmado e o grupo controle foi formado por 18 indivíduos saudáveis, livres de neoplasia e que não se encontravam hospitalizados.

A partir de 4 mL de sangue coletado com heparina foi obtido o plasma por centrifugação e este foi mantido congelado -20°C até o momento da análise. A análise do MDA seguiu o procedimento experimental descrito no item 2.3, sendo utilizado o protocolo de extração MEB (item 2.3.3).

A análise de componentes principais foi realizada utilizando o software MATLAB (The MathWorks, Natick, Massachusetts).

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A realização da validação parcial do método foi efetuada a partir da triplicata da curva de calibração analítica por adição de padrão em um *pool* de plasma na faixa dinâmica de trabalho de 0,25 a 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$, precisão ($n=6$) e recuperação em 3 níveis de concentração, baixo, médio e alto. Os parâmetros *LD* e *LQ* foram obtidos a partir da curva de calibração. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Validação do método de MDA em pacientes de LLA

Parâmetro	[MDA] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Resultado
Teste de Recuperação (%)	0,25	103,02
	2,50	109,12
	5,00	109,44
Linearidade (R^2)		0,9928
Equação da reta		$y = 15597x + 1407,7$
<i>LD</i> ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		0,20
<i>LQ</i> ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		0,66
Repetitividade ($n=6$) <i>DPR</i> (%)		3,10

[MDA]: Concentração do MDA; R^2 : Coeficiente de determinação; *LD*: Limite de detecção; *LQ*: Limite de quantificação; *n*: Número de observações; *DPR*: Desvio padrão relativo.

A análise das amostras de plasma revelou uma grande variação no estresse oxidativo dos grupos, controle e LLA. Os níveis de MDA para o grupo controle apresentou valores de 0,58 a 1,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e valor médio de $0,91 \pm 0,18 \mu\text{mol L}^{-1}$. Já para pacientes diagnosticados com LLA os níveis de MDA variaram entre 0,97 e 3,67 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com um valor médio de $2,17 \pm 0,77 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os valores numéricos de MDA para todos os indivíduos analisados estão apresentados no Anexo 1. Os gráficos apresentados nas Figuras 5.1 e 5.2 ilustram a variabilidade dos níveis de MDA obtidos para o grupo controle e para o grupo LLA, respectivamente.

Figura 5.1 Variação dos níveis de MDA no grupo controle ($n=18$)

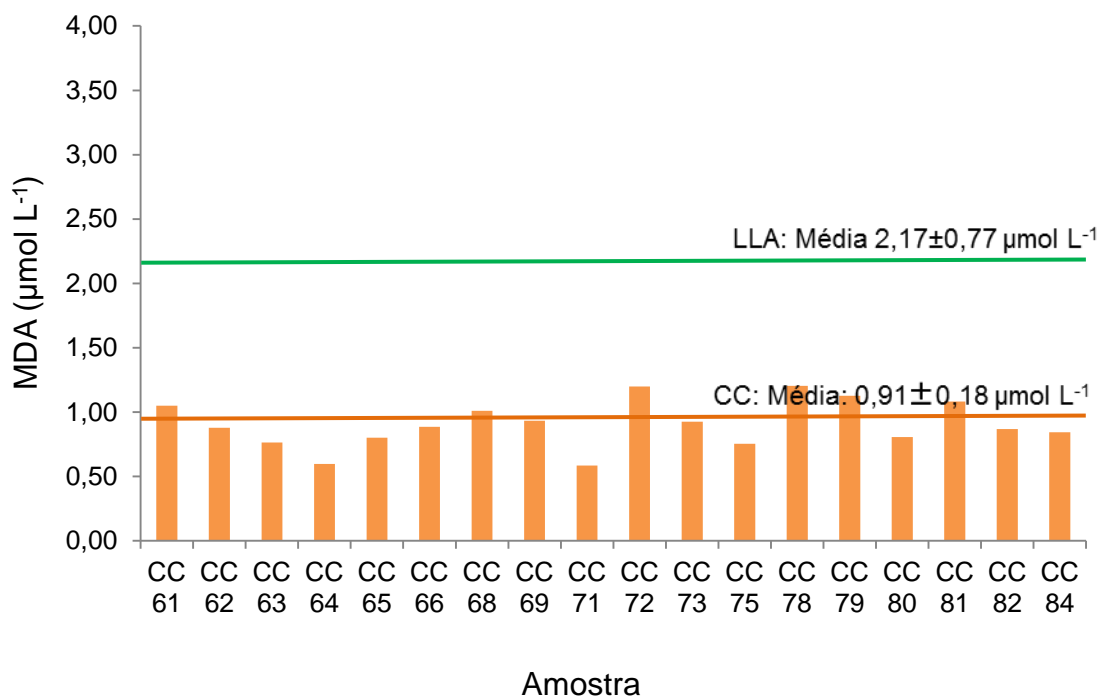
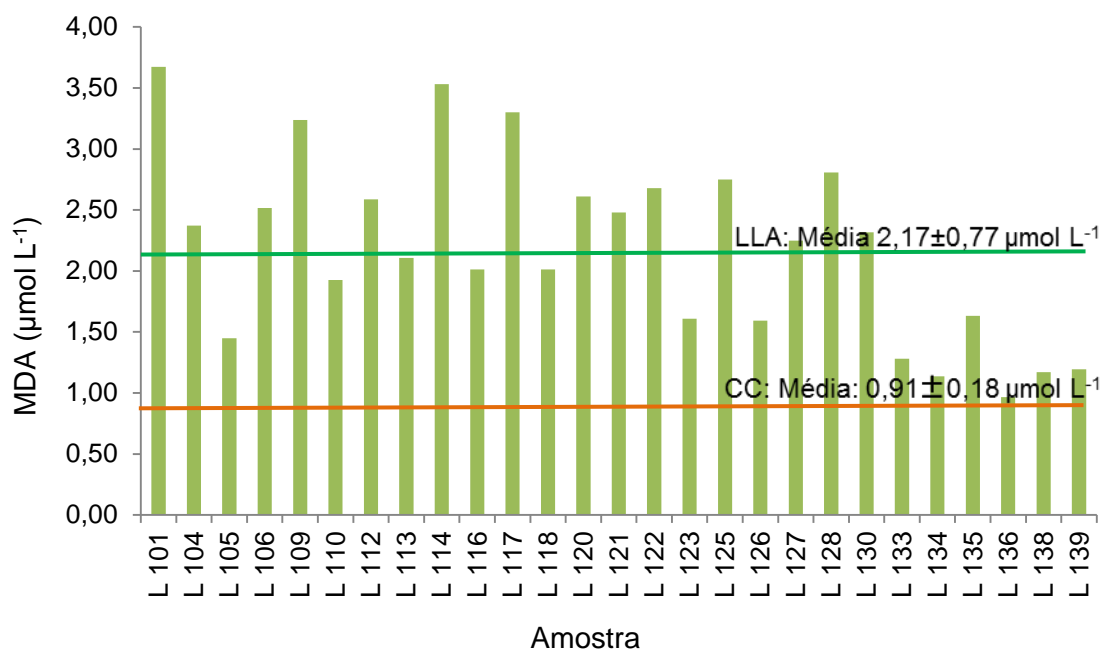


