

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

MARCUS VINÍCIUS GUIMARÃES DE LACERDA

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOGÊNESE DA
PLAQUETOPENIA NA MALÁRIA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical (Área de Concentração - Clínica das Doenças Infecciosas e Parasitárias)

Orientadores:

Profa. Dra. Vanize de Oliveira Macêdo†
Prof. Dr. João Barberino Santos

Brasília

2007

Lacerda, Marcus Vinícius Guimarães

Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária / Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda. Brasília: UnB/NMT, 2007.
xliv, 395 f. : il.; 30 cm.

Orientadores: Profa. Vanize de Oliveira Macêdo e Prof. João Barberino Santos
Tese (doutorado) – Universidade de Brasília / Núcleo de Medicina Tropical /
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2007.

Referências bibliográficas: f. 293-344

1. Malária 2. Plasmodium 3. Plaquetas 4. Hematologia 5. Imunologia 6.
Medicina Tropical 7. Doenças Infecciosas 8. Patologia 9. Parasitologia I. Macêdo,
Vanize de Oliveira. II. Santos, João Barberino. III. Universidade de Brasília, Núcleo de
Medicina Tropical. IV. Título

CDU 616.936

Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda

Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária
(Tese de Doutorado)

Universidade de Brasília

Medicina Tropical (Clínica das Doenças Infecciosas e Parasitárias)

Data da defesa da tese

08 de março de 2007

Banca examinadora

(em ordem alfabética)

Claúdio Tadeu Daniel Ribeiro (Pós-Doutor)

Fundação Oswaldo Cruz

João Barberino Santos (Doutor)

Universidade de Brasília

Maria das Graças Costa Alecrim (Doutora)

Universidade do Estado do Amazonas

Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira (Doutora)

Universidade de Brasília

Pedro Luiz Tauil (Doutor)

Universidade de Brasília

(Suplente)

Vagner de Castro (Pós-Doutor)

Universidade Estadual de Campinas

PREFÁCIO

Ainda como médico residente em Infectologia, em 2000, chamou-me a atenção a grande quantidade de pacientes com malária internados por causa de plaquetopenia, em Manaus. Em relação a este problema, pouco ou nada se fazia pelos doentes, que recebiam alta hospitalar alguns dias depois, com plaquetimetria invariavelmente normal, sem sangramento de grande volume. Seguiu-se o brocardo de abundans cautela non nocet (cautela excessiva não prejudica).

No mesmo ano, a Profa. Graça Alecrim defendeu sua tese de doutorado, na Universidade de Brasília, mostrando que a plaquetopenia era um evento freqüente nos pacientes com malária vivax, infecção tida como benigna, desde a Antigüidade. A observação carecia de maior detalhamento e assim, sob a supervisão da Profa. Graça Alecrim e do Prof. Wilson Alecrim, recebi como desafio a tarefa de esclarecer os aspectos clínicos e patogênicos desta complicação.

A Profa. Vanize Macêdo, sempre visionária, entendeu que o assunto justificava minha tese de doutoramento. As primeiras discussões aconteceram, portanto, sob o olhar crítico dos professores do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília, que contribuíram sobremaneira para o amadurecimento metodológico do estudo.

Foram muitas as dificuldades para estabelecer a colaboração com os hematologistas, o que só foi possível com a ajuda do Prof. Victor Nussenzweig, da Universidade de Nova York, que conversou comigo em Atlanta, em 2001, sobre o amigo hematologista Simon Karpatkin. O Dr. Karpatkin e seu grupo haviam publicado, em 1982, as primeiras observações de púrpura trombocitopênica idiopática em pacientes infectados por HIV-1. Desde então, demonstrando sua persistência e tirocínio, descobriram, de forma elegante, que a doença era causada pela presença de auto-anticorpos plaquetários. Em 2005, mais de 20 anos depois, como que concluindo o objetivo perseguido, o mesmo grupo descreveu a mímica

molecular entre antígenos do vírus e um receptor glicoprotéico plaquetário (GP130⁴⁹⁻⁶⁶).

Durante a visita que fiz ao Hospital Tisch, no Centro Médico da Universidade de Nova York, em 2002, foram estabelecidas com o Dr. Karpatkin as principais lacunas do conhecimento na plaquetopenia da malária. Reconheceu-se a necessidade de um estudo epidemiológico mais robusto e a possibilidade de investigar um mecanismo patogênico semelhante ao da púrpura trombocitopênica do HIV. As discussões renderam, mais tarde, a seleção para o Programa de Estagiário Visitante (Visiting Trainee Program), de 2004, financiado pela Sociedade Americana de Hematologia (American Society of Hematology).

A equipe da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas abriu as portas de seus laboratórios e permitiu que nosso trabalho pudesse ser desenvolvido em um dos maiores centros latino-americanos de pesquisa clínica em Medicina Tropical.

Ao longo do estudo, as discussões sobre plaquetas incentivaram também trabalhos com outras doenças infecciosas. Durante o XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, em Florianópolis, em 2005, na mesa-redonda de Doenças infecto-parasitárias emergentes e re-emergentes, foi lançada a proposta de uma nova área do conhecimento, a Plaquetologia Tropical, como uma forma de apelo à realização de mais estudos com doenças tropicais que cursam com plaquetopenia, cuja etiologia, manifestações clínicas e formas de tratamento são pouco conhecidas.

Na tese ora apresentada à comunidade científica, permitimo-nos discutir alguns conceitos importantes no campo da Malariologia, da Hematologia e da Imunologia, motivo pelo qual se observa uma Introdução hipertrofiada. Os itens 1.1, 1.2 e 1.3 descrevem, resumidamente, os principais aspectos do ciclo biológico do plasmódio, da epidemiologia da malária e das manifestações clínicas desta importante doença tropical. Para os estudiosos do assunto, recomenda-se iniciar a leitura da tese a partir do item 1.4. Os itens 1.4 e 1.5 tratam de descrever as plaquetas, muitas vezes reconhecidas apenas por suas propriedades hemostáticas, e as principais doenças infecciosas em que a plaquetopenia é freqüentemente observada. O item 1.6, finalmente, discorre sobre o estado-da-arte acerca da

plaquetopenia da malária e as principais hipóteses e evidências de sua patogênese, o que será discutido em maior profundidade na Discussão do trabalho.

Nos Métodos, a anexação de Procedimentos Operacionais Padrão (POP) certamente garantirá a reprodutibilidade dos dados, por outros pesquisadores que queiram se aventurar no estudo das plaquetas.

Que o produto desta tese seja mais um passo para a compreensão da partícula de Bizzozero e sua interface com o sistema imunitário.

Apesar de sua desencarnação em 1º de abril de 2006, a Prof. Vanize Macêdo continuou viva durante a redação deste trabalho, redirecionando as idéias com sua habitual incisividade.

Taguatinga

Verão de 2007



À Profa. Vanize de Oliveira Macêdo, por todas as lições de persistência e pragmatismo que ensinou a um grupo de jovens médicos, movida pelo amor à Medicina Tropical.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de pesquisa é fruto do esforço coletivo das pessoas e das instituições que nos cercam. A essas pessoas, expresso meus agradecimentos mais profundos, para que se sintam co-autoras desta pequena contribuição ao estudo da malária.

Umberto Eco diz que "é de mau gosto agradecer demasiado ao orientador, já que se o ajudou, fê-lo, em parte, por obrigação". Aos meus orientadores, Profa. Vanize de Oliveira Macêdo e Prof. João Barberino Santos, agradeço por não terem se sentido obrigados a me orientar, e por me emocionarem com seu caráter. Ao Prof. Barberino agradeço os valiosos comentários e correções. Repito a observação de Carlos Chagas, em sua tese inaugural: "Do que houver neste trabalho de aproveitável, cabem as honras ao mestre que o orientou; foram dele recebidas as verdades que aqui trazemos. Pelos desacertos nele contidos, é responsável único o autor".

À Profa. Maria das Graças Costa Alecrim e ao Prof. Wilson Duarte Alecrim, por terem-me transformado em um médico comprometido com o homem que vive entre os trópicos. Aos dois agradeço pela escolha do tema desta tese, o que os torna os verdadeiros idealizadores da Plaquetologia Tropical.

Aos fundadores das instituições que me são mais caras. Ao Prof. Darcy Ribeiro, pela criação da Universidade de Brasília (UnB), ao Prof. Aluizio da Rosa Prata, pela criação do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) e ao Prof. Heitor Vieira Dourado e Prof. Carlos Augusto Telles de Borborema, pela criação da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), lugar que escolhi para viver minha profissão.

Ao Dr. Agostinho Cruz Marques, por ter recebido em sua sala, na sede da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), em Brasília, no ano de 1995, um jovem aluno de Medicina, em busca de dados para seu trabalho sobre Malária, na Disciplina de Parasitologia. Foi a minha primeira impressão de um malariologista.

Aos pacientes de malária, que maciçamente contribuíram para a realização desta tese, acreditando que ele minimizaria, de alguma maneira, o seu sofrimento.

À memória de Gesildo Pinheiro de Lacerda, porque nenhum homem pode viver sem a lembrança de um pai. À minha mãe, Regina de Fátima Guimarães Lacerda, de quem herdei o capricho, a organização e a certeza de que tudo sempre vai dar certo.

À memória do Dr. João Felix Cunha, tio que me ensinou a cuidar dos pobres, como forma de dignificar o ser humano e o próprio médico.

À memória do Prof. Philip (Felipe) Davis Marsden, pela inspiração post mortem, por me ensinar, alguns milênios mais tarde, o que Hipócrates já havia mencionado: que a Medicina é arte pura.

Ao meu querido filho, Felipe (Philip) Mourão de Lacerda, para que possa pesquisar, no futuro, os fatores determinantes do amor entre os homens. Que esta tese sobre malária seja para ele apenas uma referência ultrapassada de uma doença erradicada.

À minha esposa, Maria Paula Gomes Mourão, pelo amor incondicional e pela pesquisadora tenaz em que se transformou, ao longo dos últimos anos. Agradeço as valiosas contribuições intelectuais e braçais para esta tese, e por estar sempre ao meu lado nos momentos de desesperança. Se eu não te amasse tanto assim, talvez perdesse os sonhos dentro de mim, e vivesse na escuridão.

Aos meus estimados alunos de iniciação científica Torben Cavalcante Bezerra, Adelmir Chagas da Silva, William Su, Rafael Lopes Gurgel, Lucas Inoue Coutinho, Alciane de Aguiar Prado, Dácia Sarina Parente Maia, Laila Cristina Alves Rojas, Dênisson Pontes e Wilson Marques Ramos Júnior, que desenvolveram

experimentos fundamentais da tese e se apaixonaram também pelas plaquetas. Ao Programa de Apoio à Iniciação Científica (PAIC) da FMT-AM, pelo apoio financeiro.

A todos os técnicos da Gerência de Malária, pela ajuda e pela sabedoria. A Jubal de Gonzaga Simões e a José Eckner Alves Lessa, pela revisão das gotas espessas de sangue e contagem da parasitemia. A Raimunda Ericilda de Araújo, minha infalível técnica, por ter coletado as amostras de sangue dos pacientes e ter compartilhado comigo o sonho da criação do Laboratório de Plaquetologia.

À Gerente de Malária da FMT-AM, Mônica Regina Farias Costa Manso, pelo apoio integral ao projeto. A Yonne Francis Chehuan Melo, por fornecer os parasitos em cultura, do Laboratório de Cultivo In vitro da Gerência de Malária. A Eva Batista da Silva Carvalho, pela ajuda com a dosagem de proteínas. Ao Dr. Pedro Paulo Ribeiro Vieira e a Cynthia de Oliveira Ferreira, pela realização dos exames de PCR, no Laboratório de Biologia Molecular da Gerência de Malária. Um especial agradecimento aos secretários da Gerência de Malária, Rosemary Viana dos Santos e Eckner da Silva Falcão, pela ajuda e compreensão, nos momentos mais difíceis do dia-a-dia.

Ao Gerente de Virologia da FMT-AM, Dr. Wornei Silva Miranda Braga, e ao amigo de todas as horas, João Bosco de Lima Gimaque, pela realização dos exames sorológicos para hepatites e dengue.

Ao Gerente do Laboratório de Análises Clínicas da FMT-AM, José Felipe Jardim Sardinha, e a todos os seus funcionários, em especial a Luciana, pela realização dos exames de hematologia e bioquímica do sangue, muitas vezes em horários inapropriados.

À equipe do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública (DESP) da FMT-AM, em especial à Maria das Graças Gomes Saraiva e ao Raul Diniz Souza Amorim, pelos dados epidemiológicos, sem os quais não poderíamos ter planejado ou concluído qualquer coisa.

A Marlise Souza Santana e a todos os funcionários do Núcleo de Arquivo Médico e Estatística (NAME) da FMT-AM, pelos dados de internação fornecidos e pelo zelo com os prontuários dos pacientes do projeto.

A Enf. Maria Almada da Silva e ao Dr. Antônio de Matos Tavares, diretor da Diretoria de Assistência Médica (DAM), por terem organizado a enfermaria de seguimento dos pacientes com malária, durante o período do estudo.

A Patrícia Dantas Santos-Ciminera, pela facilidade de acesso às referências bibliográficas.

Ao Coordenador da Pós-Graduação em Medicina Tropical da UnB, Dr. Cleudson Nery de Castro e a toda equipe do NMT, em especial a Regina Borges Pacheco e a Leandro Mendes Nascimento. Aos amigos da pós-graduação, pela amizade. Aos professores da pós-graduação, pela solidez dos conhecimentos adquiridos.

Ao Dr. José Carlos Ferraz da Fonseca e ao Dr. Marcus Luiz Barroso Barros, pela liberação remunerada de minhas atividades na FMT-AM, durante todo o ano de 2003.

À Diretoria da FMT-AM, nomeadamente o Dr. Sinésio Talhari, Dr. Tancredo Castro Soares e Dr. Silas Guedes de Oliveira, pela construção do Laboratório de Plaquetologia, compra do freezer para armazenamento das amostras e do agregômetro de plaquetas, além da liberação remunerada de minhas atividades de pesquisa e assistenciais, durante a fase de redação da tese.

À equipe da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), nomeadamente o Dr. Emerson Silva Lima e o Cláudio Fernandez Araújo, pela ajuda na padronização da agregação plaquetária.

Ao Prof. Marcus Vinitius de Farias Guerra, diretor da Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), pela liberação remunerada de minhas atividades docentes, durante a fase de redação da tese.

Ao Dr. Ricardo Ernesto Machado, da UNINILTON LINS, pela paciência em ter-me treinado para a realização da ultra-sonografia de abdome superior.

Aos participantes do IX Seminário Laveran & Deane sobre malária, de 2004, e seu idealizador, o Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro, da Fundação Oswaldo Cruz

(FIOCRUZ), pelas valiosas contribuições ao projeto de tese incipiente, e pela intensa parceria que se seguiu.

Aos participantes do II Seminário de Anemia e Outras Complicações da Malária, realizado em Cali (Colômbia), em 2004, e a seus organizadores, o Dr. Sócrates Herrera e a Dra. Myriam Arévalo-Herrera, do Instituto de Inmunología del Valle, pela amizade e pela doação dos esporozoítos de P. vivax.

À Dra. Ann Stewart e ao Dr. Donald Skillman, do Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), em Silver Spring (EUA), pela doação dos Unopettes® para a contagem de plaquetas em camundongos, pela ajuda com o transporte de reagentes, e pelo aperfeiçoamento de minhas habilidades lingüísticas anglo-saxãs.

Aos amigos que ajudaram na tradução dos resumos para línguas estrangeiras: Donald Skillman, Hernando del Portillo, Hélène Laperrière, Anne Herholz, Behruz Foroutan e Arantxa Viudes.

À Sociedade Americana de Hematologia (American Society of Hematology - ASH), que financiou o meu estágio na Divisão de Hematologia da Universidade de Nova York (NYU), sob a orientação do Dr. Simon Karpatkin e do Dr. Michael Nardi, e da Dra. Theresa Coetzer, do South African Institute for Medical Research. Agradeço ao Dr. Victor Nussenzweig pela apresentação ao grupo do Dr. Karpatkin, e pela discussão de algumas idéias. A Bette Pancake e Carol Burns, pela hospitalidade durante o inverno nova-iorquino. Agradeço também à safra de vinhos da Califórnia, de 2004, por me manter aquecido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao Dr. Hernando Antonio del Portillo, Márcio Masao Yamamoto e Ariane Machado Lima, da Universidade de São Paulo (USP), pela parceria sólida, pelas discussões sobre o baço e pelo seqüenciamento dos genes vir de P. vivax e análise dos dendogramas.

À Profa. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, por ter-me ensinado um dia a pipetar e fagocitar.

Aos amigos Carlos Eduardo Tosta, Pedro Luiz Tauil, Cor Jesus Fernandes Fontes, Antoniana Ursine Krettlí, Antônio Rafael da Silva, Mariano Gustavo Zalis e Bernardino Cláudio Albuquerque, pelas discussões sobre a doença e o parasito, que me fizeram refletir sobre o desenho experimental do projeto de tese.

Aos meus alunos de graduação em Medicina da UEA e da UNINILTON LINS, por terem me dado humildade de aprender para poder ensinar, e por terem compreendido minhas ausências justificadas.

Ao amigo Marcelo Cordeiro dos Santos, por cumprir parte de minhas atividades docentes, durante a minha ausência.

Aos meus queridos avós, Tita (Maria Alves Guimarães) e Dedê (José Guimarães Sobrinho), que se lembravam da malária ainda como maleita, no interior de Minas Gerais, nos tempos remotos, mas mesmo assim nos acolheram em sua casa e nos proporcionaram dias de muita tranquilidade e café.

A todos os que cuidaram do nosso filho quando dava seus primeiros passos, durante a fase de redação da tese: Maria José de Farias Colares, Mara Regina Colares da Costa, Ana Maria Mourão de Carvalho, Regianni Coeli Guimarães de Lacerda, Ana Beatriz Guimarães Machado, Gustavo Machado, Maria de Fátima Barbosa Cunha, Regis Geraldo Guimarães e Márcia Oliveira.

“Também desejo salientar que não é fácil aos profissionais da Medicina no Amazonas grande safra de estudo, porque trabalham demasiadamente, numa terra em que há muita doença, poucos proventos e um alto custo de vida. E o clima – perdoe-me o mestre Afrânio Peixoto – o clima desajuda... Aos bochornos de um meio-dia ou de uma noitinha, não há esforço que vença a apatia em face aos mais belos capítulos da Medicina... Acresce que os livros, em razão da distância e da pobreza, se tornam quase inacessíveis”.

Djalma Batista. *O paludismo na Amazônia*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; **1946**.

"De três maneiras se adquire a sabedoria: a primeira é pela reflexão, que é a mais nobre; a segunda, pela imitação, que é a mais simples; e a terceira é pela experiência, que é a mais amarga".

Confúcio (551-479 a.C.)

“Da minha aldeia vejo quanto da terra se pode ver do universo...
Por isso a minha aldeia é tão grande como outra terra qualquer,
Porque eu sou do tamanho do que vejo
E não do tamanho da minha altura...”

Fernando Pessoa (Alberto Caeiro), *O guardador de rebanhos*, **1925**

RESUMO

A plaquetopenia é uma reconhecida complicação hematológica da infecção malárica, porém, sua patogênese ainda é incerta. Os objetivos deste trabalho foram estimar a frequência e as manifestações clínicas da plaquetopenia na malária, e avaliar o papel dos imunocomplexos circulantes (ICC) e da agregação plaquetária *in vitro*. O estudo foi realizado em Manaus (Amazonas), entre 2004 e 2006, com seleção aleatória de pacientes com diagnóstico microscópico e molecular de malária vivax (n=142) e malária falciparum (n=26), após exclusão de pacientes com outras doenças. Foram analisadas as características dos pacientes, além da parasitemia, hemograma, exames bioquímicos do sangue e testes de coagulação. Os ICC foram dosados (n=48) e após a eluição da IgG dos ICC, em pacientes com plaquetopenia grave, verificou-se sua capacidade de ligação *in vitro* a plaquetas normais (n=2), e sua capacidade de destruição plaquetária *in vivo*, após injeção intraperitoneal em camundongo C57BL/6 sadio (n=1). Plaquetas incubadas com ICC de pacientes com malária e plaquetopenia foram submetidas à fagocitose por células THP-1 (n=3). Avaliou-se também a agregação de plaquetas normais, na presença de lisado de hemácias parasitadas por *P. vivax* e por *P. falciparum*, e de esporozoítos lisados de *P. vivax*. Nos pacientes com malária vivax complicada, realizou-se o seqüenciamento das subfamílias dos genes *vir*. Observou-se plaquetopenia (plaquetas < 150.000/ μ L) em 70,8% dos pacientes (IC_{95%} 66,7-74,9%). A plaquetopenia grave (plaquetas < 50.000/ μ L) foi encontrada em 8,9% (IC_{95%} 4,6-13,2%), sendo que em 26,6% desses pacientes se observaram sangramentos leves. Todos os pacientes com formas complicadas de malária falciparum (n=3) ou malária vivax (n=2) apresentavam plaquetopenia grave. Não se detectou diferença entre média ou frequência de plaquetopenia entre os pacientes com malária vivax (119,8 x 1000/ μ L; 71,8%) ou com malária falciparum (122,6 x 1000/ μ L; 65,4%). As variáveis que estiveram associadas à plaquetopenia, de forma independente, foram o gênero masculino, a primoinfecção e a alta parasitemia. O sangramento esteve associado à malária grave. Identificou-se correlação inversa entre plaquetimetria e o volume plaquetário médio, na malária vivax (r=-0,527; p<0,01), entretanto, não houve

associação entre plaquetimetria e ICC ($r=-0,148$; $p=0,355$). Não se detectou a ligação *in vitro* de IgG (ICC) a plaquetas normais, e não houve queda na contagem de plaquetas do camundongo, após injeção de IgG (ICC). A incubação de plaquetas normais com ICC inibiu sua fagocitose *in vitro*. Verificou-se intensa agregação de plaquetas normais, na presença de lisado de *P. vivax* e de *P. falciparum*. Não se identificou qualquer polimorfismo dos genes *vir* nos parasitos isolados das formas complicadas de malária vivax. Conclui-se que a plaquetopenia é uma complicação freqüente na malária, com pouca repercussão clínica, mesmo entre pacientes com plaquetopenia grave, o que pode ser explicado pela liberação de megaplaquetas compensatórias, pelos megacariócitos, e pela maior ativação das plaquetas por formas sangüíneas de *Plasmodium* spp. A associação de alta parasitemia e de primoinfecção com a plaquetopenia sugere que a patogênese desta complicação é multifatorial. Os ICC parecem não contribuir para a queda da contagem de plaquetas na malária, e não se demonstrou a presença de auto-anticorpos plaquetários nos casos estudados.

Palavras-chaves: Malária. *Plasmodium*. Plaquetas. Imunologia. Hematologia. Medicina Tropical.

ABSTRACT

Thrombocytopenia is a well-known hematological complication of malaria, although its pathogenesis is still unclear. The objectives of the present work were to estimate the frequency and the clinical manifestations of thrombocytopenia in malaria, and to investigate a possible role for the circulating immune complexes (CIC) and of platelet aggregation *in vitro* in the generation of thrombocytopenia. The work was carried out in Manaus (Amazonas) from 2004 to 2006, by randomly selecting patients with a microscopic and molecular diagnosis of *P. vivax* malaria (n=142) and *P. falciparum* malaria (n=26), after excluding patients with other diseases. Individual and clinical features of the patients were studied, including the degree of parasitemia, blood cell counts, biochemical parameters, and coagulation indices. The CIC were quantified (n=48), and after IgG was eluted from the CIC of patients with severe thrombocytopenia. The *in vitro* effects of IgG binding to normal platelets *in vitro* (n=2), as well as *in vivo*, following intraperitoneal injection in a C57BL/6 healthy mouse (n=1) were assessed. Platelets incubated with CIC from patients with malaria and thrombocytopenia were examined for phagocytosis by THP-1 cells (n=3). Aggregation of normal platelets in the presence of lysates of blood stages of *P. vivax* and *P. falciparum*, and *P. vivax* sporozoite lysates was also noted. In the patients with complicated vivax malaria, subfamilies of *vir* genes were sequenced. Thrombocytopenia (platelets<150,000/ μ L) was found in 70.8% of the patients (IC_{95%} 66.7-74.9%). Severe thrombocytopenia (platelets<50,000/ μ L) was found in 8.9% (IC_{95%} 4.6-13.2%), and in 26.6% of these patients mild bleeding was seen. All of the patients with complicated falciparum malaria (n=3) or vivax malaria (n=2) presented severe thrombocytopenia. There was no difference between the median platelet count or frequency of thrombocytopenia in the patients with vivax (119.8 x 1000/ μ L; 71.8%) or falciparum malaria (122.6 x 1000/ μ L; 65.4%). Independent variables which were associated with thrombocytopenia included male gender, primary infection, and high parasitemia. The bleeding was associated with severe malaria. An inverse relationship between platelet count and median platelet volume for vivax malaria was identified (r= -0.527, p<0.01). Overall, there was no

association between platelet count and CIC ($r = -0.148$; $p = 0.355$). *In vitro* binding of IgG (CIC) to normal platelets was not detected, and there was no platelet destruction in the mouse after injection of IgG (CIC). Incubation of normal platelets with CIC inhibited their phagocytosis. Intense aggregation of normal platelets in the presence of lysates of *P. vivax* and *P. falciparum* was seen. No polymorphisms of the *vir* genes were identified in the parasites isolated from patients with severe vivax malaria. Taken together, data reported here show that thrombocytopenia is a frequent complication of malaria, with few clinical consequences, even in patients with severe thrombocytopenia. This could be explained by the release of large platelets from megakaryocytes, and the prominent activation of platelets by blood forms of *Plasmodium* spp. The association of high parasitemia and primary infection with thrombocytopenia suggests a multifactorial pathogenesis for this complication. The CIC do not appear to contribute to the decreased platelet counts seen in malaria, and auto-antibodies against platelets were not detected in the cases studied.

Key-words: Malaria. *Plasmodium*. Platelets. Immunology. Hematology. Tropical Medicine.

RESÚMEN

La plaquetopenia es una complicación hematológica reconocida en malaria aunque su patogénesis es todavía incierta. Los objetivos de este trabajo fueron estimar la frecuencia y las manifestaciones clínicas de la plaquetopenia en malaria, así como el de evaluar el papel de los inmunocomplejos circulantes (ICC) y de la agregación plaquetaria *in vitro*. El estudio fue realizado en Manaus (Amazonas), entre 2004 y 2006, a través de la selección aleatoria de pacientes diagnosticados por microscopia y PCR de malaria vivax (n=142), malaria falciparum (n=26), y excluyendo los pacientes con otras enfermedades. Fueron analizados los aspectos individuales y clínicos de los pacientes además de la parasitemia, hemograma, examen bioquímico de sangre y pruebas de coagulación. Los ICC fueron dosificados (n=48) y después de la elución de IgG de los ICC de pacientes con plaquetopenia grave se verificó su capacidad de ligación *in vitro* a plaquetas normales (n=2), y de su capacidad de destrucción plaquetaria *in vivo* después de la inyección intraperitoneal en ratón C57BL/6 sano (n=1). Las plaquetas incubadas con ICC de pacientes con malaria y plaquetopenia fueron sometidas a fagocitosis por células THP-1 (n=3). Se evaluó también la agregación de plaquetas normales en la presencia de un lisado de glóbulos rojos parasitados por *P. vivax* y *P. falciparum*, así como de esporozoitos lisados de *P. vivax*. En los pacientes con malaria vivax complicada, se realizó el secuenciamiento de las subfamilias de los genes variantes, *vir*. Se observó plaquetopenia (plaquetas < 150.000/ μ L) en 70,8% de los pacientes (IC_{95%} 66,7-74,9%). La plaquetopenia grave (plaquetas < 50.000/ μ L) fue detectada en 8,9% (IC_{95%} 4,6-13,2%), siendo que en 26,6% de esos pacientes se observaron sangramientos leves. Todos los pacientes con formas complicadas de malaria falciparum (n=3) o malaria vivax (n=2) presentaron plaquetopenia grave. No se detectó diferencia entre media o frecuencia de plaquetopenia en los pacientes con malaria vivax (119,8 x 1000/ μ L; 71,8%) y malaria falciparum (122,6 x 1000/ μ L; 65,4%). Las variables que estuvieron asociadas a plaquetopenia, de forma independiente, fueron el género masculino, la primo-infección y la alta parasitemia. El sangrado estuvo asociado a malaria severa. Se identificó correlación inversa entre

plaquetimetria y el volumen plaquetario medio, en la malaria vivax ($r=-0,527$; $p<0,01$); sin embargo, no hubo asociación entre plaquetimetria y ICC ($r=-0,148$; $p=0,355$). No se detectó la ligación *in vitro* de IgG (ICC) a plaquetas normales y no hubo queda en el conteo de plaquetas del ratón después de la inyección de IgG (ICC). La incubación de plaquetas normales con ICC inhibió su fagocitosis *in vitro*. Se verificó intensa agregación de plaquetas normales en la presencia de lisados de *P. vivax* y *P. falciparum*. No se identificaron secuencias *vir* subfamilia-especifica de parásitos obtenidos de pacientes con malaria vivax complicada. Se concluye que la plaquetopenia es una complicación frecuente en malaria, con poca repercusión clínica, incluso entre pacientes con plaquetopenia grave, lo que puede ser explicado por la liberación de megaplaquetas, por los megacariocitos y por la mayor activación de plaquetas por formas sanguíneas de *Plasmodium* spp. La asociación de la alta parasitemia y de la primo-infección con la plaquetopenia sugiere que la patogénesis de esta complicación es multifactorial. No parece que los ICC contribuyan para la disminución de plaquetas en malaria y no se demostró la presencia de auto-anticuerpos plaquetarios en los casos estudiados.

Palabras-claves: Malaria. *Plasmodium*. Plaquetas. Inmunología. Hematología. Medicina Tropical.

RÉSUMÉ

La thrombopénie est une complication hématologique reconnue de l'infection palustre, dont la pathogenèse est, toutefois, encore incertaine. Les objectifs de ce travail ont été estimer la fréquence et les manifestations cliniques de la thrombopénie dans le paludisme et d'évaluer le rôle des complexes immunes circulantes (CIC) et l'aggrégation plaquettaire *in vitro*. L'étude a été réalisée à Manaus (Amazonas), entre 2004 et 2006, avec une sélection aléatoire de patients ayant un diagnostic microscopique et moléculaire de paludisme à *P. vivax* (n=142) et à *P. falciparum* (n=26), après exclusion des patientes ayant d'autres pathologies. En plus de la parasitémie, l'hémogramme, examens biochimiques du sang et les tests de coagulation, les aspects individuels et cliniques des patients furent également analysés. Les CIC furent dosés (n=48) et, après l'éluion de l'IgG des CIC sur les patients avec thrombopénie grave, leur capacité de liaison *in vitro* avec des plaquettes normales (n=2) fut vérifiée et leur capacité de destruction plaquettaire *in vivo*, après injection intra-péritonéale sur une souris C57BL/6 saine (n=1). Les plaquettes incubées avec CIC provenant des patients avec paludisme et thrombopénie furent soumises à la phagocytose par cellules THP-1 (n=3). L'aggrégation de plaquettes normales fut également évaluée, en présence du lysé d'hématies parasitées par *P. vivax* et *P. falciparum*, et des sporozoaires lysés de *P. vivax*. Aux patients avec paludisme à *P. vivax* compliquée, la séquence des sous-familles de gènes *vir* fut réalisée. La thrombopénie (plaquettes < 150.000/μL) fut observée chez 70,8% des patients (IC_{95%} 66,7-74,9%). La thrombopénie grave (plaquettes < 50.000/μL) fut rencontrée chez 8,9% (IC_{95%} 4,6-13,2%) des patients, bien que des saignements légers aient été observés chez 26,6% de ces patients. Tous les patients avec des formes compliquées de paludisme à *P. falciparum* (n=3) ou à *P. vivax* (n=2) ont présenté une thrombopénie grave. Aucune différence ne fut détectée entre la moyenne ou la fréquence de thrombopénie chez les patients avec paludisme à *P. vivax* (119,8 x 1000/μL; 71,8%) et à *P. falciparum* (122,6 x 1000/μL; 65,4%). Les variables associées à la thrombopénie, de forme indépendante, furent le genre masculin, la primo-infection et la haute parasitémie. Des saignements

étaient associées aux formes compliquées de paludisme. Une corrélation inverse fut identifiée entre la thrombopénie et le volume plaquettaire moyen, dans le paludisme à *P. vivax* ($r=-0,527$; $p<0,01$), toutefois, il n'y a pas eu d'association entre la thrombopénie et l'CIC ($r=-0,148$; $p=0,355$). Aucune liaison *in vitro* de IgG (CIC) aux plaquettes normales n'a été détectée et aucune diminution dans le comptage des plaquettes de la souris, après injection d'IgG (CIC). L'incubation des plaquettes normales avec CIC a inhibé leur phagocytose *in vitro*. Une agrégation intense de plaquettes normales fut vérifiée, en présence du lysé de *P. vivax* et *P. falciparum*. Aucun polymorphisme des gènes *vir* ne fut identifié chez les parasites isolés des formes compliquées de paludisme à *P. vivax*. En conclusion, la thrombopénie est une complication fréquente du paludisme, avec peu de répercussion clinique, même chez les patients avec thrombopénie grave; ce qui peut s'expliquer par la libération de mégaplaquettes compensatoires, par les mégacaryocytes et par l'activation accrue des plaquettes par les formes sanguines de *Plasmodium* spp. L'association de la haute parasitémie et de la primo-infection avec la thrombopénie suggère que la pathogenèse de cette complication soit multifactorielle. Les CIC ne semblent pas contribuer à la diminution du comptage des plaquettes, dans le paludisme, et la présence d'auto-anticorps plaquettaire n'a pas été démontrée dans les cas étudiés.

Mots-clés: Paludisme. *Plasmodium*. Plaquettes. Immunologie. Hématologie.
Médecine Tropicale.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Pathogenese der Thrombozytopenie, eine bekannte Komplikation der Malaria, ist nicht geklärt. Diese Untersuchung beschäftigte sich mit der Häufigkeit der klinischen Manifestation der Thrombozytopenie sowie der Bedeutung der zirkulierenden Immunkomplexe (CIC) und der Thrombozyten aggregation *in vitro*. Von 2004 bis 2006 wurden in Manaus Patienten mit mikroskopisch und im molekular Verfahren nachgewiesener Malaria, verursacht durch *P. vivax* (n=142), sowie *P. falciparum* (n=26) nach Ausschluss weiterer Erkrankungen randomisiert. Die Patienten wurden einzeln untersucht. Dazu zählten u.a. die Gradeinteilung der Parasitämie, Blutbild, biochemische Daten und Gerinnungsparameter. Die CIC (n=48) wurden quantifiziert. Bei Patienten mit hochgradiger Thrombozytopenie wurden die IgG aus den CIC eluiert. Anschließend erfolgte die Evaluierung ihrer Bindung an normale Thrombozyten *in vitro* (n=2), sowie ihren Effekt auf den Zerfall selbiger *in vivo* nach intraperitonealer Applikation in eine C57BL/6 gesunde Maus (n=1). Thrombozyten wurden nach Inkubation mit den CIC von Malariapatienten mit Thrombozytopenie einer Phagozytose von THP-1 Zellen (n=3) ausgesetzt. Die Aggregation von normalen Thrombozyten in Anwesenheit von Lysaten der Blutstadien des *P. vivax* und *P. falciparum*, sowie derer der Sporozoiten des *P. vivax* wurde untersucht. Bei Patienten mit komplizierter *P. vivax* Erkrankung wurden Untergruppen von *vir* Genen sequenziert. Eine Thrombozytopenie (<150.000/ μ L) zeigte sich bei 70,8% der Patienten (KI_{95%}: 66.7-74.9%). Eine schwere Thrombozytopenie (<50.000/ μ L) wurde bei 8.9% (KI_{95%}: 4.6-13.2%) dokumentiert und bei 26,6% dieser Patienten wurden leichte Blutungen berichtet. Alle Patienten mit dem schwerer Malaria (*P. vivax* n=2, *P. falciparum* n=3) boten eine schwere Thrombozytopenie. Die mittlere Thrombozytenzahl verhielt sich bei den Patienten mit *P. vivax* (119,8 x 1000/ μ L; 71,8%) und den Patienten mit *P. falciparum* (122,6 x 1000/ μ L; 65,4%) vergleichsweise ähnlich. Zu den unabhängigen Parametern, die mit der Thrombozytopenie assoziiert waren, gehörten das männliche Geschlecht, die Erstinfektion und die hohe Parasitämie. Die Blutung wurde mit schwerer Malaria assoziiert. Das Verhältnis zwischen Thrombozytenzahl und Thrombozytenvolumen

war bei der *P. vivax* Infektion invers ($r = -0.527$, $p < 0.01$). Im Gesamten zeigte sich keine Beziehung zwischen Thrombozytenzahl und CIC ($r = -0,148$; $p = 0.355$). Auch zeigte sich weder eine *in vitro* Bindung der eluierten IgG (CIC) an normale Thrombozyten, noch ein Thrombozytenzerfall in der Maus nach Applikation von IgG (CIC). Die Inkubation normaler Thrombozyten mit CIC führte zur Verhinderung ihrer Phagozytose. Die Anwesenheit der Lysate von sowohl *P. vivax*, als auch *P. falciparum* verstärkt die Thrombozytenaggregation. Ein Polymorphismus der *vir* Gene bei Parasiten, entnommen von Patienten mit schwerem Verlauf der *P. vivax* Infektion lässt sich nicht bestätigen. Die Thrombozytopenie, auch in ihrer schweren Ausprägung, bleibt also eine häufige Komplikation der Malaria, jedoch mit wenig klinischer Konsequenz. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass große Thrombozyten aus den Megakaryozyten entstehen, und dass die Blutformen der Plasmodien eine stärkere Thrombozytenaktivierung auslösen. Die Verbindung von Erstinfektion und hoher Parasitämie mit Thrombozytopenie lässt eine multifaktorielle Pathogenese dieser Komplikation vermuten. Die CIC scheinen keinen Einfluss auf die Thrombozytenzahl bei der Malaria zu haben. Auch konnten keine Auto-Antikörper gegen Thrombozyten in dieser Untersuchungen nachgewiesen werden.