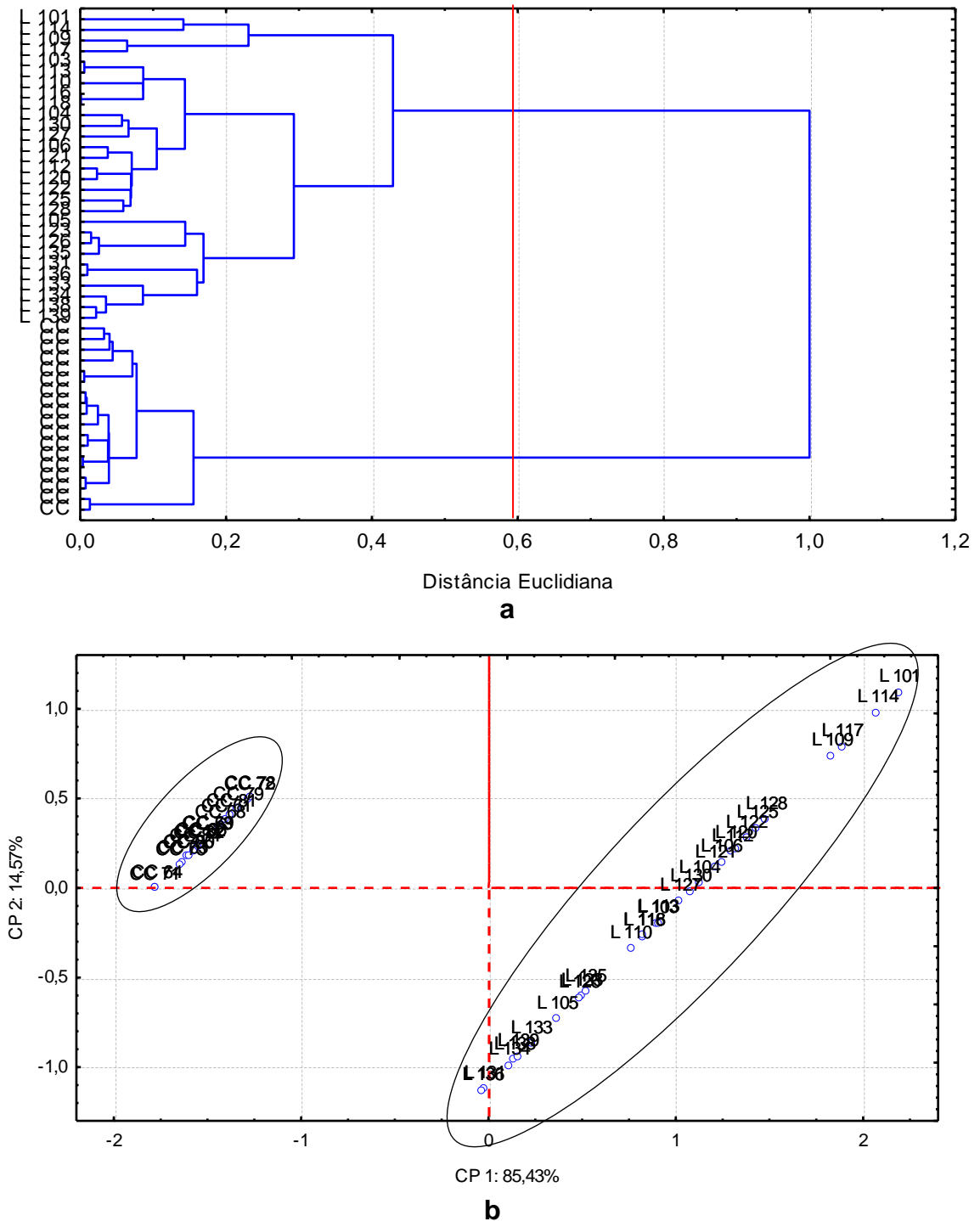
Figura 5.2 Variação dos níveis de MDA no grupo diagnosticado com LLA ($n=27$)



Para se analisar a dispersão dos níveis de MDA entre os dois grupos - controle e LLA utilizou-se a análise multivariada. A análise de componentes principais distingue claramente os dois grupos no dendrograma, quando se

corta o mesmo na maior distância Euclidiana, sendo esta divisão explicada pela CP 1 (Fig. 5.3).

Figura 5.3 Dendrograma obtido pela análise de agrupamento hierárquico I **(a)**, projeção das variáveis **(b)** pela análise de componentes principais, considerando os níveis de MDA obtidos para os grupos de pacientes controle (CC) e de pacientes diagnosticadas com LLA (L).



A análise do MDA demonstrou ser suficiente para distinguir pacientes sadios dos diagnosticados com leucemia, assim como o observado por Sheel (2011) e Battisti et al. (2008). Entretanto, os valores de MDA obtidos para estas observações não podem ser utilizados como critério de normalidade em análises toxicológicas, podem somente identificar indivíduos com valores alterados em relação ao valor médio obtido para o grupo controle.

Sabe-se que o estresse oxidativo em humanos também é relacionado à variabilidade biológica existente e a diversos fatores como idade, sexo, etnia e índice de massa corpórea (KUNO et al., 2010).

O grupo de pacientes LLA neste estudo foi constituído de 46,43% do sexo masculino e 53, 57% do sexo feminino. De acordo com Lemos (2013) há uma predileção pelo sexo masculino em pacientes com LLA, o que não foi observado devido ao pequeno número amostral.

Em relação à idade, 40,74% dos casos apresentavam idade inferior a 5 anos, 22,22% idade entre 5 e 10 anos, 18,52% corresponderam a pacientes entre 10 e 15 anos e 18,52 % acima de 18 anos.