Schlüsselwörter: Malaria. *Plasmodium*. Thrombozyten. Immunologie. Hämatologie. Tropenmedizin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Ilustração de um esporozoíto de plasmódio, evidenciando o complexo apical.....	53
Figura 2:	Ilustração do ciclo biológico do plasmódio.....	56
Figura 3:	Série histórica do número de casos de malária, no Brasil, por espécie de plasmódio, de 1970 a 2005.....	60
Figura 4:	IPA por UF de notificação, Amazônia Legal, em 1999 e 2005.....	61
Figura 5:	Percentual de internação por malária, na FMT-AM, de 1989 a 2006.....	63
Figura 6:	Ilustração onde se descreve a seqüência de desenvolvimento dos megacariócitos e formação das plaquetas.....	79
Figura 7:	Ilustração onde se vê microscopia eletrônica de transmissão de plaquetas ativadas por trombina, com projeções, microscopia eletrônica de varredura evidenciando a imensa rede canalicular interna das plaquetas.....	82
Figura 8:	Ilustração do papel da fagocitose na patogênese da PTI, desencadeando a formação de auto-anticorpos plaquetários....	90
Figura 9:	Ilustração da teoria proposta para a plaquetopenia da malária, com formação de ICC na superfície das plaquetas.....	110
Figura 10:	Localização geográfica do Estado do Amazonas, da Cidade de Manaus e da FMT-AM.....	131
Figura 11:	Mapa da Cidade de Manaus, localizada à margem esquerda do Rio Negro, dividida em zonas geopolíticas.....	132
Figura 12:	Ilustração da região abdominal, onde se evidenciam os limites de palpação da extremidade caudal do baço e a classificação de esplenomegalia de Hackett.....	139

Figura 13:	Esquema de precipitação dos ICC do soro dos pacientes com malária.....	147
Figura 14:	Esquema de isolamento da IgG (ICC), a partir da ligação à proteína G em gel de agarose, e subsequente eluição em tampão ácido.....	148
Figura 15:	Esquema de experimento de ligação <i>in vitro</i> em plaquetas normais, da IgG (ICC).....	150
Figura 16:	Esquema de experimento de ligação e destruição <i>in vivo</i> de plaquetas normais de camundongos isogênicos C57BL/6 sadios, após injeção intraperitoneal de ICC, IgG (ICC) e IgG sérica.....	151
Figura 17:	Esquema de experimento de fagocitose de plaquetas normais marcadas com CMFDA após incubação com ICC, por células THP-1 estimuladas com PMA.....	152
Figura 18:	Esquema de experimento de agregação <i>in vitro</i> de plaquetas normais, com lisado de hemácias parasitadas por <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> e esporozoítos de <i>P. vivax</i>	155
Figura 19:	Diagrama de fluxo do desenho experimental utilizado.....	156
Figura 20:	Varredura de imagem de gel de PCR em transiluminador com luz ultravioleta, evidenciando o diagnóstico molecular de malária por <i>P. falciparum</i> , malária por <i>P. vivax</i> e infecção mista (<i>P.f./P.v.</i>).....	165
Figura 21:	Diagrama de fluxo de seleção dos pacientes do estudo.....	166
Figura 22:	Mapa do Estado do Amazonas, evidenciando os municípios de ocorrência dos 168 casos incluídos no estudo.....	168
Figura 23:	Foto de paciente com malária vivax e plaquetopenia grave, evidenciando hemorragia conjuntival bilateral.....	182
Figura 24:	Foto de paciente com malária vivax e plaquetopenia grave, evidenciando hemorragia conjuntival unilateral.....	183

Figura 25: Foto de paciente com malária falciparum grave e plaquetopenia grave, evidenciando equimoses no membro superior esquerdo, em local de venipunção.....	183
Figura 26: Esfregaço de paciente com malária falciparum grave e plaquetimetria de 29.000/ μ L, onde se evidenciam hemácias e uma megaplaqueta.....	185
Figura 27: Correlação entre plaquetimetria e VPM, em pacientes com malária vivax e malária falciparum.....	186
Figura 28: Correlação entre hematimetria e VCM, em pacientes com malária vivax e malária falciparum.....	187
Figura 29: Correlação entre plaquetimetria e hematimetria, em pacientes com malária vivax e malária falciparum.....	188
Figura 30: Plaquetimetria e parasitemia de pacientes com diferentes níveis de exposição prévia à malária.....	192
Figura 31: Correlação entre parasitemia e plaquetimetria, em pacientes com malária vivax e malária falciparum.....	194
Figura 32: Plaquetimetria e parasitemia de pacientes com e sem dieta rica em alho.....	195
Figura 33: Plaquetimetria seriada de 3 pacientes com malária vivax e 4 pacientes com malária falciparum, durante 7 dias de hospitalização.....	197
Figura 34: Esplenometria seriada de 3 pacientes com malária vivax e 4 pacientes com malária falciparum, durante 7 dias de hospitalização.....	197
Figura 35: Ultra-sonografia de paciente hospitalizado com malária vivax, evidenciando a medida do maior eixo do baço, à inspiração profunda.....	198
Figura 36: Ultra-sonografia de paciente hospitalizado com malária vivax, evidenciando a presença de três pequenos baços acessórios.....	199

Figura 37:	Ultra-sonografia de paciente hospitalizado com malária falciparum, petéquias e 32.000 plaquetas/ μ L, evidenciando a presença de pequeno hematoma subcapsular esplênico.....	199
Figura 38:	Ultra-sonografia de paciente hospitalizado com malária falciparum, evidenciando o "sinal do beijo"	200
Figura 39:	Dosagem de ICC em pacientes com malária por <i>P. vivax</i> , por <i>P. falciparum</i> e controles sadios.....	201
Figura 40:	Correlação entre ICC e plaquetimetria em pacientes com malária vivax e malária falciparum.....	202
Figura 41:	Exemplos de gráficos de seleção (<i>gating</i>) de plaquetas marcadas para análise à citometria de fluxo.....	203
Figura 42:	Média do índice de ligação de IgG (ICC) a plaquetas normais, por citometria de fluxo.....	204
Figura 43:	Plaquetimetria de camundongos C57BL/6 nas horas 0, 2 e 4 após injeção intraperitoneal de ICC, IgG sérica e IgG (ICC).....	205
Figura 44:	Exemplos de gráficos de seleção (<i>gating</i>) de células THP-1, após a fagocitose de plaquetas marcadas com CMFDA.....	206
Figura 45:	Média de fluorescência (CMFDA) de plaquetas normais marcadas, submetidas à fagocitose por células THP-1, após incubação das plaquetas com ICC de pacientes com malária vivax e plaquetopenia grave.....	206
Figura 46:	Curvas de agregação de plaquetas normais, na presença de PBS e lisado de hemácias não parasitadas, ristocetina, lisado de hemácias parasitadas por <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> e esporozoítos de <i>P. vivax</i>	207
Figura 47:	Média do máximo percentual de agregação de plaquetas normais, na presença de lisado de hemácias parasitadas por <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> e esporozoítos de <i>P. vivax</i>	208
Figura 48:	Dendograma com distâncias genéticas entre as seqüências da subfamília A dos genes <i>vir</i> de <i>P. vivax</i>	209

Figura 49: Dendograma com distâncias genéticas entre as seqüências da subfamília B dos genes <i>vir</i> de <i>P. vivax</i>	210
Figura 50: Dendograma com distâncias genéticas entre as seqüências da subfamília C dos genes <i>vir</i> de <i>P. vivax</i>	211
Figura 51: Dendograma com distâncias genéticas entre as seqüências da subfamília D dos genes <i>vir</i> de <i>P. vivax</i>	212
Figura 52: Dendograma com distâncias genéticas entre as seqüências da subfamília E dos genes <i>vir</i> de <i>P. vivax</i>	213
Figura 53: Provável patogênese da plaquetopenia da malária e de suas manifestações clínicas.....	287

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Estimativas da distribuição mundial de casos de malária, por continente.....	58
Tabela 2:	Série histórica do número de casos de malária, no Amazonas, em Manaus e na FMT-AM, de 1995 a 2006.....	64
Tabela 3:	Crítérios de malária grave por <i>P. falciparum</i>	71
Tabela 4:	Receptores plaquetários, por grupos e famílias, e seus respectivos ligantes.....	86
Tabela 5:	Revisão sistemática de estudos que realizaram contagem de plaquetas, em pacientes com malária.....	100
Tabela 6:	Revisão sistemática de relatos de casos de malária por <i>P. vivax</i> com plaquetopenia.....	103
Tabela 7:	Lista de drogas com potencial de causar plaquetopenia.....	136
Tabela 8:	Caracterização dos pacientes que preencheram algum critério de exclusão.....	167
Tabela 9:	Procedência dos pacientes estudados, por local provável de infecção.....	169
Tabela 10:	Características individuais dos pacientes, por espécie de plasmódio.....	170
Tabela 11:	História patológica pregressa, hábitos e tempo da doença atual dos pacientes, por espécie de plasmódio.....	171
Tabela 12:	Caracterização clínica dos pacientes à história clínica, por espécie de plasmódio.....	172
Tabela 13:	Caracterização clínica dos pacientes ao exame físico, por espécie de plasmódio.....	173
Tabela 14:	Exames laboratoriais realizados nos pacientes com malária.....	175

Tabela 15: Exames laboratoriais realizados nos pacientes com malária.....	177
Tabela 16: Caracterização clínica dos casos de malária grave.....	178
Tabela 17: Freqüências de plaquetopenia, sangramento e malária grave..	179
Tabela 18: Freqüência de tipos de sangramento, pelos níveis de plaquetopenia.....	180
Tabela 19: Modelos de regressão logística (análise multivariada) das variáveis preditoras de sangramento, nos pacientes com malária.....	181
Tabela 20: Análise univariada de possíveis preditores de plaquetopenia, nos pacientes com malária.....	189
Tabela 21: Modelos de regressão logística (análise multivariada) das variáveis preditoras de plaquetopenia, nos pacientes com malária.....	191
Tabela 22: Modelos de regressão linear multivariada de plaquetimetria, nos pacientes com malária.....	196

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. allium</i>	<i>Allium allium</i> (cebola)
<i>A. sativum</i>	<i>Allium sativum</i> (alho)
AAS	Ácido acetilsalicílico
ADP	Adenosina difosfato
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (<i>Acquired ImmunoDeficiency Syndrome</i>)
<i>An. albimanus</i>	<i>Anopheles albimanus</i>
ANOVA	Análise de variância
Anti-HBc total	Anticorpos totais anti-antígeno do <i>core</i> do vírus da hepatite B
Anti-HCV	Anticorpos anti-vírus da hepatite C
ASH	Sociedade Americana de Hematologia (<i>American Society of Hematology</i>)
AT	Anti-trombina
BSGC	Solução salina tamponada com glicose e citrato (<i>Buffered Saline Glucose-Citrate</i>)
C3	Proteína do complexo 3 da cascata do complemento
CCI	Aumento de contagem corrigido (<i>Corrected Count Increment</i>)
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CMFDA	Diacetato de 5-clorometilfluoresceína (<i>5-ChloroMethylFluorescein DiAcetate</i>)
cols.	Colaboradores

CR1	Receptor-1 de complemento (<i>Complement Receptor-1</i>)
DALY	Anos de vida perdidos por incapacidade (<i>Disability-Adjusted Life Years</i>)
DEN	Vírus do dengue
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>)
ELISA	Ensaio imuno-enzimático em fase sólida
FcR	Receptor para a fração Fc do anticorpo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>)
FL1-H	Canal 1 de fluorescência à citometria de fluxo (<i>Fluorescence 1-Height</i>)
FMT-AM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
FSC-H	Tamanho das células à citometria de fluxo (<i>Forward Scatter-Height</i>)
GP	Glicoproteína
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da hepatite B
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)

IC	Imunocomplexo
IC _{95%}	Intervalo de confiança 95%
ICC	Imunocomplexo circulante
IgG (ICC)	Imunoglobulina da classe G isolada de ICC
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
IPA	Incidência Parasitária Anual
IRA	Insuficiência renal aguda
MAC-ELISA	ELISA com captura de anticorpo IgM
MHCM	Média da hemoglobina corpuscular média
MSP-1	Proteína de superfície do merozoíto-1 (<i>Merozoite Surface Protein-1</i>)
ND	Não disponível
NYU	Universidade de Nova York (<i>New York University</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Razão de chances (<i>Odds Ratio</i>)
p. ex.	Por exemplo
<i>P. f.</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. v.</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PA	Para análise
PAF	Fator ativador de plaqueta (<i>Platelet-Activating Factor</i>)

PAHO	Organização Pan-Americana da Saúde (<i>Pan-American Health Organization</i>)
PAIgG	IgG associada à plaqueta (<i>Platelet-Associated IgG</i>)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia de polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCT	Plaquetócrito
PDF	Produtos de degradação da fibrina
PDW	Amplitude de distribuição do tamanho das plaquetas (<i>Platelet Distribution Width</i>)
PEG	Poliétilenoglicol
PfEMP-1	Proteína da membrana eritrocitária-1 do <i>P. falciparum</i> (<i>P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1</i>)
PL	Prova do laço
PM	Peso molecular
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato (<i>Phorbol Myristate Acetate</i>)
POP	Procedimento operacional padrão
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
PTI	Púrpura trombocitopênica idiopática (ou imune)
PvAMA-1	Antígeno de membrana apical-1 de <i>P. vivax</i> (<i>P. vivax Apical Membrane Antigen-1</i>)
RDW	Amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos (<i>Red cell Distribution Width</i>)

RNA	Ácido ribonucléico (<i>RiboNucleic Acid</i>)
RNI	Relação normalizada internacional
RPMI	Meio de cultura desenvolvido pelo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	PCR com transcriptase reversa (<i>Reverse Transcriptase PCR</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SIVEP/Malária	Sistema de Vigilância Epidemiológica em Malária
SSC-H	Granulações das células à citometria de fluxo (<i>Side Scatter-Height</i>)
TAD	Tensão arterial diastólica
TAP	Tempo de atividade de protrombina
TAS	Tensão arterial sistólica
TAT	Complexo trombina-antitrombina
TC	Tempo de coagulação
TCLEP	Termo de consentimento livre e esclarecido ao paciente
TGF- β	Fator de crescimento de transformação – beta (<i>Transforming Growth Factor – beta</i>)
THP-1	Linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TPO	Trombopoietina
TRAP	Proteína anônima (ou adesiva) relacionada à trombospondina (<i>Thrombospondin Related Anonymous – or Adhesive - Protein</i>)
TS	Tempo de sangramento

TSP	Trombospondina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UF	Unidade federativa
USP	Universidade de São Paulo
VCM	Volume corpuscular médio
VPM	Volume plaquetário médio
vWF	Fator von Willebrand (<i>von Willebrand Factor</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
\bar{x}	Média aritmética de uma amostra
α	Erro alfa (tipo I)
β	Erro beta (tipo II)
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma/mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm^3	Micrômetro cúbico
^{111}In	Índio radioativo
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro quadrado
fg	Fentograma
g	Aceleração da gravidade
g	Gramma
g/dL	Gramma/decilitro
h	Hora
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
m^2	Metro quadrado
mg	Miligramma

mg/dL	Miligrama/decilitro
mg/mL	Miligrama/mililitro
min	Minuto
mmHg	Milímetros de mercúrio
n	Número de uma amostra
N	Número de uma população
N	Normal
°C	Graus Celsius
p	Probabilidade de erro alfa
pb	Pares de bases
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
r	Coefficiente de correlação
s	Desvio padrão de uma amostra
s	Segundo
U/L	Unidade/litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	46
1.1 CICLO BIOLÓGICO DO PLASMÓDIO	51
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA	56
1.2.1 O impacto mundial da malária	56
1.2.2 O impacto da malária na Amazônia Brasileira	59
1.2.3 O impacto da malária no Estado do Amazonas	62
1.3 ASPECTOS CLÍNICOS E PATOGÊNESE DA MALÁRIA	64
1.3.1 Malária não-grave	64
1.3.2 Malária grave	66
1.4 ASPECTOS GERAIS SOBRE AS PLAQUETAS	73
1.4.1 Breve história do estudo das plaquetas	73
1.4.2 Formação das plaquetas.....	77
1.4.3 Morfologia das plaquetas	79
1.4.4 Fisiologia das plaquetas.....	81
1.5 DOENÇAS INFECCIOSAS QUE EVOLUEM COM PLAQUETOPENIA	89
1.5.1 Plaquetopenia nas doenças infecciosas de evolução crônica	89
1.5.2 Plaquetopenia nas doenças infecciosas de evolução aguda	93
1.6 PLAQUETOPENIA NA MALÁRIA	94
1.6.1 Freqüência e aspectos clínicos da plaquetopenia na malária.....	94
1.6.2 Patogênese da plaquetopenia na malária.....	104
1.6.3 Manejo clínico da plaquetopenia na malária	117
2 JUSTIFICATIVA	121
3 OBJETIVOS	125
3.1 OBJETIVO GERAL	127
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	127

4	PACIENTES E MÉTODOS	129
4.1	TIPOS DE ESTUDO	131
4.2	LOCAL DO ESTUDO.....	131
4.3	TIPO DA AMOSTRA.....	134
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	135
4.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	135
4.6	SELEÇÃO DOS PACIENTES	137
4.7	AVALIAÇÃO CLÍNICA	137
4.8	EXAMES LABORATORIAIS	139
4.9	EVOLUÇÃO CLÍNICA DA PLAQUETOPENIA E DA ESPLENOMETRIA	145
4.10	IMUNOCOMPLEXOS CIRCULANTES	146
4.10.1	Precipitação de imunocomplexos circulantes	147
4.10.2	Isolamento de IgG dos imunocomplexos circulantes.....	148
4.11	DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS PLAQUETÁRIOS	148
4.11.1	Teste <i>in vitro</i>	149
4.11.2	Teste <i>in vivo</i> em modelo experimental	150
4.12	TESTE DE FAGOCITOSE DE PLAQUETAS <i>IN VITRO</i>	152
4.13	TESTE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA <i>IN VITRO</i>	153
4.14	SUBFAMÍLIAS DOS GENES <i>VIR</i> DE <i>P. VIVAX</i>	154
4.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	157
4.16	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	160
5	RESULTADOS	163
5.1	PACIENTES EXCLUÍDOS.....	165
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES	167
5.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	171
5.4	AVALIAÇÃO DOS EXAMES LABORATORIAIS.....	174
5.5	MALÁRIA GRAVE	178
5.6	AVALIAÇÃO DA PLAQUETIMETRIA.....	180
5.7	EVOLUÇÃO CLÍNICA DA ESPLENOMETRIA E DA PLAQUETIMETRIA	196
5.8	IMUNOCOMPLEXOS CIRCULANTES	201
5.9	DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS.....	203

5.9.1	Teste <i>in vitro</i>	203
5.9.2	Teste <i>in vivo</i> em modelo experimental.....	204
5.10	TESTE DE FAGOCITOSE DE PLAQUETAS <i>IN VITRO</i>	205
5.11	TESTE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA <i>IN VITRO</i>	207
5.12	SUBFAMÍLIAS DOS GENES <i>VIR</i> DE <i>P. VIVAX</i>	208
6	DISCUSSÃO	215
6.1	PACIENTES EXCLUÍDOS.....	217
6.2	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES	229
6.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	230
6.4	AVALIAÇÃO DOS EXAMES COMPLEMENTARES	233
6.5	MALÁRIA GRAVE	240
6.6	AVALIAÇÃO DA PLAQUETIMETRIA	245
6.7	EVOLUÇÃO CLÍNICA DA ESPLENOMETRIA E DA PLAQUETIMETRIA	263
6.8	IMUNOCOMPLEXOS CIRCULANTES	269
6.9	DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS	272
6.9.1	Teste <i>in vitro</i>	272
6.9.2	Teste <i>in vivo</i> em modelo experimental.....	277
6.10	TESTE DE FAGOCITOSE DE PLAQUETAS <i>IN VITRO</i>	278
6.11	TESTE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA <i>IN VITRO</i>	280
	CONCLUSÕES	289
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	293
	OBRAS CONSULTADAS	341
	ANEXOS.....	345
	ANEXO A (TABELA DE DÍGITOS RANDÔMICOS).....	347
	ANEXO B (FICHA CLÍNICA).....	351
	ANEXO C (POP).....	357
	ANEXO D (PROCESSO DE APROVAÇÃO DO PROJETO).....	429
	ANEXO E (TCLEP).....	433

1 INTRODUÇÃO



Ilustração de Bizzozero de uma imagem microscópica intravital da deposição de plaquetas e leucócitos, em um vaso sanguíneo lesado de mesentério de cobaio.

Bizzozero G. Über einen neuen formbestandteil des blutes und dessen rolle bei der thrombose und blutgerinnung. *Virchow's Arch Path Anat Physiol Klin Med* **1882**; 90: 261-332.

1.1 CICLO BIOLÓGICO DO PLASMÓDIO

A malária humana, uma das doenças parasitárias mais antigas de que se tem notícia, é causada por um protozoário intracelular obrigatório do gênero *Plasmodium*, pertencente ao filo *Apicomplexa*, classe *Aconoidasida*, ordem *Haemosporida* e família *Plasmodiidae*.

Fazem parte do mesmo filo dos plasmódios: *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Babesia* e *Theileria*, que partilham com aquele parasito semelhantes mecanismos de invasão celular.

Existem várias espécies, entre elas as espécies que infectam aves (*P. matutinum*, *P. elongatum*, *P. cathemerium*, *P. circumflexum*, *P. relictum*, *P. vauhani*, *P. polare*, *P. gallinaceum*, *P. juxtannucleare*, *P. ashfordi*, *P. pedioecetii* e *P. corradettii* Laird), espécies de roedores (*P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vinckei* e *P. yoelli*), espécies de primatas não-humanos (*P. inui*, *P. coatneyi*, *P. fieldi*, *P. gonderi*, *P. hylobati*, *P. fragile*, *P. simium*, *P. brasilianum*, *P. knowlesi*, *P. reichenowi* e *P. simiovale*) e espécies que causam doença no homem (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*) (193).

Várias das espécies que não causam doença humana têm sido utilizadas como modelos para o estudo da malária humana. Cada modelo experimental tem vantagens e desvantagens no esclarecimento dos mecanismos fisiopatogênicos da malária, a depender da analogia dos antígenos das diferentes fases do parasito, dos mecanismos de invasão, mecanismos de desencadeamento da resposta imunitária, seqüestro no fígado ou no baço e mecanismos genéticos de resistência do modelo

experimental à infecção (150). Grande parte dos mecanismos de produção da doença que se conhece, hoje, se deve aos estudos realizados com esses modelos experimentais, especialmente em países não-endêmicos, onde se concentra a maior parte dos recursos para pesquisa em doenças infecciosas. Essa realidade tem levado, cada vez mais, a uma rarefação dos estudos clínicos sobre a infecção malárica, nas áreas endêmicas. Muitas vezes é tomado como verdadeiro para a malária humana o paradigma criado a partir dos estudos em modelos experimentais.

A biologia dos plasmódios inclui um ciclo de vida em um hospedeiro vertebrado intermediário e em um hospedeiro definitivo invertebrado (285). A depender do gênero, cada plasmódio possui um ciclo da doença com certas peculiaridades. A seguir, detalha-se o ciclo biológico dos plasmódios que causam doença no homem, por julgar que as características patogênicas e clínicas da malária humana, objeto desta tese, estão diretamente relacionadas à interação entre os vários estádios do plasmódio com seu hospedeiro intermediário, o homem.

O ciclo hepático (pré-eritrocítico) tem início quando a fêmea do anofelino, ao fazer seu repasto sangüíneo, inocula os esporozoítos, que penetram nos hepatócitos, desaparecendo da corrente sangüínea em cerca de 30 minutos. Recentemente, observou-se que os esporozoítos inoculados pelo vetor permanecem viáveis durante várias horas na pele, e alguns são drenados para os gânglios linfáticos, permitindo uma interação com o sistema imunitário, até então considerada irrelevante (384). O mecanismo de penetração dos esporozoítos, nos hepatócitos, tem sido amplamente estudado, em parte por se acreditar que uma vacina contra

antígenos das formas pré-eritrocíticas seria a melhor estratégia de imunização ativa, conferindo imunidade estéril (136).

Faz parte do rol de proteínas utilizadas para a penetração dos esporozoítos nos hepatócitos, a proteína TRAP (proteína anônima ou adesiva, relacionada à trombospondina - TSP). Desde 1997, se sabe que a proteína TRAP, de 90 kDa, é necessária tanto para o deslizamento do esporozoíto no sinusóide hepático, quanto para a invasão dos hepatócitos (Figura 1) (291). A proteína se liga à proteoglicana heparan sulfato (na superfície dos hepatócitos) através de um epítipo ligador de heparina na metade N-terminal da estrutura protéica (6). As TSP são glicoproteínas extracelulares, com múltiplos domínios, ligadoras de cálcio, com importante função de adesão celular (3).

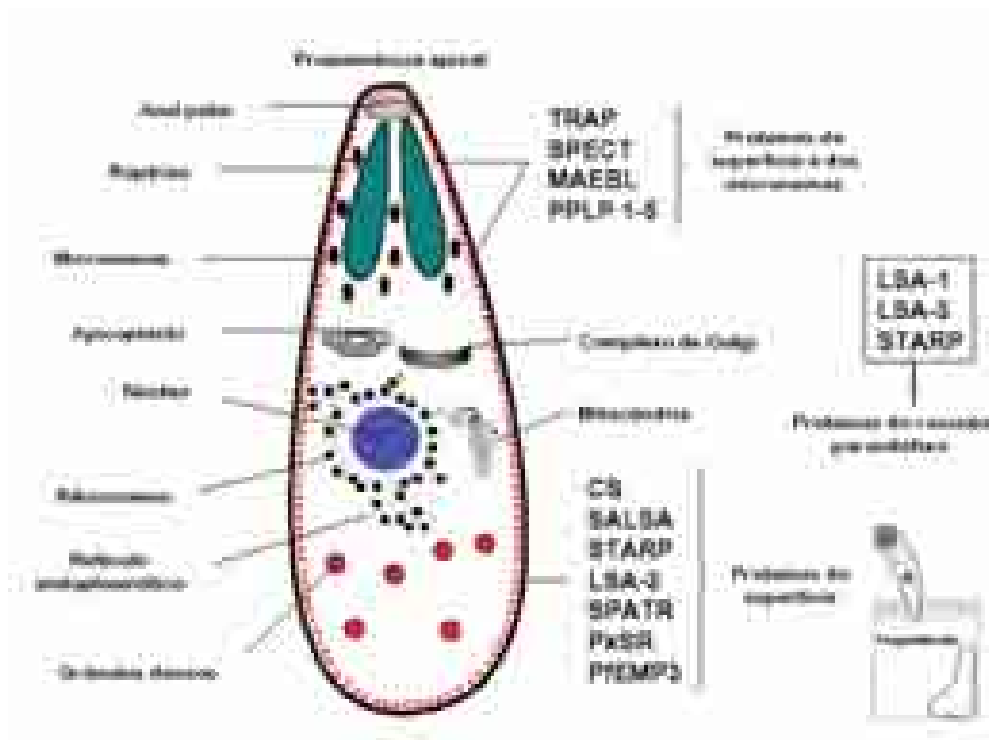


Figura 1: Ilustração de um esporozoíto de plasmódio, evidenciando o complexo apical (mais acima), responsável pela penetração nos hepatócitos. Reproduzida de Garcia e cols., 2006 (123)

Em estudo realizado com amostras da Tailândia e do Brasil, demonstrou-se que existe uma grande variedade genética de haplótipos da TRAP de *P. vivax* (294).

Após a produção de esquizontes nos hepatócitos (esquizogonia tecidual), estas formas vão dar origem a milhares de merozoítos. Ainda no fígado, *P. vivax* e *P. ovale* evoluem para uma forma conhecida como hipnozoíto, que, posteriormente, ainda por mecanismos desconhecidos, podem iniciar novo ciclo sangüíneo, sendo responsável pela recaída da doença. O ciclo hepático dura, em média, 14 dias, o que corresponde, praticamente, ao período de incubação da doença. Os merozoítos liberados pelos hepatócitos, nos sinusóides hepáticos, provavelmente na forma de pequenas vesículas conhecidas como merossomos (341), vão invadir as hemácias, desenvolvendo-se em trofozoítos, que, através de divisão nuclear, formam os esquizontes sangüíneos (esquizogonia sangüínea), as formas do plasmódio que incitam resposta imunitária com repercussões clínicas. Os esquizontes, ao se fragmentarem, rompem as hemácias e liberam novos merozoítos na circulação sangüínea. Esse é o momento que coincide com o paroxismo febril. O ciclo sangüíneo se repete a cada 48 horas (*P. vivax*, *P. falciparum* e *P. ovale*) ou a cada 72 horas (*P. malariae*); entretanto, a sincronia do ciclo, com a histórica febre terçã ou quartã, geralmente acontece apenas depois de duas semanas de doença clínica, o que torna estes tipos de febre infreqüentes em locais de rápido diagnóstico e tratamento. A característica fenotípica mais importante do gênero *Plasmodium* é sua capacidade de penetração em hemácias, através da liberação de proteínas contidas em um complexo apical, de maneira semelhante à penetração dos esporozoítos nos

hepatócitos. No caso de *P. falciparum*, a invasão eritrocitária acontece através dos receptores eritrocitários glicoforina A e C e da banda 3.

P. vivax utiliza o antígeno do grupo sanguíneo *Duffy* (124). Caso haja a penetração do plasmódio em outras células do sangue, como leucócitos e plaquetas, outros receptores ainda não descritos devem ser implicados.

Alguns merozoítos resultantes da esquizogonia sanguínea se diferenciam nos gametócitos, formas sexuadas responsáveis pela infecção do vetor. No Brasil, a principal espécie implicada na transmissão é o *Anopheles darlingi*. Na malária vivax, já estão presentes no sangue periférico no segundo dia de doença clínica, enquanto na malária falciparum, apenas depois de sete dias, em média. O ciclo de vida no hospedeiro invertebrado começa no momento da ingestão de sangue humano contendo as formas sexuadas, pelo anofelino. No estômago do mosquito há a formação do zigoto, do oocineto, do oocisto e, finalmente, dos esporozoítos, que migram até as glândulas salivares do inseto, capacitando a fêmea a infectar um novo ser humano.

A figura 2 ilustra o ciclo biológico de plasmódio, chamando a atenção para a diferença de tamanho dos trofozoítos de *P. falciparum* e de *P. vivax* no interior das hemácias, útil para o diagnóstico microscópico da espécie responsável pela infecção humana, ao exame da gota espessa de sangue.

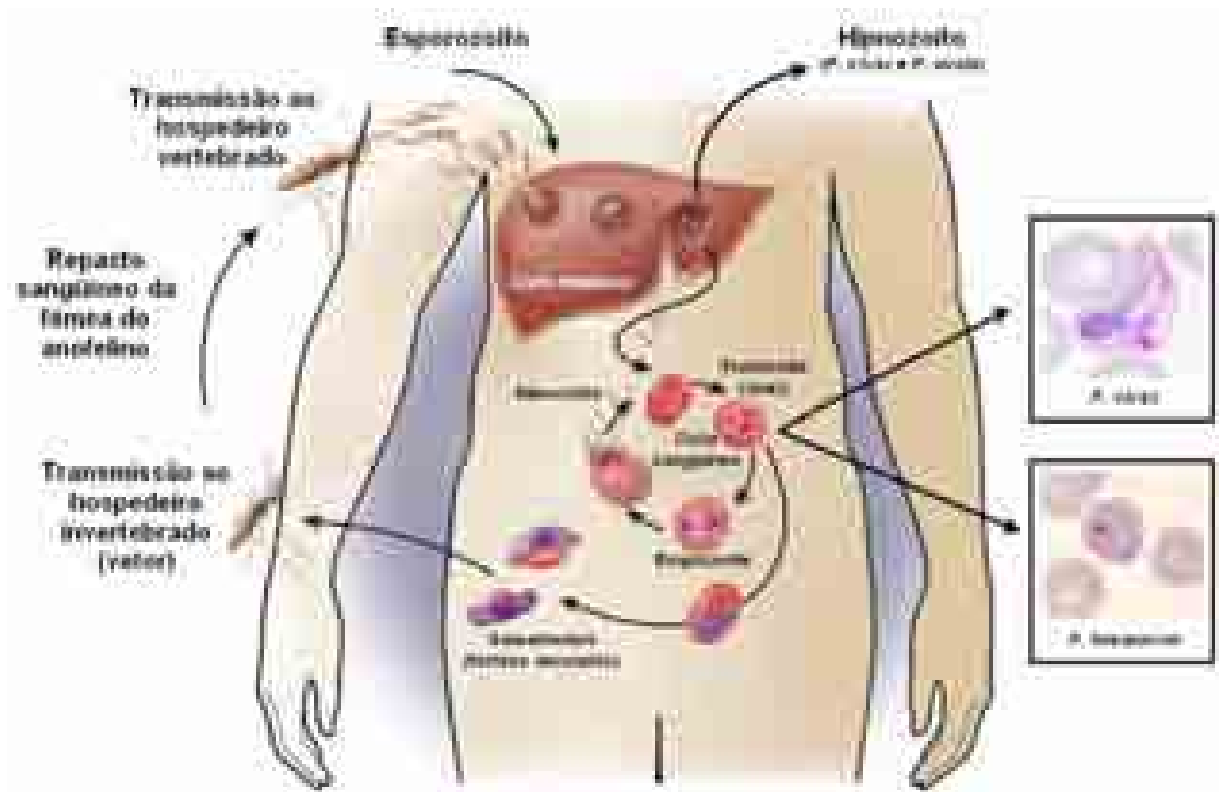


Figura 2: Ilustração do ciclo biológico do plasmódio. Adaptada de Miller e cols., 2002 (238)

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

1.2.1 O impacto mundial da malária

O número total de casos de malária, no mundo, tem sido uma informação imprecisa e passível de críticas. A doença tem se restringido, nas últimas décadas, às áreas tropicais em processo de desenvolvimento, onde sistemas de informação de morbidade são ainda incipientes (140). A falta de conhecimento sobre o real impacto desta doença dificulta grandemente as ações de controle. Exceção se faz pelo Sistema de Vigilância Epidemiológica em Malária (SIVEP/Malária), do Ministério

da Saúde do Brasil, com base de dados permanentemente atualizada, em operação regular desde 2003.

O Relatório Mundial sobre Malária, publicado em 2005 (377), sob os auspícios da Organização Mundial de Saúde (OMS), do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e da iniciativa *Roll-Back Malaria*, de 1998, resume uma tendência de distribuição da malária, conforme se observa na Tabela 1.

Nessa tabela, fica claro que a malária ainda é uma doença de grande impacto no continente africano, especialmente abaixo do deserto do Saara (África Sub-Saariana). Aí acontece 89% dos óbitos por malária, em parte pela maior incidência de infecções por *P. falciparum*, em função das características genéticas desta população (ausência do fator *Duffy*).

O resultado final é o grande volume de estudos com malária realizados na África, e uma escassez de estudos nas Américas, onde o número de óbitos é pequeno, pela maior incidência de infecções por *P. vivax*, espécie responsável por infecções, de fato, mais benignas.

Assim, o perfil epidemiológico da malária nas Américas tem repercutido no volume de pesquisa local sobre essa doença, em que pese a baixa disponibilidade de recursos para a pesquisa básica ou aplicada sobre a malária vivax.

Tabela 1

Estimativas da distribuição mundial de casos de malária, por continente

	África	Ásia	América
<i>P. falciparum</i>	93%	35%	18%
<i>P. vivax</i>	7%	65%	72%
<i>P. malariae</i> ou infecções mistas			10%
População exposta à malária	66%	49%	14%
Contribuição ao número global de casos de malária	59%	38%	3%
Contribuição ao número global de casos de malária falciparum	74%	25%	1%
Contribuição ao número global de óbitos por malária	89%	10%	<1%

Fonte: OMS, Relatório Mundial de Malária, 2005 (377)

Esta infecção, entretanto, tem tido alto impacto sócio-econômico, contribuindo para aumento dos custos com saúde, através de custos com o diagnóstico, tratamento específico, medicações sintomáticas, eventuais hospitalizações e dias de trabalho perdidos. É importante lembrar que a despeito de apresentar baixa letalidade, a malária vivax, em comparação com a malária falciparum não-grave, gera igual custo com diagnóstico e tratamento, além de cursar com freqüentes recaídas (pela formação de hipnozoítos), o que multiplica os gastos. Custos adicionais com hospitalização por anemia ou plaquetopenia, por exemplo, são geralmente desprezados nos cálculos de custo com a doença. Em avaliação de custo-efetividade do controle da malária, no Brasil, entre 1988 e 1996, estimou-se DALY (cálculo de anos de vida perdidos por incapacidade, de acordo com o Banco

Mundial) de 0,22 para malária vivax e 0,37 para malária falciparum, sendo 1 o máximo de saúde e zero o óbito pela doença (5).

A falta de estudos realizados nas Américas, adicionalmente, tem suscitado a adoção precipitada de medidas de controle e de manejo clínico recomendados para a malária Africana, que tem características epidemiológicas e clínicas muito diferentes da malária Americana.

1.2.2 O impacto da malária na Amazônia Brasileira

A transmissão de malária acontece, na América do Sul, nos nove países que abrigam a Floresta Amazônica (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela), sendo que os países andinos notificaram 45,4% dos casos e o Brasil 40,1%, em 2001 (275).

No Brasil, que responde historicamente pelo maior número de casos de malária, nas Américas, a inversão da fórmula parasitária (com aumento do número de casos de malária vivax, em relação aos casos de malária falciparum) desde o final da década de 1980, provavelmente se deveu ao tratamento mais eficiente da malária falciparum, com a introdução da mefloquina, além das medidas de controle empregadas no controle vetorial da doença, tendo tido maior impacto sobre a transmissão de *P. falciparum* (Figura 3).

Isso permitiu a redução do número de óbitos no país, que registrou média de 140 mortes/ano por malária, entre 1998 e 2004. Por outro lado, o novo panorama epidemiológico levou à maior exposição da população a *P. vivax*, o que, *per se*,

pode ter suscitado a maior ocorrência, no Brasil, de complicações clínicas consideradas raras nesta infecção (197, 215), à semelhança do que ocorreu em outras regiões com maior incidência de malária vivax, como o Sudeste Asiático (185).

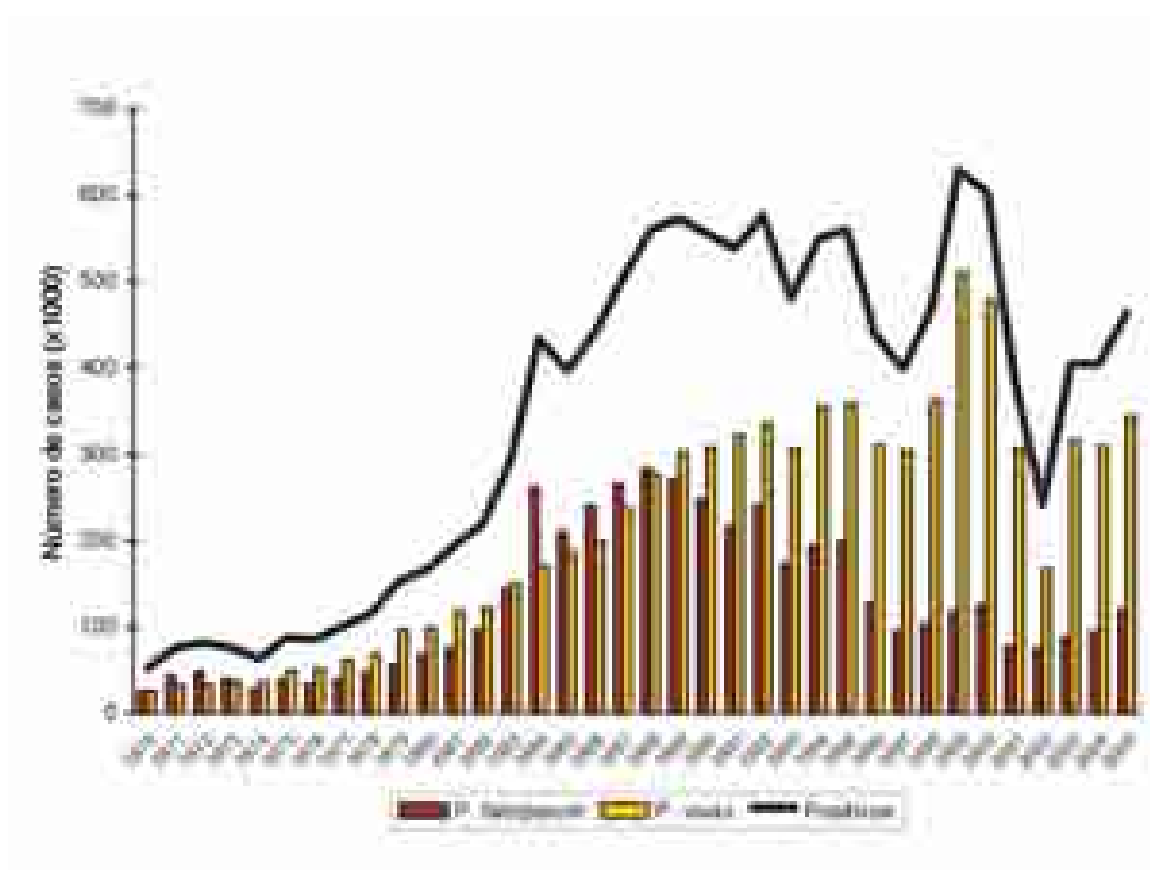


Figura 3: Série histórica do número de casos de malária, no Brasil, por espécie de plasmódio, de 1970 a 2005. Fonte: SIVEP/Malária, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde.

Aparentemente, as estratégias de controle não têm acontecido de forma sustentável. O último controle eficaz do número de casos aconteceu em 2000, durante o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM) (346). Entretanto, a partir de 2003, se observou novo aumento do número de casos de

malária, apesar da manutenção do Plano Nacional de Controle da Malária (PNCM) (214).

No Brasil, 99,9% dos casos autóctones notificados de malária procedem dos estados que compõem a Amazônia Legal (49).

A Incidência Parasitária Anual (IPA) é um indicador de risco de malária, calculado a partir do número de casos de malária, por 1000 habitantes, sendo um parâmetro mais robusto do que o número total de casos, na avaliação da morbidade. Considera-se como área de alto risco aquela com IPA maior do que 50 casos/1000 habitantes. Na figura 4, observa-se a IPA por Unidade Federativa (UF), na Amazônia Legal, em dois momentos distintos.

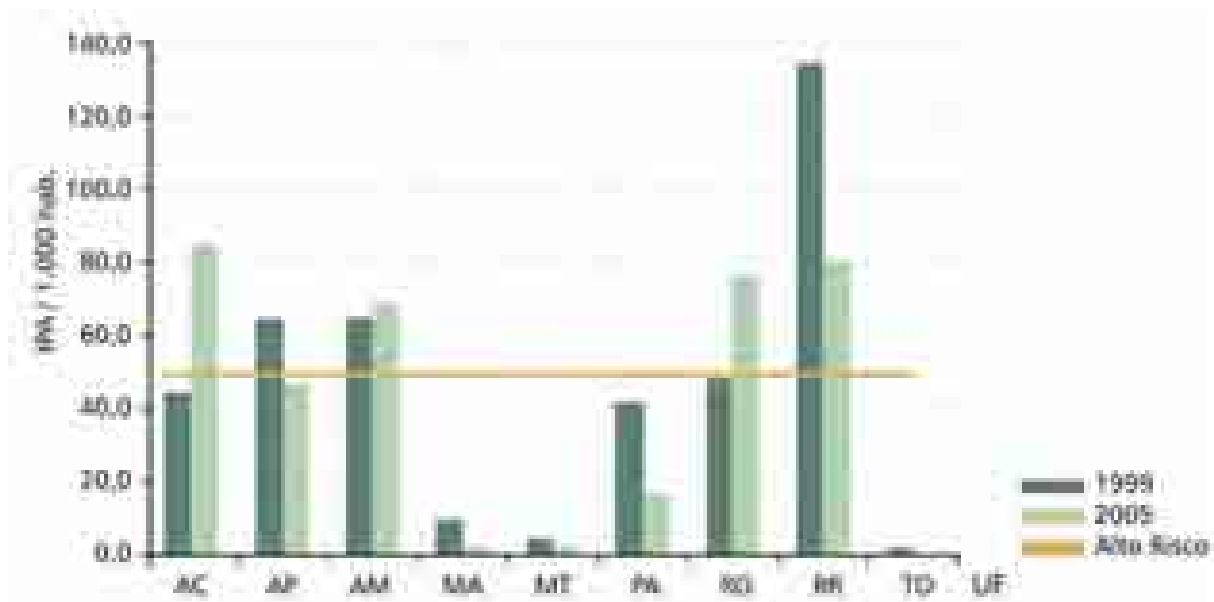


Figura 4: IPA, por UF de notificação, nos estados da Amazônia Legal, em 1999 e 2005.

Fonte: SIVEP/Malária, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde.

A malária tem também grande impacto econômico. Em 2005, se observou incidência de malária, em pessoas de 20 a 29 anos, de 30,8 casos/1000, e 27,7 casos/1000, em pessoas entre 30 e 49 anos de idade, sendo superiores às incidências em outras faixas etárias. A malária, portanto, acomete de maneira expressiva pessoas em faixa etária produtiva, acarretando importante perda de dias de trabalho, nas áreas endêmicas (49). Além disso, a anemia decorrente da infecção aguda por plasmódio, associada às importantes endemias de desnutrição energético-protéica e parasitoses intestinais, na faixa pediátrica (269), pode dificultar o aprendizado e retardar o desenvolvimento intelectual da população. A endemia malárica também impede o crescimento sustentável da indústria do turismo, em uma região com grande vocação para este tipo de atividade econômica.

1.2.3 O impacto da malária no Estado do Amazonas

Como se pôde observar na figura 5, o Estado do Amazonas é uma área de alto risco para malária. No ano de 2003, detectou-se uma epidemia de malária na capital, Manaus, de proporções nunca antes observadas. Neste mesmo ano, Manaus foi responsável por 48,4% do total de casos do Amazonas.

A urbanização não-planejada foi um dos principais elementos na perpetuação do número de casos de malária urbana (131). A Zona Franca de Manaus, com seu pólo industrial, tem sido um grande atrativo ao êxodo do interior do estado. Em 2006, 1.644.688 pessoas viviam em Manaus, correspondendo à metade

da população do estado, de 3.232.319 habitantes. A outra metade estava distribuída entre os demais 61 municípios desta UF (51).

Historicamente, a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), antigo Instituto de Medicina Tropical de Manaus (IMTM), tem sido a unidade de referência para o atendimento dos casos de doenças infecciosas, no estado, desde sua criação, em 1974. Além disso, faz parte da rede de laboratórios de diagnóstico da malária, chegando a notificar, em 1999, 83,7% dos casos de Manaus.

Na tabela 2, pode-se observar uma série histórica do número de casos de malária no Amazonas, e o percentual de casos notificados em Manaus e na FMT-AM. A partir de 2003, observa-se o resultado do processo de descentralização, com menor proporção de casos de malária diagnosticados na FMT-AM.

Na figura 5, observa-se o percentual de internação de pacientes com malária, na FMT-AM, entre 1989 e 2006, por espécie de plasmódio. Ressalta-se na figura o aumento gradual do número de internações de pacientes com malária vivax.

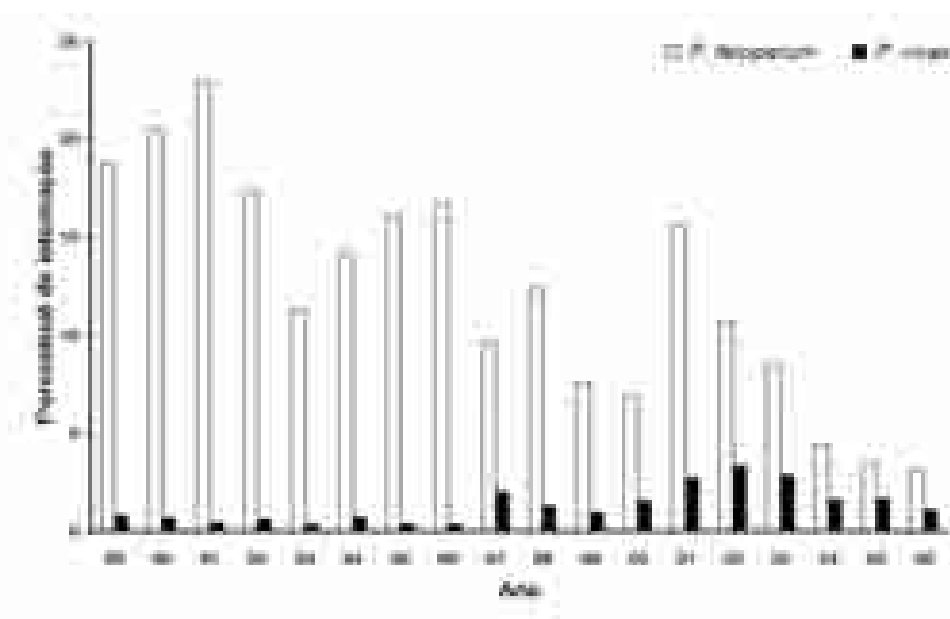


Figura 5: Percentual de internação geral por malária, na FMT-AM, de 1989 a 2006

Tabela 2

Série histórica do número de casos de malária, no Amazonas, em Manaus e na FMT-AM, de 1995 a 2006

Ano	Amazonas	Manaus	% de casos de Manaus ⁽¹⁾	FMT-AM	% de casos da FMT-AM ⁽²⁾
1995	53.953	11.828	21,9	5.765	48,7
1996	70.044	12.593	18,0	6.206	49,3
1997	94.382	21.234	22,5	10.483	49,4
1998	114.748	17.995	15,7	10.854	60,3
1999	167.722	23.861	14,2	19.967	83,7
2000	98.165	18.241	18,6	12.266	67,2
2001	48.655	5.808	11,9	4.315	74,3
2002	70.477	15.865	22,5	8.871	55,9
2003	143.302	69.310	48,4	30.017	43,3
2004	152.273	55.928	36,7	27.169	48,6
2005	227.939	64.115	28,1	31.243	48,7
2006 ⁽³⁾	180.290	51.089	28,3	15.944	31,2

Fonte: SIVEP/Malária, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde

(1) Em relação ao total de casos do Amazonas

(2) Em relação ao total de casos de Manaus

(3) Dados sujeitos à revisão

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS E PATOGÊNESE DA MALÁRIA

1.3.1 Malária não-grave

A diversidade clínica da doença contribuiu para que, em 1881, as observações de organismos no sangue de pacientes com malária, por Alphonse Laveran, fossem vistas com grande ceticismo (333).