As leucemias de modo geral apresentam sinais inespecíficos, o que pode vir a confundir o seu diagnóstico com o quadro clínico de muitas outras doenças (LEMOS, 2013). Através do hemograma podem ser observadas diferentes alterações em pacientes com LLA: contagem dos leucócitos variando entre 100 a 1 milhão de leucócitos (mm^3); baixa contagem de plaquetas ($\leq 150.000 \text{ mm}^{-3}$); anemia determinada pela baixa contagem de hemoglobina ($\leq 12 \text{ g dL}^{-1}$); e identificação de blastos (ALMEIDA, 2009; LEMOS, 2013). Os valores de referência utilizados em hemogramas estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Valores de referência para hemogramas de acordo com o sexo

	Feminino	Masculino
Leucócitos (mm^3).....	3500 a 10500	
Hemácias (mm^3).....	3,90 a 5,00	4,30 a 5,70
Hemoglobina (g dL^{-1}).....	12,00 a 15,50	13,50 a 17,50
Plaquetas (mm^3).....	150000 a 450000	

Os dados obtidos pelo hemograma dos pacientes do grupo LLA estão contidos na Tabela 5.3. É importante ressaltar que os pacientes 130 e 134

encontravam-se sem tratamento devido ao início da doença, e o paciente 118 já se encontrava fora de tratamento. Os demais pacientes encontravam-se sob tratamento.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5.3, observa-se que parte dos pacientes (109, 112, 114, 121, 125, 128 e 130), classificados como sendo baixo risco e que apresentavam blastos no momento da coleta de sangue, possuem valores acima do valor médio para MDA ($2,17 \mu\text{mol L}^{-1}$). Ao comparar os valores de hemácias e hemoglobina destes pacientes, observa-se que todos estão abaixo dos valores de referência, o que caracteriza o quadro de anemia.

Tabela 5.3 Valores de MDA e dados obtidos do hemograma dos pacientes do grupo LLA

Paciente *	Risco **	MDA (μM)	Leucócitos (mm^3)	Blastos (%)	Hemácias (mm^3)	Hemoglobina (g dL^{-1})	Plaquetas (mm^3)
101	A	3,67	5900	0	5,28	14,00	360000
104	A	2,37	8680	0	5,00	16,00	183900
105	A	1,45	3600	0	-	8,70	1000000
106	A	2,52	1900	0	4,18	12,69	327000
109	B	3,24	24400	8	2,81	7,57	41000
110	A	1,93	-	0	-	-	-
112	B	2,59	11100	63	1,86	5,09	21000
113	A	2,11	-	0	-	-	-
114	B	3,53	2400	12	3,05	9,70	55000
116	A	2,01	1700	0	3,23	10,14	304000
117	A	3,30	3100	48	4,37	14,25	157000
118	A	2,01	7800	0	5,02	15,63	222000
120	A	2,61	6700	0	4,81	-	189000
121	B	2,48	2930	32	2,28	6,57	371100
122	B	2,68	13600	0	4,28	-	232000
123	B	1,61	4400	0	4,60	12,50	-
125	B	2,75	13200	74	2,56	6,90	11000
126	B	1,59	2300	0	2,53	6,26	21000
127	A	2,25	119000	0	1,98	6,72	55000
128	B	2,81	-	4	-	-	-
130	B	2,32	5200	25	2,88	7,60	144000
133	B	1,28	4600	0	3,01	9,02	114000
134	A	1,14	39650	75	3,11	8,80	31000
135	B	1,63	8100	77	3,53	10,20	383000
136	B	0,97	1900	0	3,09	8,20	8000
138	B	1,17	20700	72	1,96	4,80	14000
139	B	1,19	-	0	-	-	-

*Paciente com cor diferente: **Feminino** e **Masculino**; ** A: Alto risco; B: Baixo risco

Vale ressaltar que o grupo LLA foi estratificado em alto e baixo risco, sendo que regimes de quimioterapia intensivos e a introdução da terapia por estratificação de risco melhoraram substancialmente as taxas de cura para crianças com LLA. Atuais esquemas de grupos de risco são imperfeitos, pois algumas crianças são classificadas como de baixo risco e tratadas com terapia menos intensa, sofrendo recaída, passando então ao grupo de alto risco intensivo (TEACHEY e HUNGER, 2013).

Ao realizar a análise de agrupamento hierárquico para o grupo LLA, utilizando os dados dos prontuários completos, observa-se que, quando o dendrograma é cortado na maior distância Euclidiana há a separação de 4 grupos amostrais (Figura 5.4), entretanto, a distinção dos mesmos na projeção das amostras de acordo com os CP 1 e 2 não é nítida quando realizado apenas em superfície 2D (Figura 5.5), que pode explicar apenas 45,90% dos dados. As amostras foram distribuídas conforme as cores recebidas durante a análise hierárquica, para melhor ilustração.

Figura 5.4 Dendrograma obtido pela análise de agrupamento hierárquico utilizando os prontuários completos do grupo LLA