A malária, na sua forma mais freqüente, a não-grave, traduz-se clinicamente em uma síndrome febril aguda indiferenciada (139). O paroxismo febril se justifica pela ruptura das hemácias pelos esquizontes, conforme observado no ciclo da doença, na figura 2.

A liberação de endotoxinas durante a ruptura das hemácias promove o estímulo das células do sistema imunitário, culminando com a produção de IL-6 e IL-10, por linfócitos T ativados, e TNF, por monócitos ativados, que produzem, em seu conjunto, a febre e os calafrios característicos da doença (175). Tem-se mostrado igualmente importantes na patogênese da doença, a produção suprafisiológica de óxido nítrico e de moléculas derivadas do próprio parasito, como o glicosilfosfatidilinositol (GPI) (74).

Existe um viés de publicação na divulgação dos dados relacionados à malária não-grave. A maior parte dos trabalhos disponíveis faz menção à forma grave da doença, que cursa com maior letalidade. A freqüência de complicações como a anemia e a plaquetopenia da malária não-grave, p. ex., ainda não foi devidamente estimada.

Mesmo na sua forma não-grave, a patogênese da malária gestacional e placentária ainda merece ampla investigação. Trata-se de uma prioridade a descoberta da razão pelas quais as gestantes são mais infectadas por *P. falciparum*, mesmo em áreas com maior endemicidade por *P. vivax* (231). Nada se conhece sobre o papel da plaquetopenia ou da ativação plaquetária na microvasculatura placentária, exceto que hemácias parasitadas por *P. falciparum* se aderem aos

depósitos de fibrina (308). Os efeitos da infecção materna sobre o concepto também são negligenciados (312).

1.3.2 Malária grave

A malária grave, por ser responsável por grande número de mortes em áreas tropicais, tem sido o alvo da maior parte dos estudos sobre malária. três fatores são tidos como relevantes na virulência dos plasmódios. Inicialmente, a capacidade de multiplicação: para cada esporozoíto de *P. falciparum* que penetra em um hepatócito, formam-se cerca de 40.000 novos merozoítos, enquanto na infecção por *P. vivax*, formam-se apenas 10.000 novos indivíduos; *P. falciparum* forma 24 novos merozoítos/hemácia a cada ciclo sangüíneo, enquanto *P. vivax* forma apenas 15. Também é importante a preferência por determinado estágio de vida da hemácia: *P. vivax* invade apenas reticulócitos, *P. malariae* apenas hemácias senescentes e *P. falciparum* hemácias de diferentes idades. Por fim, destaca-se a capacidade do parasito de produzir citoaderência, mecanismo exclusivo de *P. falciparum*.

Este conjunto de fatores determina, portanto, o desenvolvimento da forma grave da doença, classicamente encontrada na África Sub-Saariana. Além da maior incidência de *P. falciparum*, as inadequadas condições de diagnóstico e tratamento da doença resultam em maiores parasitemias e maior risco de desenvolvimento de complicações.

Assim, quando da infecção por *P. falciparum*, classicamente, alguns

pacientes têm maior chance de desenvolver malária grave, entre eles as crianças, as gestantes e os primoinfectados (pacientes considerados não-imunes) (238).

Ao longo de sua evolução biológica, *P. falciparum* possivelmente desenvolveu mecanismos de escapar à destruição pelo baço. O mecanismo mais relevante foi a capacidade de adesão das hemácias parasitadas ao endotélio microvascular. Este complexo mecanismo de citoaderência envolve a formação de protuberâncias (*knobs*) na superfície das hemácias, a partir de antígenos variantes do parasito (PfEMP1) e antígenos da própria hemácia, além da ativação endotelial, através de mediadores inflamatórios, como o TNF. Esta citocina também exerce importante papel na modulação da fagocitose de hemácias parasitadas, com provável efeito pleiotrópico (252). Os principais receptores endoteliais da ligação de hemácias parasitadas são: CD36, ICAM-1, sulfato de condroitina-A e ácido hialurônico (183). O resultado final é a obstrução de capilares de importantes órgãos como cérebro, pulmão, fígado e rins, cuja anóxia é a base fisiopatogênica do quadro clínico da malária grave. Sem a expressão de receptores no endotélio de órgãos como o baço, p. ex., a obstrução não é observada.

A citoaderência dos parasitos responsáveis pela malária grave deve ser analisada na perspectiva de um mecanismo de evolução. O parasito deve apresentar alta velocidade de multiplicação, pois isso garante sua persistência no interior do hospedeiro e a produção de gametócitos, perpetuando, assim, o ciclo no hospedeiro definitivo, o mosquito. Entretanto, como um evento adverso desta necessidade de perpetuação na natureza, o parasito que tem alta velocidade de

multiplicação estimula maior liberação de toxinas e destruição de hemácias, levando, por outro lado, à morte do hospedeiro intermediário, o homem. Conclui-se, portanto, que *P. vivax*, parasito considerado mais antigo na escala de evolução, em relação a *P. falciparum* (249), conseguiu atingir certo equilíbrio, diminuindo a capacidade de multiplicação, porém, mantendo o hospedeiro vivo. Se, por um lado, perdeu a capacidade de citoaderência aos vasos, o que permitiu maior destruição esplênica, por outro lado, diminuiu a letalidade do hospedeiro intermediário. *P. vivax* contou, ainda, com a vantagem evolutiva de produzir gametócitos de maneira mais precoce, favorecendo sua perpetuação (221).

A complicação grave da doença tem proporcionado internação de vários pacientes em unidades de terapia intensiva, com prognóstico ruim, ainda pelo desconhecimento de uma terapia de suporte eficaz. A única intervenção comprovadamente eficaz na reversão do quadro clínico é o tratamento antimalárico agressivo, com esquizonticidas de ação rápida. Entretanto, acredita-se, há algum tempo, que a patogênese da malária grave se resume à resposta imunitária do hospedeiro, desencadeada pela presença do plasmódio (25). O melhor entendimento dos mecanismos geradores da forma grave poderia contribuir substancialmente para a busca de alternativas de tratamento específico da malária grave (186). Muitas pesquisas ainda se concentram exclusivamente na busca da vacina.

Talvez em função do menor número de estudos clínicos com pacientes graves, ainda não se conhece, p. ex., a razão de crianças apresentarem mais formas

graves cerebrais e os adultos mais formas renais (235).

Apesar de ainda desconhecidos os mecanismos fisiopatogênicos, casos esporádicos de malária vivax grave, inclusive com óbitos, têm sido também relatados em várias partes do mundo, especialmente na Amazônia Ocidental Brasileira (215) e no Sudeste Asiático (185).

Um importante recurso de que dispõe o parasito é a capacidade de se revestir de antígenos variantes, ao longo da infecção. Isso permite um escape eficaz do sistema imunitário. No caso de *P. falciparum*, estão bem descritas as famílias de genes hipervariáveis *var*, *rif*, *stevor* e *Pfmc-2TM* (101). Ainda não se conhecem em detalhes os mecanismos ativadores desta variação antigênica, mas é possível que a expressão de alguns desses antígenos esteja relacionada à maior citoaderência de hemácias aos órgãos. Assim, a variação antigênica tem sido relacionada à virulência do parasito (238). Pela mudança antigênica, o parasito tem a capacidade de modular a citoaderência no curso de uma mesma infecção (58, 101).

Em razão da menor virulência de *P. vivax*, ainda se desconhece o papel dos genes ortólogos *vir* (genes variantes de *P. vivax*), nesta espécie de plasmódio. Os genes codificam proteínas variantes (VIR), que se expressam na superfície dos reticulócitos infectados por *P. vivax*, e foram descritos na região sub-telomérica do parasito, em 2001, por del Portillo e cols. (92). Membros desta família de genes estão predominantemente localizados dentro do domínio subtelomérico da maioria, senão de todos os cromossomos de *P. vivax*. Os genes *vir* estão estruturados em subfamílias conservadas e altamente polimórficas, nas infecções naturais (92, 93).

Recentemente, se evidenciou que existe uma baixa freqüência de indivíduos respondendo a cada antígeno VIR, em áreas endêmicas no Brasil. Este fato pode explicar a susceptibilidade dos hospedeiros a novos episódios da doença (271).

O estudo das subfamílias responsáveis pelas infecções, bem como de possíveis polimorfismos, nos casos graves, seria um primeiro passo na tentativa de avaliar o peso das características moleculares do parasito no desencadeamento de formas clínicas graves.

Os critérios de malária grave por *P. falciparum* foram estabelecidos pela OMS, em 1990, sendo revisados e publicados novamente em 2000 (374). Trata-se de um conjunto de sinais e sintomas clínicos e resultados de exames laboratoriais, que traduzem, clinicamente, o processo de citoaderência das hemácias parasitadas à microcirculação, com conseqüente anóxia tissular (Tabela 3).

Os critérios nem sempre se correlacionam com os achados patológicos, o que tem suscitado a busca de critérios mais específicos.

Em 2000, após estudo com 426 pacientes com malária vivax, em uma unidade de referência para o atendimento de doenças infecciosas, na Amazônia Ocidental Brasileira, Alecrim (11) propôs, pela primeira vez na literatura, uma classificação da malária grave por *P. vivax*, na qual se utilizavam os mesmos critérios de gravidade da OMS para *P. falciparum*, além da ruptura esplênica e da plaquetopenia abaixo de 50.000 plaquetas/ μ L. Nesse estudo, foram identificados 50 pacientes com a forma grave da doença, entre junho de 1997 e julho de 1999.

Tabela 3

Critérios de malária grave por *P. falciparum* ⁽¹⁾

Forma de malária grave	Manifestações clínicas	Achados em exames complementares
Malária cerebral	Prostração, rebaixamento do nível de consciência, convulsões múltiplas ou coma (escore < 9 na escala de coma de Glasgow)	Tomografia computadorizada de crânio normal ou com edema cerebral difuso
Hipoglicemia	Prostração, rebaixamento do nível de consciência, convulsões múltiplas ou coma	Glicemia < 40 mg/dL
Anemia grave	Intensa palidez cutâneo-mucosa e astenia	Hematócrito < 21% em adultos e < 15% em crianças
Malária pulmonar	Angústia respiratória com crepitações à ausculta pulmonar (inicialmente nas bases)	Infiltrado alveolar difuso ou imagem de condensação difusa à radiografia de tórax
Acidose láctica	Angústia respiratória com respiração acidótica	Acidose à gasometria arterial Hiperlactatemia
Malária algida	Síndrome do choque	Pode haver hemocultura positiva para bactérias Gram-negativas
Malária renal	Oligúria (< 400 mL) mesmo após reidratação	Creatinina sérica > 3,0 mg/mL
Coagulação intravascular disseminada (CIVD)	Sangramento de grande relevância	Plaquetopenia, prolongamento de TAP e TTPA, hipofibrinogenemia, aumento dos produtos de degradação da fibrina (PDF) e dímeros-D
Colestase hepática	Icterícia	Bilirrubina sérica total > 5,0 mg/mL
Febre hemoglobinúrica	Colúria intensa	Presença de hemoglobinúria maciça ao exame sumário de urina (EAS)

(1) De acordo com a OMS (374)

Pouco se conhece ainda sobre a capacidade de *P. vivax* de induzir formas clínicas graves, entretanto já se demonstrou, *in vitro*, sua capacidade de formação de rosetas a partir de hemácias parasitadas e não-parasitadas, o que classicamente se sabe para *P. falciparum* (357).

Além das formas graves e não-graves, há formas intermediárias, que não se caracterizam rigorosamente como formas graves, pela ausência de citoaderência à patologia, mas que fogem ao comportamento clínico habitual das formas não-graves. Podemos citar, como exemplos de malária com outras complicações, a rara ocorrência de púrpura trombocitopênica idiopática (ou imune) (PTI) após a infecção por *P. vivax*, relatada apenas três vezes na literatura (192, 345, 363), a esplenomegalia secundária à expansão policlonal de células B, desencadeada por infecções repetidas por plasmódio, conhecida como esplenomegalia tropical (251, 329), e a glomerulonefrite da infecção por *P. malariae*.

Quanto a esta complicação renal, valem a pena algumas considerações, por se tratar de uma complicação mediada por imunocomplexos (IC). Em 1969, Ward e Kibukamusoke publicaram trabalho onde descreviam a realização de imunofluorescência em biópsias renais de crianças com síndrome nefrótica após infecção por *P. malariae*, em Uganda (366). Após a detecção de depósitos glomerulares de IgM e de antígenos de plasmódio, aventou-se a hipótese de que imunocomplexos circulantes (ICC) poderiam estar envolvidos na patogênese da grave lesão renal. A seguir, Allison e cols. confirmaram os mesmos achados em 14 crianças nigerianas, com detecção de depósitos glomerulares de IgM, IgG e

proteínas do complemento (15). Os patologistas classificam a lesão renal em grau I, II ou III, a depender do percentual de glomérulos acometidos (149). Alguns modelos têm sido utilizados para o estudo da patogênese desta complicação, tais como a infecção de *Aotus* por *P. malariae* ou *P. brasilianum*, ou de macaco rhesus por *P. inui* (262). No modelo murino, a infecção de camundongos por *P. berghei* produz a deposição de ICC nos rins e nos pulmões (168). Na realidade, o estudo dos ICC na malária teve como ponto de partida a síndrome nefrótica da infecção por *P. malariae*, mas pouco se avançou no estudo do papel dos ICC em outras freqüentes complicações clínicas da malária.

1.4 ASPECTOS GERAIS SOBRE AS PLAQUETAS

1.4.1 Breve história do estudo das plaquetas

A descrição clínica da coloração violácea da pele (hemorragia) já havia sido feita por Hipócrates, e também por médicos ingleses e alemães do século XVIII (77).

Em 1881 e 1882, os primeiros trabalhos de Bizzozero, médico italiano dedicado ao ensino e à pesquisa em Patologia Geral (364), não apenas descreveram as plaquetas, mas também demonstraram o seu papel na hemostasia e na trombose experimental. Para isso, valeu-se de microscopia intravital em vênulas mesentéricas de cobaias (77). Bizzozero observou que as plaquetas eram pequenas partículas na circulação, em forma de disco (37, 38). O primeiro nome, em italiano, utilizado por ele, em um congresso médico em Turim, foi *piastri* (90). Desde sua descoberta inicial, apesar de não descrita com esse propósito, a plaqueta

já mostrava ser uma partícula de grande importância também na inflamação, pois tinha a capacidade de atrair leucócitos. Mais tarde, se verificaria a produção de agentes quimiotáticos por estas partículas, tais como fator plaquetário de quimiocinas-4 (PF-4), β -tromboglobulina (β -TG) e proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α) (184).

De fato, nas clássicas ilustrações do russo Metchnikoff, que descreveu a fagocitose pela primeira vez, observa-se a presença de pequenas partículas junto aos locais de inflamação, compatíveis com plaquetas. Mais tarde, igualmente, poderia se reconhecer na agregação plaquetária um importante mecanismo de controle da disseminação dos agentes infecciosos (385). Bizzozero descreveu também os megacariócitos na medula óssea, apesar de não ter reconhecido estas células como precursoras das plaquetas (36), o que só seria feito por Wright, em 1906, por simples observação da semelhança entre a forma e a cor dos grânulos violáceos nas plaquetas e nos megacariócitos, usando um corante policrômico (corante de Wright) (382).

A primeira aproximação das plaquetas à patologia humana aconteceu poucos anos depois, pela observação de Sir William Osler, contemporâneo de Bizzozero. Osler estabeleceu o papel das plaquetas, denominadas por ele de "placas" no sangue, na doença trombótica, identificando a presença das mesmas nos trombos brancos, encontrados nas úlceras ateromatosas e nas vegetações das valvas cardíacas (273). Estava lançado o desafio de se compreender a fisiopatogenia de uma das doenças que seria responsável pelo maior número de

mortes, em pessoas de idade avançada, do século XXI, a doença aterosclerótica. A descoberta acidental de que pessoas que usavam ácido acetilssalicílico (AAS) apresentavam maior tempo de sangramento, na década de 1960, proporcionou uma revolução na profilaxia do infarto do miocárdio (120).

O viés da primeira observação, por Osler, da microscopia da doença aterosclerótica, fez com que o estudo das plaquetas em outras doenças fosse, de certa maneira, negligenciado. Em especial na patogênese das doenças infecciosas, pouco foi estudado sobre o papel das plaquetas nos mecanismos de formação dessas doenças, muitas delas com notável acometimento do sistema hematológico.

O papel definitivo das plaquetas na hemostasia humana, entretanto, só foi demonstrado por Duke, um aluno de Whight, em 1910. Um paciente que havia chegado ao Hospital Geral de Massachusetts, em 8 de maio de 1909, com contagem de plaquetas de 6000/ μ L e sangramento de mucosas, só apresentaria melhora da contagem de plaquetas após a transfusão de sangue de um amigo desesperado, que fez a doação de sangue. Duke observou que a diminuição do tempo de sangramento (TS) no lóbulo da orelha se correlacionou com a melhora da contagem de plaquetas, após a transfusão. Seu artigo original foi publicado em 1910, com a descrição clínica do caso anterior e outros dois casos semelhantes, além dos detalhes da técnica de avaliação de plaquetas, que levaria seu nome (99). Mais tarde, ao TS se juntaram a prova do laço (PL) e a própria plaquetimetria, no rol de provas básicas de avaliação da hemostasia primária. A transfusão rotineira de plaquetas, entretanto, enfrentou muitos obstáculos, desde então.

A primeira experiência com sucesso foi observada na transfusão de plaquetas a pacientes com púrpura trombocitopênica após exposição à radiação, em Hiroshima e Nagasaki (84). A transfusão de plaquetas, finalmente, permitiu a viabilidade da quimioterapia anti-neoplásica moderna. Até hoje, a maior parte dos consensos sobre transfusão de plaquetas se baseia em eficácia demonstrada em pacientes oncológicos (300), com uma imensa lacuna no conhecimento sobre a eficácia da transfusão em doenças infecciosas, p. ex. Uma antiga limitação à transfusão de plaquetas estava ligada à dificuldade técnica da separação deste hemocomponente, que necessita de centrifugação diferenciada, temperatura ambiente para o armazenamento e material plástico especial nas bolsas de estocagem, que facilite a troca de gases e a manutenção do pH. Recentemente, tem-se descoberto que o armazenamento prolongado do concentrado de plaquetas pode interferir na eficácia da transfusão, possivelmente em função de apoptose destas partículas, apesar de desprovidas de núcleo (208). Aliás, os poucos trabalhos sobre a ocorrência de apoptose em plaquetas sinaliza a necessidade de mais pesquisa nesta área, uma vez que a apoptose de plaquetas pode também ser um dos mecanismos responsáveis pela plaquetopenia de algumas doenças infecciosas, p. ex., a malária (288). Vencida parte das limitações técnicas, o número de transfusão de plaquetas sofreu um aumento dramático a partir da década de 1980, como resultado dos transplantes de medula óssea.

Os estudos de Harrington e cols. permitiram a identificação do primeiro mecanismo de destruição de plaquetas mediado por fatores humorais. A

transferência passiva de plasma de pacientes com plaquetopenia imune para voluntários sadios, incluindo o próprio Harrington, permitiu estabelecer a associação desta doença com anticorpos auto-imunes (144). Mais tarde, outras formas de plaquetopenia imune seriam descritas, p. ex., durante o uso crônico de heparina (116, 178) ou durante a infecção por HIV (245).

1.4.2 Formação das plaquetas

As plaquetas dos mamíferos são derivadas do citoplasma dos megacariócitos, únicas células hematopoiéticas poliplóides. Em outras espécies animais, todas as células envolvidas na hemostasia e na coagulação sangüínea são nucleadas. A esta célula nucleada que participa da hemostasia de vertebrados não-mamíferos, chamamos *trombócito*. Assim, a palavra *plaqueta* se aplica melhor aos mamíferos, não sendo recomendado para esta classe, portanto, o emprego dos termos *trombócito* ou *trombocitopenia*.

Evolutivamente, há evidências de que a plaqueta representa uma especialização alcançada pelos mamíferos, e como compartilha importantes funções não-hemostáticas com células de mamíferos, é provável que a hemostasia não seja a principal função destas partículas, uma vez que vertebrados não-mamíferos possuem mecanismos hemostáticos eficazes, sem utilizar o eixo megacariócito/trombócito. A diferenciação das plaquetas foi simultânea à formação da placenta, em fêmeas grávidas de mamíferos. Curiosamente, o embrião produz o

fator ativador de plaqueta (PAF), que parece ativar as plaquetas no leito microvascular uterino, sendo indispensável ao processo de implantação (207).

A formação das plaquetas a partir dos megacariócitos acontece por processo de poliploidização nuclear, conhecido por endomitose. Os megacariócitos poliplóides iniciam uma rápida fase de expansão citoplasmática caracterizada pelo desenvolvimento de um sistema de demarcação de membranas e pelo acúmulo de proteínas citoplasmáticas e grânulos essenciais à formação das plaquetas. É importante lembrar que a composição de tais proteínas e grânulos está relacionada, em parte, à composição do plasma. Durante as fases finais, o citoplasma do megacariócito passa por uma reorganização radical, formando prolongamentos filiformes de citoplasmas conhecidos como filópodos ou pró-plaquetas. Na figura 6 está ilustrado o mecanismo da formação das plaquetas a partir dos megacariócitos, cuja diferenciação a partir das unidades formadoras de colônia de granulócitos, eritrócitos, macrófagos e megacariócitos (CFU-GEMM) se dá pela influência das citocinas reguladoras da trombopoiese, nomeadamente trombopoietina (TPO), fator de célula-tronco (SCF), IL-3, IL-6 e IL-11. Os megacariócitos são também abundantes na circulação pulmonar, estimando-se que 250.000 megacariócitos cheguem ao pulmão a cada hora (163).

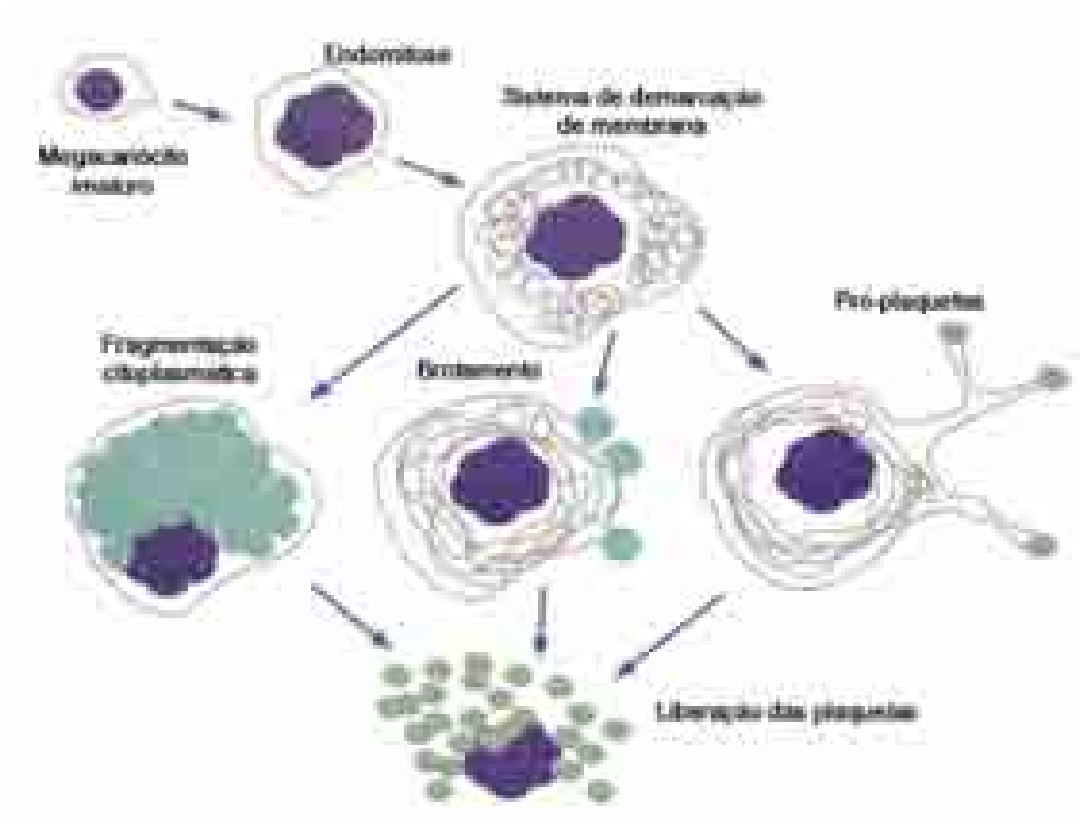


Figura 6: Ilustração onde se observa a seqüência de desenvolvimento dos megacariócitos e a formação das plaquetas. Reproduzida de Italiano Jr e Hartwig, 2002 (163)

1.4.3 Morfologia das plaquetas

Pelo fato de não possuírem núcleo e se originarem da fragmentação citoplasmática dos megacariócitos, as plaquetas, a rigor, não devem ser chamadas de células, preferindo-se, portanto, o termo fragmento ou partícula subcelular. Estes fragmentos têm dimensões de aproximadamente $3,0 \times 0,5 \mu\text{m}$ e permanecem na circulação por volta de 7 dias. Apesar de suas dimensões reduzidas, as plaquetas possuem um sistema canalicular aberto, que são, na verdade, invaginações da membrana. Isso faz com que a superfície de contato das plaquetas com o ambiente plasmático seja igual ou superior ao de células de dimensões muito maiores. Esta

possibilidade de absorver substâncias plasmáticas ou de secretar o conteúdo de seus grânulos no sangue faz a plaqueta parecer uma pequena "esponja", o que justifica sua mudança de conformação nos momentos em que está ativada, quando se desgranula (289).

Na plaqueta ativada, o sistema canalicular serve de caminho para a liberação do conteúdo da fusão dos grânulos citoplasmáticos plaquetários para o sangue. São dois tipos de grânulos: α -grânulos e grânulos densos. Os α -grânulos são maiores, armazenam proteínas adesivas e possuem, nas suas membranas, receptores glicoprotéicos (GP) (59).

Muitas proteínas e receptores estão interiorizados nestes grânulos, na plaqueta em repouso, mas quando há ativação plaquetária, proteínas como P-selectina, GPIb/IX/V (receptor para fator von Willebrand-vWF) e GPIIb/IIIa (receptor para fibrinogênio) ficam expressas na membrana externa da plaqueta. Nos grânulos densos estão armazenados importantes agentes solúveis ativadores da plaqueta, como adenosina difosfato (ADP) e serotonina.

O citoesqueleto, composto de três lâminas de espectrina, microtúbulos e actina, é responsável por manter a forma discóide da plaqueta.

Na figura 7, vê-se a representação, em microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, de uma plaqueta ativada. Na mesma figura, é possível observar os grânulos eletrondensos e uma exuberante rede canalicular no interior da plaqueta. Externamente, os pequenos fragmentos são as micropartículas, que nada

mais são do que grânulos inteiros secretados pela plaqueta, por ocasião de sua ativação.

Plaquetas maiores do que 5 μm são chamadas de megaplaquetas, sendo encontradas na circulação periférica quando há produção mais acentuada de plaquetas pelos megacariócitos, geralmente quando há destruição periférica destas partículas, e está preservada a integridade das células progenitoras, na medula óssea. Trata-se de um mecanismo vicariante. Habitualmente, o exame de hemograma de rotina, além de fornecer a contagem total de plaquetas, também disponibiliza, em caso de aparelhos automatizados, importantes parâmetros do volume plaquetário, como o volume plaquetário médio (VPM). Assim, mesmo que não se identifique a presença de megaplaquetas ao esfregaço, é possível detectar o aumento do volume das plaquetas indiretamente, pelo aumento do VPM. As megaplaquetas também possuem maior quantidade de grânulos, o que aumenta, por conseqüência, sua capacidade de adesão e de agregação.

1.4.4 Fisiologia das plaquetas

Considera-se como hemostasia primária a capacidade de adesão e agregação das plaquetas, após ruptura do endotélio e exposição do colágeno da membrana basal e do vWF endotelial. Adesão plaquetária é a capacidade de ligação da plaqueta à parede do vaso, através da ligação do GPIb/IX/V ao vWF. Agregação se resume à capacidade de plaquetas se unirem firmemente, formando um tampão

plaquetário, através da ligação de seus receptores GPIIb/IIIa, através do fibrinogênio circulante (147).

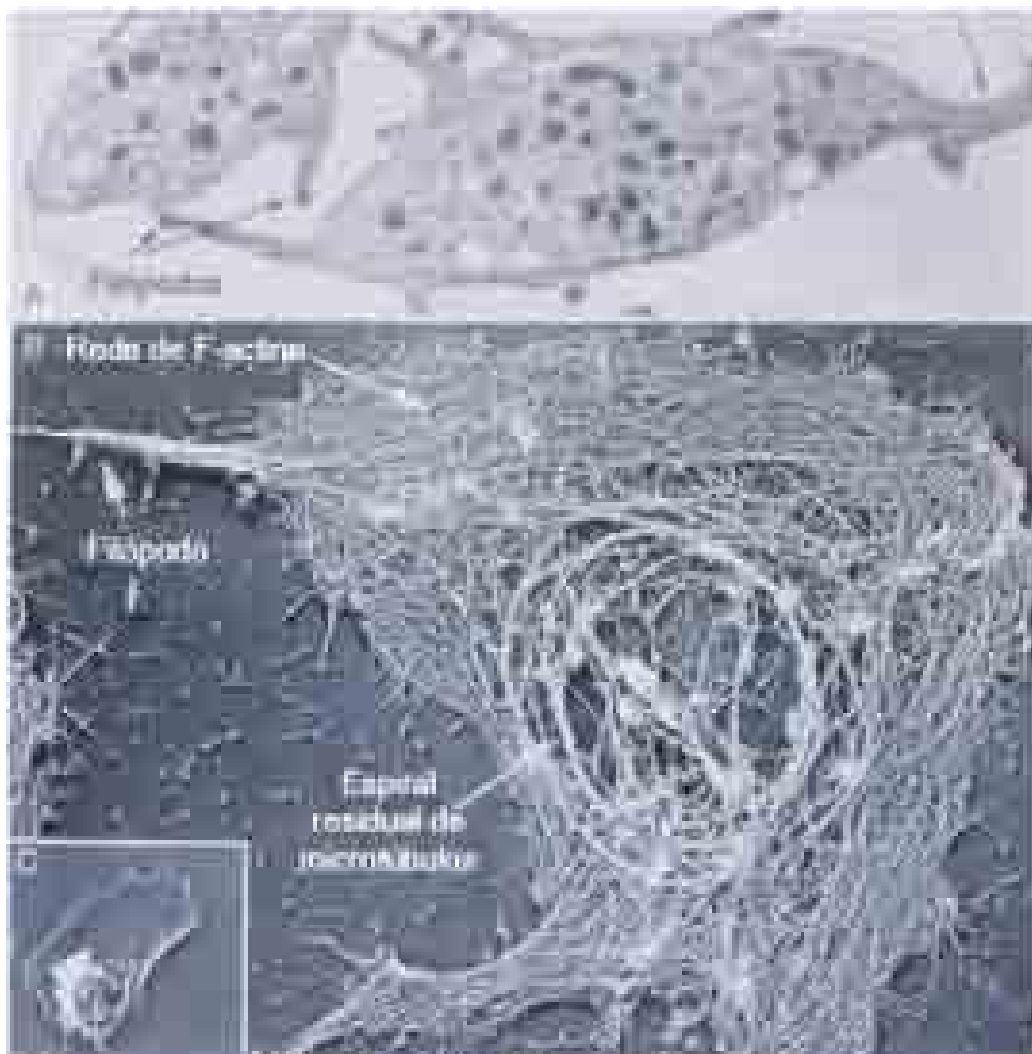


Figura 7: Ilustração onde se vê microscopia eletrônica de transmissão de plaquetas ativadas por trombina, com projeções (filópodos) (A); microscopia eletrônica de varredura evidenciando a imensa rede canalicular interna das plaquetas, rica em F-actina (B); e a superfície de uma plaqueta ativada (C). Reproduzida de Hartwig, 2002 (146).

A forma discóide da plaqueta permite o posicionamento destes fragmentos próximo ao endotélio vascular, na periferia do fluxo sanguíneo laminar, o que facilita sua pronta mobilização em resposta ao dano da parede vascular. As plaquetas não

duram mais de 10 dias na circulação periférica, e sua capacidade hemostática é inversamente proporcional ao tempo decorrido desde sua liberação a partir da medula óssea. Assim, plaquetas mais jovens, incluindo as plaquetas reticuladas (plaquetas com resíduo de RNA, análogas dos reticulócitos, para a série vermelha) possuem maior capacidade hemostática (145).

A avaliação fisiológica de agregação plaquetária pode ser realizada *in vitro*, a partir da técnica de agregometria, cujo princípio foi descrito há mais de 40 anos, por Gustav Born. A técnica tem importante utilidade clínica na avaliação da resposta clínica a antiagregantes plaquetários, mas também tem sido utilizada com sucesso na pesquisa experimental (52). São comumente utilizados como agonistas da agregação: ADP, colágeno, epinefrina, ácido araquidônico e ristocetina. A ristocetina é um antibiótico glicoprotéico, retirado do mercado, no passado, porque causava aumento da agregação plaquetária nos pacientes. A ristocetina promove a interação entre vWF e GPIa plaquetária, promovendo intensa agregação, sendo permitido seu uso, na atualidade, apenas nos testes de agregação plaquetária *in vitro*. É de grande utilidade no diagnóstico laboratorial da doença de von Willebrand.

Quando há a ruptura de pequenos vasos, a hemostasia primária é suficiente para o controle da hemorragia. Entretanto, na ocorrência de lesões em vasos de maior calibre, é necessária a participação da hemostasia secundária, com ativação da cascata de coagulação. Assim, a deficiência do número ou da função das plaquetas costuma acarretar sangramento em pequenos vasos (sangramentos leves), enquanto a deficiência de um ou mais componentes da cascata de

coagulação costuma ter como manifestação clínica o sangramento de médios e grandes vasos (sangramentos de maior volume) (78).

Portanto, na prática clínica, gengivorragia e petéquias, p. ex., devem sinalizar uma deficiência plaquetária (ou da parede dos vasos). Sangramentos mais exuberantes, como hematêmese, hemoptise, hematoma ou hematoquezia, devem levantar a suspeita de deficiência da cascata de coagulação, ainda que em algumas situações, haja comprometimento simultâneo da hemostasia primária e secundária, como acontece na CIVD. O comprometimento da cascata de coagulação pode ser avaliado por testes laboratoriais relativamente simples, como o tempo de coagulação (TC), o tempo de atividade de protrombina (TAP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) (130).

Tal qual as células do corpo, é possível conhecer a função de uma célula pelos seus receptores. As plaquetas possuem em sua superfície grande quantidade de integrinas, que consistem de heterodímeros de subunidades α e β , associados covalentemente. A principal integrina plaquetária é o complexo GPIIb/IIIa, única integrina expressa exclusivamente em plaquetas. Fala-se em complexo, pois o receptor é formado pela associação de duas GP, a GPIIb e a GPIIIa. Outro receptor importante para a adesão plaquetária é GPIb/IX/V.

Na tabela 4, estão listados os receptores plaquetários descritos até o momento.

O CD47 se liga ao domínio celular das TSP, que foi a primeira molécula descrita a participar da citoaderência induzida pela infecção por *P. falciparum* (303).

Os receptores plaquetários GPIIb (CD36) são os mesmos receptores envolvidos na citoaderência de hemácias parasitadas por *P. falciparum* a vários órgãos-alvos da malária grave (324).

Em função destas evidências, há algum tempo se especula a participação das plaquetas na fisiopatogenia da malária grave por *P. falciparum* (73, 81, 82, 134, 266).

A diversidade de receptores encontrados nas plaquetas sugere a interação destas partículas com células do sangue, sistema imunitário, sistema endócrino e sistema nervoso.

Em virtude do grande número de estudos realizados com plaquetas em modelos murinos, é importante comentar que existem algumas diferenças fundamentais entre plaquetas e megacariócitos humanos e os correspondentes murinos. Em camundongos, p. ex., a contagem normal de plaquetas é de 1000 a $1500 \times 10^9/L$, além de apresentarem menor diâmetro, menor volume e menor tempo de vida. A densidade de megacariócitos na medula óssea, em camundongos, é o dobro da densidade em humanos (318). Portanto, a plaquetimetria em estudos com plaquetas em modelo experimental não pode ser comparada a dos estudos clínicos, em termos absolutos. Alguns resultados, por outro lado, podem ser extrapolados, tendo em vista a semelhança entre alguns receptores plaquetários de plaquetas murinas e humanas.

Tabela 4

Receptores plaquetários, por grupos e famílias, e seus respectivos ligantes⁽¹⁾

Grupos de receptores	Famílias de receptores	Receptor	Ligante	
Integrinas	β_3	GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) $\alpha_v\beta_3$	Fibronectina, fibrinogênio, vWF Vitronectina	
	β_1	GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$) $\alpha_5\beta_1$	Colágeno Fibronectina	
		$\alpha_6\beta_1$	Laminina	
	β_2	$\alpha_L\beta_2$	Caspases	
Com repetições ricas em leucina	-	GPIb/IX/V	vWF	
Receptores transmembrânicos	Receptores de trombina	PAR1, PAR2, PAR3 e PAR4	Trombina	
	Receptores de ADP	P2Y ₁ e P2Y ₂	ADP	
	Receptores de prostaglandinas	Receptores de TXA ₂ /PGH ₂	Receptor de PGI ₂	TXA ₂ /PGH ₂ PGI ₂
		Receptor de PGD ₂	PGD ₂	
		Receptor de PGE ₂	PGE ₂	
	Receptores lipídicos	Receptor de PAF	PAF	
Receptor de ácido lisofosfatídico		Ácido lisofosfatídico		
Receptores de quimiocinas	CXCR4	SDF-1		
	CCR4	TARC, MDC		
	CCR1 e CCR3	RANTES		
Miscelânea	Receptor de V _{1a}	Vasopressina		
	Receptor de A _{2a}	Adenosina		
	Receptor de β_2	Epinefrina		
	Receptor de 5-HT _{2A}	Serotonina		
	Receptor de D3 e D5	Dopamina		

Tabela 4 (cont.)

Receptores plaquetários, por grupos e famílias, e seus respectivos ligantes⁽¹⁾

Grupos de receptores	Famílias de receptores	Receptor	Ligante
Imunoglobulinas	-	GPVI	Fc γ
	-	Receptor de Fc γ RIIA	Fc γ RIIA
	-	Receptor de Fc ϵ RI	Fc ϵ RI
	-	PTA-1 (TLISA1, DNAM-1, CD226)	?
	-	JAM-1 (F11)	Formação de <i>tight junctions</i> endoteliais
	-	ICAM-2 (CD102)	Neutrófilos
	-	PECAM-1	Colágeno
	-	CD47	TSP
Selectinas	-	P-selectina (CD62P)	Carboidratos
Tetraspasminas	-	CD9	?
	-	CD63	?
	-	CD82	?
	-	PETA-3 (CD151)	?
Proteínas ancoradas por GPI	-	CD55	?
	-	CD59	?
	-	CD109	?
	-	PrPC	?
Receptores carreadores de glicosaminoglicanas	-	Sindecán	Heparina
	-	Perlicán	Sulfato de condroitina
Receptores de tirosina cinase	-	<i>c-mpl</i> (CD110)	TPO
	-	<i>Tie-1</i>	Angiopietina-1
	-	Receptor de insulina	Insulina
	-	Receptor de PDGF	PDGF

Tabela 4 (cont.)

Receptores plaquetários, por grupos e famílias, e seus respectivos ligantes⁽¹⁾

Grupos de receptores	Famílias de receptores	Receptor	Ligante
Miscelânea	-	GPIV, GPIIb (CD36)	Colágeno e TSP
	-	Receptor de C1q	C1q
	-	Proteína ligadora de C3	C3
	-	Receptor de recaptção de serotonina	Serotonina
	-	LAMP-1 (CD107a)	?
	-	LAMP-2 (CD107b)	
	-	Ligante de CD40 (CD40L, CD154)	CD40
	-	P2X ₁	ADP (?)
	-	Receptor de colágeno I	Colágeno I
	-	Receptor de colágeno III	Colágeno III
	-	Receptores de <i>tight junction</i>	?

(1) De acordo com Clemetson, 2002 (75)

Receptores GPIIIa de plaquetas de camundongos C57BL/6 têm 83% de homologia com os mesmos receptores humanos (257).

Nos modelos de malária em primatas não-humanos, o modelo do *Aotus* parece ser mais consistente do que o do *Saimiri*, em relação às variáveis hematológicas, incluindo as alterações plaquetárias (171).

Possivelmente, um dos vieses no estudo das plaquetas na patogênese da malária grave está relacionado ao conceito de que a plaqueta é uma partícula essencial apenas à hemostasia primária. Entretanto, mais recentemente, depois da

descoberta de que o AAS, um potente antiinflamatório, inibe a agregação plaquetária (230), tem-se demonstrado que as plaquetas atuam de forma decisiva na inflamação, constituindo importante parte da imunidade adaptativa (104).

Tem-se demonstrado que algumas substâncias, muitas delas presentes em nossa dieta desde a Antigüidade (122), possuem a capacidade de inibir a agregação plaquetária. Duas ervas (bulbos) têm sido as mais estudadas, o alho (*Allium sativum*) e a cebola (*Allium allium*), possivelmente em função de seu uso consagrado na culinária. O alho possui capacidade antiagregante muito superior à da cebola, por apresentar maior quantidade de compostos sulfurados (220, 295, 351).

1.5 DOENÇAS INFECCIOSAS QUE EVOLUEM COM PLAQUETOPENIA

1.5.1 Plaquetopenia nas doenças infecciosas de evolução crônica

A plaquetopenia crônica é encontrada em cerca de 10% dos pacientes com infecção por HIV, e em um terço dos pacientes com AIDS (316).

No mesmo grupo de pacientes homossexuais em que se diagnosticou sarcoma de Kaposi, na Clínica Oncológica do Hospital Bellevue, da Universidade de Nova York (NYU), em novembro de 1980, detectou-se uma "epidemia" de plaquetopenia. Todos apresentavam aumento de megacariócitos na medula óssea, sem esplenomegalia e sem outras doenças que justificassem a alteração hematológica. Os casos foram classificados como PTI (173).

A PTI envolve a produção de auto-anticorpos anti-plaquetários, após fagocitose de plaquetas (34) (Figura 8).