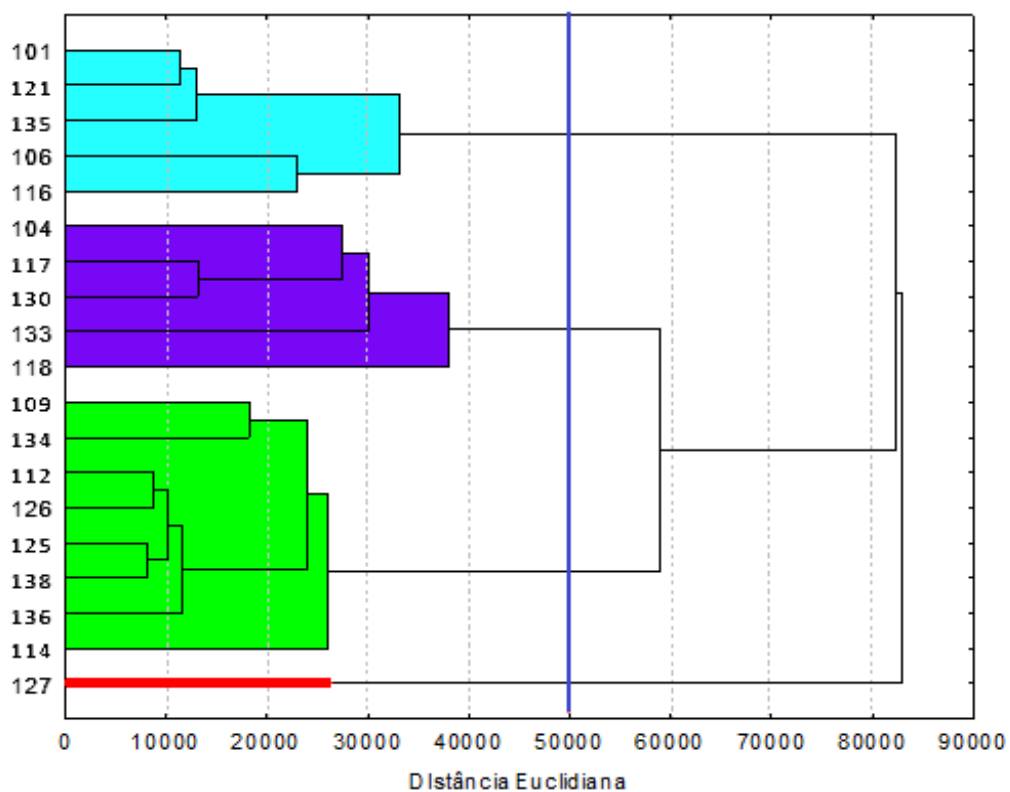
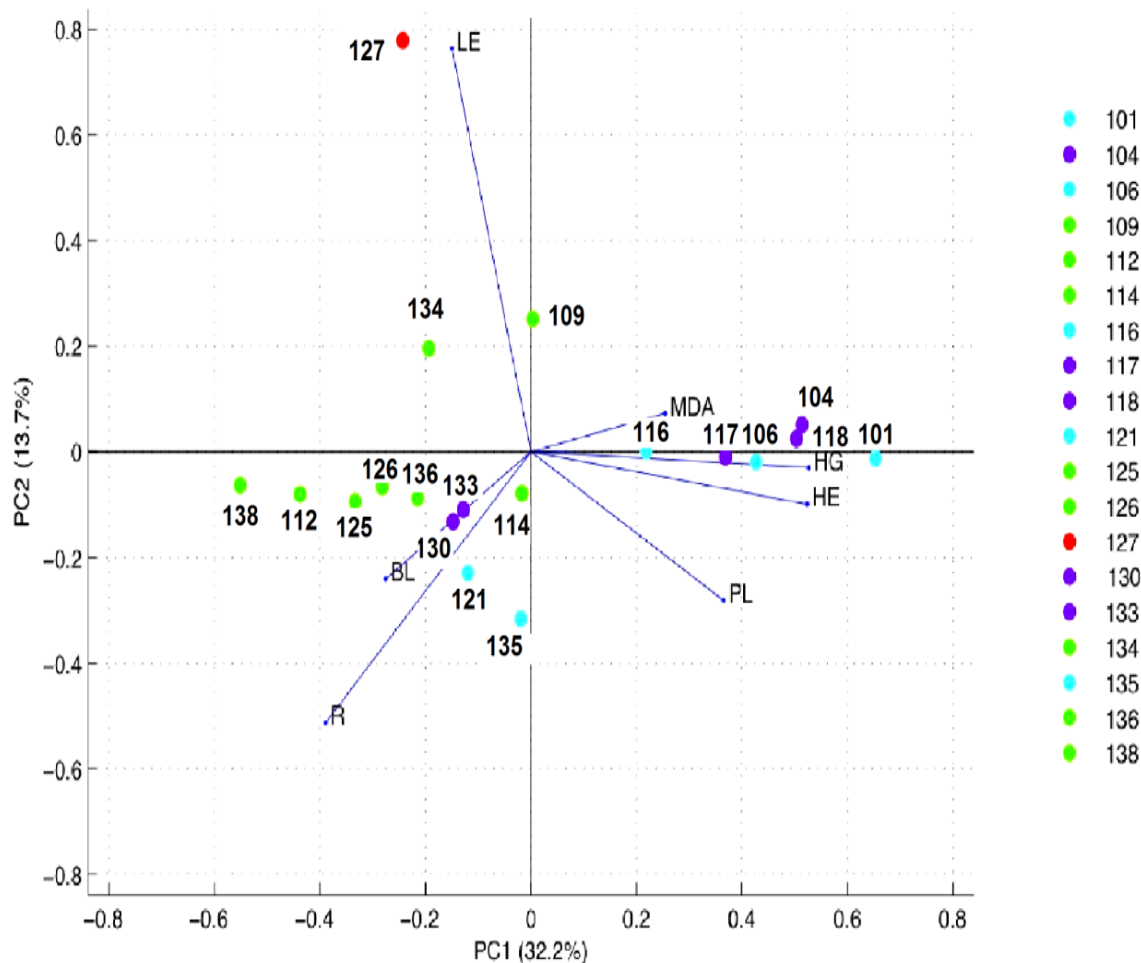


Figura 5.5 Distribuição das variáveis de acordo com os componentes principais 1 e 2 em superfície 2D utilizando os prontuários completos do grupo

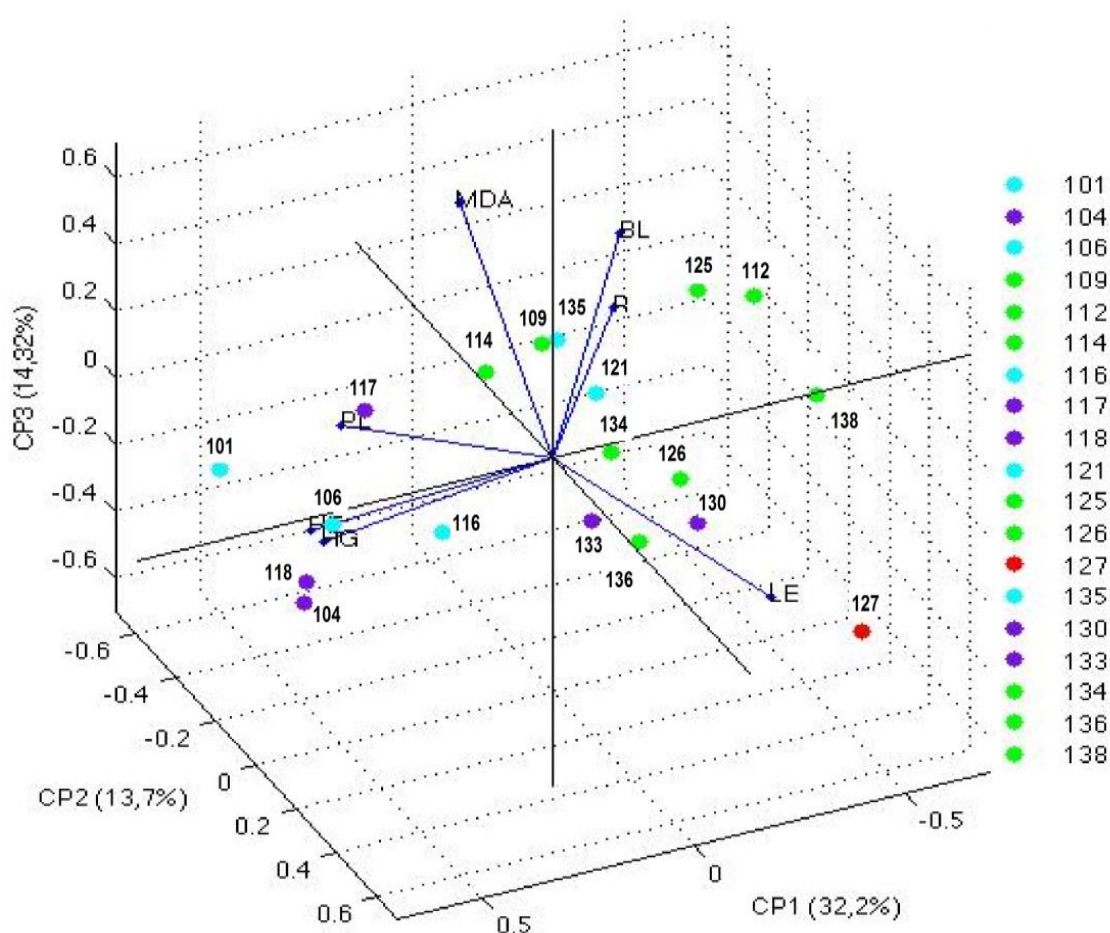


LLA

BL: blastos; HE: hemácias; HG: hemoglobina; LE: Leucócitos; MDA: malondialdeído; PL: plaquetas; R: risco.

As amostras que receberam coloração azul (●) e roxo (●), de acordo com o dendrograma apresentado na Figura 5.4, quando analisadas apenas em superfície 2D (Figura 5.5) não apresentam distinção de grupos de forma nítida. Entretanto, ao se realizar a ACP considerando 3 CP, obtém-se uma superfície 3D capaz de demonstrar esta separação (Figura 5.6) e explicar 60,22% dos dados amostrais.

Figura 5.6 Análise de componentes principais 1, 2 e 3 em superfície 3D utilizando os prontuários completos do grupo LLA



BL: blastos; HE: hemácias; HG: hemoglobina; LE: Leucócitos; MDA: malondialdeído; PL: plaquetas; R: risco.

Observa-se que 4 das 5 amostras de coloração roxa (●) estão alocadas no quadrante negativo do CP 3, enquanto que 4 das 5 amostras de coloração azul (●) estão no quadrante positivo, evidenciando a separação dos grupos.

A dispersão das variáveis em superfície 2D e 3D (Figura 5.5 e 5.6) afirma a relação observada na maior parte dos casos dos pacientes que possuem blastos e leucócitos altos (pacientes 109, 112, 125, 127, 134 e 138) pois estes estão alocados, em sua maioria, no quadrante negativo do CP 1, assim como os pacientes com anemia, observada devido à baixa contagem de hemácias e hemoglobina (pacientes 109, 112, 114, 121, 125 e 130).

Contudo apesar da distinção observada entre os pacientes, os valores de MDA quando relacionados aos demais dados do prontuário não contribuíram efetivamente com a separação das variáveis, comparando com o

que foi observado na Figura 5.3 para a distinção dos pacientes diagnosticados com LLA e saudáveis.

5.5 CONCLUSÃO

A análise de estresse oxidativo utilizando o MDA como biomarcador mostrou-se adequada no estudo da leucemia linfóide aguda, já que os indivíduos diagnosticados com LLA diferiram significativamente dos controles sadios indicando possível relação direta entre a neoplasia e a oxidação lipídica observada no organismo.

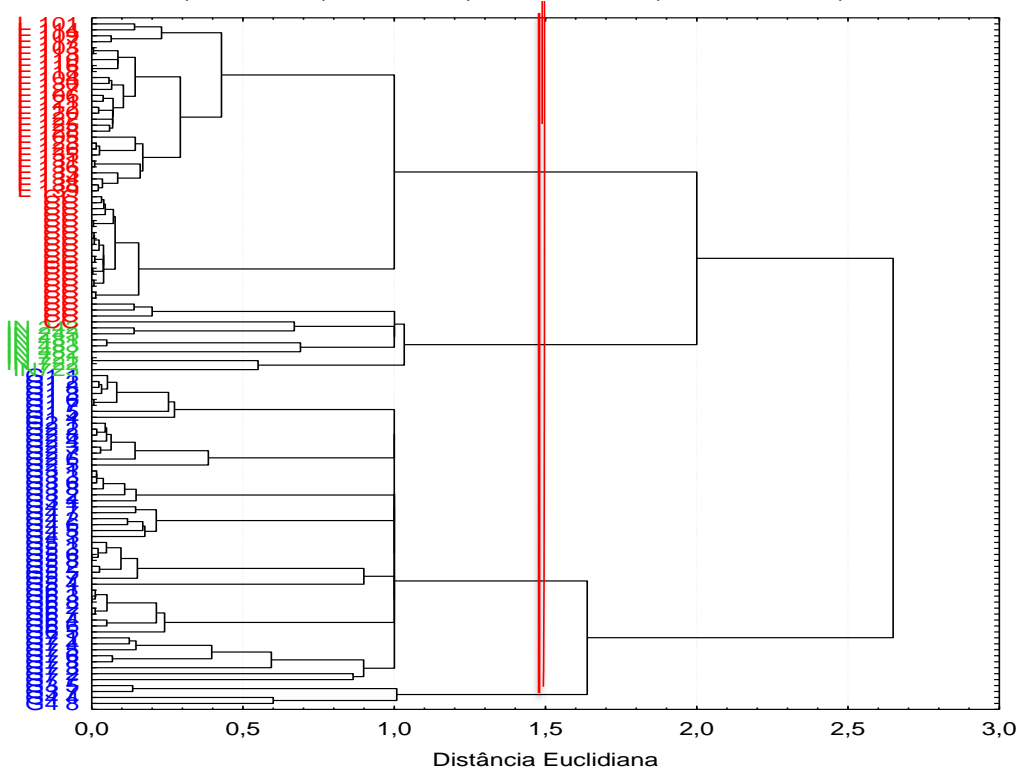
Ao analisar os valores de MDA apenas dos pacientes de LLA junto aos seus prontuários completos, este não apresentou tanta contribuição para a separação amostral, entretanto foi observada uma relação entre valores elevados de MDA, presença de blastos e a classificação dos pacientes como sendo de baixo risco, como também MDA elevado nos pacientes classificados em alto risco sem presença de blastos no sangue periférico no dia da coleta do material analisado, o que nos motiva continuar esta investigação.