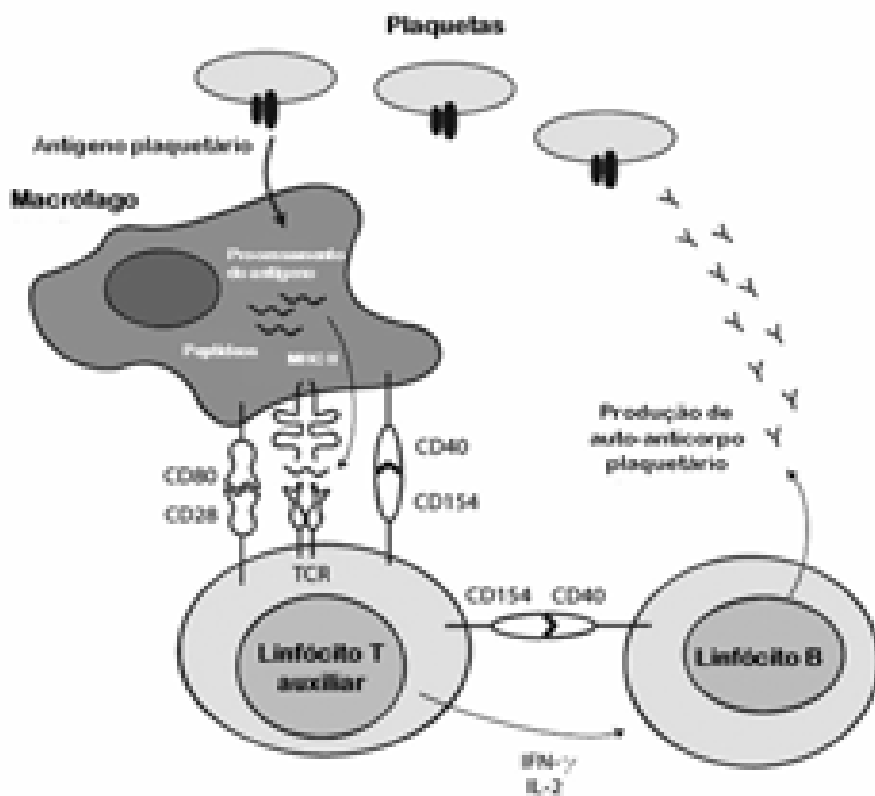


Figura 8: Ilustração do papel da fagocitose na patogênese da PTI, desencadeando a formação de auto-anticorpos plaquetários. Reproduzida de Beardsley, 2006 (34)

Desde então, nos pacientes com infecção por HIV, o desenvolvimento de PTI tem sido relatado com freqüência. A PTI se caracteriza por plaquetopenia, hemoglobina e leucograma normais e ausência de hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia ou outra causa aparente de plaquetopenia (173). Em 1992, já se sugeria a importância dos linfócitos B CD5⁺ na destruição das plaquetas, via ICC contendo IgM (189). Em seguida, demonstrou-se que os ICC de pacientes com HIV e PTI induziam a formação de rosetas entre plaquetas e monócitos, via

complemento e integrinas (160). O mesmo grupo, da NYU, demonstrou, em 1995, que a plaquetopenia nestes pacientes estava associada à presença de IgG anti-GPIIIa no soro (174). Em 1997, estabeleceu-se a associação da destruição das plaquetas com a presença de IgG dirigida contra seqüência específica de aminoácidos da GPIIIa (GPIIIa₄₉₋₆₆) (257). O mecanismo desta destruição não envolvia a participação do complemento, mas sim a geração de peróxido de hidrogênio, induzida pelos auto-anticorpos. Foram realizados experimentos *in vitro*, com inibidores de espécies reativas de oxigênio, e experimentos *in vivo*, com camundongos deficientes em oxidase de fagócitos p47 (p47-phox) (256). A lise de plaquetas, mediada por peróxido de hidrogênio e induzida por anticorpo, depende das vias da 12-lipoxigenase e da NADPH-oxidase plaquetárias (255).

Mais recentemente, foi sugerido mecanismo de mímica molecular entre regiões polimórficas de HIV-1, em especial o *nef*, e a GPIIIa₄₉₋₆₆ (211). Na verdade, não foi a primeira vez em que se tentou estabelecer mímica molecular entre componentes plaquetários e proteínas de HIV. Em 2001, se estabeleceram várias semelhanças entre gp120, proteína do envelope externo de HIV, e C1q, que se liga ao receptor de C1q na superfície de plaquetas (343).

O tratamento de PTI, em geral, é realizado com a própria terapia anti-retroviral de alta potência (HAART), o que sugere que a presença do vírus na circulação seja um dos fatores importantes na perpetuação da destruição plaquetária (60).

Outras doenças de evolução crônica que podem cursar com plaquetopenia são as hepatites virais crônicas. Pacientes cirróticos parecem desenvolver plaquetopenia mediada pela presença de ICC, de forma semelhante ao que ocorre na PTI dos pacientes com HIV (313).

O trabalho de Doi e cols., em 2002, demonstrou que a plaquetopenia de pacientes com doença hepática viral crônica está relacionada ao aumento de IgG associada às plaquetas (PAIgG). Foram também encontrados anticorpos anti-GPIIb em 5,4% dos pacientes estudados (97).

Nos pacientes com doença crônica por HCV, observa-se maior gravidade da plaquetopenia, o que pode estar relacionado a bloqueio direto da maturação dos megacariócitos por RNA viral (16).

Outra doença de evolução subaguda ou crônica, que também cursa com plaquetopenia, é leishmaniose visceral. Apesar do efeito direto sobre megacariócitos, na medula óssea, o parasito parece também desencadear a formação de IgG e IgM anti-plaquetária, no modelo canino de infecção por *Leishmania infantum* (349).

Mais uma vez se verifica que a relação dos microorganismos com as plaquetas é freqüente, e parece seguir um determinado padrão, motivo pelo qual modelos já demonstrados em uma determinada infecção devem ser testados para outras infecções com complicações clínicas semelhantes.

1.5.2 Plaquetopenia nas doenças infecciosas de evolução aguda

Várias doenças infecciosas tropicais de evolução aguda podem cursar com plaquetopenia. Até mesmo pacientes com doenças tropicais não-infecciosas, como acidentes por animais peçonhentos, podem apresentar plaquetopenia. As propriedades de antiagregação plaquetária do veneno de *Bothrops* spp. têm sido, inclusive, amplamente investigadas (8).

A diminuição na quantidade de ácido siálico, na superfície de plaquetas e hemácias, leva à redução da vida média das mesmas. Na infecção aguda por *Trypanosoma cruzi*, observa-se importante plaquetopenia, que tem sido associada à presença da trans-sialidase do parasito (355). As plaquetas também podem estar envolvidas na defesa contra este parasito, liberando substâncias com efeito antiparasitário (114).

Na infecção por qualquer um dos quatro sorotipos de vírus do dengue (DEN), a plaquetopenia pode acontecer tanto nas formas de dengue clássico como nas formas de febre hemorrágica do dengue, sendo, inclusive, um critério diagnóstico desta última forma.

Em trabalho realizado em Manaus, durante a epidemia de dengue de 2001, detectou-se plaquetopenia em 89% dos pacientes, sendo que não houve associação entre contagem de plaquetas e presença de sangramento, sugerindo que a lesão vascular seja a alteração decisiva para a manifestação clínica de hemorragia, nesta doença (247).

Ressalta-se, ainda, a presença de plaquetopenia em importantes doenças, consideradas problemas de saúde pública, como leptospirose (261), febre tifóide (157), hantavirose (314), febre amarela (243) e sepse (35).

1.6 PLAQUETOPENIA NA MALÁRIA

1.6.1 Freqüência e aspectos clínicos da plaquetopenia na malária

Revisão sobre as alterações hematológicas da malária pode ser encontrada no artigo de Wickramasinghe e Abdalla, de 2000 (378). A malária acomete praticamente todas as linhagens do sangue, sendo uma verdadeira doença infecciosa hematológica. Entre suas duas alterações mais freqüentes, estão anemia e plaquetopenia. A anemia tem merecido maior atenção na literatura, pelo potencial de letalidade. Pouco se tem estudado, entretanto, a respeito da plaquetopenia, por ser, isoladamente, de letalidade quase desprezível.

Na recente área do conhecimento de Medicina de Viagem, tem sido um grande desafio, com o explosivo aumento do número de pessoas viajando para áreas tropicais, nas últimas décadas, o diagnóstico da malária, uma vez que o exame da gota espessa de sangue tem grande especificidade, mas apenas quando realizado por pessoa experiente. A plaquetopenia em pacientes com síndrome febril aguda, recém-chegados de áreas tropicais, tem sido apontada como achado clínico de grande sensibilidade para o diagnóstico da malária (86). Um outro trabalho mostrou sensibilidade de 60% e especificidade de 88% da plaquetopenia para o

diagnóstico de malária em pacientes com doença febril aguda (204). Em estudo realizado em Nova York, a sensibilidade da plaquetopenia mais síndrome febril aguda, para o diagnóstico de malária, foi 100%, com especificidade de 70%, valor preditivo positivo de 86% e valor preditivo negativo de 100% (281).

Um relato de série de casos de malária vivax, em 1964, já descrevia a plaquetopenia como complicação freqüente na infecção por esta espécie. As contagens de plaquetas voltaram ao normal durante o tratamento e apenas um dos pacientes apresentou lesões purpúricas no dorso do pé, concomitante à contagem mais baixa de plaquetas (151).

Desde o início da década de 70, há registros de que a plaquetopenia observada na malária é semelhante entre pacientes com *P. vivax* e *P. falciparum* (33).

Em 1903, o recém-formado médico Carlos Chagas, antes mesmo de iniciar os estudos sobre a doença que levaria seu nome, teve aprovada com distinção sua tese inaugural sobre *Estudos Hematológicos no Impaludismo*, desenvolvida no então Instituto de Manguinhos (66). Ao estudar as alterações hematológicas da malária, descreveu detalhes da anemia e das alterações de leucócitos. Como ainda não figurava na literatura a importância das plaquetas, o tema não foi abordado pelo ilustre ex-interno de Clínica Médica do Rio de Janeiro. Entretanto, já descrevia a presença dos megacariócitos na medula óssea, cujo papel ainda seria esclarecido. A seguir, pode-se ler um trecho de sua tese, onde descreve o conhecimento atual, à época, sobre os megacariócitos.

Os megacaryocytes (Howel) são células de grandes dimensões, atingindo às vezes 40 e 50 microm. Encerram um núcleo único, porém constituído, no geral, de lobos diversos, todos ligados por delgados filamentos de cromatina. Distinguem-se assim dos myeloplaxos de Robin, nos quais existem vários núcleos independentes.

Estes elementos estão sempre presentes na medula óssea em actividade hematopoiética, e em número tanto maior quanto mais activa a função formadora da medula. Os megacaryocytes multiplicam-se por divisão directa e mitótica.

Nos casos de hyper-genése medular apresentam-se com certas modificações, sendo dessas as mais frequentes a opacidade maior do núcleo, a coloração basófila mais intensa do protoplasma, o maior entortilhamento do núcleo e sobre tudo o aumento de dimensões.

Tornam-se, além disso, mais abundantes na medula óssea, desde que ella entra em hyper-função (Dominici).

O papel exacto dos megacaryocytes é ainda obscuro. Alguns autores acreditam sejam elles destinados a concorrer na manutenção da estrutura da medula, servindo de apoio ao aparelho de sustentáculo. Outros querem sejam os megacaryocytes origem das hemácias nucleadas e dos myelocytes. Seriam finalmente elementos macrophagos.

Pouca menção fez Carlos Chagas aos sangramentos na malária, em relação aos 46 pacientes que observou, possivelmente em função da raridade desta complicação clínica.

Em Manaus, em 1946, o respeitado médico acreano Djalma Batista descreveu observações a respeito dos casos de malária acompanhados por ele na Santa Casa de Misericórdia, no livro *O Paludismo na Amazônia* (31). Igualmente, não há menção à contagem de plaquetas dos pacientes estudados, no documento, mas há uma importante descrição de casos de pacientes com aparentes distúrbios da hemostasia. Chama a atenção a presença de volumosa esplenomegalia e tempo de sangramento aumentado, no primeiro caso. No segundo, há menção a

gengivorragia freqüente, contudo, o caso clínico descrito não afasta a possibilidade de anemia falciforme como doença de base. É importante notar o cuidado terapêutico e a discussão sobre possível esplenectomia.

Transcreve-se, a seguir, parte de seu minucioso relato.

Observação como esta é coisa trivial na clínica em Manaus:

11^a. Obs. – J.B., sexo feminino, 16 anos, amazonense, branca, solteira, residente no lago do Anvers, município de Manaus. – Entrou na 7^a Enfermaria a 19 de maio de 1940. Doente há cerca de 5 meses, com febre do tipo intermitente. Cinco dias antes de se internar, teve um acesso fortíssimo, matinal, com calafrio, e que demorou mais de 12 horas. No curso da doença foi sentindo o aumento do ventre, sem nenhuma dor.

Mãe falecida de “febre” (sic) e pai de sarampo. Quatro irmãos, todos vivos e sadios. Menarca aos 15 anos.

Tegumentos muito descorados, sobressaindo por causa da alvura da paciente. Nada de anormal para o aparelho circulatório. Pulso 84. Tensão arterial Mx 12 – Mn 7,5. Nenhuma anormalidade para os demais aparelhos.

Baço – duro, aumentado de volume, não doloroso, estendendo-se à linha mediana, na altura da cicatriz umbelical; borda ântero-interna apresentando uma chanfradura. Do limite superior, na linha axilar posterior, ao pólo inferior, media 29 cm.

Fígado – hipertrofiado, não doloroso à palpação. Media 14 cm, na linha hemiclavicular.

HEMOGRAMA (23 DE MAIO)

Hemoglobina	70% (Talqvist)
Hemátias	2.100.000 por mm ³
Leucócitos	7.800
Relação Globular	1/397
Riqueza "	4.588.000
Valor "	1,44
Basófilos	0%
Eosinófilos	15%

Neutrófilos (M-0; J-1; B-7; S-35)	43%
Linfócitos	36%
Monócitos	6%

– Hemátias: Anisocitose; algumas com ponteados basófilos.

Índice de Schilling:	$\frac{1}{4}$
Tempo de Sangria	14'30" (Ivy-Duke)
Tempo de coagulação	1' (em lâmina)

Fizemos na paciente o velho xe. de hemoglobina e a 1ª injeção de adrenalina venosa (método de Ascoli): teve tremores, dor de cabeça, em pontada, bradicardia – 60 p.m.). Alegou melhoras, nos últimos dias de maio, e foi embora.

EPÍCRISE: Impaludada crônica com hêpato-esplenomegalia. A consistência endurecida do baço e a discrasia (a dosagem da hemoglobina, feita por processo inseguro, qual o de Talqvist, comprometeu de certo o índice colorimétrico ou valor globular, tal como foi referido na 9ª observação), além de extraordinário aumento do tempo de hemorragia, fazem pensar num estado irremovível, conseqüente à ação plasmodial sobre o baço, já com sério comprometimento jecoral, traduzido numa hipertrofia de grandes proporções.

O caso seguinte é, outrossim, dos mais expressivos:

12ª Obs. – L. S. L. – 15 anos, parda, solteira, amazonense, arrumadeira, residente à Rua Xavier de Mendonça, int. a 18 de janeiro de 1941. – Teve febre do tipo malárico desde pequena, ficando com uma “inflamação” (sic) no baço, de grandes proporções. Tipo astênico, anêmica, inapetente. Portadora de úlceras tróficas na perna esquerda. Hemorragias gengivais freqüentes. Baço duro e resistente, doloroso, estendendo-se até a fossa ilíaca direita. Fígado sem alteração de volume. – Enquanto esteve internada, padeceu de furunculose. Duas pesquisas de hematorozoários, em pequenas elevações térmicas, negativas. – Tratei-a com medicação cupro-marcial intensa, opoterapia esplênica e hepática injetável, cálcio, vitaminas, em particular o ác. ascórbico, e também quinina, apesar de não ter apresentado nenhum sintoma agudo, além das discretas piroxias citadas.

Sendo impossível, dada a falta em Manaus, intentar a radioterapia indicada, pensei em submeter a paciente a uma

esplenectomia. Mostrei o caso ao cirurgião Dr. João Veiga, que aguardou a autorização para intervir. Procurei fazer u'a medicação pré-operatória, mas atentando nos antecedentes hemorrágicos (pré-escorbuto ou simples estado carencial de vitamina C?), não me animei a tentar a extirpação do baço. – As úlceras da perna cicatrizaram. E a paciente obteve alta, continuando a se internar frequentemente na enfermaria – ora por gripe, ora por causa de reeparição das úlceras. Seu baço, até fins de 1943, quando a encontrei pela última vez, continuava do tamanho anotado há três anos. Estado geral regular.

EPÍCRISE: Grande esplenomegalia, em paludada crônica, com anemia e hemorragias gengivais.

De outras vezes, o acometimento esplênico se traduz apenas por um aumento ao tipo I, de Boyd (palpável o baço no rebordo costal esquerdo) com intensa esplenalgia. Os autores referem que o aumento pode chegar à rutura da cápsula e conseqüente hemorragia, de caráter muita vez mortal, já que só a intervenção de urgência poderá salvar o enfêrmo.

Há muita indefinição sobre a real freqüência de plaquetopenia em pacientes com malária. Os estudos são contraditórios e muitas vezes com pouco cuidado na seleção dos pacientes. Na tabela 5, está detalhada uma análise sistemática de publicações com as respectivas freqüências de plaquetopenia encontradas.

A única informação sobre as manifestações clínicas da plaquetopenia na malária está disponível apenas em relatos de caso, em sua maioria de pacientes com malária vivax (Tabela 6). Não parece existir nenhum trabalho com seleção aleatória de número adequado de pacientes com malária, que estime a freqüência de sangramento, nesta infecção, e sua associação com a plaquetopenia.

Tabela 5

Revisão sistemática de estudos que realizaram contagem de plaquetas, em pacientes com malária

Referência	Local do estudo	Seleção de pacientes	Faixa etária	Espécie	n	% de plaquetopenia (critério)
Mohanty e cols., 1997 (239)	Surat, Índia	Ambulatoriais e internados	Todos	<i>P.v.</i> ⁽¹⁾	24	29,0% (<150.000/ μ L)
				<i>P.f.</i>	76	39,0% (<150.000/ μ L)
Noronha, 1998 (263)	Manaus (AM), Brasil	Ambulatoriais e internados	<14 anos	<i>P.f.</i>	54	51,8% (<150.000/ μ L)
Kortepeter e Brown, 1998 (188)	Havaí, EUA (viajantes)	Ambulatoriais e internados	>18 anos	<i>P.f./P.v.</i>	79	74,0% (<150.000/ μ L)
Murthy e cols., 1998 (254)	Hyderabad, Índia	Internados	10-80 anos	<i>P.f.</i>	158	40,5% (<150.000/ μ L)
Gonzalez e cols., 2000 (132)	Medellín, Colômbia	Internados	Todos	<i>P.f.</i>	113	33,6% (<150.000/ μ L)
				<i>P.v.</i>	128	39,0% (<150.000/ μ L)
Alecrim, 2000 (11)	Manaus (AM), Brasil	Internados	>12 anos	<i>P.v.</i>	73	91,8% (<150.000/ μ L)
		Ambulatoriais			319	60,8% (<150.000/ μ L)
Silva e cols., 2000 (327)	Manaus (AM), Brasil	Internados	Todos	<i>P.v.</i>	429	46,6% (<140.000/ μ L)

Tabela 5 (cont.)

Revisão sistemática de estudos que realizaram contagem de plaquetas, em pacientes com malária

Referência	Local do estudo	Seleção de pacientes	Faixa etária	Espécie	n	% de plaquetopenia (critério)
Oh e cols., 2001 (267)	Coréia do Sul	Ambulatoriais e internados	> 17 anos	<i>P.v.</i>	101	85,1% (<150.000/ μ L)
Robinson e cols., 2001 (304)	Melbourne, Austrália (viajantes)	Internados	ND ⁽²⁾	<i>P.f./ P.v./P.o.</i>	246	71,0% (<150.000/ μ L)
Mourão e cols., 2001 (248)	Manaus (AM), Brasil	Internados	<12 anos	<i>P.f.</i>	255	73,7% (<150.000/ μ L)
Lacerda e cols., 2001 (198)	Manaus (AM), Brasil	Internados	>12 anos	<i>P.f.</i>	218	87,6% (<150.000/ μ L)
Ladhani e cols., 2002 (200)	Quênia	Internados	Crianças	<i>P.f.</i>	1369	56,7% (<150.000/ μ L)
Park e cols., 2002 (278)	São Paulo (SP), Brasil (viajantes)	Internados	Todas	<i>P.v.</i>	237	61,6% ND
Mohapatra e cols., 2002 (242)	Orissa, Índia	Ambulatoriais e internados	15-60 anos	<i>P.v.</i>	110	3,6% (<100.000/ μ L)
Bashawri e cols., 2002 (30)	Al-Khobar, Arábia Saudita	Ambulatoriais e internados	2 meses – 74 anos	<i>P.v./P.f.</i>	727	55,6% (<150.000/ μ L)
Araújo Filho e cols., 2003 (23)	Goiânia (GO), Brasil	Ambulatoriais e internados	4-64 anos	<i>P.v.</i>	68	20,6% (<50.000/ μ L)

Tabela 5 (cont.)

Revisão sistemática de estudos que realizaram contagem de plaquetas, em pacientes com malária

Referência	Local do estudo	Seleção de pacientes	Faixa etária	Espécie	n	% de plaquetopenia (critério)
Echeverri e cols., 2003 (102)	Turbo, Colômbia	Ambulatoriais	Todas	<i>P.v.</i>	104	8,0% (<130.000/ μ L)
Jadhav e cols., 2004 (164)	Índia	Ambulatoriais e internados	Todas	<i>P.v.</i>	973	65,0% (50.000 -150.000/ μ L)
				<i>P.f.</i>	590	50,0% (50.000 -150.000/ μ L)
Marques, 2004 (228)	Manaus (AM), Brasil	Ambulatoriais e internados	>15 anos	<i>P.f.</i>	44	79,0% (<150.000/ μ L)
				<i>P.v.</i>	106	94,0% (<150.000/ μ L)
Rodríguez-Morales e cols., 2005 (306)	Sucre, Venezuela	ND	ND	<i>P.v.</i>	116	87,6% (<150.000/ μ L)
Rodríguez-Morales e cols., 2005 (305)	Sucre, Venezuela	Internados	<12 anos	<i>P.v.</i>	78	58,9% (<150.000/ μ L)
Casals-Pascual e cols., 2006 (63)	Kilifi, Quênia	Ambulatoriais e internados	6 meses - 10 anos	<i>P.f.</i>	120	34,4% (<150.000/ μ L)
Kumar e cols., 2006 (191)	Nova Deli, Índia	Ambulatoriais e internados	Todas	<i>P.v.</i>	27	88,8% (<150.000/ μ L)

(1) *P.v.* (*P. vivax*); *P.f.* (*P. falciparum*); *P.o.* (*P. ovale*)

(2) ND (não disponível)

Tabela 6

Revisão sistemática de relatos de casos de malária por *P. vivax* com plaquetopenia

Referência	Procedência do caso	Plaquetimetria (x1000/ μ L)	Presença de sangramento	Transfusão de plaquetas	Observação
Hill e cols., 1964 (151)	EUA (9 casos)	20-49	Petéquias (1/9)	Não	Infecção experimental
Takaki e cols., 1991 (344)	Ilhas Salomão	ND	ND	ND	CIVD
Anstey e cols. 1992 (20)	Bali	22	Não	Não	-
Ohtaka e cols., 1993 (268)	ND	ND	ND	ND	Aumento de PAIgG
Yamaguchi e cols., 1997 (383)	Tailândia e Sri Lanka (2 casos)	22 e 53	Não	Não	Aumento de PAIgG
Victoria e cols., 1998 (363)	Brasil	1	Múltiplos	Sim	PTI
Kakar e cols., 1999 (170)	Índia	5	Não	Não	-
Makkar e cols., 2002 (223)	Índia	8	Gengivorragia	Sim	Aumento de TAP e TTPA
Holland e cols., 2004 (155)	México	19	Epistaxe	Sim	-
Lacerda e cols., 2004 (192)	Brasil	1	Gengivorragia	Sim	PTI
Aggarwal e cols., 2005 (4)	Índia	6	Petéquias	Sim	-
Katira e cols., 2006 (176)	Índia (6 casos)	14-92	Não	Sim (1/6)	-
Komoda e cols., 2006 (187)	América do Sul	15	ND	ND	-
Kaur e cols., 2007 (177)	Índia	30	Não	Não	IRA

Em 2005, de 684 casos de malária hospitalizados na FMT-AM, em Manaus, 138 (20,1%) tiveram como causa exclusiva a plaquetopenia. Isto correspondeu a 6,8% do total de internações por todas as causas. A hospitalização, nestes casos, não apresenta benefício comprovado, o que pode aumentar, desnecessariamente, os custos para as instituições públicas de saúde.

1.6.2 Patogênese da plaquetopenia na malária

1.6.2.1 Distúrbios da coagulação

Em 1967, estudo publicado com 31 soldados americanos procedentes do Vietnã, hospitalizados no Hospital Geral Walter Reed, em Washington (EUA), com malária falciparum resistente à cloroquina, verificou que na fase aguda da doença, tendo os mesmos pacientes como controles durante a fase de convalescença, havia diminuição de plaquetas, diminuição do percentual de TAP, aumento do TTPA, fibrinogênio normal e diminuição de fatores V, VII e VIII (94). O relato, com bom acompanhamento clínico, trata a plaquetopenia no rol de alterações da coagulação na malária, sugerindo que a plaquetopenia poderia ser apenas uma consequência do distúrbio de coagulação apresentado por estes pacientes.

Em 1975, Srichaikul e cols. relataram 21 pacientes com malária falciparum, tendo seis deles desenvolvido CIVD. Os autores observaram que os casos com plaquetopenia mais intensa eram justamente os que apresentavam CIVD. Observou-se também correlação entre contagem de plaquetas e proteína C3. Entretanto,

também foi observada uma queda de C3 na mesma proporção da queda da parasitemia, fazendo acreditar que C3 poderia não estar relacionada com a plaquetopenia, de forma independente (339).

Em Manaus, em 2004, estudo realizado em pacientes com malária vivax e falciparum, demonstrou correlação negativa entre contagem de plaquetas e complexo trombina-anti-trombina (TAT) e dímeros-D, sugerindo que a ativação da coagulação pode, em parte, ser responsável pela plaquetopenia (229).

1.6.2.2 Esplenomegalia

O baço, na malária, tem sido visto muito mais como um órgão de fundamental importância na formação da resposta imunitária contra o plasmódio, além de exercer importante papel no controle da parasitemia, fagocitando hemácias parasitadas (106).

O clássico trabalho de Skudowitz e cols., em 1973, sugeriu que as plaquetas ficavam seqüestradas no baço durante a infecção malárica aguda (332).

No modelo experimental com ratos infectados por *P. chabaudi*, a plaquetopenia estava ausente nos animais esplenectomizados, dando maior credibilidade à teoria de que o baço era essencial ao desenvolvimento da plaquetopenia (371).

O termo hiperesplenismo foi cunhado com o propósito de descrever um quadro clínico de esplenomegalia acompanhado da diminuição da contagem de uma ou mais linhagens celulares periféricas (geralmente revertida após esplenectomia),

em função do seqüestro ou destruição de células do sangue periférico no baço, em doenças de origem hepática, que levavam ao aumento da pressão no sistema portal. Entretanto, com o entendimento, ao longo das últimas décadas, da fisiologia da formação das células do sangue, além do importante papel desempenhado pelos recém-descobertos fatores de crescimento hematopoiéticos, deve-se fazer uma releitura do termo hiperesplenismo (283). Ainda é tomada como dogma, em várias doenças, a teoria de que o simples aumento do baço pode levar à destruição não-específica das células do sangue, ignorando-se o fato de que este órgão tem uma notável organização e controla de forma muito sofisticada a exposição das células que por ele passam, às células responsáveis pela hemocaterese.

Em pacientes com malária, demonstrou-se que o aumento do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) estava associado à plaquetopenia, sugerindo que macrófagos teriam papel fundamental na destruição destas partículas, na malária (206).

Em um dos raros trabalhos em que se avaliou o baço de pacientes falecidos por malária falciparum grave, em comparação com baços de pacientes controles e de pacientes sépticos, verificou-se que existe aumento de células dendríticas no baço de pacientes com malária, além de perda de linfócitos B e diminuição dos macrófagos, nos cordões esplênicos (358). Nada se estudou até o momento sobre o papel destas alterações na gênese da plaquetopenia da malária, apesar da detecção clínica do aumento deste importante órgão imunitário durante a fase aguda da malária (222, 236).

Também não se sabe se a formação de hematomas esplênicos, mais observados nas infecções por *P. vivax*, possuem alguma relação com a plaquetopenia ou algum distúrbio da coagulação (199).

Na malária vivax, chama a atenção o possível papel do baço na expressão dos genes *vir* desta espécie de plasmódio. Del Portillo e cols. propuseram, em 2004, um modelo no qual *P. vivax*, ao passar pelo baço, teria ativada a expressão de suas proteínas polimórficas VIR, transcritas por genes *vir*, a fim de escapar da destruição pelos macrófagos, neste órgão. Por outro lado, as mesmas proteínas permitiriam a ligação das hemácias parasitadas a células de barreira, que criariam um cordão de isolamento na circulação fechada do baço, com seqüestro de grande quantidade de reticulócitos (93).

1.6.2.3 Alterações na medula óssea

Algumas teorias para a plaquetopenia da malária foram propostas com base em observações isoladas. O encontro de trofozoíto de *P. vivax* no interior de plaquetas humanas, demonstrado por Fajardo e cols., em 1974, sugeria que a plaquetopenia da malária pudesse se dever à invasão destas partículas pelo plasmódio, da mesma maneira que ocorre com as hemácias. Os autores não encontraram parasitos no interior de megacariócitos e sugeriram que a penetração plaquetária do parasito ocorria na circulação periférica (113). Entretanto, a observação nunca mais foi confirmada na literatura.

De maneira semelhante, acreditava-se que a presença de parasitos na medula óssea pudesse comprometer a produção de plaquetas pelos megacariócitos, à maneira do que ocorria na série vermelha, onde citocinas da fase aguda da doença proporcionavam importante diseritropoiese (237).

Os poucos estudos com observação direta da medula óssea em pacientes com malária, entretanto, mostraram que a série megacariocítica estava preservada (33, 259). TPO parece estar aumentada na fase aguda da doença, mesmo na vigência de comprometimento hepático (sendo TPO produzida no fígado), o que deixa claro que não há inibição da produção de plaquetas pela medula óssea, na malária (190).

1.6.2.4 Destruição mediada por anticorpos

Ao longo da história do estudo da plaquetopenia da malária, cada vez mais evidências de aumento de PAIgG têm se acumulado. O que nunca ficou claro foi a natureza destes anticorpos, uma vez que as plaquetas possuem anticorpos em seus α -grânulos, e sua simples ativação poderia expressar maior quantidade de anticorpos na superfície. Como parece haver uma hiperatividade plaquetária na malária, seria simplista, mas legítimo, admitir que este aumento de PAIgG não traduzisse necessariamente auto-imunidade.

Relatos de casos esporádicos têm associado a plaquetopenia da malária à presença de auto-anticorpos dirigidos contra GP plaquetárias (80, 277). O estudo de Rios-Orrego e cols., publicado em 2005, descreve a presença de auto-anticorpos

plaquetários no soro de pacientes com plaquetopenia, através de dosagem por citometria de fluxo (302).

Não se pode olvidar, entretanto, que a presença de auto-anticorpos naturais é uma forma comum de defesa do organismo e pode ser detectada após infecções virais, bacterianas ou parasitárias, sem exercer, muitas vezes, qualquer patogenia (88). A mimíca molecular, por outro lado, é vantajosa evolutivamente para os microorganismos, que escapam à agressão imunitária (87). A relação entre malária e auto-imunidade, de fato, não é recente. A primeira associação foi feita com base na observação epidemiológica de que há menos doenças auto-imunes em áreas malarígenas, por Greenwood, em 1968 (138).

A formação de ICC *in vivo*, na malária, bem como em outras infecções virais, bacterianas ou parasitárias, é um processo contínuo, sempre que há o encontro de um anticorpo com um antígeno, de forma específica ou não-específica. A formação destes ICC pode ser o resultado de infecção persistente. O ICC parece modular a resposta imunitária a vários antígenos, além de ficar seqüestrado nos folículos ricos em linfócitos B, podendo ficar aí retidos nas células foliculares dendríticas por longos períodos de tempo. Isto contribui para a formação e perpetuação da resposta de memória dos linfócitos B. Como os ICC formados *in vitro* parecem ser mais potentes do que os ICC formados *in vivo*, os mesmos foram, durante algum tempo, investigados como possíveis alvos de vacinas (89).

O trabalho de Kelton e cols., de 1983, apesar de antigo, tem se mantido como uma das melhores referências sobre a plaquetopenia imuno-mediada da

malária, tendo demonstrado, de maneira muito elegante, que a ligação de antígenos parasitários à superfície das plaquetas ocorre durante a infecção aguda da malária, e a estes antígenos se ligam, secundariamente, anticorpos antimaláricos (179). Os autores não puderam detalhar os antígenos específicos que se ligavam às plaquetas, pois utilizaram o lisado total do parasito, mas sugeriram que a ligação de ICC à superfície das plaquetas era pouco provável, assim como a ligação de IgG a plaquetas danificadas. O que provavelmente acontecia era a formação de IC *in situ*. O esquema proposto por Kelton e cols. está reproduzido na figura 9.

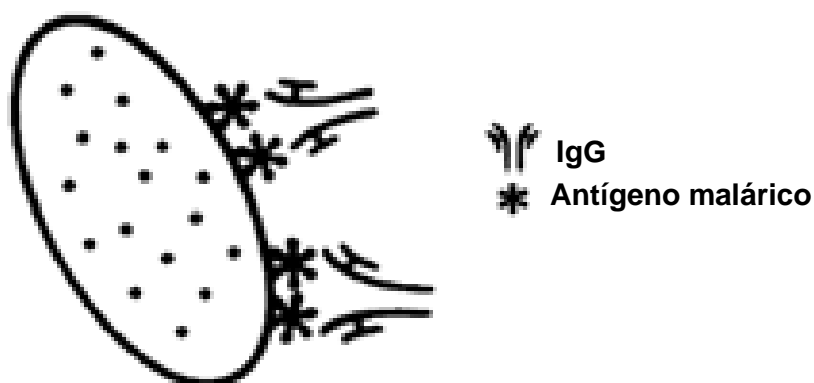


Figura 9: Ilustração da teoria proposta para a plaquetopenia da malária, com formação de IC na superfície das plaquetas. Reproduzida de Kelton e cols., 1983 (179)

Em modelo experimental com *P. berghei*, Grau e cols. mostraram, em 1988, a correlação entre plaquetimetria e PAIgG, além da importância dos linfócitos T CD4⁺ neste processo (135).

Os autores do trabalho se tornariam mais tarde as maiores autoridades no tema, concentrando importantes trabalhos realizados em modelos experimentais.

Em outro estudo, não houve associação entre dosagem de IgM e plaquetopenia (33).

A importância dos ICC, entretanto, sempre esteve obscura quanto ao seu papel na plaquetopenia da malária, tendo, a maioria dos trabalhos, demonstrado seu aumento tanto na malária vivax quanto na malária falciparum, mas com correlações contraditórias com a plaquetopenia (354, 356).

Mesmo que os ICC não estivessem ligados diretamente à destruição de plaquetas, sua reconhecida capacidade imunossupressora ainda não foi explorada como determinante das manifestações clínicas e laboratoriais da malária aguda, incluindo a plaquetopenia (56, 323).

1.6.2.5 Estresse oxidativo

Tem sido demonstrado que os radicais livres podem exercer importante papel na destruição de plaquetas, na malária. Há evidências bioquímicas de que, na malária vivax, a considerável diminuição do colesterol total e frações se deva à peroxidação lipídica que ocorre nesta infecção (107). Ainda na malária vivax, parece haver uma correlação negativa entre contagem de plaquetas periféricas e a peroxidação de lipídios plaquetários, além de correlação positiva com a atividade da glutationa-peroxidase e da superóxido dismutase plaquetárias, consideradas enzimas antioxidantes (108).

Em 103 pacientes estudados com malária falciparum, houve significativa correlação inversa entre a plaquetimetria e intermediários reativos de nitrogênio (315).

Mais recentemente, demonstrou-se que há uma forte correlação inversa entre a contagem de plaquetas de pacientes com malária e a quantidade de glutationa-peroxidase plaquetária, sugerindo um mecanismo de compensação antioxidante, pelas plaquetas submetidas ao estresse oxidativo da infecção malárica aguda (22).

1.6.2.6 Alteração da função de agregação plaquetária

Já em 1981, demonstrava-se a hipersensibilidade das plaquetas de pacientes com malária, quando da adição *in vitro* de ADP (110). Acreditava-se que a liberação de ADP após a hemólise pudesse contribuir para maior agregação plaquetária na malária.

Mais tarde, se verificaria que a incubação de plaquetas com hemácias parasitadas por *P. falciparum* também aumentaria a agregação de plaquetas, *in vitro*, após a adição de ADP e tromboxano A₂ (TXA₂) (162).

Em 1988, o clássico trabalho de Mohanty e cols. verificou, por microscopia eletrônica, que mesmo as plaquetas não estimuladas *in vitro*, coletadas de pacientes com malária vivax e falciparum, apresentavam centralização dos grânulos densos, depleção de glicogênio e formação de filópodos e microagregados, indicando uma ativação *in vivo*, que poderia ser responsável pela plaquetopenia dos pacientes com

malária (240). A hipótese levantada foi a de que plaquetas ativadas ficariam aderidas às paredes dos vasos, diminuindo seu número na periferia, quando da plaquetimetria no sangue periférico, ou seja, como se a plaquetopenia da malária fosse, na realidade, uma pseudo-plaquetopenia.

Dados contraditórios foram apresentados por Srichaikul e cols., no mesmo ano de 1988, quando se evidenciou a diminuição da agregação de plaquetas de pacientes com malária grave, após a adição de ADP *in vitro*, além da melhora da capacidade de agregação após a negativação da parasitemia (338).

A capacidade de drogas antimaláricas diminuírem a capacidade de agregação plaquetária foi demonstrada *in vitro* e *ex vivo* com a cloroquina, apesar de uma grande concentração da droga ter sido necessária *in vitro* para a redução da agregação (85). De toda maneira, estudos clínicos para avaliação da plaquetopenia na malária devem excluir a participação de drogas antimaláricas na patogênese desta complicação.

1.6.2.7 A relação entre plaquetopenia e malária grave

A contagem de plaquetas, apesar de não constituir um critério de malária grave, de acordo com a OMS, tem sido associada à malária falciparum grave (128, 309), apesar do achado não ser consensual (246).

Mais recentemente, também nos casos de malária vivax com complicações, tem-se observado, sistematicamente, o aparecimento de plaquetopenia. Em estudo descritivo de 43 casos de malária vivax grave, em Manaus, a média da contagem de

plaquetas, no dia da admissão, em pacientes graves, foi significativamente menor do que a de pacientes não-graves, sendo que não se observou maior parasitemia ou maior tempo de doença naquele grupo. A coagulação não foi estudada nestes pacientes (12). Em relato de 11 casos de malária vivax considerada grave, no Estado do Maranhão, todos os pacientes apresentaram plaquetopenia e quatro deles desenvolveram plaquetopenia grave (297).

Estudos mais antigos já demonstravam que as plaquetas podiam participar da patogenia das lesões microvasculares da malária, ao se aderirem ao endotélio, quando este era estimulado previamente com TNF (216). Recentemente, se demonstrou um mecanismo de adesão de plaquetas ao endotélio vascular cerebral (mesmo não sendo estimulado por TNF), em modelo experimental, que facilita a adesão também de hemácias parasitadas por *P. falciparum*, através do receptor CD36, presente não apenas no endotélio, mas também nas plaquetas (369). Assim, é como se as plaquetas reorientassem a adesão das hemácias parasitadas ao endotélio, contribuindo de forma decisiva para uma lesão básica que é considerada essencial na malária grave em seres humanos.

A agregação (roseteamento) de hemácias parasitadas, mediada pelos receptores CD36 das plaquetas, tem, de fato, sido reconhecida como importante mecanismo envolvido na malária grave (276). Na Tailândia, observou-se auto-aglutinação de hemácias parasitadas, dependente de plaquetas, em 100% dos casos de malária cerebral humana (72).

A interação entre o CD36 e a TSP resulta em agregação irreversível das plaquetas (225). Considerando que o esporozoítio de plasmódio possui uma proteína pertencente à família das TSP, TRAP, nunca se aventou a possibilidade de que esta proteína do plasmódio, útil na invasão de hepatócitos, pudesse de alguma maneira estimular a agregação plaquetária.

Em modelo experimental com *P. berghei* ANKA, camundongos deficientes em ativadores do plasminogênio tecidual (tPA) e da uroquinase (uPA) tiveram menor seqüestro capilar de plaquetas e também malária menos grave (287).

O bloqueio de GPIIb com anticorpos monoclonais anti-CD41, no primeiro dia da infecção murina por *P. berghei*, também demonstrou que houve maior produção de IL-10, IL-1 α , IL-6, IFN- γ e TNF, e menor letalidade entre os animais, sugerindo que as plaquetas exercem importante controle da resposta imunitária responsável pelas lesões da malária grave (342, 360).

Em estudo realizado com 83 pacientes com diagnóstico de malária vivax, primoinfectados, em Belém (Pará), observou-se correlação inversa significativa entre a contagem de plaquetas e a parasitemia periférica e também entre a contagem de plaquetas e a dosagem sérica de TNF. Não foi encontrada nenhuma relação entre a presença de mutação específica G \rightarrow A na posição 308 da região promotora do gene TNF e aspectos clínicos, parasitemia periférica ou plaquetimetria. Os casos com maior gravidade clínica, e que apresentavam, em paralelo, plaquetopenia mais grave, também tiveram maiores níveis de TNF sérico (326). Entretanto, não foi realizada uma análise multivariada dos dados a fim de estabelecer se havia

correlação inversa entre contagem de plaquetas e TNF sérico, independente da parasitemia periférica e do tempo de doença. Além do mais, estudos transversais dessa natureza não permitem qualquer associação de causalidade, entretanto, há evidências na literatura, a partir de modelos experimentais, de que as plaquetas, ativadas por hemácias parasitadas por *P. falciparum*, podem induzir apoptose em endotélio previamente estimulado por TNF, o que parece ser mediado pela liberação de TGF- β_1 pelas plaquetas ativadas (368, 370).

Assim, parece que, ao menos na malária cerebral por *P. falciparum*, uma das formas mais agressivas de malária grave, a plaqueta tem um papel importante no desencadeamento das lesões endoteliais, mas não de forma isolada. Ressalta-se também que os modelos experimentais mostraram que as lesões endoteliais são prioritariamente induzidas pelo receptor-2 para TNF (TNFR2), sugerindo que as formas transmembrânicas são mais importantes do que as formas solúveis do TNF (217).

Em estudo realizado em crianças do Quênia, com malária falciparum, evidenciou-se correlação inversa significativa, e independente, entre a contagem de plaquetas e IL-10 plasmática (63). A interpretação de tal achado é confusa, porque IL-10 geralmente tem sido associada com proteção contra a malária grave. Especula-se, no referido trabalho, que IL-10 poderia, ao reduzir o número de plaquetas circulantes, evitar a adesão de hemácias parasitadas ao endotélio vascular, como se a plaquetopenia pudesse representar um mecanismo de defesa

contra a malária grave. Em outro trabalho, a plaquetopenia em pacientes com malária vivax esteve associada a aumento de IL-1, IL-6, IL-10 e TGF- β (279).

Em avaliação da concentração de citocinas como TNF e IL-1, em pacientes com malária vivax e falciparum, não se detectou correlação com a contagem de plaquetas (194).

1.6.3 Manejo clínico da plaquetopenia na malária

Não se conhece até o momento a melhor maneira de se conduzir os casos de pacientes com plaquetopenia e malária.

A transfusão de plaquetas tem sido utilizada em casos isolados, na literatura, mas em nenhum deles se identificou uma indicação bem definida. A indicação de transfusão de plaquetas profilática quando a plaquetimetria está abaixo de 10.000/ μ L, provavelmente se aplica apenas nos casos em que a medula óssea não pode fazer uma adequada compensação na produção de novas plaquetas (299), o que não parece ser o caso da malária. Manter contagem de plaquetas entre 50.000 e 100.000/ μ L é uma indicação apenas para pacientes que vão se submeter a procedimento cirúrgico (300).

Em estudo realizado em instituição de atenção terciária para doenças infecciosas, em Manaus, entre abril de 2004 e abril de 2005, verificou-se que 10,4% (20/191) dos pacientes que se submeteram à transfusão de plaquetas tinham diagnóstico de malária (195). A dose variou de 1 a 20 concentrados de plaquetas, em sua maioria, doses muito aquém daquelas recomendadas por Schlossberg e

Herman (317). Dos 17 prontuários de pacientes com malária transfundidos, avaliados retrospectivamente, 10 deles se tratavam de pacientes com algum critério de malária grave. Metade dos casos apresentava malária vivax e a outra metade, diagnóstico de malária falciparum. Curiosamente, ao se tentar estabelecer o critério de transfusão utilizados pelos profissionais que conduziram o caso, verificou-se que 40% dos pacientes foram transfundidos por apresentar plaquetimetria abaixo de 10.000/ μ L e discreto sangramento; 6% apenas em função da plaquetimetria abaixo de 10.000/ μ L; 20% apenas pela observação de discretos sangramentos, e 33% sem qualquer indicação. Em nenhum paciente foi calculado o aumento de contagem corrigido (CCI), que avalia a eficácia da transfusão, pela superfície corporal do paciente.

As dificuldades com a transfusão de plaquetas, no Brasil, já eram demonstradas desde 1990, por de Paula e cols., quando evidenciaram que nos pacientes com alguma infecção, a eficácia da transfusão, medida pelo CCI, era reduzida (91). Na atualidade, estuda-se a possibilidade de uso de plaquetas congeladas, ou liofilizadas, micropartículas e outros substitutos de plaquetas, tais como agentes hemostáticos lipossomais (39).

Há uma necessidade urgente de se conhecer os mecanismos que levam à plaquetopenia da malária, a fim de que a indicação de transfusão nesses pacientes seja definida. Até o momento, não há qualquer evidência para indicar a transfusão de plaquetas na malária, mesmo naqueles casos em que a contagem de plaquetas é muito baixa, sendo seu uso considerado empírico.

Apesar de se acreditar que o principal mecanismo de destruição plaquetária seja imunológico, o uso de corticosteróides, por exemplo, nunca foi aventado para a reversão da plaquetopenia, possivelmente em função da maior parte dos pacientes experimentar recuperação da contagem de plaquetas logo na primeira semana após a negatificação da parasitemia, sem maiores complicações. Nos estudos em que se utilizou dexametasona em pacientes com malária cerebral, o uso deste corticosteróide mostrou piora do número de convulsões e maior sangramento gastrointestinal (153, 367). Em nenhum destes estudos se avaliou a recuperação da contagem de plaquetas como variável de desfecho.

Outros estudos têm se dedicado, mais recentemente, à investigação do papel de imunomoduladores como terapêutica adjuvante na malária (241, 253). A inibição da expressão de moléculas de adesão de hemácias parasitadas e plaquetas tem sido aventada como alternativa para a modulação da inflamação que ocorre na malária (250). A análise da evolução da plaquetopenia, na malária grave, após o uso de pentoxifilina ou talidomida, p. ex., drogas reconhecidamente anti-inflamatórias, moduladoras da produção de TNF, poderia não só contribuir para o entendimento da malária grave, mas também de sua relação com as plaquetas.

2 JUSTIFICATIVA

“No es posible pasar una vida creando concepciones patogénicas sobre una enfermedad o sobre la difusión de una epidemia, que un mejor régimen social hubiera impedido aparecer. El aspecto social predominará en la Medicina de los nuevos tiempos. Menos patogenia discursiva, más campañas profiláticas, mejor legislación de protección social, podría ser nuestro futuro temario”.

A malária é uma doença de alta incidência na Amazônia Brasileira, que afeta principalmente a população economicamente ativa. Em Manaus, foram notificados em 2006, 51.088 casos de malária, o que representou cerca de um terço dos 178.253 casos de malária do Estado do Amazonas, nesse mesmo ano.

A plaquetopenia encontrada na malária é uma complicação freqüente e contribui para o aumento do número, da duração e dos custos das internações. Os dados são controversos na literatura, provavelmente em função da falta de padronização na seleção dos pacientes. Na FMT-AM, unidade de referência para doenças infecciosas no Amazonas, cerca de 21% das internações por malária registradas se deve exclusivamente à presença de plaquetopenia, cujo manejo clínico ainda permanece indefinido.

Pouco se conhece sobre as manifestações clínicas da plaquetopenia, em especial quando a contagem de plaquetas é inferior a 50.000/ μ L. Também não se sabe se há diferenças entre as manifestações clínicas da malária por *P. vivax* e da malária por *P. falciparum*.

Comparativamente, há uma grande quantidade de conhecimento disponível sobre a anemia da malária, mas não se conhecem ainda, em detalhes, os mecanismos determinantes da plaquetopenia. Nenhum estudo de base populacional avaliou adequadamente, até o momento, os fatores ligados ao hospedeiro associados, de forma independente, à plaquetopenia.

As causas da plaquetopenia na malária parecem ser múltiplas, envolvendo possível destruição desencadeada por mecanismos imunitários, além da destruição não-específica pelo baço e a presença de distúrbios de coagulação.

Nunca ficou bem demonstrada a ocorrência de auto-imunidade, apesar de relatos esporádicos de anticorpos contra receptores plaquetários em pacientes com malária.

Os ICC são responsáveis pela glomerulonefrite associada à infecção por *P. malariae*, mas os estudos que avaliaram o papel dos ICC na plaquetopenia são poucos, e os resultados contraditórios.

A falta de conhecimentos sobre a patogênese da plaquetopenia na malária torna seu tratamento de suporte empírico.

O esclarecimento dos mecanismos fisiopatogênicos envolvidos nesta alteração hematológica poderia também contribuir para o entendimento dos mecanismos determinantes da malária complicada, em função da forte associação, já demonstrada, entre plaquetopenia e malária grave.

3 OBJETIVOS

“A existência de uma partícula constante no sangue, diferente das células brancas e vermelhas, tem sido suspeitada por vários autores, já há algum tempo”.

Bizzozero G. Über einen neuen formbestandteil des blutes und dessen rolle bei der thrombose und blutgerinnung. *Virchow's Arch Path Anat Physiol Klin Med* **1882**; 90: 261-332.

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a frequência, as manifestações clínicas e a patogênese da plaquetopenia encontrada em pacientes com malária.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Estimar a frequência e a intensidade da plaquetopenia, em pacientes com malária, na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, em Manaus (Amazonas).

3.2.2 Estudar os fatores associados à ocorrência de plaquetopenia, em pacientes com malária.

3.2.3 Avaliar se há diferença na frequência e na intensidade de plaquetopenia entre pacientes com malária vivax e malária falciparum.

3.2.4 Avaliar a frequência, o tipo, a intensidade e os fatores associados às manifestações clínicas da plaquetopenia da malária.

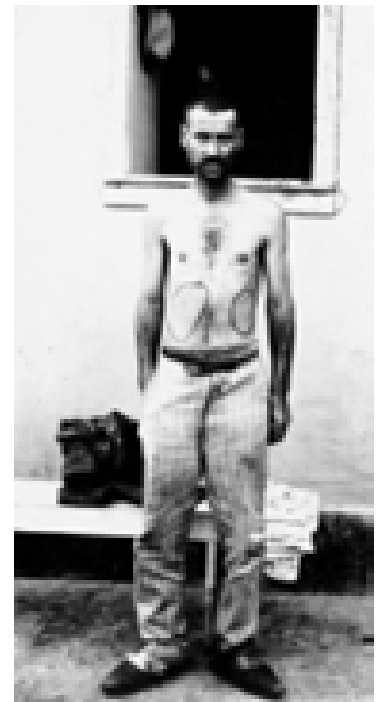
3.2.5 Avaliar o papel dos ICC e da presença de auto-anticorpos plaquetários, semelhantes aos da infecção pelo HIV-1, no desenvolvimento da plaquetopenia associada à malária, *in vitro* e *in vivo*.

3.2.6 Avaliar o papel dos ICC na fagocitose de plaquetas, por células THP-1.

3.2.7 Avaliar se o plasmódio altera, de *per se*, a função de agregação de plaquetas normais *in vitro*.

3.2.8 Verificar se existe associação entre a malária vivax com complicações e o polimorfismo genético das subfamílias dos genes *vir* de *P. vivax*.

4 PACIENTES E MÉTODOS



Paciente com malária e hepatoesplenomegalia.
Posto de profilaxia rural em Merity, Rio de Janeiro.
Entre **1918** e **1922**. Arquivo Belisário Penna,
Casa de Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Hochman G, Mello MT, Santos PR. A malária em foto: imagens de campanhas e ações no Brasil da primeira metade do século XX.
Hist Cienc Saude Manguinhos 2002; Sup.9:233-73.

4.1 TIPOS DE ESTUDO

Estudo transversal tipo série de casos e estudo de casos.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, na Cidade de Manaus (Estado do Amazonas), localizada entre as coordenadas $2^{\circ}57'$ e $3^{\circ}10'$ de latitude Sul e $59^{\circ}53'$ e $60^{\circ}07'$ de longitude Oeste (Figura 10).

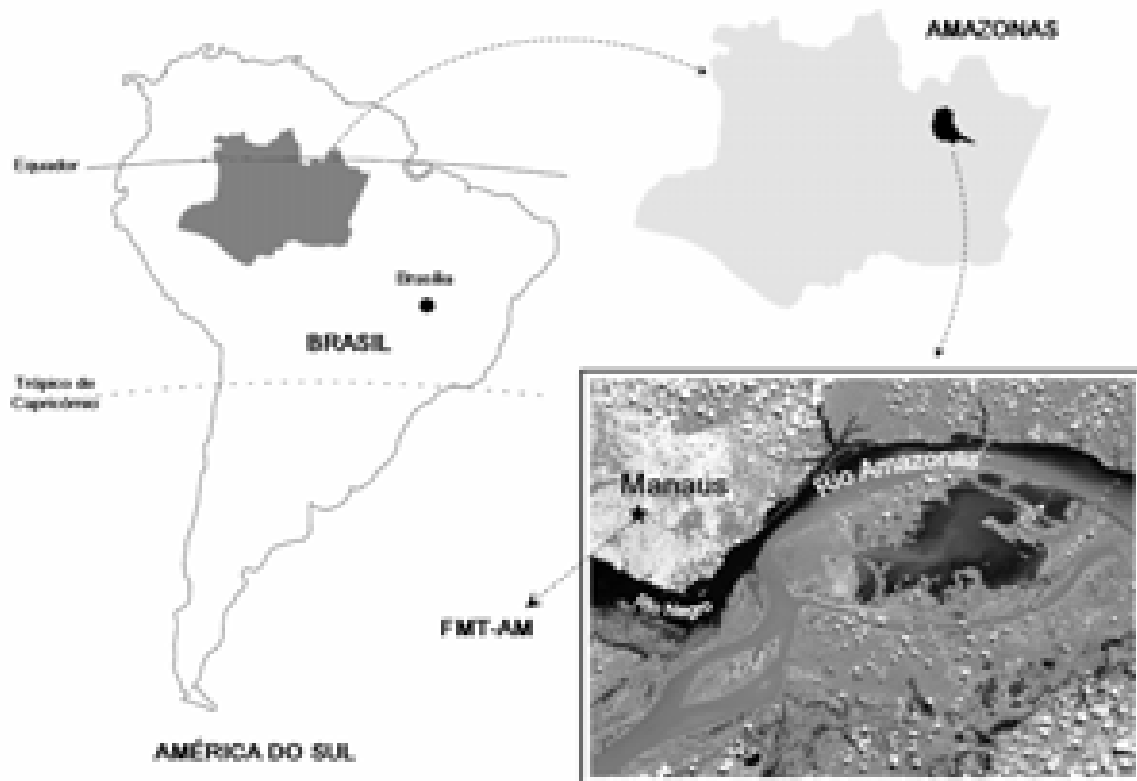


Figura 10: Localização geográfica do Estado do Amazonas, da Cidade de Manaus e da FMT-AM

A Prefeitura de Manaus divide o município, geopoliticamente, em zonas. Na figura 11, vemos um mapa da cidade, com suas seis zonas. O restante do município é considerado a zona rural.



Figura 11: Mapa da Cidade de Manaus, localizada à margem esquerda do Rio Negro, dividida em zonas geopolíticas (FMT-AM assinalada na Zona Centro-Oeste)

A unidade de saúde de seleção dos pacientes foi a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), unidade de referência da Secretaria de Estado da Saúde do Amazonas (SUSAM), referência para o atendimento de pacientes com

doenças infecciosas. É também referência para o ensino e a pesquisa em doenças infecciosas e parasitárias no estado. A instituição foi fundada em 1974, e hoje tem uma área construída de 18.000 m², na Zona Centro-Oeste de Manaus.

Conta com uma Unidade Ambulatorial (16 consultórios médicos, 1 consultório odontológico, 1 consultório do Serviço de Psicologia e 2 consultórios para atendimento aos viajantes), a Unidade de Internação Hospitalar Dr. Nelson Antunes (120 leitos distribuídos entre Enfermaria de homens, Enfermaria de mulheres, Enfermaria de Pediatria, Pronto-Atendimento, Unidade de Isolamento e Unidade de Alto Risco), o Laboratório de Análises Clínicas e as Gerências de Pesquisa, dentre as quais a Gerência de Malária. De janeiro e setembro de 2006, a FMT-AM realizou 63.450 atendimentos ambulatoriais, 19.611 atendimentos de urgência e 823 hospitalizações.

Na Gerência de Malária, que conta com cinco laboratórios para o diagnóstico de rotina e pesquisa em malária (Microscopia, Sorologia, Biologia Molecular, Cultura *in vitro* de *P. falciparum* e Plaquetologia), foram diagnosticados, em 2006, 16.182 pacientes com malária (32,6% do número total de lâminas examinadas nesta instituição), correspondendo a 31,6% do total de 51.086 casos de malária notificados na Cidade de Manaus, nesse mesmo ano (dados ainda sujeitos a revisão).

Esse percentual tem se mantido semelhante ao longo dos últimos 10 anos, de forma que a FMT-AM, apesar de classificada como uma unidade terciária de atenção à saúde, comporta-se, historicamente, no caso específico da malária,

também como uma unidade de atenção primária, realizando o diagnóstico e o tratamento dos pacientes que se auto-referenciam para essa instituição, com síndrome febril aguda a esclarecer.

4.3 TIPO DA AMOSTRA

Decidiu-se por um plano amostral probabilístico, com amostragem aleatória simples com reposição.

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no Software Power and Precision®.

Foi considerada uma frequência esperada de plaquetopenia de 60,8%, tendo como base estudo realizado com pacientes ambulatoriais com malária vivax, na FMT-AM, com 319 pacientes acima de 12 anos, entre 1997-1999 (11).

Foi considerada 70,8% a pior frequência de plaquetopenia aceitável, com erro $\alpha = 0,05$ e erro $\beta = 0,20$ (poder de 80%). Assim, o cálculo estimado foi 176 pacientes.

Estimando uma exclusão de 20% dos pacientes, por preencherem critérios de exclusão a posteriori, foram incluídos mais 34 pacientes, totalizando 210 pacientes.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

4.4.1 Pacientes acima de 18 anos.

4.4.2 Pacientes com diagnóstico microscópico de malária por *P. vivax* ou por *P. falciparum*.

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

4.5.1 Mulheres com história de gestação atual.

4.5.2 Pacientes com história de sangramento espontâneo freqüente.

4.5.3 Pacientes com história de comorbidade com potencial de alterar o número ou a função das plaquetas.

4.5.4 Pacientes em uso crônico de medicamentos com potencial de alterar a função de agregação plaquetária ou causar plaquetopenia (Tabela 7).

4.5.5 Paciente na vigência de tratamento antimalárico.

4.5.6 Pseudo-plaquetopenia induzida por EDTA.

4.5.7 Pacientes com exame sorológico positivo para HIV, HBV, HCV ou vírus do dengue (DEN-1, DEN-2 ou DEN-3).

4.5.8 Pacientes com diagnóstico de malária mista (*P. vivax*/*P. falciparum*) à PCR.

Tabela 7

Lista de drogas com potencial de causar plaquetopenia (em ordem alfabética)⁽¹⁾

Abciximab	Hidroclorotiazida
Ácido aminossalicílico	Ibuprofeno
Ácido nalidíxico	Interferon- α
Ácido valpróico	Isoniazida
Aminoglutetimida	Levamisol
Amiodarona	Lítio
Ampicilina	Meclofenamato
Amrinona	Meticilina
Anfotericina B	Metildopa
Captopril	Minoxidil
Carbamazepina	Nafazolina
Cimetidina	Ouro
Clorotiazida	Oxipenbutazona
Clorpromazina	Oxitetraciclina
Clorpropamida	Paracetamol
Danazol	Piperacilina
Deferroxamina	Procainamida
Diatrizoato de meglumina	Quinidina
Diazepam	Quinino
Diazóxido	Ranitidina
Diclofenaco	Rifampicina
Dietilelbestrol	Sulfametoxazol/trimetoprima
Digoxina	Sulfassalazina
Eptifibatide	Sulfisoxazol
Fenitoína	Sulindac
Fluconazol	Tamoxifeno
Furosemida	Tiotixeno
Haloperidol	Tirofiban
Heparina	Vancomicina

(1) De acordo com Sekhon e Roy, 2006 (65)

4.6 SELEÇÃO DOS PACIENTES

A seleção foi realizada após a confirmação do diagnóstico de malária, no Laboratório de Microscopia da Gerência de Malária da FMT-AM. Os pacientes foram selecionados de forma aleatória sistematizada, por meio do número individual da lâmina para exame de gota espessa de sangue, atribuído seqüencialmente pela Gerência de Malária. Para a aleatorização, utilizou-se uma tabela de dígitos randômicos (Anexo A).

A seleção foi realizada entre novembro de 2004 e outubro de 2006 e os pacientes eram avaliados clínica e laboratorialmente, apenas no dia em que recebiam o diagnóstico de malária. Não houve seguimento clínico dos pacientes além do dia da inclusão.

4.7 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A história clínica e o exame físico foram realizados após a inclusão do paciente no estudo, porém, antes da realização dos exames complementares, por um único observador. Foram coletados dados de identificação do paciente, características individuais (história fisiológica, história patológica pregressa e história epidemiológica), história da doença atual e exame físico. Todos os dados foram transcritos em uma ficha clínica, previamente testada e validada para o estudo, em 10 pacientes pilotos (Anexo B).

Na história clínica, buscaram-se informações sobre hábitos de vida e uso de substâncias com potencial de interferir na quantidade ou na qualidade das plaquetas. Foi considerado tabagista o paciente que fumou nos últimos 30 dias prévios à consulta, de acordo com o critério utilizado por Malcon e cols. (224). O consumo regular de qualquer bebida alcoólica, pelo menos uma vez por semana, foi considerado como uso freqüente. A dieta rica em *A. sativum* e em *A. allium* foi considerada perguntando-se ao paciente, ou ao acompanhante, se a dieta habitual continha "muito alho" ou "muita cebola" respectivamente.

Durante a coleta da história clínica, buscou-se sistematicamente o relato de quaisquer tipos de sangramentos ao longo da história da doença atual.

Ao exame físico, também se buscou, sistematicamente, a presença de sangramentos, através de ectoscopia detalhada, incluindo a oroscopia. Para a palpação do baço, o paciente era colocado na posição de Schuster (decúbito lateral direito, com flexão do membro inferior esquerdo e extensão do membro superior esquerdo acima da cabeça).

A esplenomegalia foi classificada de acordo com a classificação proposta por Hackett, para pacientes com malária, em 1944 (141). Assim, os pacientes foram classificados em Hackett 1, 2, 3, 4 ou 5: 1-baço não palpável à inspiração profunda; 2-baço palpável abaixo da borda costal esquerda; 3-baço palpável próximo à cicatriz umbilical; 4-baço palpável abaixo da cicatriz umbilical; 5-baço palpável próximo à fossa ilíaca direita (Figura 12).

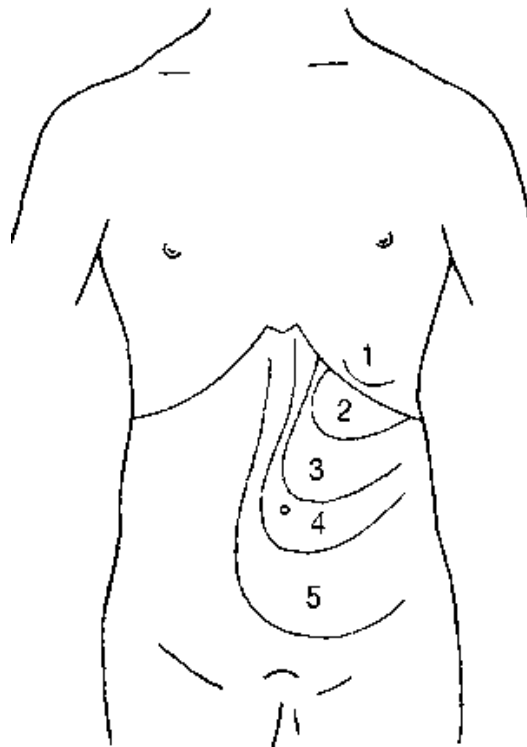


Figura 12: Ilustração da região abdominal, onde se evidenciam os limites de palpção da extremidade caudal do baço e a classificação de esplenomegalia de Hackett (Hackett 1 se refere ao baço de tamanho normal)

Para a classificação dos casos como malária grave, foram utilizados os critérios da OMS, de 2000 (374). A classificação de gravidade dos casos de malária vivax obedeceu aos mesmos critérios, em função da inexistência de critérios bem definidos, para a infecção por esta espécie, até o presente momento.

4.8 EXAMES LABORATORIAIS

Após a consulta médica, os pacientes se dirigiam ao Laboratório de Plaquetologia da Gerência de Malária da FMT-AM, onde era coletado material biológico para a realização dos exames laboratoriais necessários ao estudo, cujos

resultados eram registrados na mesma ficha clínica utilizada para o registro dos dados clínicos (Anexo B).

Para o diagnóstico da malária, pela gota espessa, a partir de uma gota de sangue coletada por punção digital, foi utilizado o método de coloração de Walker (48), descrito no Procedimento Operacional Padrão nº 001 do Laboratório de Plaquetologia da Gerência de Malária (MAL/PLA-POP-001) (Anexo C). As lâminas foram observadas inicialmente, antes da inclusão, por um dos microscopistas do Laboratório de Microscopia da Gerência de Malária, e a parasitemia era semi-quantificada em cruzes. Após a inclusão do paciente, a lâmina previamente confeccionada era recolhida e novamente observada, sempre por um mesmo microscopista experiente da Gerência de Malária, que ademais, fazia a quantificação da parasitemia por microlitro, segundo método descrito no mesmo MAL/PLA-POP-001. Na presença de gametócitos ou esquizontes de *P. falciparum*, fazia-se o registro na ficha clínica.

Foram coletados a vácuo (BD Vacutainer®) 4,5 mL de sangue venoso periférico em tubos de vidro siliconados, com K₂EDTA. Imediatamente, se misturava a amostra de sangue ao anticoagulante contido no tubo, por inversão. A realização dos hemogramas não superou 2 horas após a coleta do sangue, sendo os tubos mantidos em temperatura ambiente. O cuidado foi semelhante com todas as amostras coletadas. Os hemogramas foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas da FMT-AM, em aparelho automatizado PENTRA 120-Retic®, da ABX Diagnostics®, com avaliação da série branca, vermelha e plaquetária.

Adicionalmente, se realizava um esfregaço, a partir do sangue com anticoagulante, para a contagem diferencial das células brancas, em caso de *flag* pelo aparelho (sinalização da necessidade de confirmação manual quando há na amostra leucócitos atípicos ou imaturos). O mesmo esfregaço foi utilizado para a pesquisa de evidências morfológicas de pseudo-plaquetopenia induzida por EDTA, como satelitismo plaquetário (plaquetas aderidas à superfície dos leucócitos). A análise do esfregaço foi realizada apenas nos casos em que se observou diminuição da contagem de plaquetas, ao hemograma.

Considerou-se anêmico o paciente com hemoglobina menor que 12 g/dL (mulheres) ou menor que 13 g/dL (homens). Anemia grave, de acordo com a OMS, foi considerada quando a dosagem de hemoglobina foi menor que 7 g/dL. A leucocitose foi considerada quando a contagem de leucócitos totais foi maior que 12.000/ μ L, a linfocitose quando o percentual de linfócitos foi maior que 35% e a neutrofilia, quando o percentual de neutrófilos foi maior que 70%. Considerou-se plaquetopenia quando a plaquetimetria foi menor que 150.000/ μ L. Categorizou-se a plaquetopenia em leve (100.000-150.000/ μ L), moderada (50.000-100.000/ μ L) e grave (<50.000/ μ L) (126).

Foram coletados a vácuo (BD Vacutainer®) 4,5 mL de sangue venoso periférico em tubos de vidro sem anticoagulante, com gel separador. Após 20 minutos em repouso, para a coagulação do sangue, procedia-se à centrifugação a 1000 g por 15 minutos, para a retirada do soro, utilizado para a dosagem de bilirrubinas totais, glicose e creatinina (utilizados como critérios laboratoriais de

malária grave pela OMS). Os exames bioquímicos foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas da FMT-AM, em aparelho automatizado DIMENSION AR® da Dade Behring®, utilizando kits comerciais da mesma empresa. São valores normais de referência do aparelho: bilirrubinas totais até 1,2 mg/dL; glicose entre 70 e 110 mg/dL; creatinina entre 0,6 e 1,3 mg/dL. Entretanto, para o diagnóstico de malária grave, utilizou-se a recomendação da OMS: bilirrubinas totais acima de 5,0 mg/dL, glicose abaixo de 40 mg/dL e creatinina acima de 3,0 mg/dL. O restante do soro foi armazenado em *freezer* a -20°C para a realização da dosagem de ICC e dos exames sorológicos para HIV, hepatite B, hepatite C e dengue.

Em outro tubo com citrato de sódio a 3,2%, coletaram-se mais 4,5 mL de sangue venoso periférico, a vácuo (BD Vacutainer®). Imediatamente, se misturava a amostra de sangue ao anticoagulante contido no tubo, por inversão. Em seguida, se centrifugava o material a 1500 g, por 10 minutos, para a obtenção do plasma. Uma alíquota do mesmo era utilizada para a realização da dosagem semi-quantitativa do TAP e do TTPA, no Laboratório de Análises Clínicas da FMT-AM, em aparelho FIBRIN-TIMER II® da Dade Behring®. O RNI foi calculado a partir da razão entre o TAP do paciente (em segundos) e o TAP controle de 100% de um *pool* de pacientes normais controlado no mesmo laboratório (11,3 segundos), elevado a 0,97 (índice de sensibilidade internacional – ISI - da tromboplastina Thromborel S® da Dade Behring®).

Considerou-se como distúrbio de coagulação o paciente que tivesse RNI maior que 1,26 ou TTPA maior que 34 segundos.

Para a confirmação do diagnóstico de malária vivax ou falciparum, por PCR, utilizou-se a técnica descrita por Snounou e cols., em 1993 (334), detalhada em MAL/MOL-POP-001 (Anexo C). Nos casos de PCR evidenciando malária mista (vivax e falciparum), repetiu-se o exame para a confirmação da dupla infecção. A PCR foi realizada a partir de papa de hemácias coletada do fundo do tubo com citrato de sódio a 3,2%, após a retirada do plasma.

Para a realização do teste de sangramento (TS), foi utilizada a técnica de Duke (99). Fazia-se a assepsia da polpa digital com álcool a 70% e com uma lanceta estéril perfurava-se o local desinfetado, deixando o sangue fluir livremente. No momento da picada, era acionado um cronômetro. Usando papel de filtro, secava-se de trinta em trinta segundos a gota de sangue que se formava, sem tocar a pele, utilizando cada vez uma parte limpa do papel de filtro. Quando o sangue parava de fluir e de manchar o papel, o cronômetro era parado e esse tempo decorrido era registrado como o TS. Considerou-se TS normal entre 1 e 3 minutos.

Para a realização do tempo de coagulação (TC), foi utilizada a técnica de Lee-White (205). O sangue venoso foi coletado por punção venosa e o cronômetro acionado assim que o sangue aparecesse na seringa. Tomaram-se dois tubos secos e limpos, sem anticoagulante (tubo para hemólise), e colocado 1 mL de sangue em cada um. A seguir, os tubos eram colocados em banho-maria, a 37°C. Inclina-se um dos tubos a cada minuto, até que este pudesse ser inclinado em um ângulo de 90°, sem que o sangue escorresse. Inclina-se então o segundo tubo de 30 em 30 segundos até à formação do coágulo. O tempo entre o momento da coleta e a total

coagulação do sangue foi registrado como o TC. Considerou-se TC normal entre 5 e 10 minutos.

A PL foi realizada após a verificação da tensão arterial sistólica (TAS) e da tensão arterial diastólica (TAD) pelo método de Korotkoff, em um dos membros superiores. Foi calculado o valor médio da tensão arterial $(TAS+TAD)/2$ e o manguito foi novamente insuflado até o valor médio e assim mantido por cinco minutos. A prova foi considerada positiva quando houve o aparecimento de 20 ou mais petéquias, no espaço de 2,5 cm², no membro submetido ao teste.

De acordo com os critérios de exclusão estabelecidos para o estudo, todos os pacientes tiveram amostra do soro testada para HIV, hepatite B, hepatite C e dengue. Foram realizados os seguintes testes: Anti-HIV Tetra ELISA[®] (Biotest[®]) (ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche, de terceira geração, para detecção de anticorpos IgG contra duas proteínas recombinantes do HIV - gp41 e p24 - e dois peptídeos provenientes das regiões GAG/ENV do HIV-1 e HIV-2); ELISA Anti-HBc total (DiaSorin[®]) (ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos totais contra HBcAg recombinante) e ELISA HBsAg (DiaSorin[®]) (ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche para detecção do HBsAg); ELISA Anti-HCV (DiaSorin[®]) (ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos totais contra polipeptídeos recombinantes das regiões estrutural e não-estrutural do HCV); MAC-ELISA anti-dengue (ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos IgM contra *pool* de DEN-1, DEN-2 e DEN-3). A detecção de HBsAg só foi realizada nos pacientes positivos para anti-HBc total. Adotou-se como critério de exclusão a positividade

para HBsAg, por estar a presença deste antígeno associada às formas clínicas que podem cursar com plaquetopenia, p. ex., estado de portador crônico e hepatite crônica.

O teste para HIV foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas da FMT-AM e os testes para HBV, HCV e dengue foram realizados na Gerência de Virologia da FMT-AM.

4.9 EVOLUÇÃO CLÍNICA DA PLAQUETOPENIA E DA ESPLENOMETRIA

Foi selecionada uma amostra não-probabilística de sete pacientes (três com malária vivax e quatro com malária falciparum), com alguma indicação de observação clínica hospitalar, que aceitaram permanecer hospitalizados por sete dias, para a aferição diária da plaquetimetria e da esplenometria, a fim de se avaliar o tempo de normalização da plaquetimetria e o tempo de involução da esplenomegalia.

Nos sete pacientes internados, foi realizada a mesma avaliação clínica e laboratorial dos demais pacientes incluídos no estudo transversal, no dia do diagnóstico (primeiro dia do tratamento específico). Além disso, esses pacientes foram submetidos a exame de ultra-sonografia de abdome superior para a medição do maior eixo do baço. A partir do segundo dia até o sétimo dia, em regime de internação hospitalar, os pacientes se submetiam a nova ultra-sonografia de abdome superior para esplenometria e nova plaquetimetria.

A medição do maior eixo do baço (em centímetros) foi realizada com o paciente na posição de Schuster, em inspiração profunda, no mesmo aparelho e sempre pelo mesmo examinador. Foi utilizado aparelho de ultra-sonografia da marca Sonoace®, modelo 6000C, com transdutor convexo de 3,5 a 7 Megahertz, multifrequencial. Foi realizado um corte virtual no sexto espaço intercostal esquerdo, com inclinação cranial e uma varredura crânio-caudal e látero-lateral, para medição do maior eixo do baço, à inspiração profunda (325). A medição era realizada três vezes, de forma cega (uma folha de papel era colada na parte superior direita da tela do monitor, onde se lia a medição do baço), e as medidas eram registradas por um ajudante. Considerou-se como medida final para análise a média aritmética simples entre as três medidas realizadas, com maior reprodutibilidade do que uma única medida, de acordo com Li e cols., 2004 (210). O examinador só tomava conhecimento das medidas de cada paciente ao final do sétimo dia de internação, para não se influenciar pelas medidas dos dias anteriores.

Os pacientes com malária vivax foram tratados com cloroquina e primaquina, e os pacientes com malária falciparum tratados com artesunato e mefloquina, de acordo com as recomendações da Gerência de Malária da FMT-AM (196).

4.10 IMUNOCOMPLEXOS CIRCULANTES

Foi selecionada uma amostra não-probabilística de 48 pacientes (41 com malária vivax e 7 com malária falciparum), para a dosagem de ICC.

Foram selecionadas 5 pessoas sadias controles, entre 18 e 60 anos de idade, procedentes das mesmas áreas dos pacientes incluídos, sem história de doença febril ou vacinação nos últimos 6 meses. Foi realizado um hemograma de controle para afastar possíveis infecções e examinada uma gota espessa de sangue de cada controle para afastar infecção malárica.

Alguns procedimentos experimentais (isolamento de ICC, pesquisa de auto-anticorpos e teste de fagocitose) foram realizados nos laboratórios da Divisão de Hematologia da NYU.

4.10.1 Precipitação de imunocomplexos circulantes

Os ICC foram isolados do soro dos pacientes, através de precipitação por polietilenoglicol (PEG). A técnica está detalhada em MAL/PLA-POP-002 (Anexo C) (Figura 13).

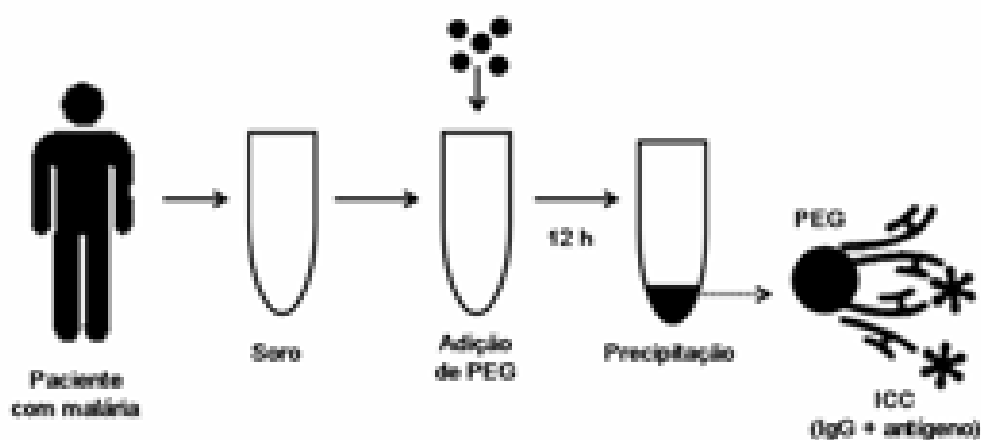


Figura 13: Esquema de precipitação dos ICC do soro dos pacientes com malária, com PEG

4.10.2 Isolamento de IgG dos imunocomplexos circulantes

A partir dos ICC isolados do soro, isolou-se a IgG, por eluição em gel de agarose com proteína G. A técnica está detalhada em MAL/PLA-POP-002 (Anexo C) (Figura 14).

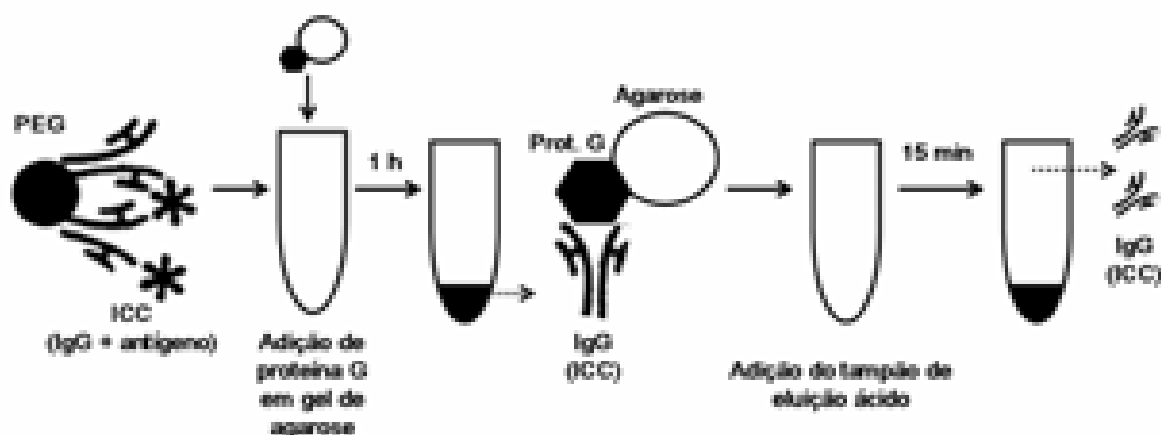


Figura 14: Esquema de isolamento da IgG (ICC), a partir da ligação à proteína G em gel de agarose, e subsequente eluição em tampão ácido

4.11 DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS PLAQUETÁRIOS

A pesquisa de auto-anticorpos plaquetários foi realizada utilizando-se o mesmo modelo previamente padronizado para a descrição de auto-anticorpos anti-GPIIIa₄₉₋₆₆ em pacientes com PTI e infecção pelo HIV-1 (257). O método envolve a eluição de IgG (ICC) e testa a ligação da mesma a plaquetas normais, *in vitro*, ou em plaquetas de camundongos *in vivo*.

4.11.1 Teste *in vitro*

Para o teste *in vitro*, foi selecionada uma amostra não-probabilística de dois pacientes com malária vivax e plaquetopenia grave, e um paciente com malária vivax e contagem de plaquetas normal.

Como controle positivo da presença de auto-anticorpos plaquetários, foi selecionado um paciente de 30 anos, com diagnóstico sorológico de HIV-1 há 1 ano, em acompanhamento ambulatorial na FMT-AM, preenchendo os critérios clínicos de PTI da Sociedade Americana de Hematologia (ASH) (127).

Após o isolamento da IgG (ICC) (vide item 4.10.2), adicionaram-se 0,15 µg de IgG (anticorpo primário) em uma suspensão de 200 µL de tampão BSGC com $1,6 \times 10^8$ plaquetas (concentração final do anticorpo primário: 0,6 µg/mL). A suspensão foi incubada durante 60 minutos, a 37°C e depois lavada três vezes com tampão BSGC gelado, em centrifugação a 1000 g, a 4°C, por 7 minutos. A seguir, adicionou-se à suspensão o anticorpo secundário (IgG de camundongo anti-IgG humana, marcada com FITC) (Sigma®) na concentração de 4 µg/mL. A suspensão ficou incubada por 60 minutos, a 37°C, e depois lavada três vezes com BSGC gelado, em centrifugação de 1000 g, a 4°C, por 7 minutos.

A leitura foi realizada imediatamente em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur®). Fez-se uma seleção prévia (*gating*) das plaquetas, pelo volume (*forward scatter*/FSC-H) e pela densidade interna (*side scatter*/SSC-H), excluindo-se da análise as micropartículas resultantes da ativação inespecífica das plaquetas

durante o preparo da amostra. A leitura foi realizada no canal de fluorescência 1 (FL1-H) (Figura 15).

A variável analisada foi o índice de ligação plaquetária, obtido pela multiplicação entre o número de eventos selecionados e a média de fluorescência em FL1-H.

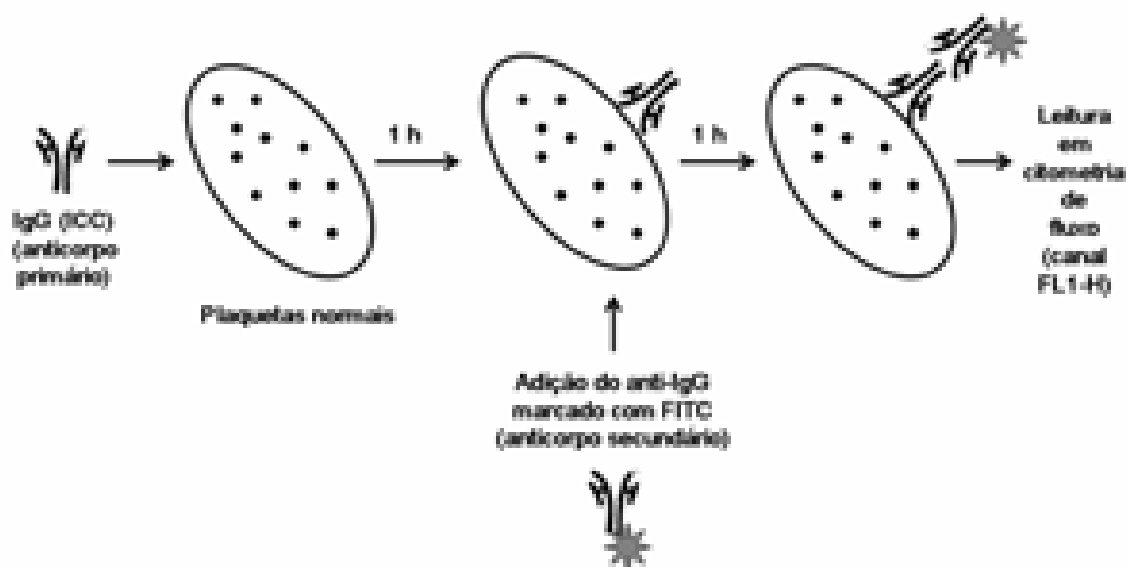


Figura 15: Esquema de experimento de ligação *in vitro* em plaquetas normais, de IgG (ICC)

4.11.2 Teste *in vivo* em modelo experimental

Foi selecionado aleatoriamente um paciente com malária vivax e plaquetopenia grave para o estudo. Após o isolamento dos ICC e da IgG dos ICC do paciente com malária (vide item 4.10.1 e 4.10.2), foram injetados no peritônio (IP) de camundongos, 50 µg de ICC, 50 µg de IgG isolada de ICC e 50 µg de IgG isolada diretamente do soro deste paciente.

Como controle positivo da plaquetopenia induzida por auto-anticorpos plaquetários (IgG anti-GPIIIa₄₉₋₆₆), foi selecionado o mesmo paciente utilizado no teste *in vitro*. Foram injetados, por via IP, 25 µg de IgG (ICC) deste paciente, no peritônio de um camundongo.

A contagem de plaquetas foi realizada antes da injeção e 2 e 4 horas após. Considerou-se significativa uma queda de 20% ou mais na contagem inicial de plaquetas, conforme utilizado por Nardi e cols. (257).

O detalhamento do modelo de indução de plaquetopenia em camundongos C57BL/6 está em MAL/PLA-POP-004 (Anexo C) (Figura 16).

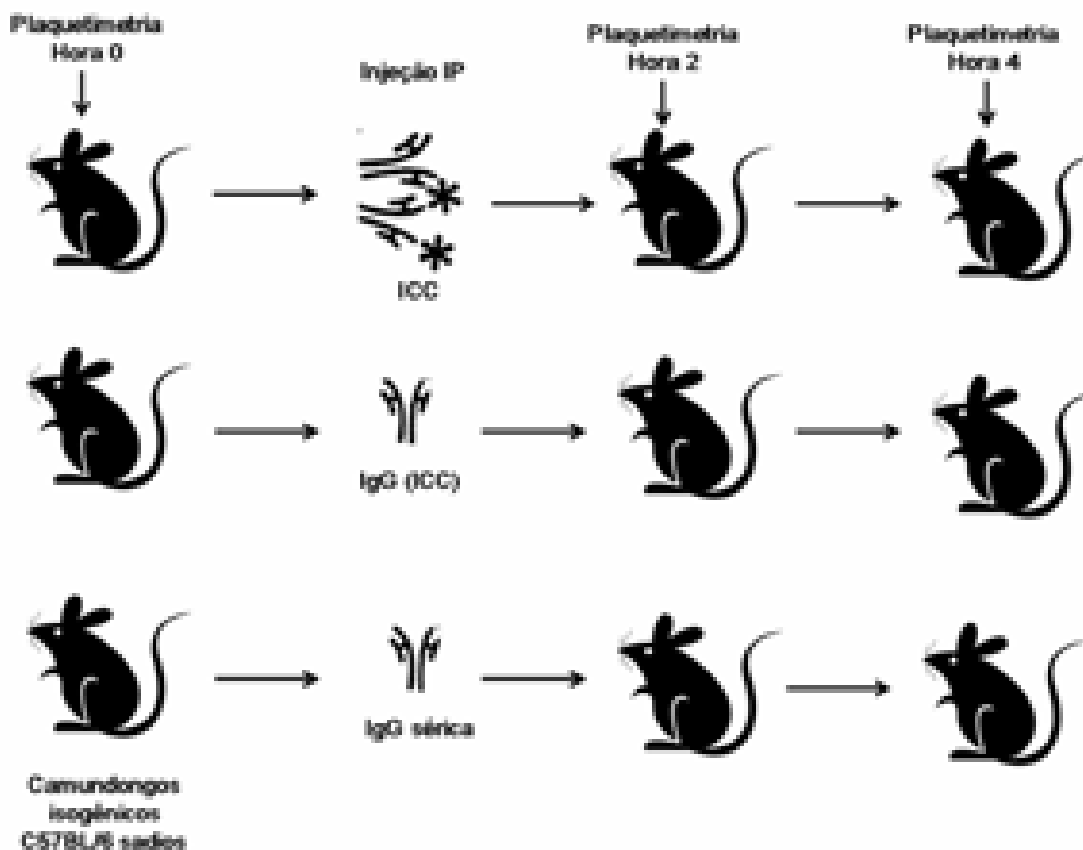


Figura 16: Esquema de experimento de ligação e destruição *in vivo* de plaquetas normais de camundongos isogênicos C57BL/6 sadios, após injeção IP de ICC, IgG (ICC) e IgG sérica

4.12 TESTE DE FAGOCITOSE DE PLAQUETAS *IN VITRO*

Todo o procedimento de fagocitose de plaquetas está detalhado em MAL/PLA-POP-005 (Anexo C) (Figura 17).