Capítulo 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

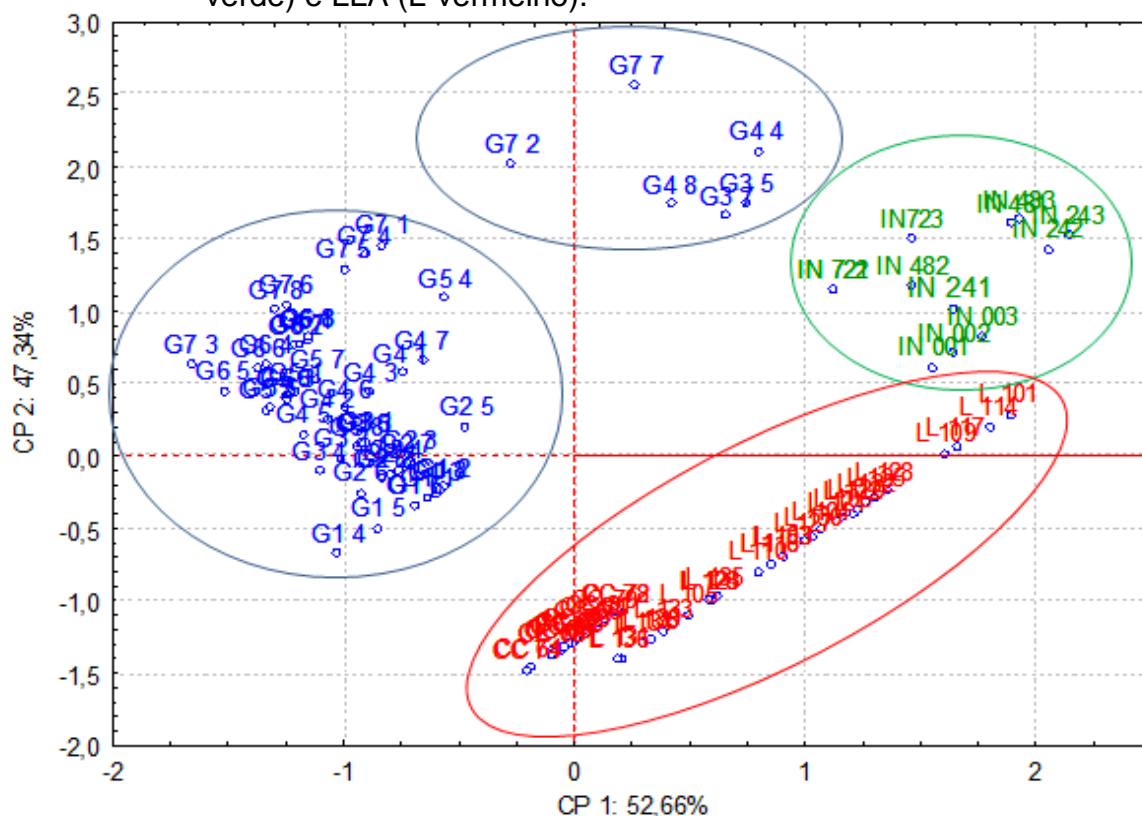
A análise de agrupamento hierárquico realizado a partir dos modelos experimentais estudados nos Capítulos 3, 4 e 5 desta dissertação, demonstra a existência de 4 grandes grupos amostrais, quando cortado na maior distância Euclidiana (Figura 6.1).

Figura 6.1. Dendrograma obtido pela análise hierárquica de agrupamentos dos níveis de MDA estudados em 3 tratamentos: leishmaniose (G-azul), inulina (IN - verde) e leucemia (L - vermelho).



A Figura 6.2 demonstra a projeção de todas as amostras. Apesar de o dendrograma apresentar 4 grupos, a análise de componentes principais foi limitada aos 3 modelos estudados, aqui denominados como: leishmaniose (azul), inulina (verde) e LLA (vermelho).

Figura 6.2 Análise de componentes principais 1 e 2 para níveis de MDA nos modelos leishmaniose (G1 a G7- azul), inulina (IN 24,48 e 72 - verde) e LLA (L-vermelho).



Assim como já discutido no Capítulo 3, as amostras hemolisadas apresentam comportamento diferenciado em relação às demais, devendo ser descartadas durante a realização dos experimentos, e este foi o grupo formado adicionalmente por algumas amostras do estudo de leishmaniose (azul), mais acima na Figura 6.2.

Observou-se que o tratamento com FD de *T. parthenium* ocasionou um aumento no estresse oxidativo no organismo, atribuído à presença do partenólídeo no fitofármaco proposto, o que ocasiona apoptose celular e consequente aumento nos níveis de peroxidação lipídica. Podendo, portanto o aumento no MDA pode, portanto, estar relacionado à eficácia no tratamento, já que isto ocorreu em 2 dos grupos tratados com o fitofármaco.

No Capítulo 4 o uso do biomarcador MDA possibilitou indicar que o uso da inulina não ocasionou variação significativa em relação ao estresse oxidativo dos animais sadios tratados com o nutracêutico, porém, estudos adicionais devem ser realizados para se inferir sobre a sua real capacidade

anticarcinogênica e de diminuição de metabólitos tóxicos no organismo, visto que o tratamento realizado foi de apenas 72 horas.

A utilização do MDA para avaliar a leucemia linfóide aguda em modelo humano (Capítulo 5) apresentou evidente distinção entre indivíduos saudáveis, designados como controle, e com LLA, possibilitando relacionar a neoplasia e a variação do estresse oxidativo no organismo. Quando analisado em conjunto com aos dados obtidos dos prontuários de cada paciente, os níveis elevados de MDA apresentaram boa relação com os pacientes de baixo risco com presença de blastos. Contudo, o número de observações ainda é baixo.