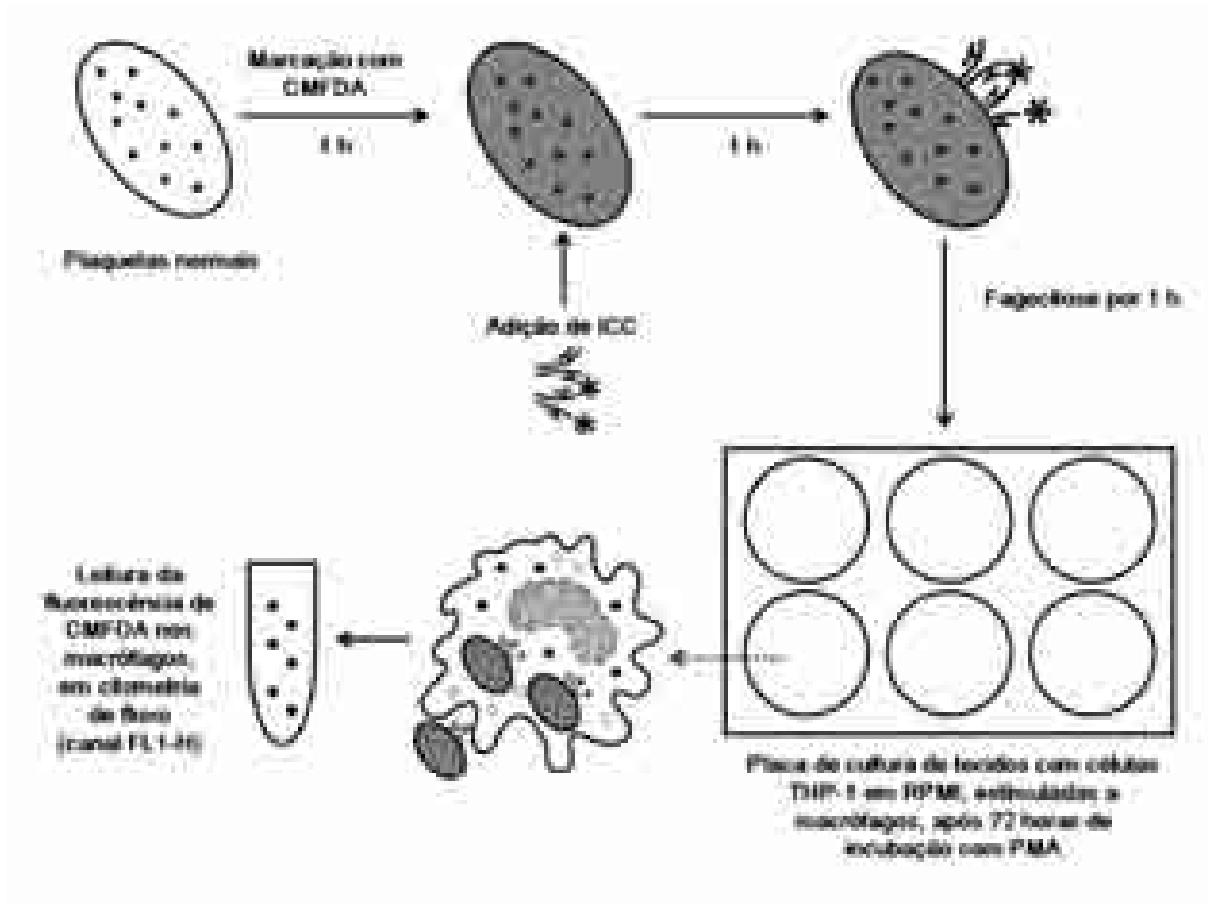


Figura 17: Esquema de experimento de fagocitose de plaquetas normais marcadas com CMFDA após incubação com ICC, por células THP-1 estimuladas com PMA

Plaquetas normais marcadas com CMFDA foram incubadas durante 1 hora, a 37°C, com solução contendo ICC (0,5 µg/mL) de três pacientes com malária vivax e plaquetopenia grave escolhidos aleatoriamente (vide item 4.10.1). A seguir, após duas lavagens em tampão BSGC, para retirar os ICC que não se ligaram às

plaquetas, as mesmas foram adicionadas em escavações de placas de cultura contendo células monocíticas da linhagem THP-1, estimuladas à diferenciação em macrófagos, na presença de forbol miristato acetato (PMA), por 72 horas. Após incubação por 1 hora, para permitir a fagocitose, as células foram levadas ao citômetro de fluxo (BD FACSCalibur®) para leitura da fluorescência de CMFDA, nas células THP-1 isoladas, traduzindo, portanto, a quantidade de plaquetas aderidas ou fagocitadas pelas células THP-1.

A variável analisada foi a média de fluorescência emitida em FL1-H por cada célula THP-1 contada, entre as células selecionadas.

4.13 TESTE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA *IN VITRO*

Plaquetas isoladas de três pessoas normais saudáveis, sem história de uso de medicações foram submetidas a teste de agregação plaquetária *in vitro*, durante 5 minutos. O teste de agregação plaquetária *in vitro* está detalhado em MAL/PLA-POP-006 (Anexo C).

A fim de testar a capacidade de agregação plaquetária *in vitro* dos vários estádios do *Plasmodium* spp., foram utilizados 3,5 e 1,7 µg/mL de proteínas contidas na solução resultante da lise de hemácias parasitadas por *P. falciparum*; 3,0 e 1,5 µg/mL de proteínas contidas na solução resultante da lise de hemácias parasitadas por *P. vivax*; 3,7 e 1,9 µg/mL de proteínas contidas na solução resultante da lise de esporozoítos de *P. vivax* (Figura 18).

As formas sangüíneas de *P. vivax* foram obtidas de pacientes infectados (portanto, esquizontes e trofozoítos) e as formas sangüíneas de *P. falciparum* (cepa W3), obtidas de cultura *in vitro* (na fase de sincronização com cerca de 80% de trofozoítos). A obtenção do lisado está descrita em MAL/PLA-POP-007 (Anexo C). Os esporozoítos foram doados pelo *Instituto de Imunologia del Valle* (Cali – Colômbia) e foram obtidos a partir da dissecação de glândulas salivares de *An. albimanus* (159). A obtenção do lisado está descrita em MAL/PLA-POP-008 (Anexo C). Como reconhecido agonista de agregação plaquetária (controle positivo), foi utilizada a ristocetina (Bio/Data Corporation®). Como controles negativos, foram utilizados o tampão PBS e a solução resultante da lise de hemácias não-parasitadas de uma pessoa normal sadia.

4.14 SUBFAMÍLIAS DOS GENES *VIR* DE *P. VIVAX*

Foram seqüenciadas as subfamílias dos genes *vir* dos parasitos de pacientes do estudo que apresentaram malária vivax com complicações. Como controle, foram seqüenciadas as subfamílias de outros três parasitos de pacientes com malária vivax sem complicações. O procedimento de seqüenciamento das subfamílias dos genes *vir* foi realizado no Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo (USP), e está descrito em POP-USP (Anexo C).

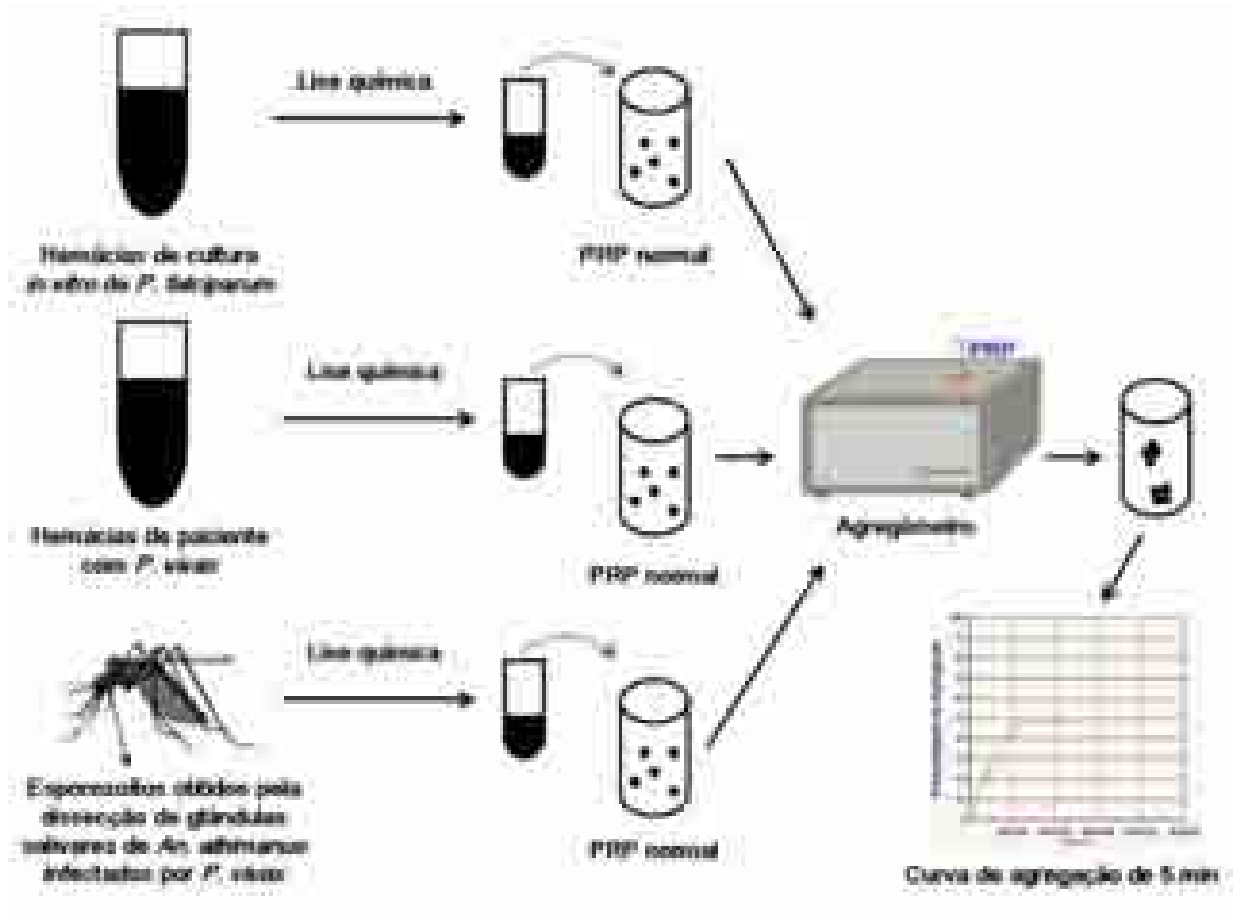


Figura 18: Esquema de experimento de agregação *in vitro* de plaquetas normais, com lisado de hemácias parasitadas por *P. falciparum* e *P. vivax* e esporozoítos de *P. vivax*

Na figura 19, está resumido o desenho experimental utilizado na parte de avaliação clínica e experimental, a partir dos pacientes com malária selecionados.

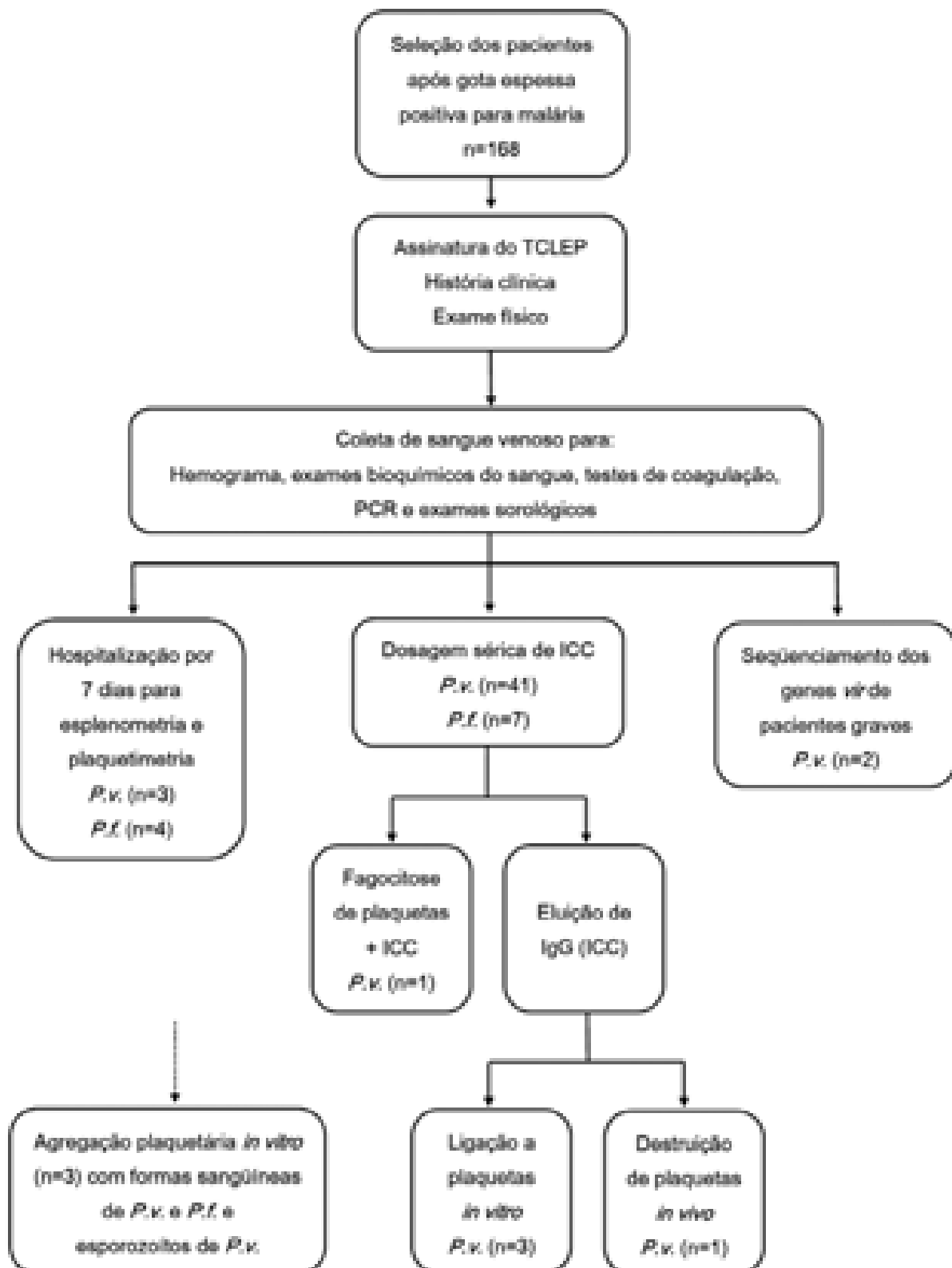


Figura 19: Diagrama de fluxo do desenho experimental utilizado

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em muitas observações clínicas realizadas, a análise foi meramente descritiva, sem a aplicação de testes de inferência estatística.

Os dados foram analisados estatisticamente no *software* Epi Info® (versão 3.3.2, de 9 de fevereiro de 2005), de distribuição gratuita *on-line* pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Atlanta (<http://www.cdc.gov/epiinfo/installation.htm>).

Utilizou-se o teste não-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov para verificar se a população da qual a amostra procedia tinha distribuição normal. A distribuição foi considerada normal se $p > 0,05$.

Para a detecção de diferenças entre proporções, foram utilizados os seguintes testes não-paramétricos: teste do Qui-quadrado e teste exato de Fisher.

Para a detecção de diferenças entre duas médias, utilizou-se o teste *t* de Student (paramétrico) para as amostras de distribuição normal, e o teste U de Mann-Whitney (não-paramétrico) para as amostras de distribuição não-normal. No caso de comparação entre mais de duas médias, utilizou-se o teste ANOVA para distribuição normal, com teste *post hoc* de Tukey, ou o teste R de Kruskal-Wallis, para populações de distribuição não-normal.

Para a apresentação das variáveis não-categóricas, utilizou-se o gráfico do tipo *boxplot*, onde se evidenciam a mediana, os quartis 25% e 75% e os valores máximo e mínimo da respectiva amostra.

Após o cálculo da razão de chances (OR), para a estimativa da força de associação entre duas variáveis, sua significância foi estimada pelo intervalo de confiança 95% (IC_{95%}) e pelo teste de Cochran e de Mantel-Haenszel.

Realizou-se análise multivariada, mediante modelo de regressão logística, com o objetivo de controlar os fatores de confusão, por eliminação das variáveis por entrada (*enter*), ajustando-se os valores de OR e selecionando-se, entre as variáveis independentes que mostraram associação estatisticamente significativa na análise univariada (ou muito próximas da significância), um conjunto restrito, com maior probabilidade de prever a ocorrência de desfecho desfavorável. A significância de OR foi estimada pelo IC_{95%} e pela estatística de ajustamento da equação (*goodness-of-fit*) de Hosmer-Lemeshow. Apenas no modelo de análise multivariada, a significância foi considerada em caso de $p < 0,10$.

Para a correlação entre duas variáveis numéricas, realizou-se a regressão linear simples, utilizando-se o coeficiente de correlação (*r*) de Pearson ou o coeficiente de correlação de Spearman.

Para a apresentação das variáveis correlacionadas, foram utilizados gráficos de dispersão, com a plotagem da reta de regressão e seu respectivo IC_{95%}.

Também foi realizada a análise de correlação entre múltiplas variáveis, utilizando-se modelos de regressão linear, com o devido ajuste do coeficiente de correlação.

As árvores filogenéticas (dendogramas) das subfamílias dos genes *vir* foram construídas da seguinte maneira: para cada subfamília foram traduzidas seis janelas de leitura, usando o programa *Get orf* do *software* EMBOSS® (<http://emboss.sourceforge.net>), e alinhadas as seqüências de aminoácidos usando o *software* Clustalw® (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Eventualmente, se fez a edição manual dos alinhamentos para a inferência final. As árvores filogenéticas foram geradas usando o *software* MrBayes 3.1® (<http://mrbayes.csit.fsu.edu/>). Os parâmetros usados foram *ngen*=1.500.000, *samplefreq*=100, *burnin*=1000, e utilizados os valores padrões para os demais parâmetros. Foi apresentada apenas a árvore de consenso, calculada a partir das outras árvores geradas pelo *software*.

Para a análise de distância genética entre os isolados de *P. vivax* de pacientes com e sem malária grave, foi utilizada a inferência estatística de *bootstrapping*.

Em geral, a significância foi considerada em caso de $p < 0,05$.

4.16 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A pesquisa seguiu as normas de Boas Práticas Clínicas (*Good Clinical Practice – GCP*) (375) e os princípios éticos da Declaração de Helsinki (26) e da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (79).

O projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMT-AM, no dia 4 de novembro de 2003, e foi aprovado em plenária do dia 24 de novembro de 2003 (Processo 2692/2003) (Anexo D).

Todos os pacientes que aceitaram participar da pesquisa, após o devido esclarecimento verbal sobre seus objetivos e métodos, assinaram e dataram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao Paciente (TCLEP), que também foi assinado e datado pelo pesquisador responsável. Uma cópia foi entregue ao paciente e outra cópia foi arquivada sob a responsabilidade do pesquisador responsável (Anexo E).

Todos os pacientes foram avaliados clinicamente pelo pesquisador responsável e receberam o devido tratamento antimalárico gratuito preconizado pelo Manual de Rotinas da FMT-AM (196) e pelo Ministério da Saúde do Brasil (46), inclusive os que não aceitaram a inclusão na pesquisa. Durante o processo de esclarecimento sobre os métodos do estudo, os pacientes receberam aconselhamento pré-teste para HIV e hepatites virais. Após o resultado dos exames sorológicos para estas infecções virais, os mesmos foram contatados para o aconselhamento pós-teste e, quando necessário, orientação quanto ao seguimento

clínico nos ambulatórios especializados da FMT-AM, de acordo com as condutas recomendadas pelo Ministério da Saúde do Brasil (47, 50).

A exclusão de pacientes gestantes se justificou pela ocorrência de plaquetopenia de etiologia adversa daquela objetivada no estudo. A exclusão de pacientes abaixo de 18 anos se justificou pelo grande volume de sangue necessário para os exames laboratoriais requeridos ao estudo.

O estudo com animais obedeceu às recomendações brasileiras de experimentação animal (61) e aos métodos de eutanásia recomendados pela Associação Americana de Medicina Veterinária (19).

5 RESULTADOS

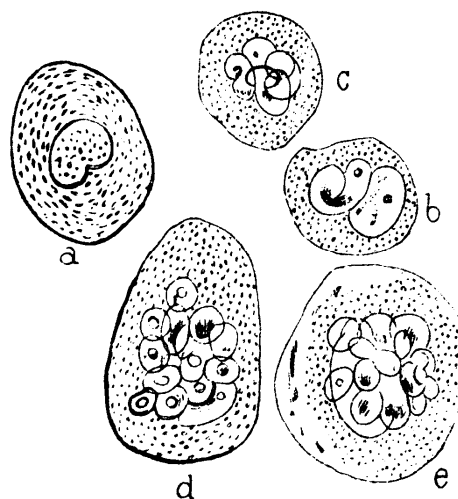


Ilustração de Bizzozero de uma célula gigante, encontrada na medula óssea, com núcleos multilobulares, hoje reconhecidos como megacariócitos.

Baerg A. The hematologic work of Giulio Bizzozero (1869). *Scient Med Ital* (Edição em inglês) 1958; 7:45-63.

5.1 PACIENTES EXCLUÍDOS

Os pacientes elegíveis para o estudo foram 213. Foram excluídos 3 pacientes a priori.

Dos 210 pacientes restantes, a maior parte das exclusões ocorreu a posteriori (n=42), após a realização dos exames laboratoriais específicos. Assim, foram analisados, no final, 168 pacientes.

Na figura 20, está ilustrada a imagem de um gel de PCR, evidenciando a confirmação do diagnóstico molecular de malária vivax, malária falciparum e de paciente com infecção mista (*P.f./P.v.*). Na figura 21, está discriminado o diagrama de fluxo de seleção dos pacientes e as respectivas causa de exclusão.

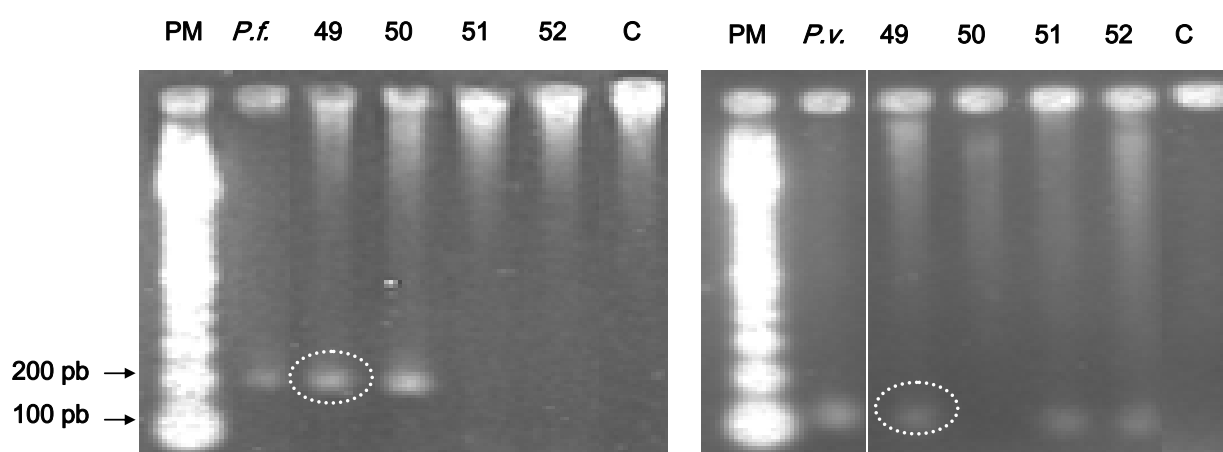


Figura 20: Varredura de imagem de gel de PCR em transiluminador com luz ultravioleta, evidenciando o diagnóstico molecular de malária por *P. falciparum* na amostra 50, malária por *P. vivax* nas amostras 51 e 52, e infecção mista (*P.f./P.v.*) na amostra 49 marcada, com uma banda em cada gel; PM (peso molecular de referência); C (controle negativo)

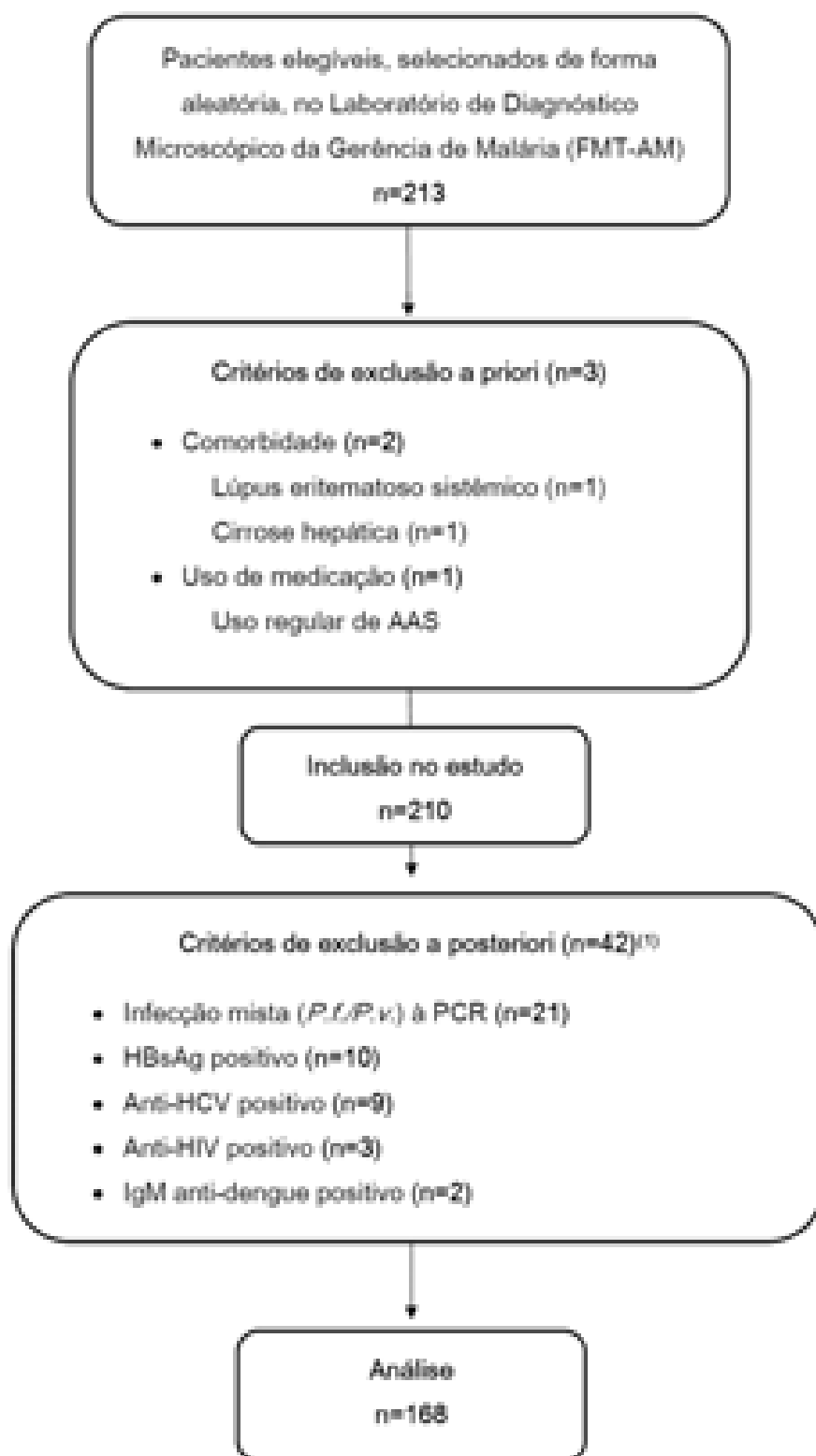


Figura 21: Diagrama de fluxo de seleção dos pacientes do estudo

(1) Três pacientes apresentaram simultaneamente mais de um critério de exclusão, totalizando, portanto, 42 pacientes excluídos

Dos 210 pacientes testados, 102 foram positivos para o marcador anti-HBc total (75 com *P. vivax* e 27 com *P. falciparum*), perfazendo uma frequência de 48,5% (IC_{95%} 45,6-51,4). Apenas nestes pacientes positivos para anti-HBc total, foi realizada a testagem para HBsAg. Na tabela 8, os pacientes que foram excluídos a posteriori da análise final, estão discriminados em relação à espécie de plasmódio à gota espessa, com sua respectiva plaquetimetria.

Tabela 8

Caracterização dos pacientes que preencheram critérios de exclusão a posteriori (não-analisados)

Critério de exclusão	<i>P. vivax</i> ⁽¹⁾ n	<i>P. falciparum</i> ⁽¹⁾ n	Total n/N	% (IC _{95%})	Plaquetimetria (x1000/ μ L) \bar{x} (Mín-Máx)
PCR com <i>P.f./P.v.</i>	7	14	21/210	10,0 (6,0-14,0)	115 (32-242)
HBsAg positivo	8	2	10/210	4,8 (1,1-8,4)	130 (41-181)
Anti-HCV positivo	3	6	9/210	4,3 (2,0-6,6)	97 (27-226)
Anti-HIV positivo	3	0	3/210	1,4 (0,0-4,1)	137 (47-215)
IgM anti-dengue positivo	1	1	2/210	1,0 (0,0-2,3)	35 (13-58)
Total	21⁽²⁾	21⁽²⁾	42/210⁽²⁾	20,0 (19,1-26,4)	114 (13-242)

(1) Diagnóstico pela gota espessa

(2) Três pacientes apresentaram simultaneamente mais de um critério de exclusão, totalizando, portanto, 42 pacientes excluídos

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

Foram analisados 168 pacientes, sendo 142 (84,5%) com malária vivax e 26 (15,5%) com malária falciparum.

Em relação à procedência dos casos, verifica-se que 49,4% deles relataram que a infecção ocorreu no Município de Manaus, sendo a Zona Rural responsável por quase metade desses casos. Entre os outros municípios do Estado do Amazonas, destacam-se aqueles próximos a Manaus (Figura 22). Apenas dois pacientes procediam de outros estados da Amazônia Legal.

Na tabela 9, está indicada a procedência dos pacientes pelo local provável de infecção.

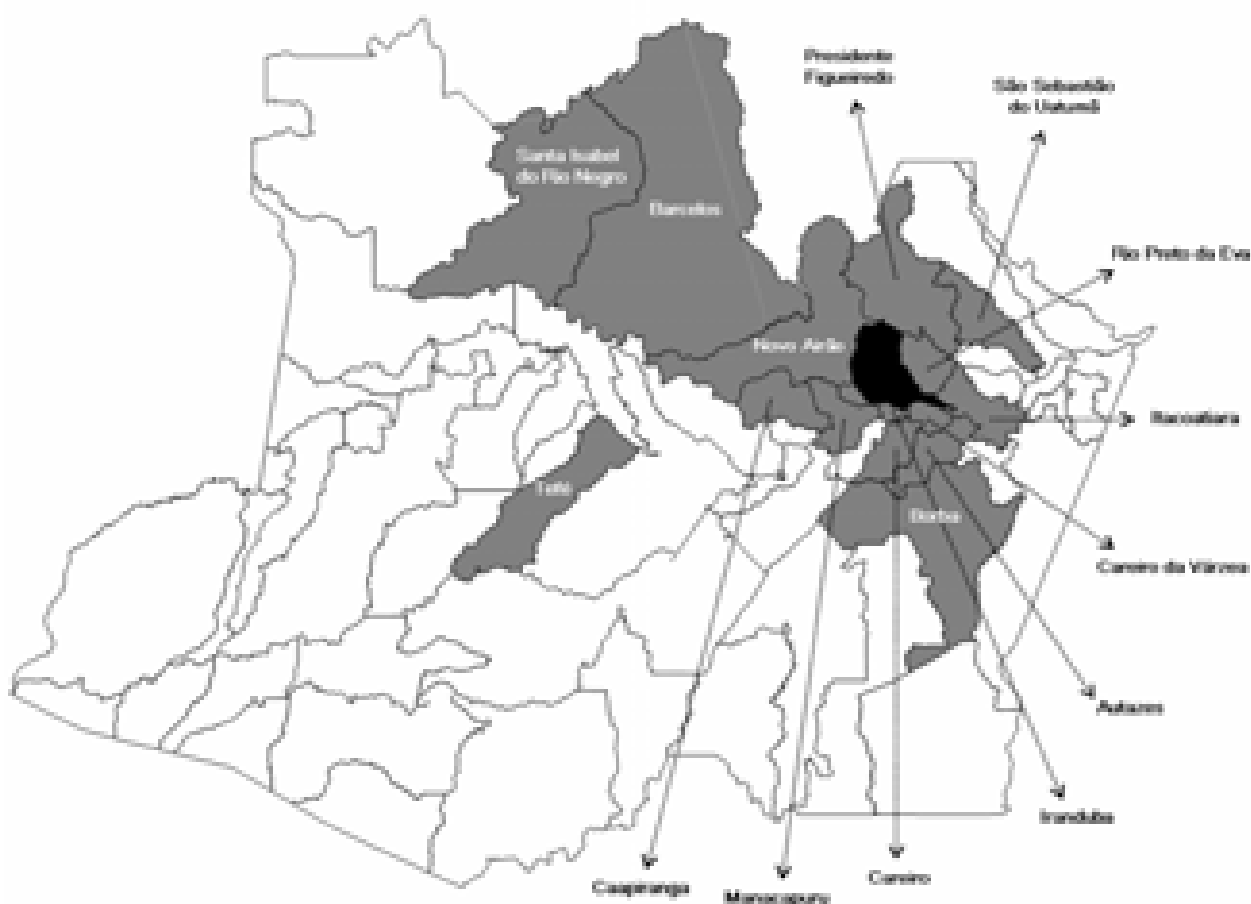


Figura 22: Mapa do Estado do Amazonas, evidenciando os municípios de ocorrência dos 168 casos incluídos no estudo (Manaus em preto e outros municípios em cinza)

Tabela 9

Procedência dos pacientes estudados, por local provável de infecção (n=168)

Local		n (%)	Percentual acumulado
Manaus	Zona Rural	41 (24,4)	24,4
	Zona Oeste	21 (12,5)	36,9
	Zona Norte	14 (8,3)	45,2
	Zona Leste	7 (4,2)	49,4
Outros municípios do Estado do Amazonas	Presidente Figueiredo	17 (10,1)	59,5
	Rio Preto da Eva	16 (9,5)	69,0
	Careiro	12 (7,1)	76,2
	Irlanduba	10 (6,0)	82,1
	Manacapuru	7 (4,2)	86,3
	Autazes	5 (3,0)	89,3
	Itacoatiara	3 (1,8)	91,1
	Novo Airão	3 (1,8)	92,9
	Tefé	1 (0,6)	93,5
	Barcelos	1 (0,6)	94,0
	Borba	1 (0,6)	94,6
	Caapiranga	1 (0,6)	95,2
	Careiro da Várzea	1 (0,6)	95,8
	Santa Isabel do Rio Negro	1 (0,6)	96,4
São Sebastião do Uatumã	1 (0,6)	97,0	
Outros estados da Amazônia Legal	Pará	2 (1,2)	98,2
	Rondônia	2 (1,2)	99,4
Indeterminado		1 (0,6)	100,0
Total		168 (100,0)	100,0

Na tabela 10 estão listadas as características individuais dos pacientes, onde se observa duas vezes mais homens do que mulheres entre os pacientes infectados.

Tabela 10

Características dos pacientes, por espécie de plasmódio

Característica		<i>P. vivax</i> N=142	<i>P. falciparum</i> N=26	Total N=168
Gênero	Masculino	98 (69,0)	16 (61,5)	114 (67,9)
	Feminino	44 (31,0)	10 (38,5)	54 (32,1)
Cor/Raça	Parda	111 (78,2)	15 (57,7)	126 (75,0)
	Branca	23 (16,2)	7 (26,9)	30 (17,9)
	Preta	7 (4,9)	4 (15,4)	11 (6,5)
	Indígena	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (0,6)
Idade (anos)		37,6 ± 12,9	36,2 ± 13,2	37,4 ± 12,9

As variáveis estão representadas em n (%) ou $\bar{x} \pm s$.

Na tabela 11, está resumida a história patológica progressiva dos pacientes, bem como seus hábitos alimentares, tabagismo, consumo de bebida alcoólica e o tempo da doença atual. Observa-se que o número de infecções prévias por malária é discretamente maior nos pacientes com malária vivax e que o número de dias de doença é discretamente menor nesses pacientes.

Tabela 11

História patológica progressiva, hábitos e tempo da doença atual dos pacientes, por espécie de plasmódio

Informação da história clínica	<i>P. vivax</i> N=142	<i>P. falciparum</i> N=26	Total N=168
Primoinfecção	37 (26,1)	12 (46,2)	49 (29,2)
Infecção malárica prévia (número de episódios)	3,7 ± 8,7	2,3 ± 6,0	3,5 ± 8,3
História de malária nos últimos 2 meses	19 (13,4)	5 (19,2)	24 (14,3)
Uso de AAS nos últimos 2 meses	38 (26,8)	2 (7,7)	40 (23,8)
Dieta rica em alho	65 (46,1)	12 (46,2)	77 (46,1)
Dieta rica em cebola	83 (58,9)	14 (53,8)	97 (58,1)
Tabagismo	44 (31,0)	7 (26,9)	51 (30,4)
Uso regular de bebida alcoólica	62 (43,7)	7 (26,9)	69 (41,1)
Tempo da doença atual (dias)	4,7 ± 4,0	5,6 ± 3,7	4,9 ± 3,9

As variáveis estão representadas em n (%) ou $\bar{x} \pm s$.

5.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A tabela 12 resume os sintomas referidos pelos pacientes analisados. Observa-se que praticamente não há diferença clínica, na história clínica, entre pacientes com malária vivax e com malária falciparum. Observou-se em três pacientes com malária vivax a ausência de febre. O exame de gota espessa de sangue só foi realizado porque estes pacientes acompanhavam parentes enfermos e se decidiram pela realização do exame. Todos tinham relato de mais de 10 episódios de malária previamente.

Tabela 12

Caracterização clínica dos pacientes à história clínica, por espécie de plasmódio

Sintoma clínico	<i>P. vivax</i> N=142 n (%)	<i>P. falciparum</i> N=26 n (%)	Total N=168 n (%)
Febre	139 (97,9)	26 (100,0)	165 (98,2)
Mioartralgia	138 (97,2)	23 (88,5)	161 (95,8)
Cefaléia	130 (91,5)	22 (85,6)	152 (90,5)
Tontura	93 (65,5)	20 (76,9)	113 (67,3)
Dor abdominal	65 (45,8)	15 (57,7)	80 (47,6)
Dispnéia	48 (33,8)	9 (34,6)	57 (33,9)
Vômitos	46 (32,4)	9 (34,6)	55 (32,7)
Colúria	41 (28,9)	12 (46,2)	53 (31,5)
Diarréia	17 (12,1)	9 (34,6)	26 (15,6)
Oligúria	14 (9,9)	6 (23,1)	20 (11,9)
Menometrorragia ⁽¹⁾	3 (7,0)	0 (0,0)	3 (5,7)
Gengivorragia	5 (3,5)	0 (0,0)	5 (3,0)
Desmaio	2 (1,4)	0 (0,0)	2 (1,2)
Convulsão	0 (0,0)	1 (3,8)	1 (0,6)
Epistaxe	0 (0,0)	1 (3,8)	1 (0,6)
Hematênese leve	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (0,6)
Hematoquezia leve	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (0,6)

(1) Percentual entre pacientes do gênero feminino

Na tabela 13, estão discriminados os sinais apresentados pelos pacientes, ao exame físico. Igualmente, não se notam grandes diferenças entre os pacientes com infecção por *P. falciparum* ou por *P. vivax*, exceto pelos sinais característicos de malária grave (mais comuns na infecção por *P. falciparum*), tais como icterícia,

hipotensão grave e coma. Também se registraram mais casos de esplenomegalia volumosa nos pacientes com malária falciparum, e maior freqüência de hepatomegalia entre pacientes com malária vivax.

Tabela 13

Caracterização clínica dos pacientes ao exame físico, por espécie de plasmódio

Sinal clínico	<i>P. vivax</i> N=142 n (%)	<i>P. falciparum</i> N=26 n (%)	Total N=168 n (%)
Esplenomegalia	44 (31,7)	7 (28,0)	51 (31,1)
Hackett 2	35 (79,5)	4 (57,1)	39 (76,5)
Hackett 3	9 (20,5)	3 (42,9)	12 (23,5)
Hepatomegalia	41 (29,5)	4 (16,0)	45 (27,4)
Mucosas hipocoradas	33 (23,7)	8 (30,8)	41 (24,8)
Dor abdominal	30 (22,2)	7 (28,0)	37 (23,1)
Icterícia	12 (8,6)	5 (19,2)	17 (10,3)
Hemorragia conjuntival	1 (0,7)	2 (7,7)	3 (1,8)
Petéquia	2 (1,4)	1 (3,8)	3 (1,8)
Equimose	0 (0,0)	1 (3,8)	1 (0,6)
Hipotensão grave ⁽¹⁾	0 (0,0)	1 (3,8)	1 (0,6)
Coma ⁽²⁾	0 (0,0)	1 (3,8)	1 (0,6)

(1) TAS < 80 mmHg

(2) Escore < 9, na escala de coma de Glasgow

5.4 AVALIAÇÃO DOS EXAMES LABORATORIAIS

Nas tabelas 14 e 15, estão discriminadas as médias e as frequências, respectivamente, de variáveis obtidas na leitura da gota espessa, no hemograma e nas análises bioquímicas do sangue.

Não se observou qualquer diferença entre malária vivax e falciparum, no que diz respeito às variáveis hematológicas. Entre as provas de avaliação da hemostasia, observou-se maior TS entre pacientes com malária falciparum.

Não houve diferença entre as médias do TS entre pacientes com e sem sangramento clínico (78,1 x 69,3 s; teste U de Mann-Whitney; $p=0,176$). Também não houve associação entre o TS e a contagem de plaquetas (teste de Pearson; $r=0,009$; $p=0,929$).

Não houve associação entre o TC e RNI (teste de Pearson; $r=0,132$; $p=0,202$) ou TTPA (teste de Pearson; $r=-0,034$; $p=0,748$) ou entre a contagem de plaquetas e a leucometria (teste de Pearson; $r=0,102$; $p=0,186$).

Proporcionalmente, se observaram mais casos de hiperbilirrubinemia entre pacientes com malária falciparum.