A capacidade de distinção dos grupamentos formados em relação ao tratamento estudado (Figura 6.1 e 6.2) indica que os níveis de MDA a serem obtidos dependem diretamente do tipo de doença ou dano biológico investigado e do modelo utilizado, visto que cada indivíduo apresenta uma faixa normal de oxidação lipídica no organismo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T. J. B. Avanços e perspectivas para o diagnóstico da leucemia linfóide aguda. **Candombá-Revista Virtual**, v. 5, n. 1, p. 40-55, 2009. ISSN: 1809-0362
- ANDRIOLO, A.; MARTINS, A. R.; BALLARATI, C. A. F.; BARBOSA, I.V.; MESNDES, M. E.; MELO, M. R.; SUMITA, N. M.; ROMANO, P.; TRINDADE, P. A. **Recomendações da sociedade brasileira de patologia clínica/medicina laboratorial para coleta de sangue venoso**. 2 ed. Barueri: Manole, 2010.
- ANTUNES, M. V.; LAZZARETTI, C.; GAMARO, G. D.; LINDEN, R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de Malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.44, n.2, p. 278-287, 2008.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. *Nutrire*: **Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v.33, n.2, p.111-128, 2008.
- BASTOS, A. S.; LOUREIRO, A. P. M.; OLIVEIRA, T. F.; CORBI, S. C. T.; CAMINAGA, R. M. S.; ROSSA JÚNIOR, C.; ORRICO, S. R. P. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. **Anal. Biochem.**, v.423, p.141-146, 2012.
- BATTISTI, V. **Estudo do perfil oxidativo e atividade da enzima acetilcolinesterase em pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
- BATTISTI, V.; MADERS, L. D. K.; BAGATINI, M. D.; SANTOS, K. F.; SPANEVELLO, R. M.; MALDONADO, P. A.; BRULÉ, A. O.; ARAÚJO, M. C.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 511–518, 2008.
- BEDOR, C. N. G., **Estudo do potencial carcinogênico dos agrotóxicos empregados na fruticultura e sua implicação para a vigilância da saúde**. Tese de Doutorado em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz: Centro de Pesquisas Ageu Magalhães, 2008.
- BENZIE, I.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **Int. j. Food Sci. Nut.**, v.47, n.3, p.233-261, 1996.
- CRANS, H. N.; SAKAMOTO, K. M. Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 15, n. 3, p. 313-331, 2001.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin. Chem.**, v. 52, n. 4, p. 601-623, 2006.

DE BRUYN, A.; ALVAREZ, A. P.; SANDRA, P.; DE LEENHEER, L. Isolation and identification of O- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1) -O- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow D-fructose, a product of the enzymic hydrolysis of the inulin from *Cichorium intybus*. **Carbohydr. Res.**, v.235, n.1 p.303–308, 1992.

DENIPOTE, F. G.; DENIPOTE, F.G.; TRINDADE, E. B. S. M.; BURINI, R. C. Probiotics and prebiotics in primary care for colon cancer. **Arq. Gastroenterol.**, v.47, n.1, p. 93-98, 2010.

ELIAS, D. B. D.; FREITAS, R. M.; GONÇALVES, R. P.; MAGALHÃES, H. Y. F.; SOUSA, J. H.; MAGALHÃES, S. M. M. Avaliação das concentrações de malonaldeído e nitrito em pacientes com anemia falciforme em tratamento ou não com hidroxíureia. **Einstein**, v.8, n. 4, p.414-418, 2010.

FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 2, p. 91-98, 2004.

FENG, Z.; HU, W.; MARNETT, L. J.; TANG, M. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. **Mutat. Res.**, v. 601, p. 125-136, 2006.

FERGUSON, L.R. Chronic inflammation and mutagenesis. **Mutat. Res.**, 690, 3-11.

FERRARA, F. Unanswered questions in acute myeloid leukemia. **Lancet Oncol**, v. 5, n. 7 p. 443-450, 2004.

FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos. Disponível em: <http://www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao6/inovacao_em_pauta_6_doenca_negl.pdf> Acesso em: 10 nov.13.

GRIGNON, S.; CHIANETTA, J. M. Assessment of malondialdehyde levels in schizophrenia: A meta-analysis and some methodological considerations. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 31, p. 365-369, 2007.

GROTTO, D.; VALENTINI, J.; BOEIRA, S.; PANIZ, C.; MARIA, L. S.; VICENTINI, J.; MORO, A.; CHARÃO, M.; GARCIA, S. C.; & CARDOSO, S. G. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo: malondialdeído. **Quím. Nova**, v. 31, n. 2, p. 275-270, 2008.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=1>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

_____ - Instituto Nacional do Câncer. Leucemia Aguda. Disponível em <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344>. Acesso em 18 nov. 2013.

_____ - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226/Apresentacao+Estimativa+2014_final+corrigido+tireoide.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226>. Acesso em: 15 jan. 2014.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biol. Med.**, v.9, n.6, p.515-540, 1990.

KARATAS, F.; KARATEPE, M.; BAYSAR, A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.311, p.76-79, 2002.

KARATEPE, M. Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Free Malondialdehyde in Human Serum by HPLC–UV. **LCGC Asia Pac.**, v.7, n. 2, p.36-38, 2004.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, n.1, p. 239-267, 2004.

KOCYIGIT, A.; KELES, H.; SELEK, S.; GUZEL, S.; CELIK, H.; EREL, C. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. **Mutat. Res.**, v. 585, n.1, p. 71-78, 2005.

KUNO, R.; ROQUETTI, M. H.; GOUVEIA, N. Conceitos e derivação de valores de referência para biomonitorização humana de contaminantes ambientais. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 27, n. 1, p. 74-79, 2010.

LEMOS, J. D. **Leucemia linfóide aguda: avanços no diagnóstico.** Monografia (Especialização em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial), Centro de Consultoria Educacional, Universidade Paulista, Recife, 2013.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **Braz. J. Pharm. Sci**, v.37, n.3, p. 293-303, 2001.

LOWENBERG, B. Prognostic factors in acute myeloid leukemia. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 14, n. 1, p. 65-75, 2001.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Quim. Nova**, v.33, n.7, p.1559-1568, 2010.