Tabela 14

Exames laboratoriais realizados nos pacientes com malária, por espécie de plasmódio

Exames laboratoriais	<i>P. vivax</i> $\bar{x} \pm s$ (n)	<i>P. falciparum</i> $\bar{x} \pm s$ (n)	Total $\bar{x} \pm s$ (N)	p ⁽¹⁾
Parasitemia periférica (parasitos/ μ L)	3647,0 \pm 5073,2 (111)	3538,0 \pm 4704,8 (20)	3630,4 \pm 5001,5 (131)	0,918
Hemoglobina (g/dL)	13,1 \pm 1,7 (142)	13,3 \pm 1,2 (25)	13,2 \pm 1,7 (167)	0,525
Hemácias ($\times 10^6/\mu$ L)	4,4 \pm 0,6 (142)	4,4 \pm 0,6 (26)	4,4 \pm 0,6 (168)	0,792
VCM (μ m ³)	86,5 \pm 4,6 (142)	85,4 \pm 4,7 (26)	86,3 \pm 4,6 (168)	0,280
HCM (pg)	29,8 \pm 1,7 (142)	29,3 \pm 1,6 (26)	29,7 \pm 1,7 (168)	0,188
MHCM (g/dL)	34,5 \pm 1,0 (142)	34,4 \pm 1,3 (26)	34,4 \pm 1,0 (168)	0,753
RDW (%)	13,0 \pm 1,3 (142)	13,3 \pm 1,6 (26)	13,1 \pm 1,3 (168)	0,338
Leucócitos totais ($\times 1000/\mu$ L)	5,1 \pm 1,8 (142)	4,8 \pm 2,3 (26)	5,1 \pm 1,9 (168)	0,133
Linfócitos (%)	28,5 \pm 11,1 (141)	25,7 \pm 11,4 (26)	28,1 \pm 11,1 (167)	0,262
Monócitos (%)	9,1 \pm 4,5 (141)	9,0 \pm 3,5 (26)	9,1 \pm 4,3 (167)	0,808
Neutrófilos (%)	59,1 \pm 12,8 (141)	60,3 \pm 14,7 (26)	59,3 \pm 13,1 (167)	0,721
Eosinófilos (%)	2,6 \pm 2,5 (141)	4,4 \pm 6,0 (26)	2,9 \pm 3,3 (167)	0,477
Bastões (%)	0,4 \pm 0,6 (141)	0,4 \pm 0,4 (26)	0,4 \pm 0,6 (167)	0,127
Plaquetas ($\times 1000/\mu$ L)	119,8 \pm 53,6 (142)	122,6 \pm 66,7 (26)	120,2 \pm 55,6 (168)	0,841

Tabela 14 (cont.)

Exames laboratoriais realizados nos pacientes com malária, por espécie de plasmódio

Exames laboratoriais	<i>P. vivax</i> $\bar{x} \pm s$ (n)	<i>P. falciparum</i> $\bar{x} \pm s$ (n)	Total $\bar{x} \pm s$ (N)	p ⁽¹⁾
VPM (μm^3)	8,0 \pm 1,0 (141)	8,2 \pm 1,0 (24)	8,0 \pm 1,0 (165)	0,342
PCT (%)	0,09 \pm 0,03 (141)	0,10 \pm 0,05 (24)	0,9 \pm 0,4 (165)	0,476
PDW (%)	16,1 \pm 3,5 (139)	16,7 \pm 3,4 (24)	16,2 \pm 3,4 (163)	0,431
RNI	1,09 \pm 0,17 (131)	1,08 \pm 0,12 (21)	1,0 \pm 0,2 (152)	0,684
TTPA (s)	26,0 \pm 5,2 (130)	28,2 \pm 5,9 (20)	26,3 \pm 5,3 (150)	0,122
TS (s)	68,1 \pm 16,3 (94)	82,1 \pm 21,9 (14)	70,0 \pm 17,6 (108)	0,020
TC (s)	332,7 \pm 120,3 (94)	347,4 \pm 89,5 (16)	334,8 \pm 116,1 (110)	0,571

(1) Teste *t* de Student ou teste U de Mann-Whitney

Tabela 15

Achados laboratoriais encontrados nos pacientes com malária

Achados laboratoriais	<i>P. vivax</i> n/N (%)	<i>P. falciparum</i> n/N (%)	Total n/N (%)	p ⁽¹⁾	
Parasitemia semi-quantitativa	< ½ +	35/141 (24,8)	8/26 (30,8)	43/167 (25,7)	0,714
	½ +	16/141 (11,3)	1/26 (3,8)	17/167 (10,2)	
	+	31/141 (22,0)	6/26 (23,1)	37/167 (22,2)	
	++	57/141 (40,4)	7/26 (26,9)	64/167 (38,3)	
	+++	2/141 (1,4)	4/26 (15,4)	6/167 (3,6)	
Gametocitemia periférica	-	6/26 (23,1)	-	-	
Esquizontemia periférica	-	6/26 (23,1)	-	-	
Anemia ⁽²⁾	53/142 (37,3)	8/25 (32,0)	61/167 (36,5)	0,251	
Anemia grave ⁽³⁾	0/142 (0,0)	0/25 (0,0)	0/167 (0,0)	-	
Leucocitose ⁽⁴⁾	1/142 (0,7)	2/26 (3,8)	3/168 (1,2)	0,286	
Leucopenia ⁽⁵⁾	39/142 (27,5)	10/26 (38,5)	49/168 (29,2)	0,183	
Linfocitose ⁽⁶⁾	42/142 (29,6)	5/26 (19,2)	47/168 (28,0)	0,202	
Neutrofilia ⁽⁷⁾	36/142 (25,4)	9/26 (34,6)	45/168 (26,8)	0,226	
Plaquetopenia ⁽⁸⁾	102/142 (71,8)	17/26 (65,4)	119/168 (70,8)	0,327	
Plaquetopenia grave ⁽⁹⁾	12/142 (8,5)	3/26 (11,5)	15/168 (8,9)	0,419	
Distúrbio de coagulação ⁽¹⁰⁾	109/130 (83,8)	16/20 (80,0)	125/150 (83,3)	0,436	
TS prolongado ⁽¹¹⁾	0/94 (0,0)	0/14 (0,0)	0/108 (0,0)	-	
TC prolongado ⁽¹²⁾	1/94 (1,0)	0/16 (0,0)	1/110 (0,9)	0,671	
PL positiva	0/97 (0,0)	0/16 (0,0)	0/113 (0,0)	-	
Hipoglicemia ⁽¹³⁾	0/142 (0,0)	0/26 (0,0)	0/168 (0,0)	-	
Insuficiência renal aguda ⁽¹⁴⁾	0/142 (0,0)	1/26 (3,8)	1/168 (0,6)	0,155	
Hiperbilirrubinemia ⁽¹⁵⁾	1/142 (0,7)	3/26 (11,5)	4/168 (2,4)	0,012	

(1) Teste do Qui-quadrado ou teste de Fisher

(8) Plaquetimetria < 150.000/μL

(2) Hemoglobina < 12 g/dL (mulheres) e < 13 g/dL (homens)

(9) Plaquetimetria < 50.000/μL

(3) Hemoglobina < 7 g/dL

(10) RNI > 1,26 ou TTPA > 34 s

(4) Leucócitos > 12.000/μL

(11) TS > 3 min

(5) Leucócitos < 4000/μL

(12) TC > 10 min

(6) Contagem de linfócitos > 35%

(13) Glicemia < 40 mg/dL

(7) Contagem de neutrófilos > 70%

(14) Creatinina sérica > 3,0 mg/dL

(15) Bilirrubina sérica total > 5,0 mg/dL

5.5 MALÁRIA GRAVE

Na tabela 16, estão detalhados dados individuais, clínicos e laboratoriais dos cinco pacientes com malária que preencheram os critérios de gravidade da OMS, sendo dois deles com malária vivax e três com malária falciparum.

Tabela 16

Caracterização clínica dos casos de malária grave

Característica	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
Espécie de plasmódio	<i>P.v.</i>	<i>P.v.</i>	<i>P.f.</i>	<i>P.f.</i>	<i>P.f.</i>
Gênero	Feminino	Feminino	Masculino	Masculino	Feminino
Idade (anos)	33	44	35	32	60
Tempo de doença (dias)	5	7	11	5	10
Primoinfecção	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Parasitemia/ μ L	29.783	6160	-	3496	15.158
Hiperbilirrubinemia ⁽¹⁾	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Insuficiência renal aguda ⁽²⁾	Não	Não	Não	Não	Sim
Malária cerebral ⁽³⁾	Não	Não	Não	Não	Sim
Malária algida ⁽⁴⁾	Não	Não	Não	Sim	Não
Plaquetimetria (x1000/ μ L)	42	24	44	32	8
Distúrbio de coagulação ⁽⁵⁾	Sim	Sim	-	Não	-
Óbito	Não	Não	Não	Não	Sim

(1) Bilirrubina sérica total > 5,0 mg/dL

(2) Creatinina sérica > 3,0 mg/dL

(3) Coma (escore total < 9, na escala de coma de Glasgow)

(4) Hipotensão grave (TAS < 80 mmHg)

(5) RNI > 1,26 ou TTPA > 34 s

Entre os pacientes com malária vivax grave, a única complicação observada foi a hiperbilirrubinemia. Já entre os pacientes com malária falciparum, observou-se também insuficiência renal aguda, malária cerebral e malária álgida.

O tempo de doença entre os pacientes graves variou de 5 a 11 dias. Quatro dos cinco pacientes eram primoinfectados.

Entre os pacientes graves que se pôde observar clinicamente além do dia da inclusão, houve um óbito (paciente com malária falciparum) e em todos os casos observou-se plaquetopenia grave. No caso do óbito não foi possível realizar a necropsia. Apenas em uma paciente com malária falciparum que se apresentava com insuficiência renal aguda, hiperbilirrubinemia e coma, observou-se leucocitose (contagem de leucócitos de 14.300/ μ L). Na tabela 17, estão resumidos os principais desfechos do estudo (freqüência de plaquetopenia, sangramentos e malária grave).

Tabela 17

Freqüências de plaquetopenia, sangramento e malária grave

Principais desfechos	n/N	% (IC _{95%})
Plaquetopenia ⁽¹⁾	119/168	70,8 (66,7 – 74,9)
Sangramento entre os pacientes com plaquetopenia	14/119	11,7 (7,5 – 15,9)
Plaquetopenia grave ⁽²⁾	15/168	8,9 (4,6 – 13,2)
Sangramento entre os pacientes com plaquetopenia grave	4/15	26,6 (18,1 – 35,1)
Malária grave por <i>P. falciparum</i>	3/26	11,5 (3,2 – 19,9)
Malária grave por <i>P. vivax</i>	2/142	1,4 (0,0 - 4,6)

(1) Plaquetimetria < 150.000/ μ L

(2) Plaquetimetria < 50.000/ μ L

5.6 AVALIAÇÃO DA PLAQUETIMETRIA

A plaquetopenia foi encontrada em 70,8% dos pacientes, com semelhante proporção entre pacientes com malária vivax e falciparum.

Na tabela 18, observa-se que a maior ocorrência de sangramento se deu nos casos de plaquetopenia grave, sendo mais freqüentes os casos de sangramentos leves. No gênero feminino, o mais freqüente foi a menometrorragia.

Tabela 18

Freqüência de tipos de sangramento, distribuída pelos níveis de plaquetopenia

Sangramento	Plaquetopenia grave ⁽¹⁾ n/N (%)	Plaquetopenia moderada ⁽²⁾ n/N (%)	Plaquetopenia leve ⁽³⁾ n/N (%)	Plaquetimetria normal ⁽⁴⁾ n/N (%)	Total n/N (%)
Menometrorragia ⁽⁵⁾	1/7 (14,3)	1/14 (7,1)	1/12 (8,3)	0/21 (0,0)	3/54 (5,7)
Gengivorragia	1/15 (6,7)	1/54 (1,9)	3/50 (6,0)	0/49 (0,0)	5/168 (3,0)
Conjuntival	1/15 (6,7)	2/54 (3,7)	0/50 (0,0)	0/49 (0,0)	3/168 (1,8)
Petéquia	1/15 (6,7)	0/54 (0,0)	1/50 (2,0)	1/49 (2,0)	3/168 (1,8)
Equimose	1/15 (6,7)	0/54 (0,0)	0/50 (0,0)	0/49 (0,0)	1/168 (0,6)
Epistaxe	1/15 (6,7)	0/54 (0,0)	0/50 (0,0)	0/49 (0,0)	1/168 (0,6)
Hematêtese leve	1/15 (6,7)	0/54 (0,0)	0/50 (0,0)	0/49 (0,0)	1/168 (0,6)
Hematoquezia leve	0/15 (0,0)	0/54 (0,0)	1/50 (2,0)	0/49 (0,0)	1/168 (0,6)
Algum sangramento	4/15 (26,6)⁽⁶⁾	4/54 (7,4)	6/50 (12,0)	1/49 (2,0)	15/168 (8,9)

(1) Plaquetopenia grave: < 50.000/μL

(2) Plaquetopenia moderada: 50.000 – 100.000/μL

(3) Plaquetopenia leve: 100.000 – 150.000/μL

(4) Plaquetimetria normal: > 150.000/μL

(5) Percentual entre pacientes do gênero feminino

(6) Três pacientes apresentaram dois tipos de sangramento simultaneamente

Na avaliação das variáveis preditoras de sangramento, observou-se, na análise univariada, associação com plaquetopenia grave e malária grave. Na análise multivariada, o sangramento esteve associado, de forma independente, apenas à ocorrência de malária grave (Tabela 19).

Tabela 19

Análise univariada e modelos de regressão logística (análise multivariada) de possíveis preditores de sangramento, nos pacientes com malária

	OR não ajustada (IC _{95%})	p ⁽¹⁾	OR ajustada (IC _{95%})	p ⁽²⁾
Gênero masculino	0,68 (0,23-2,03)	0,497	0,98 (0,27-3,50)	0,981
Primoinfecção	0,58 (0,15-2,15)	0,418	0,20 (1,01-1,27)	0,130
Plaquetopenia grave ⁽²⁾	4,69 (1,28-17,19)	0,020	1,77 (0,02-1,61)	0,621
Distúrbio de coagulação	1,41 (0,36-5,48)	0,617	0,84 (0,16-4,35)	0,839
Malária grave	18,87 (2,87-124,10)	0,002	54,75 (1,41-2125,73)	0,032

(1) Teste de Mantel-Haenszel

(2) Estatística de ajustamento da equação (*goodness-of-fit*) de Hosmer-Lemeshow

(3) Plaquetimetria < 50.000/ μ L

Nas figuras de 23 a 25, evidenciam-se as formas brandas de sangramento apresentadas por alguns pacientes com plaquetopenia grave, tais como hemorragia conjuntival e equimoses em local de venipunção.

Nenhum dos pacientes avaliados necessitou de transfusão de plaquetas, pois não apresentaram sinais clínicos ou laboratoriais de CIVD ou sangramento de grande intensidade, e comprometimento da hemodinâmica.

Na figura 26, está ilustrada a presença de megaplaqueta, em esfregaço de sangue, em um dos pacientes com malária falciparum grave e plaquetopenia grave. Em muitos outros pacientes com plaquetopenia grave, evidenciou-se a presença de megaplaquetas ao esfregaço, mas o percentual desse achado não foi quantificado, pois se preferiu a aferição do VPM.



Figura 23: Foto de paciente com malária vivax e plaquetopenia grave, evidenciando hemorragia conjuntival bilateral



Figura 24: Foto de paciente com malária vivax e plaquetopenia grave, evidenciando hemorragia conjuntival unilateral



Figura 25: Foto de paciente com malária falciparum grave e plaquetopenia grave, evidenciando várias equimoses no membro superior esquerdo, em locais de venipunção

Observou-se correlação inversa significativa entre a plaquetimetria e o VPM, apenas nos casos de malária vivax (Figura 27). De maneira semelhante, a hematimetria também apresentou correlação inversa significativa com o VCM (Figura 28). Quando se correlacionou a plaquetimetria com a hematimetria, observou-se uma tendência à correlação positiva nos casos de malária vivax, mas nenhuma evidência de correlação nos casos de malária falciparum (Figura 29).

Na tabela 20, realizou-se uma análise univariada da associação de fatores como características individuais, história patológica pregressa, hábitos de vida, sinais e sintomas da infecção atual e exames laboratoriais, com a presença de plaquetopenia. Nessa análise, apenas a dieta rica em alho, o tempo de doença superior a quatro dias, a presença de esplenomegalia, a alta parasitemia e a presença de distúrbio de coagulação mostraram associação significativa. Estiveram próximos da significância estatística o gênero masculino e o número de infecções prévias por malária.

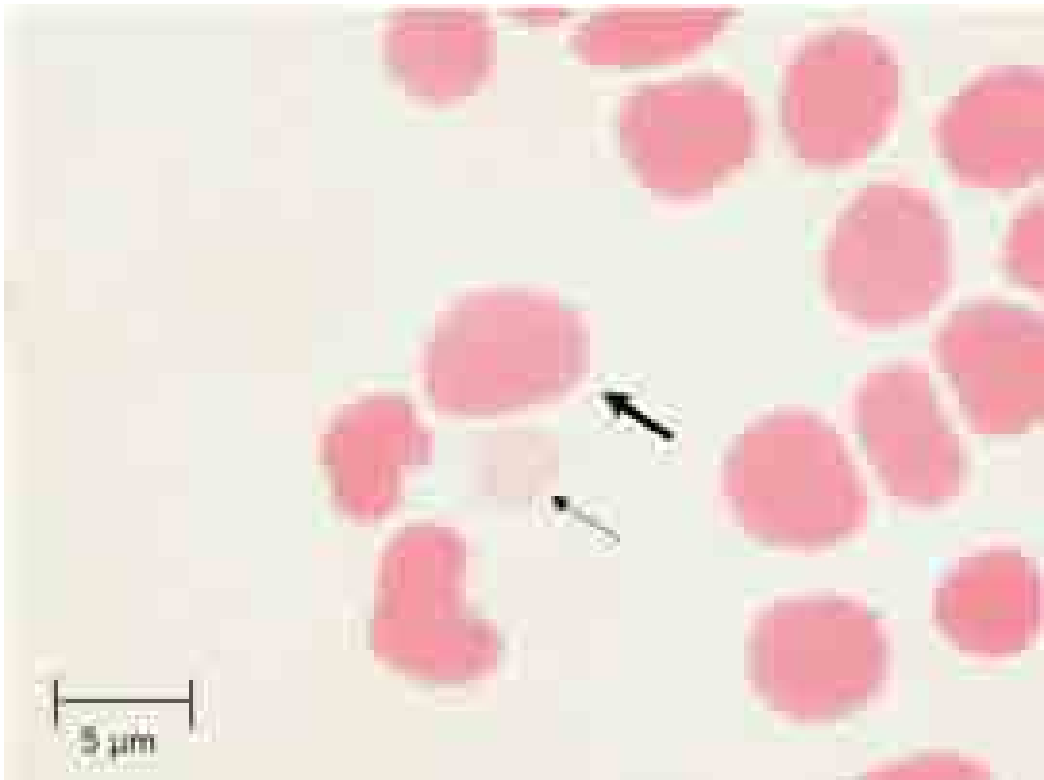


Figura 26: Esfregaço de paciente com malária falciparum grave e plaquetimetria de 29.000/ μ L, onde se evidenciam hemácias (seta grossa) e uma megaplaqueta (seta fina) (hematoxilina/eosina; aumento de 1000x)

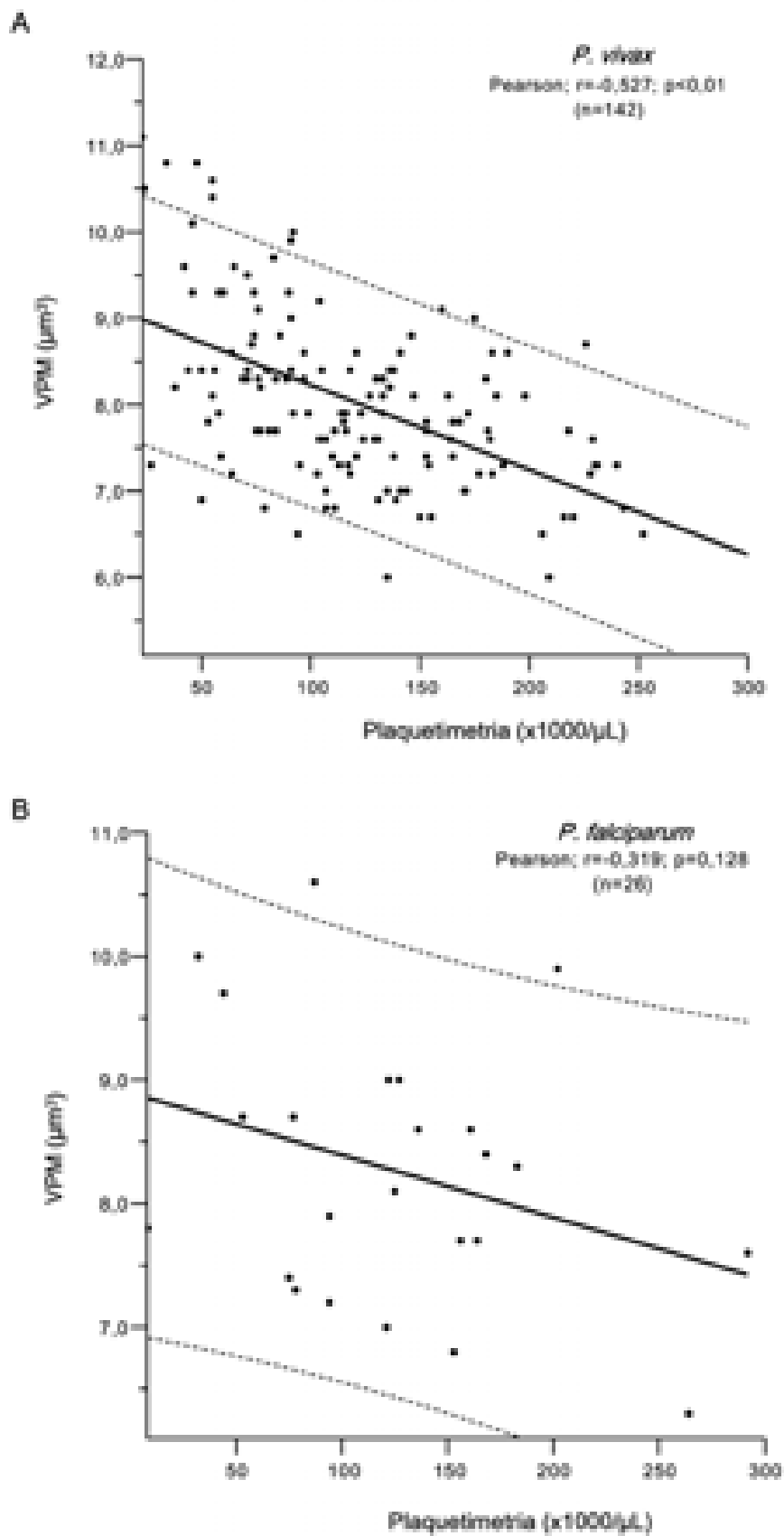


Figura 27: Correlação entre plaquetimetria e VPM, em pacientes com malária vivax (A) e malária falciparum (B), com reta de regressão e IC_{95%}

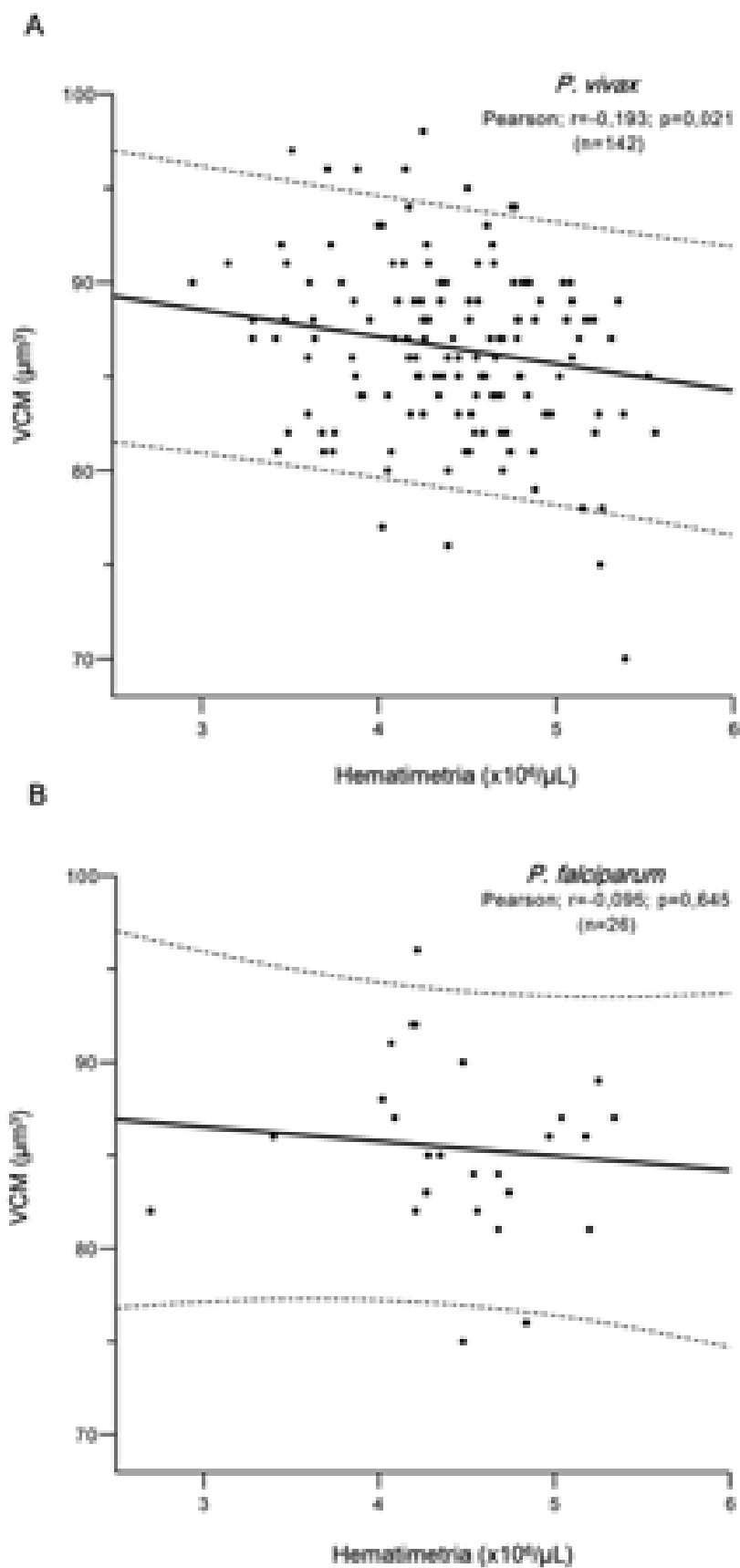


Figura 28: Correlação entre hematimetria e VCM, em pacientes com malária vivax (A) e malária falciparum (B), com reta de regressão e IC_{95%}

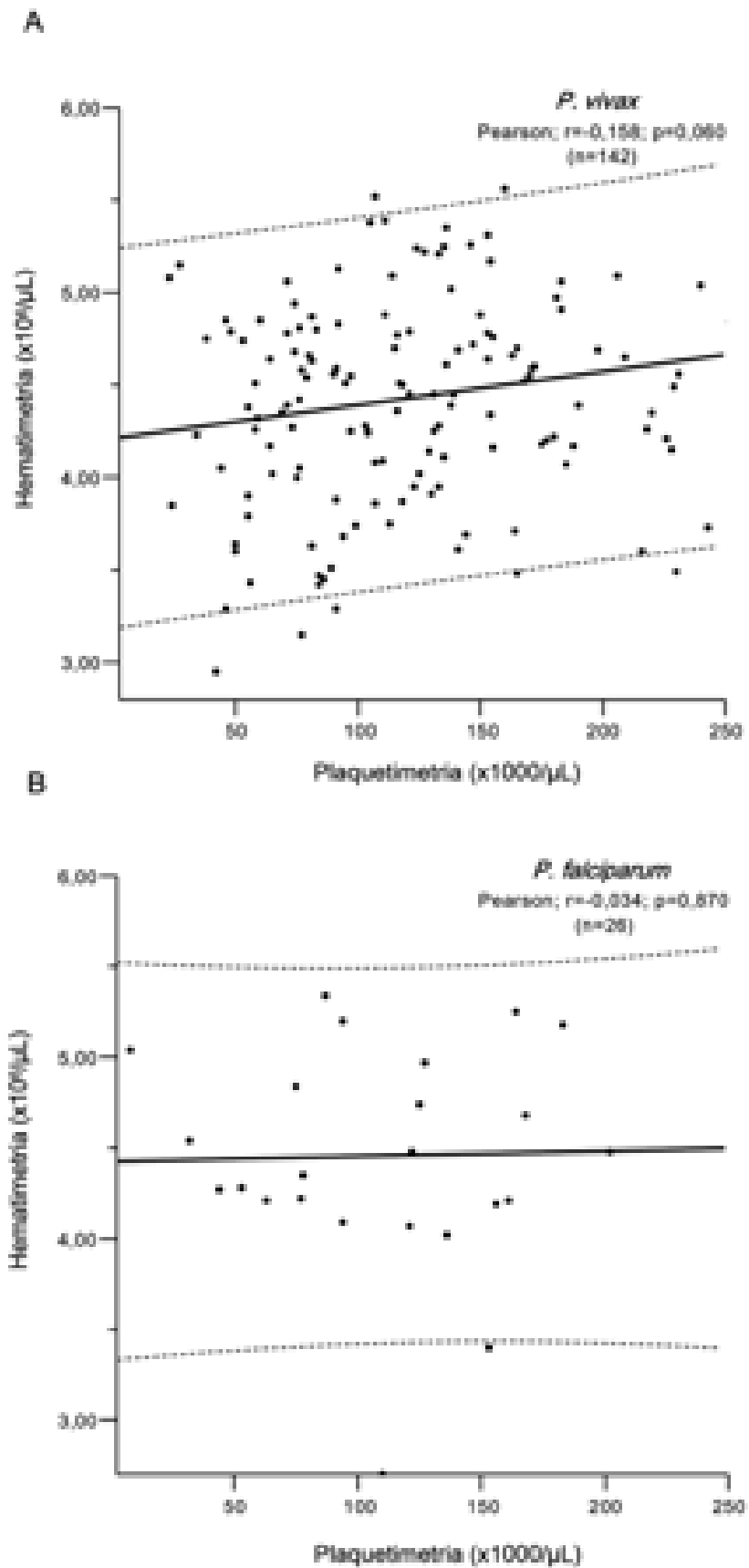


Figura 29: Correlação entre plaquetimetria e hematimetria, em pacientes com malária vivax (A) e malária falciparum (B), com reta de regressão e IC_{95%}

Tabela 20

Análise univariada de possíveis preditores de plaquetopenia, nos pacientes com malária

		Plaquetopenia ⁽¹⁾	Plaquetas normais N=49 n (%)	Total N=168 n (%)	OR (IC _{95%})	p ⁽²⁾
Gênero	Masculino	86 (75,4)	28 (24,6)	114 (67,9)	1,95 (0,97-3,91)	0,058
	Feminino	33 (61,1)	21 (38,9)	54 (32,1)		
Cor/Raça	Parda	89 (70,6)	37 (29,4)	126 (75,0)	1,11 (0,58-2,14)	0,749
	Branca	22 (73,3)	8 (26,7)	30 (17,9)		
	Preta	7 (63,6)	4 (36,4)	11 (6,5)		
	Indígena	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (0,6)		
Idade	< 50 anos	95 (68,8)	43 (31,2)	138 (82,1)	0,55 (0,21-1,45)	0,228
	> 50 anos	24 (80,0)	6 (20,0)	30 (17,9)		
Número de infecções maláricas prévias	0 (primoinfectados)	39 (79,6)	10 (20,4)	49 (29,2)	1,36 (0,99-1,88)	0,061
	1x	33 (67,3)	16 (32,7)	49 (29,2)		
	2-5x	34 (75,5)	11 (24,5)	45 (26,8)		
	> 5x	13 (52,0)	12 (48,0)	25 (14,9)		
História de malária nos últimos 2 meses		18 (75,0)	6 (25,0)	24 (14,3)	1,27 (0,47-3,43)	0,628
Transfusão prévia de hemoderivados ou hemocomponentes		7 (46,7)	8 (53,3)	15 (8,9)	0,32 (0,10-1,10)	0,080
Uso de AAS nos últimos 7 dias		26 (65,0)	14 (35,0)	40 (23,8)	0,70 (0,33-1,49)	0,354
Dieta rica em alho		48 (62,3)	29 (37,7)	77 (46,1)	0,47 (0,24-0,93)	0,030
Dieta rica em cebola		66 (68,0)	31 (32,0)	97 (58,1)	0,74 (0,37-1,46)	0,383

Tabela 20 (cont.)

Análise univariada de possíveis preditores de plaquetopenia, nos pacientes com malária

		Plaquetopenia ⁽¹⁾	Plaquetas normais N=49 n (%)	Total N=168 n (%)	OR (IC _{95%})	p ⁽²⁾
		N=119 n (%)				
Tabagismo		41 (80,4)	10 (19,6)	51 (30,4)	2,05 (0,93-4,52)	0,075
Uso regular de bebida alcoólica		52 (75,4)	17 (24,6)	69 (41,1)	1,46 (0,73-2,91)	0,282
Tempo de doença	< 4 dias	51 (61,4)	32 (38,6)	83 (49,4)	0,40 (0,20-0,79)	0,009
	> 4 dias	68 (80,0)	17 (20,0)	85 (50,6)		
Esplenomegalia		42 (82,3)	9 (17,7)	51 (31,1)	2,46 (1,09-5,57)	0,031
Espécie de plasmódio	<i>P. vivax</i>	102 (71,8)	40 (28,2)	142 (84,5)	1,35 (0,56-3,28)	0,507
	<i>P. falciparum</i>	17 (65,4)	9 (34,6)	26 (15,5)		
Parasitemia semi-quantitativa	< ½ +	22 (51,2)	21 (48,8)	43 (25,7)	0,64 (0,49-0,84)	0,001
	½ +	11 (64,7)	6 (35,7)	17 (10,2)		
	+	29 (78,4)	8 (21,6)	37 (22,2)		
	++	51 (79,7)	13 (20,3)	64 (38,3)		
	+++	5 (83,3)	1 (16,7)	6 (3,6)		
Distúrbio de coagulação		84 (67,2)	41 (32,8)	125 (83,3)	0,28 (0,08-0,99)	0,048
Malária grave		5 (100,0)	0 (0,0)	5 (3,0)	-	-

(1) Plaquetimetria < 150.000/μL

(2) Teste de Mantel-Haenszel

Após a aplicação dos modelos de regressão logística, observaram-se OR ajustadas que mostraram significância da associação apenas entre plaquetopenia e gênero masculino, número de infecções prévias de malária e parasitemia (Tabela 21).

Tabela 21

Modelos de regressão logística (análise multivariada) das variáveis preditoras de plaquetopenia (plaquetimetria < 150.000/ μ L), nos pacientes com malária

	OR não ajustada (IC _{95%})	p	OR ajustada (IC _{95%})	p ⁽¹⁾
Gênero masculino	1,95 (0,97-3,91)	0,058	2,82 (1,08-7,37)	0,034
Número de infecções maláricas prévias ⁽²⁾	1,36 (0,99-1,88)	0,061	1,14 (1,01-1,27)	0,030
Dieta rica em alho	0,47 (0,24-0,93)	0,030	0,80 (0,30-2,10)	0,638
Tempo de doença (dias) ⁽²⁾	0,40 (0,20-0,79)	0,009	0,95 (0,81-1,12)	0,565
Esplenomegalia	2,46 (1,09-5,57)	0,031	2,37 (0,79-7,13)	0,126
Parasitemia/ μ L ⁽²⁾	0,64 (0,49-0,84)	0,001	0,99 (0,99-1,00)	0,050
Distúrbio de coagulação	0,28 (0,08-0,99)	0,048	0,36 (0,07-1,75)	0,204

(1) Estatística de ajustamento da equação (*goodness-of-fit*) de Hosmer-Lemeshow

(2) Foram utilizadas as variáveis não-categóricas na análise multivariada

Na figura 30, observa-se menor contagem de plaquetas em pacientes primoinfectados, em comparação com pacientes que referiam mais de cinco infecções prévias por malária, de fato, de maneira independente da parasitemia, que não se alterou com o número prévio de infecções maláricas.

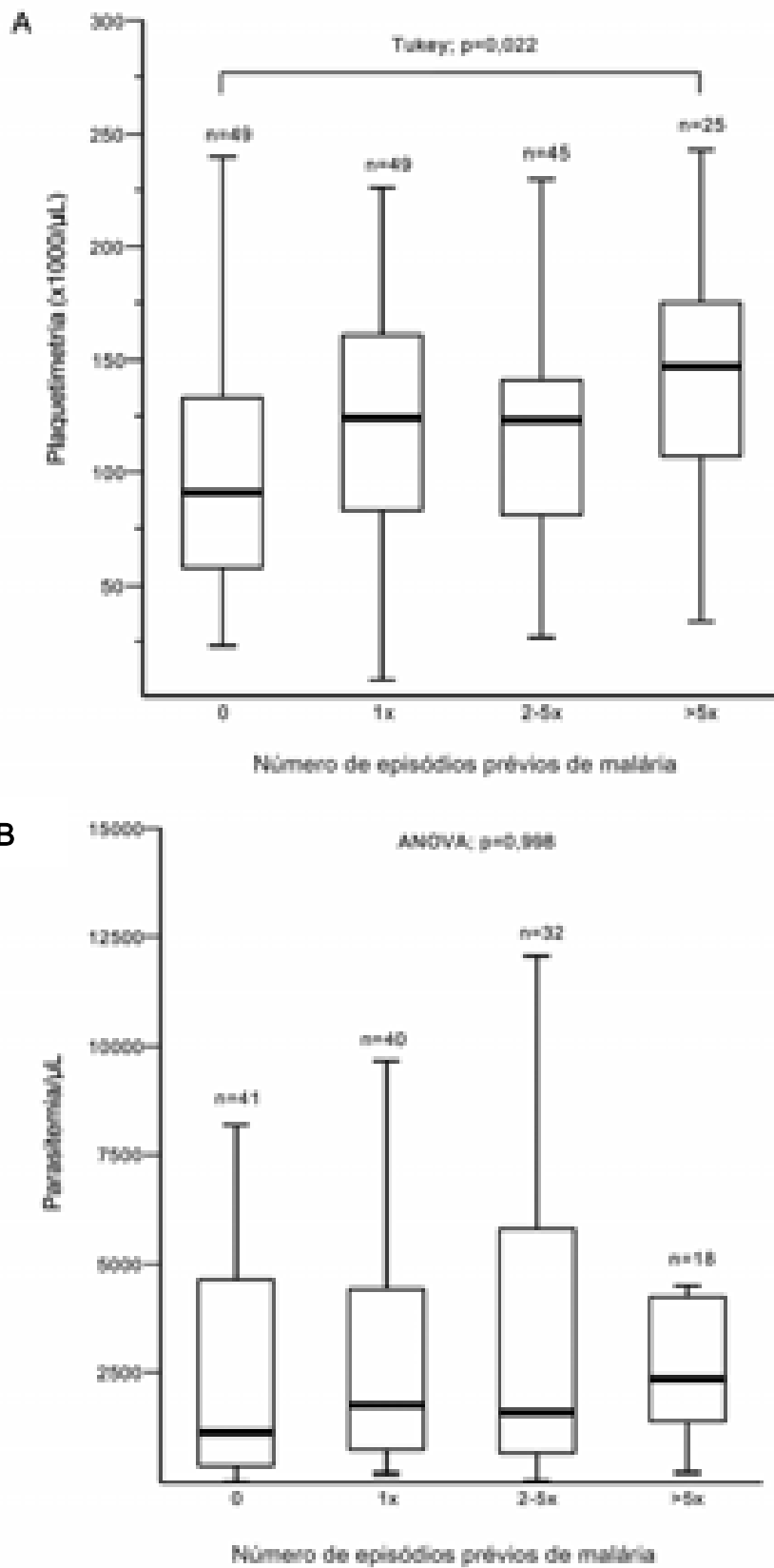


Figura 30: Plaquetimetria (A) e parasitemia (B) de pacientes com diferentes níveis de exposição prévia à malária

Na figura 31, observa-se uma correlação inversa significativa entre parasitemia e plaquetimetria, nos pacientes com malária vivax. Nos pacientes com malária falciparum, houve uma tendência ao mesmo tipo de correlação, apesar de não se ter obtido a significância estatística, utilizando-se o limiar de erro alfa estabelecido previamente.

Na figura 32, observa-se que houve maior contagem de plaquetas nos pacientes com malária vivax que referiam uso regular de grande quantidade de alho (*A. sativum*). Entretanto, houve também uma menor parasitemia nesses mesmos pacientes.

Na tabela 22, observa-se significância de correlação entre plaquetimetria e RNI, TTPA, tempo de doença e parasitemia periférica. Quando se aplicam os modelos de regressão linear, ajustando-se a correlação pelo RNI, TTPA, tempo de doença, parasitemia, gênero e espécie de plasmódio, verifica-se que plaquetimetria está associada apenas com parasitemia, conforme já demonstrado na análise de regressão logística.