MAO, J., ZHANG, H., LUO, J., LI, L., ZHAO, R., ZHANG, R., LIU, G. New method for HPLC separation and fluorescence detection of malonaldehyde in normal human plasma. **J. Chromatogr. B.**, v.832, p.103-108, 2006.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. **Mutat. Res.**, v.424, p. 83-95, 1999.

MATEOS, R., LECUMBERRI, E., RAMOS, S., GOYA, L., BRAVO, L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. **J. Chromatogr. B.**, v.827, p.76-82, 2005.

MONTEIRO, V. C. B. **Avaliação do estresse oxidativo em humanos e animais suplementados com ácidos graxos poliinsaturados Omega-3.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MOREIRA, A. M. **Obtenção de lactonas sesquiterpênicas do gênero *Tanacetum parthenium*.** Relatório (Projeto de iniciação científica vinculado ao PIBIC/CNPq- Fundação Araucária -UEM.), Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, 2011.

NOBILI, S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacol. Res.**, v.59, n.1, p. 365-378, 2009.

PERIM, A. L.; LOSI-GUEMBAROVSKI, R.; ODA, J. M. M.; LOPES, L. F.; ARIZA, C. B.; AMARANTE, M. K.; FUNGARO, M. H. P.; WATANABE, M. A. E. CXCL12 and TP53 genetic polymorphisms as markers of susceptibility in a Brazilian children population with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). **Mol. Biol. Rep.**, v. 40, n.1, p. 1-7, 2013.

PONTE, C. M. M.; GURGEL, M. H. C.; PONTE, G. A.; RAMOS, A. V. A.; MONTENEGRO, R. M. Distúrbios metabólicos em doenças infecciosas emergentes e negligenciadas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n. 9, p. 785-792, 2010.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quím. Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RODRIGUES, K. E., CAMARGO, B. Diagnóstico precoce do câncer infantil: responsabilidade de todos. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.49, n.1, p.29-34, 2003.

STATSOFT, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), versão 8.0.

SCHEEL, P. C. **Determinação do malondialdeído (MDA) com o agente derivatizante 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) por HPLC-PDA em pacientes leucêmicos.** Trabalho de Conclusão de Curso em Química, Universidade Estadual de Londrina, 2011.

SEN, G.; MANDALB, S.; ROYA, S. S.; MUKHOPADHYAYB, T. B. Therapeutic use of quercetin in the control of infection and anemia associated with visceral leishmaniasis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, n.1, p.1257-1264, 2005.

SILVA, B. P. **Lactonas sesquiterpênicas do *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip e avaliação da atividade antileishmania.** Dissertação de Mestrado de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, 2008.

SILVA, B.P.; CORTEZ, D. A.; VIOLIN, T. Y.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U.; FERREIRA, I. C. P. Antileishmanial activity of a guaianolide from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. **Parasitol. Int.**, v.59, n. 4, p.643-646, 2010.

SOKIĆ, Z. B.; KNEZEVIĆ J.; VRVIĆ, M. M. Inulin--potential prebiotic. **Med. Pregl.**, v. 62, n. 3-4, p. 153-6, 2009.

STEGHENS, J-P., KAPPEL, A. L. V., DENIS, I. COLLOMBEL, C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radic. Biol. Med.**, v.31, n.2, p.242-249, 2001.

TEACHEY, D. T.; HUNGER, S. P. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Br J Haematol.**, v. 162, n. 5, p. 606-20, 2013.

TIUMAN, T.S.; NAKAMURA, T.U.; CORTEZ, D.A.G.; FILHO, B.P.D.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; SOUZA,W.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.49, n.1, p.176-182, 2005.

TORUN, M.; YARDIM, S.; GÖNENÇ, A. SARGIN, H.; MENEVSE, A.; SIMSEK, B. Serum b-carotene, vitamin E, vitamin C and malondialdehyde levels in several types of cancer. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v. 20, n. 1, p. 259-263, 1995.

TÜKÖZKAN, N.; ERDAMAR, H.; SEVEN, I. Measurement of total malondialdehyde in plasma and tissues by high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid assay. **Firat Tıp Dergisi**, v.11, n.2, p.88-92, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, M. S.; MANFREDINI, V.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

WASOWICZ, W.; NÈVE, J.; PERETZ, A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. **Clin. Chem.**, v.39, n. 12, p.2522-2526, 1993.

WEN, J.; YOU, K. R.; LEE, S. Y.; SONG, C .H.; KIM, D. G. Oxidative Stress-mediated Apoptosis: The anticancer effect of the sesquiterpene lactone

parthenolide. **Journal of Biological Chemistry**. v. 277, Issue 41, p. 38954-38964, 2002.

YAGI, K.A. Simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochem. Med.**, v.15, p.212-216, 1976.

ANEXO 1

Tabela 1. Valores de MDA dos pacientes estudados no Capítulo 5

Pacientes com LLA		Crianças Controle	
Código	MDA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Código	MDA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
L 101	3,67±0,05	CC 61	1,05±0,04
L 103	2,10±0,01	CC 62	0,88±0,04
L 104	2,37±0,02	CC 63	0,76±0,16
L 105	1,45±0,06	CC 64	0,60±0,16
L 106	2,52±0,06	CC 65	0,80±0,25
L 109	3,24±0,27	CC 66	0,88±0,02
L 110	1,93±0,18	CC 68	1,01±0,09
L 112	2,59±0,21	CC 69	0,93±0,05
L 113	2,11±0,17	CC 71	0,58±0,03
L 114	3,53±0,06	CC 72	1,20±0,09
L 116	2,01±0,31	CC 73	0,92±0,04
L 117	3,30±0,06	CC 75	0,75±0,01
L 118	2,01±0,06	CC 78	1,20±0,08
L 120	2,61±0,25	CC 79	1,13±0,05
L 121	2,48±0,01	CC 80	0,80±0,03
L 122	2,68±0,03	CC 81	1,08±0,11
L 123	1,61±0,02	CC 82	0,87±0,25
L 125	2,75±0,13	CC 84	0,84±0,12
L 126	1,59±0,01		
L 127	2,25±0,12		
L 128	2,81±0,09		
L 130	2,32±0,13		
L 133	1,28±0,10		
L 134	1,14±0,01		
L 135	1,63±0,13		
L 136	0,97±0,11		
L 138	1,17±0,13		
L 139	1,19±0,042		
Média ± DP	2,15±0,77	Média ± DP	0,95±0,2