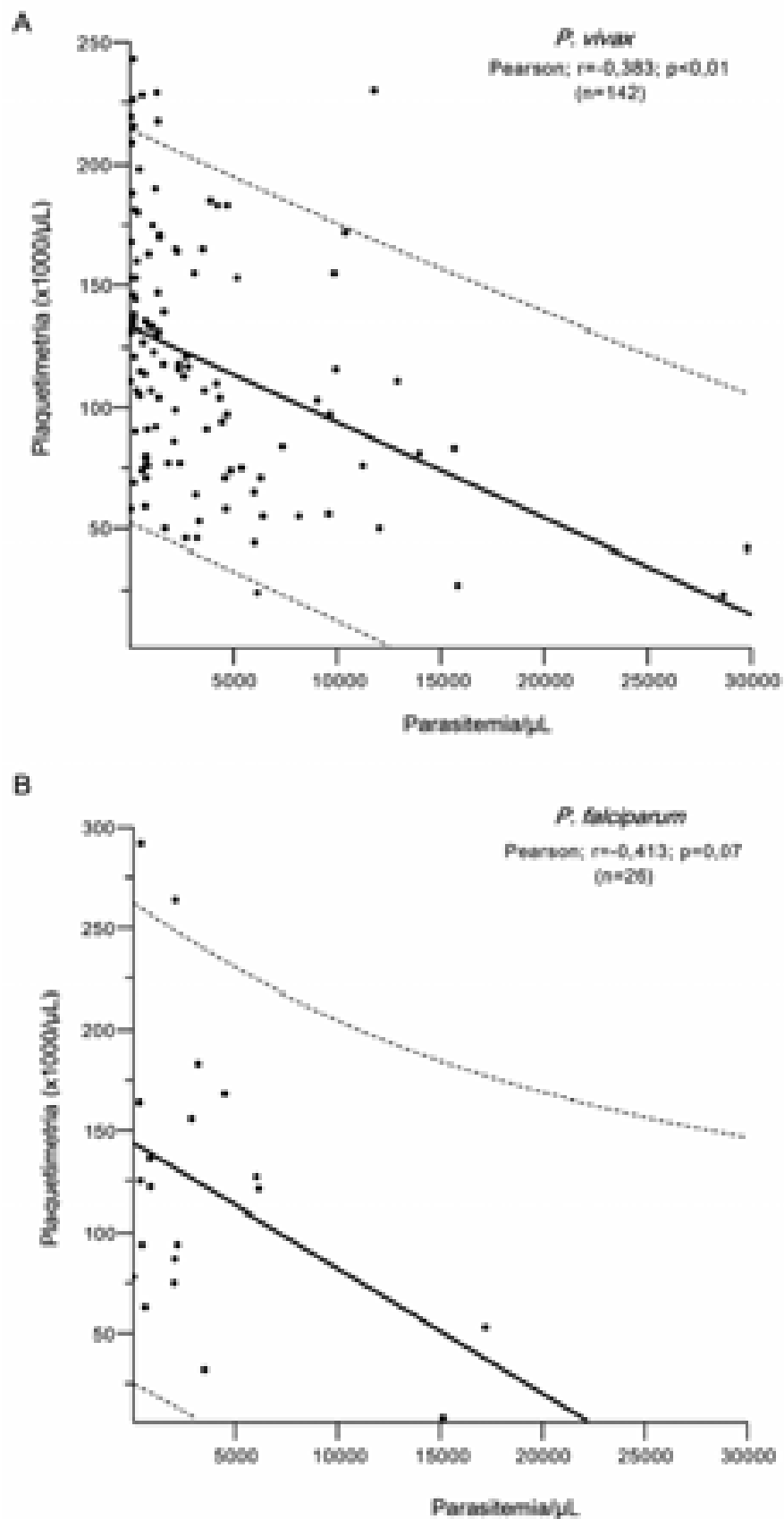


Figura 31: Correlação entre parasitemia e plaquetimetria, em pacientes com malária vivax (A) e malária falciparum (B), com reta de regressão e IC_{95%}

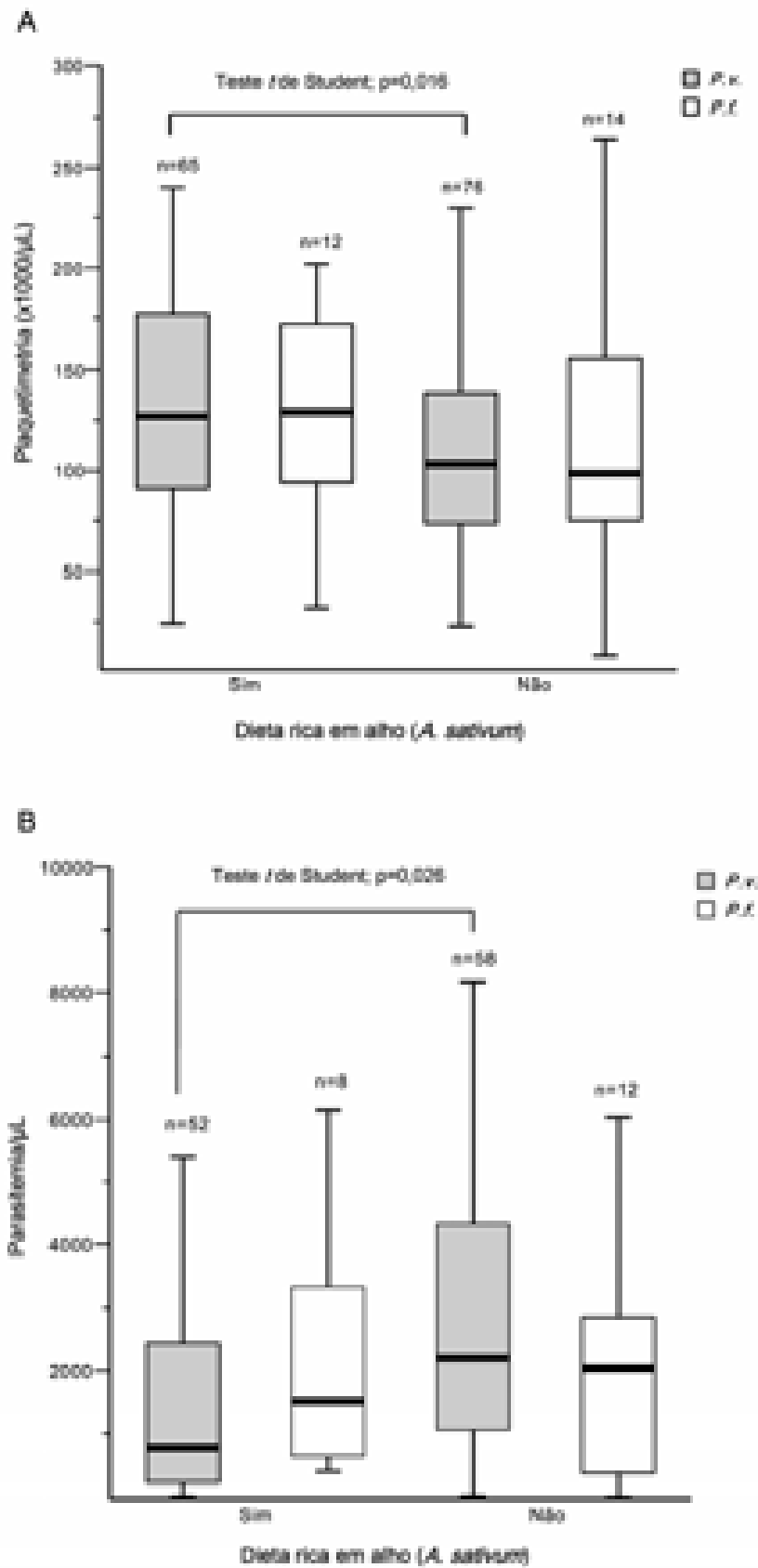


Figura 32: Plaquetimetria (A) e parasitemia (B) de pacientes com e sem dieta rica em alho

Tabela 22

Modelos de regressão linear multivariada de plaquetimetria, nos pacientes com malária

	r ⁽¹⁾	p	r ⁽²⁾	p
Plaquetimetria/ μ L x RNI	-0,160	0,050	-0,097	0,292
Plaquetimetria/ μ L x TTPA (s)	-0,209	0,010	-0,037	0,691
Plaquetimetria/ μ L x tempo de doença (dias)	-0,375	<0,001	-0,170	0,056
Plaquetimetria/ μ L x parasitemia/ μ L	-0,397	<0,001	-0,312	0,001

(1) Coeficiente de correlação de Spearman não-ajustado

(2) Coeficiente de regressão ajustado para RNI, TTPA, tempo de doença, parasitemia, gênero e espécie de plasmódio

5.7 EVOLUÇÃO CLÍNICA DA ESPLENOMETRIA E DA PLAQUETIMETRIA

Na figura 33, observa-se que dos sete pacientes hospitalizados com malária, apenas um não apresentava plaquetopenia à admissão. Entretanto, com a negatificação da parasitemia, até o quinto dia após o início da terapêutica específica, todos os pacientes apresentaram plaquetas no nível da normalidade após o sexto dia de observação. A velocidade de recuperação da contagem de plaquetas foi muito semelhante em todos os pacientes.

O tamanho do maior eixo do baço à ultra-sonografia, por outro lado, não mostrou redução importante ao longo dos sete dias de hospitalização. Três pacientes com malária falciparum tiveram esplenometria normal durante o tempo observado. Os três pacientes com malária vivax apresentaram esplenomegalia durante a internação (Figura 34).

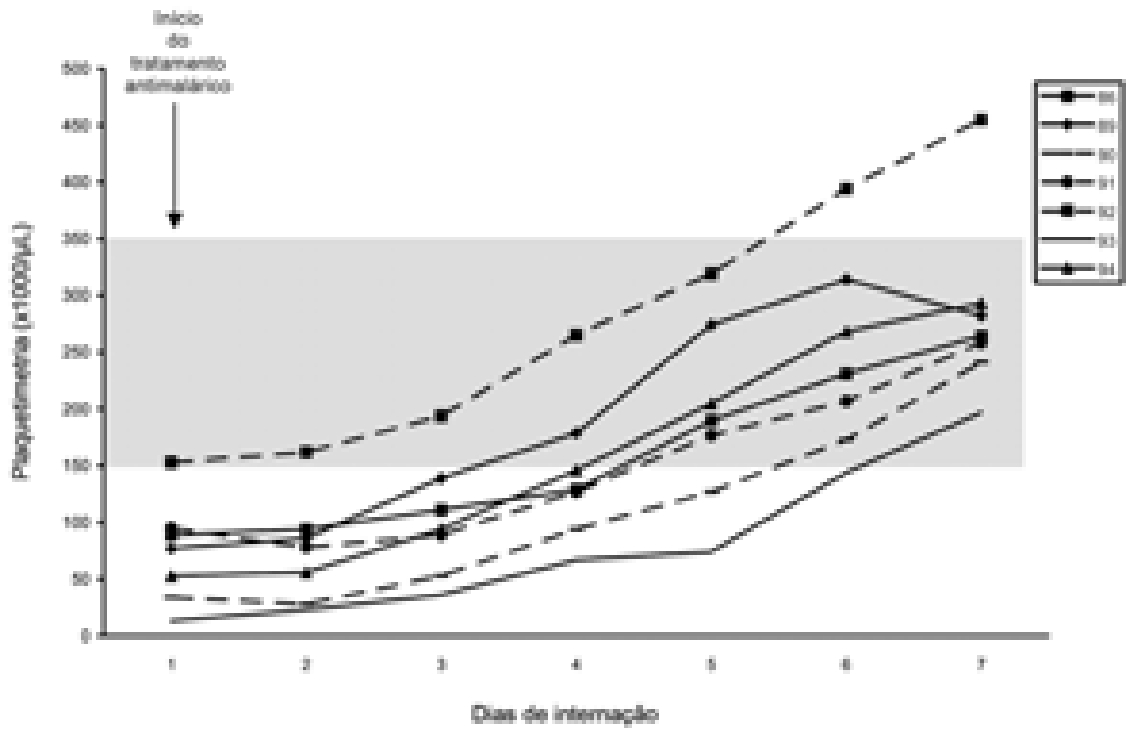


Figura 33: Plaquetimetria seriada de 3 pacientes com malária vivax (linhas interrompidas) e 4 pacientes com malária falciparum (linhas contínuas), durante 7 dias de hospitalização (intervalo de normalidade em cinza)

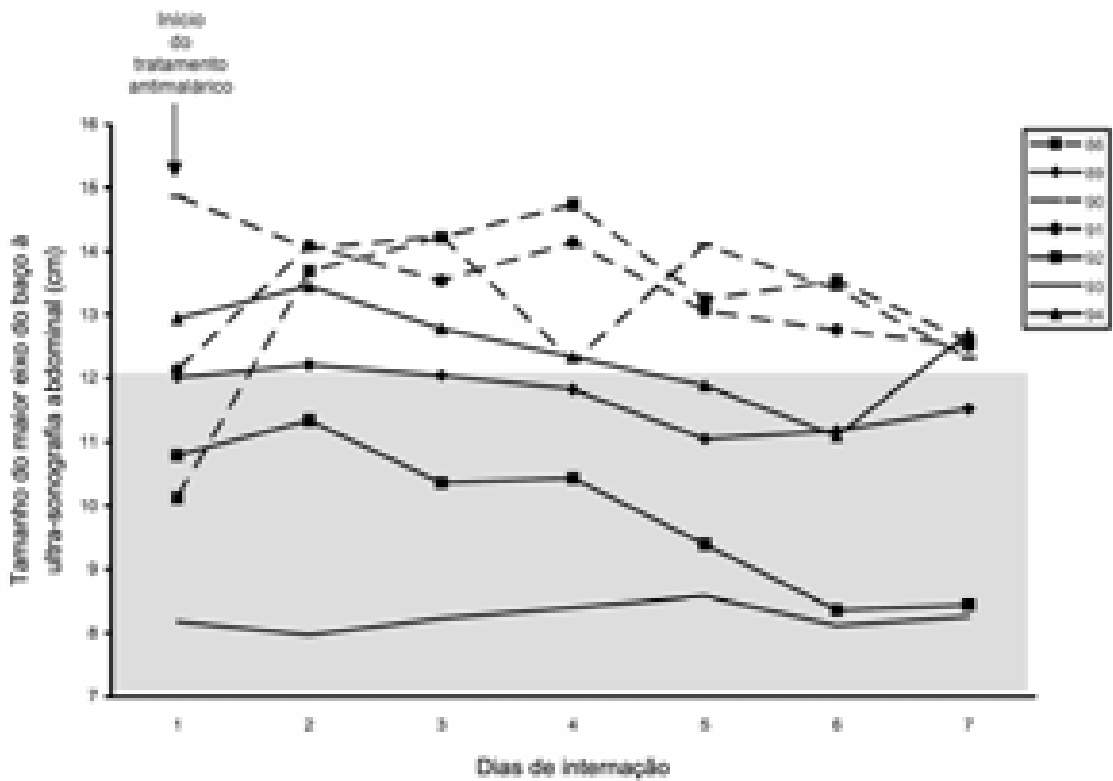


Figura 34: Esplenometria seriada de 3 pacientes com malária vivax (linhas interrompidas) e 4 pacientes com malária falciparum (linhas contínuas), durante 7 dias de hospitalização (intervalo de normalidade em cinza)

Apesar de não representados graficamente, a aferição diária de hemoglobina sérica não mostrou alteração aparente, ao longo dos sete dias de observação dos pacientes.

Na figura 35, está ilustrado um exemplo de aferição do maior eixo do baço à ultra-sonografia abdominal, em inspiração profunda.

Durante a realização das ultra-sonografias esplênicas nos sete pacientes internados, foi possível a identificação de um paciente com três pequenos baços acessórios (Figura 36), um paciente com discreto hematoma subcapsular esplênico (Figura 37) e um paciente com o "sinal do beijo" (aumento expressivo do baço e do fígado, permitindo a aproximação do pólo diafragmático do baço com o lobo esquerdo do fígado; o achado ultra-sonográfico traduz a hepatoesplenomegalia ao exame físico) (Figura 38).

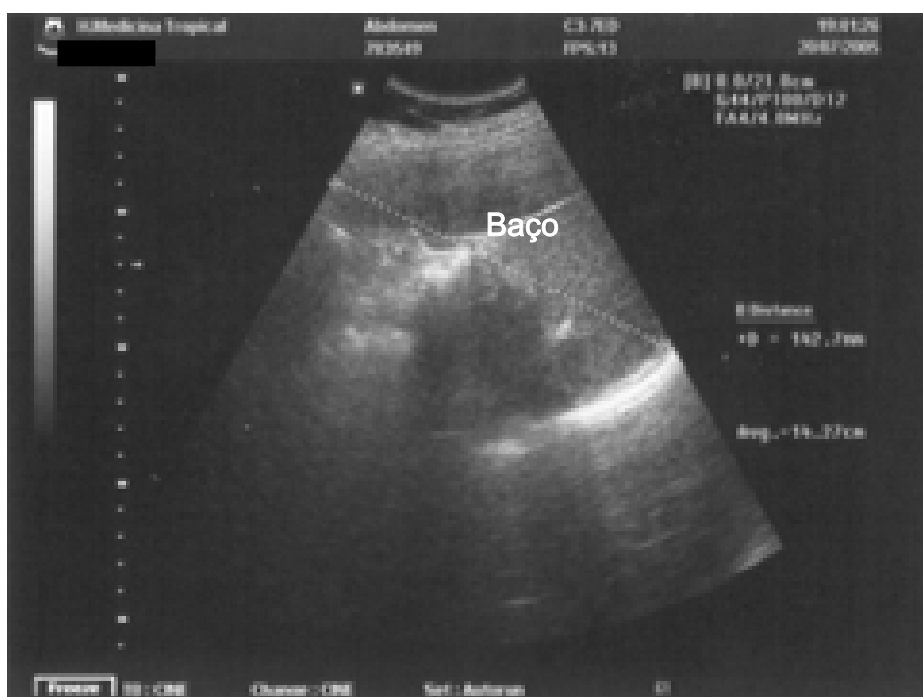


Figura 35: Ultra-sonografia de paciente hospitalizado com malária vivax, evidenciando a medida do maior eixo do baço (14,27 cm), à inspiração profunda (linha pontilhada)

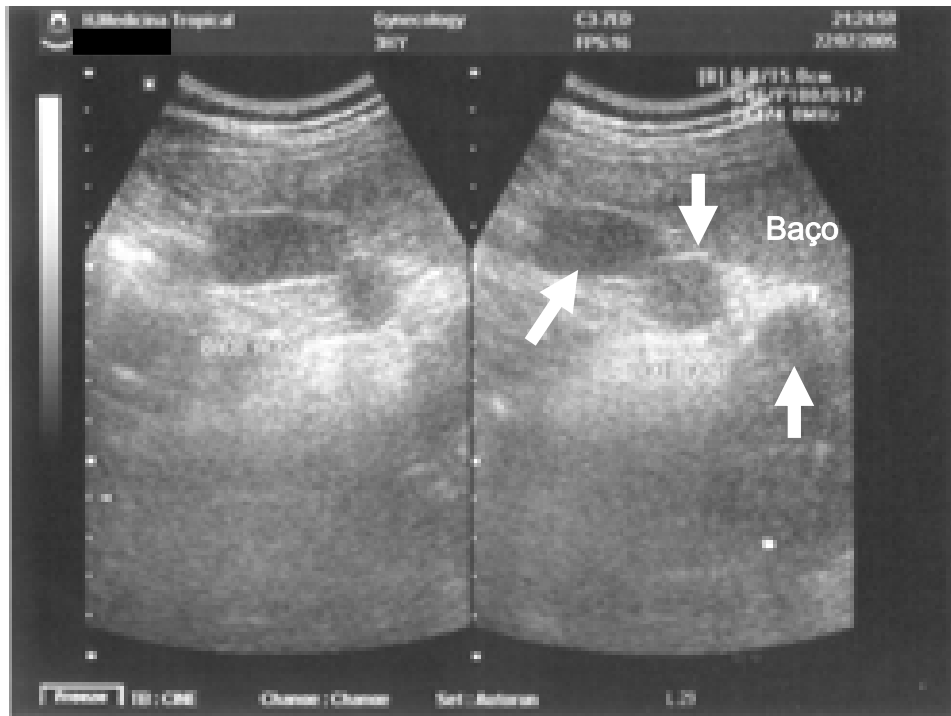


Figura 36: Ultra-sonografia de paciente hospitalizado com malária vivax, evidenciando a presença de três pequenos baços acessórios (setas)

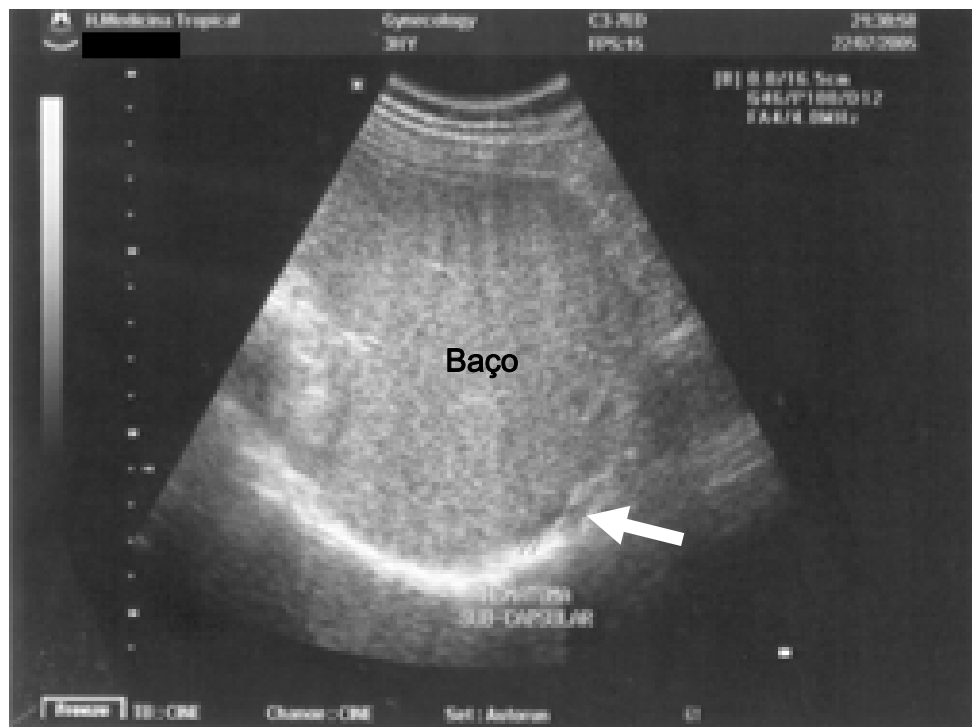


Figura 37: Ultra-sonografia de paciente hospitalizado com malária falciparum, petéquias e 32.000 plaquetas/ μ L, evidenciando a presença de pequeno hematoma subcapsular esplênico (seta)

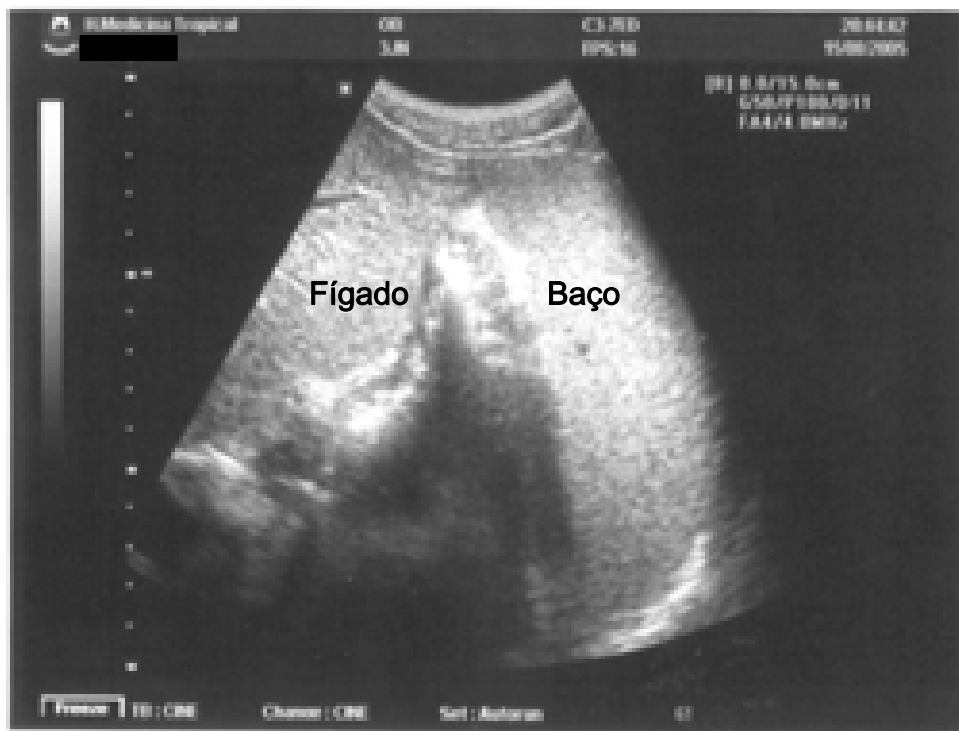


Figura 38: Ultra-sonografia de paciente hospitalizado com malária falciparum, evidenciando o "sinal do beijo" (hepatoesplenomegalia)

O discreto hematoma subcapsular esplênico encontrado no paciente com malária falciparum e plaquetopenia grave, da figura 37, não foi analisado junto com os demais tipos de sangramento clínico descritos na tabela 18, pois apenas os sete pacientes hospitalizados se submeteram ao exame ultra-sonográfico, não sendo possível estimar, com mais precisão, a frequência deste achado.

Comparando a técnica da palpação abdominal do baço com a ultra-sonografia, nos sete pacientes avaliados, para o diagnóstico de esplenomegalia, verificou-se que a palpação abdominal não foi capaz de detectar o aumento desse órgão, nem mesmo quando a medida do maior eixo foi 14,9 cm.

5.8 IMUNOCOMPLEXOS CIRCULANTES

A mediana da dosagem de ICC de pacientes com malária vivax e malária falciparum foi semelhante (Figura 39).

Também não se verificou diferença entre a média de ICC entre pacientes com menos de cinco infecções maláricas prévias e mais de cinco infecções ($n=42$, $\bar{x}=370,7$ x $n=6$, $\bar{x}=288,1$; teste U de Mann-Whitney, $p=0,454$) ou correlação entre níveis de ICC e hemoglobina (Pearson; $r=0,159$; $p=0,280$), RNI (Pearson; $r=0,209$; $p=0,350$), TTPA (Pearson; $r=0,121$; $p=0,560$) ou contagem de plaquetas (Figura 40). Houve, entretanto, uma tendência à significância, na correlação entre plaquetimetria e ICC, nos pacientes com malária falciparum.

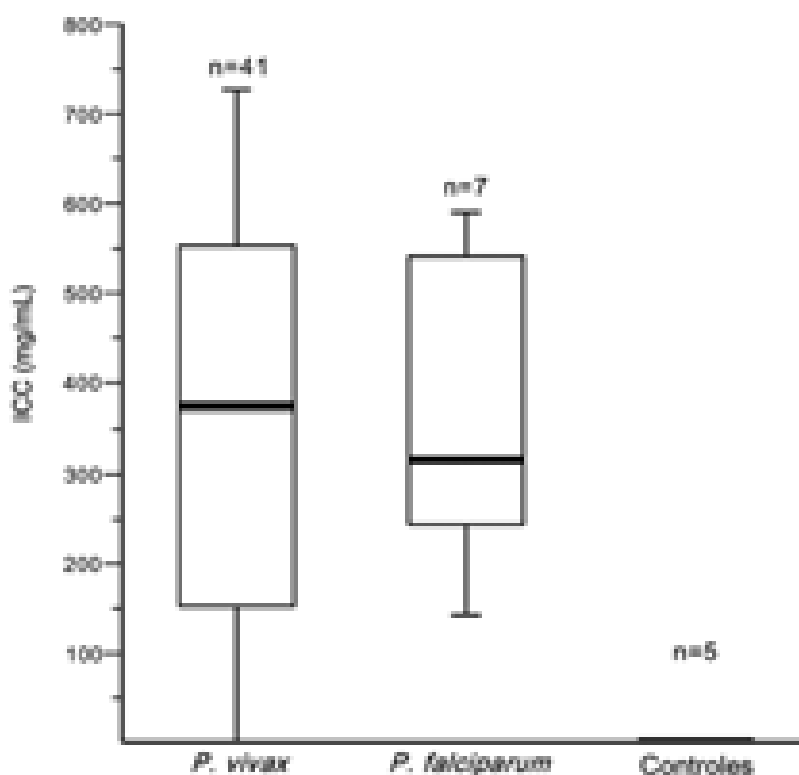


Figura 39: Dosagem de ICC em pacientes com malária por *P. vivax*, por *P. falciparum* e controles sadios

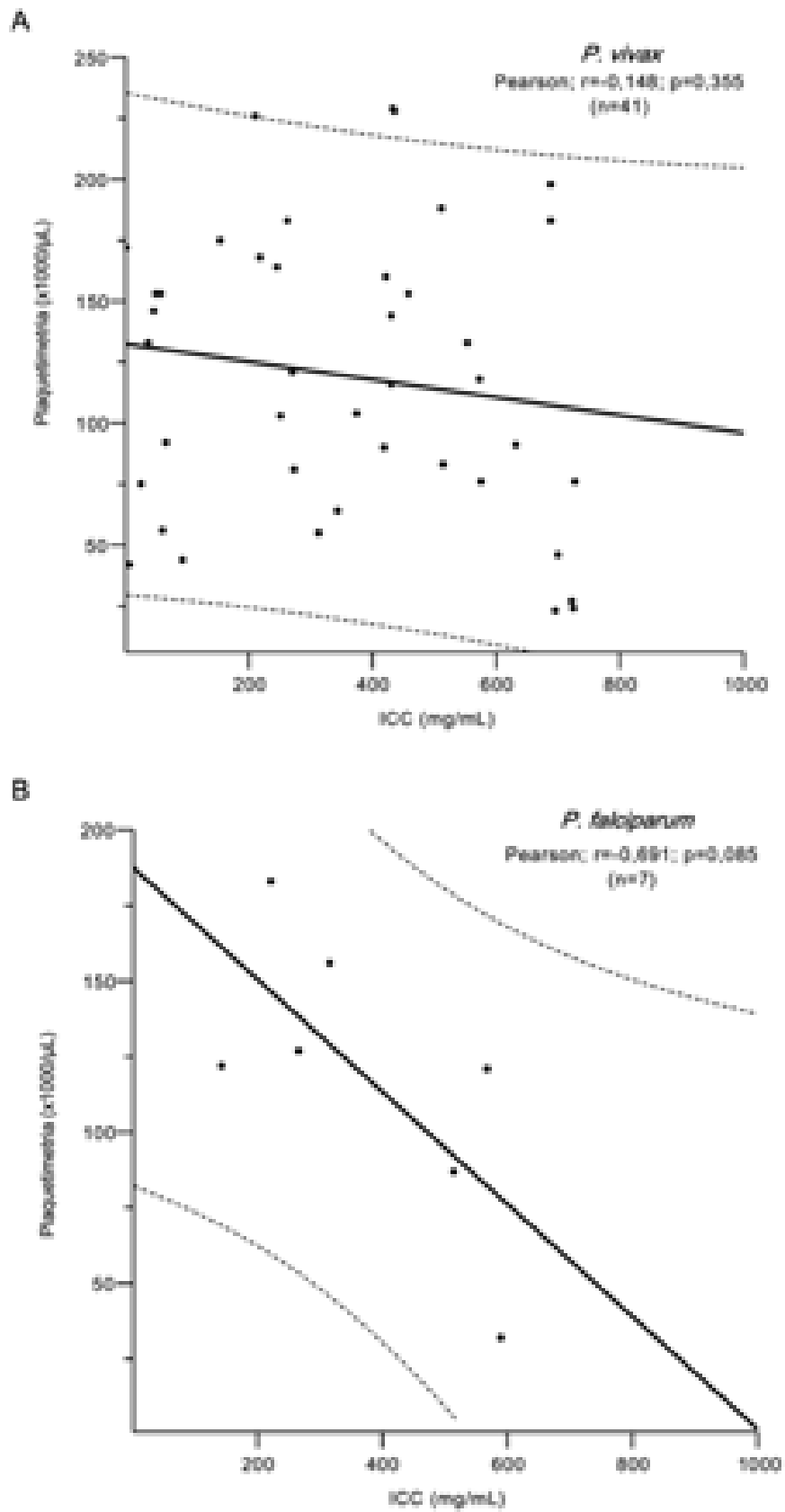


Figura 40: Correlação entre ICC e plaquetimetria em pacientes com malária vivax (A) e malária falciparum (B), com reta de regressão e IC_{95%}

5.9 DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS

5.9.1 Teste *in vitro*

Na figura 41 estão exemplificados os gráficos em que se selecionaram (*gating*) as plaquetas para análise, à citometria de fluxo.

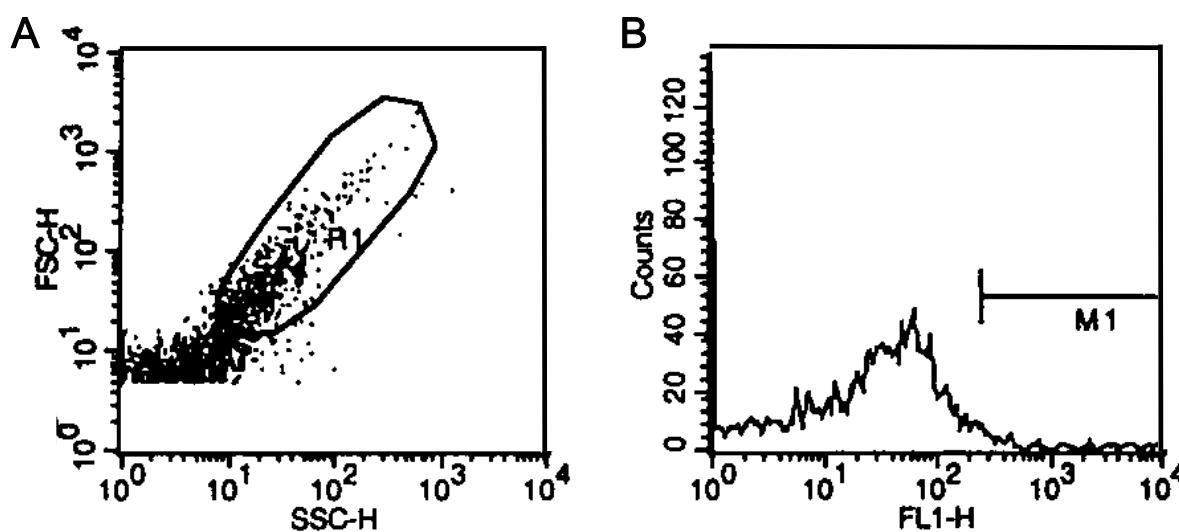


Figura 41: Exemplos de gráficos de seleção (*gating*) de plaquetas marcadas para análise à citometria de fluxo. (A) Seleção nos canais FSC-H e SSC-H (R1); a parte não selecionada corresponde às micropartículas plaquetárias. (B) Histograma de seleção de fluorescência no canal FL1-H (M1).

Na figura 42, observa-se que o índice de ligação plaquetária de IgG (ICC) de pacientes com malária vivax com e sem plaquetopenia grave foi semelhante à ligação de IgG do controle negativo. Para evidenciar a validade do modelo utilizado, observa-se intensa ligação de IgG (ICC) de paciente com infecção pelo HIV-1 e PTI, às plaquetas normais.

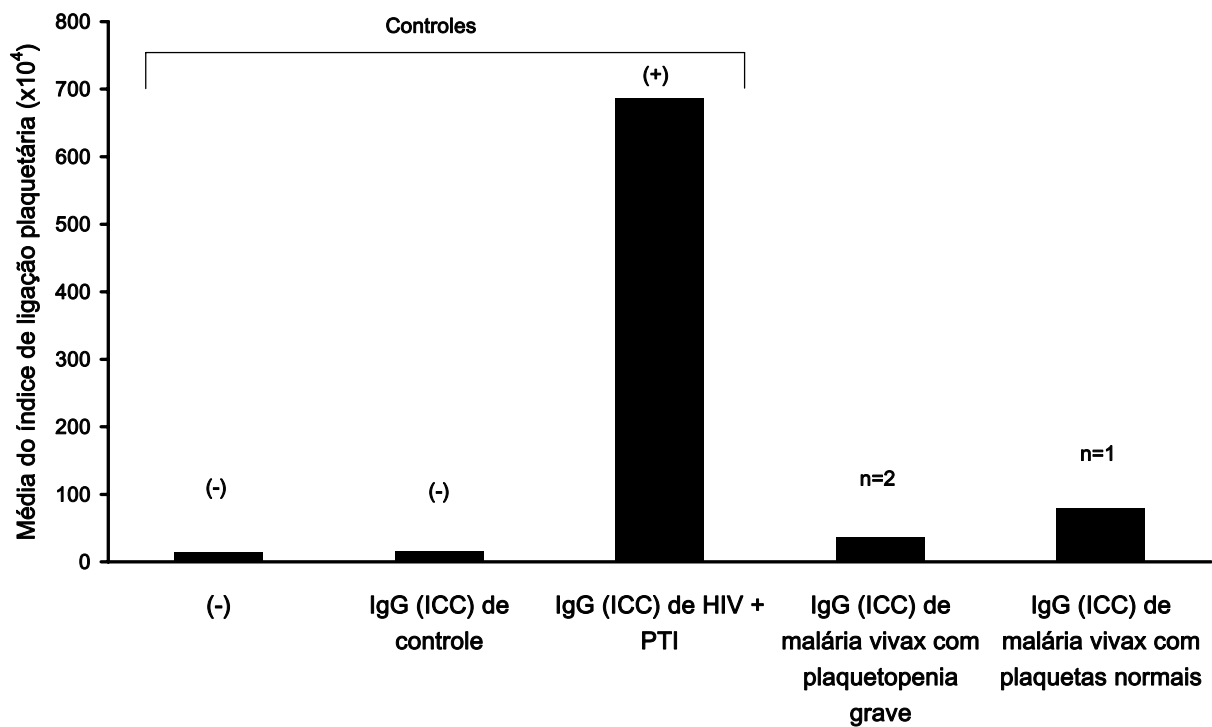


Figura 42: Média do índice de ligação de IgG (ICC) a plaquetas normais, por citometria de fluxo

5.9.2 Teste *in vivo* em modelo experimental

Na figura 43, estão representadas as contagens de plaquetas em camundongos C57BL/6 antes e 2 e 4 horas após a injeção IP de ICC, IgG (ICC) e IgG sérica, isolados de paciente com malária vivax e plaquetopenia grave. Não se observou qualquer alteração na contagem de plaquetas. A contagem de plaquetas, entretanto, com a injeção de IgG (ICC) de paciente com PTI e HIV-1 (controle positivo), caiu 75%, o que também valida o método como forma de demonstrar a capacidade de destruição plaquetária *in vivo* mediada por auto-anticorpos, neste modelo experimental.

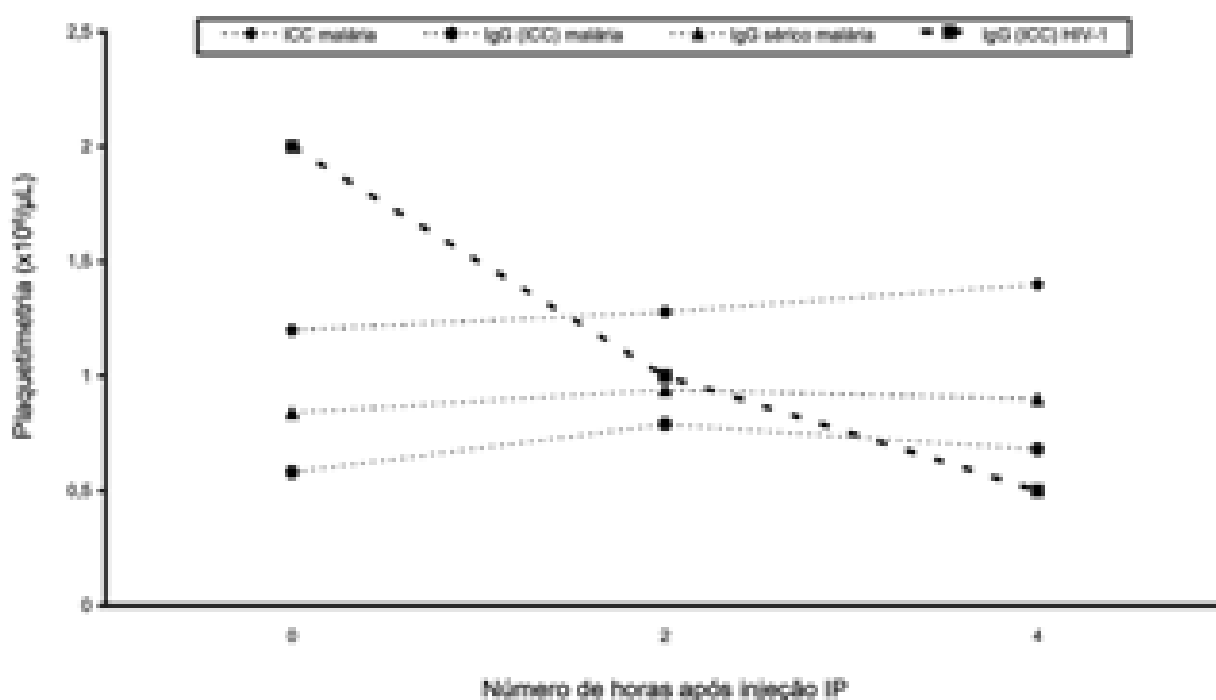


Figura 43: Plaquetimetria de camundongos C57BL/6 nas horas 0, 2 e 4 após injeção IP de 50 μ g de ICC de paciente com malária vivax e plaquetopenia grave (n=1), IgG (ICC) de paciente com malária vivax e plaquetopenia grave (n=1), IgG sérico de paciente com malária vivax e plaquetopenia grave (n=1) e IgG (ICC) de paciente com PTI e HIV-1 (n=1)

5.10 TESTE DE FAGOCITOSE DE PLAQUETAS *IN VITRO*

Na figura 44, estão exemplificados os gráficos em que se selecionaram (*gating*) as células THP-1 para análise à citometria de fluxo, deixando de fora da análise as plaquetas que não se aderiram ou não foram fagocitadas pelos fagócitos.

Na análise da média de fluorescência emitida pelas plaquetas fagocitadas ou aderidas à superfície das células THP-1, verificou-se redução da fagocitose de plaquetas quando as mesmas foram incubadas previamente com ICC de pacientes com malária vivax e plaquetopenia grave, em comparação com a fagocitose de plaquetas marcadas com CMFDA sem incubação prévia (Figura 45).

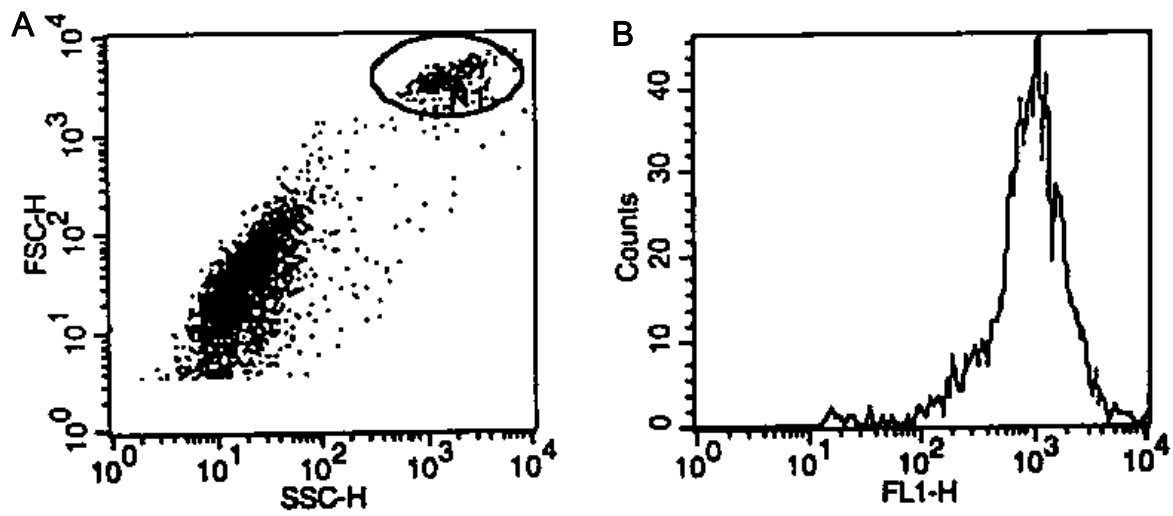


Figura 44: Exemplos de gráficos de seleção (*gating*) de células THP-1 (R1), após a fagocitose de plaquetas marcadas com CMFDA (A), cuja fluorescência está representada no histograma do canal FL1-H (B)

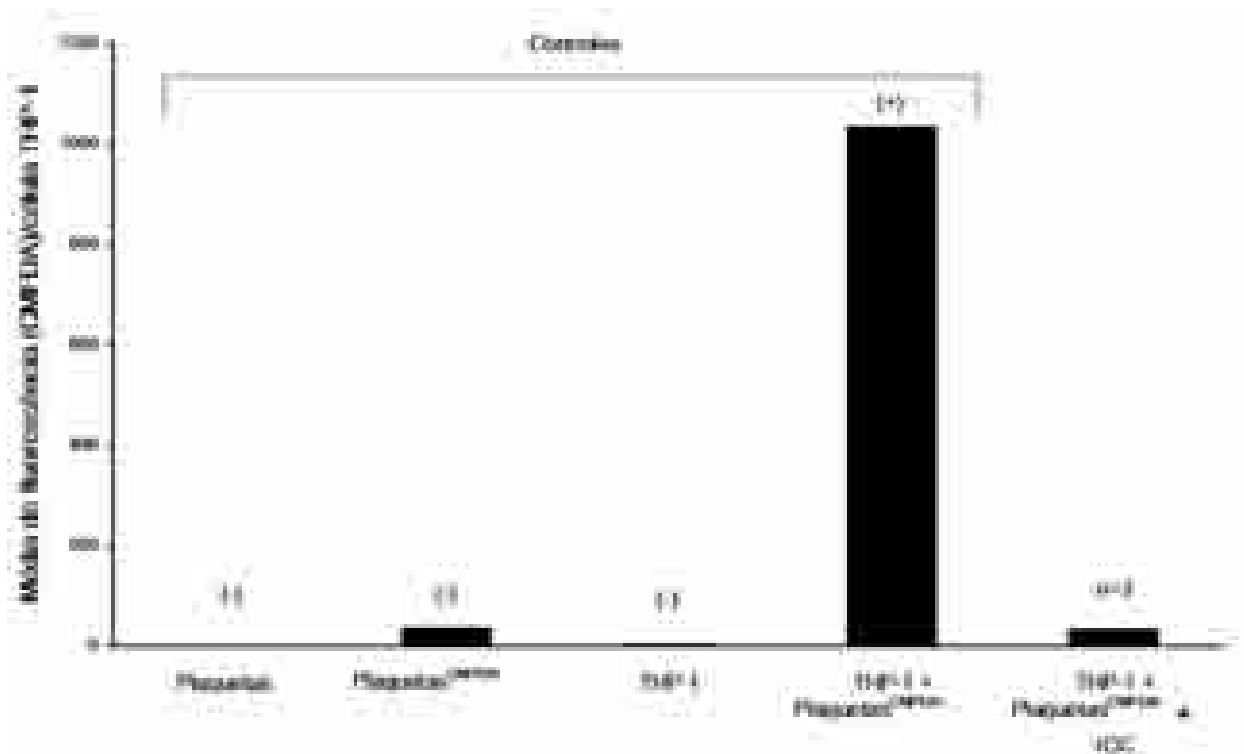


Figura 45: Média de fluorescência (CMFDA) de plaquetas normais marcadas, submetidas à fagocitose por células THP-1, após incubação das plaquetas com ICC de pacientes com malária vivax e plaquetopenia grave

5.11 TESTE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA *IN VITRO*

Na figura 46, estão exemplificadas curvas de agregação plaquetária de plaquetas normais após a adição de controles negativos (PBS e lisado de hemácias não-parasitadas) e positivo (ristocetina), e lisado de hemácias parasitadas por *P. falciparum* (trofozoítos e esquizontes), *P. vivax* (trofozoítos e esquizontes) e lisado de esporozoítos de *P. vivax*.

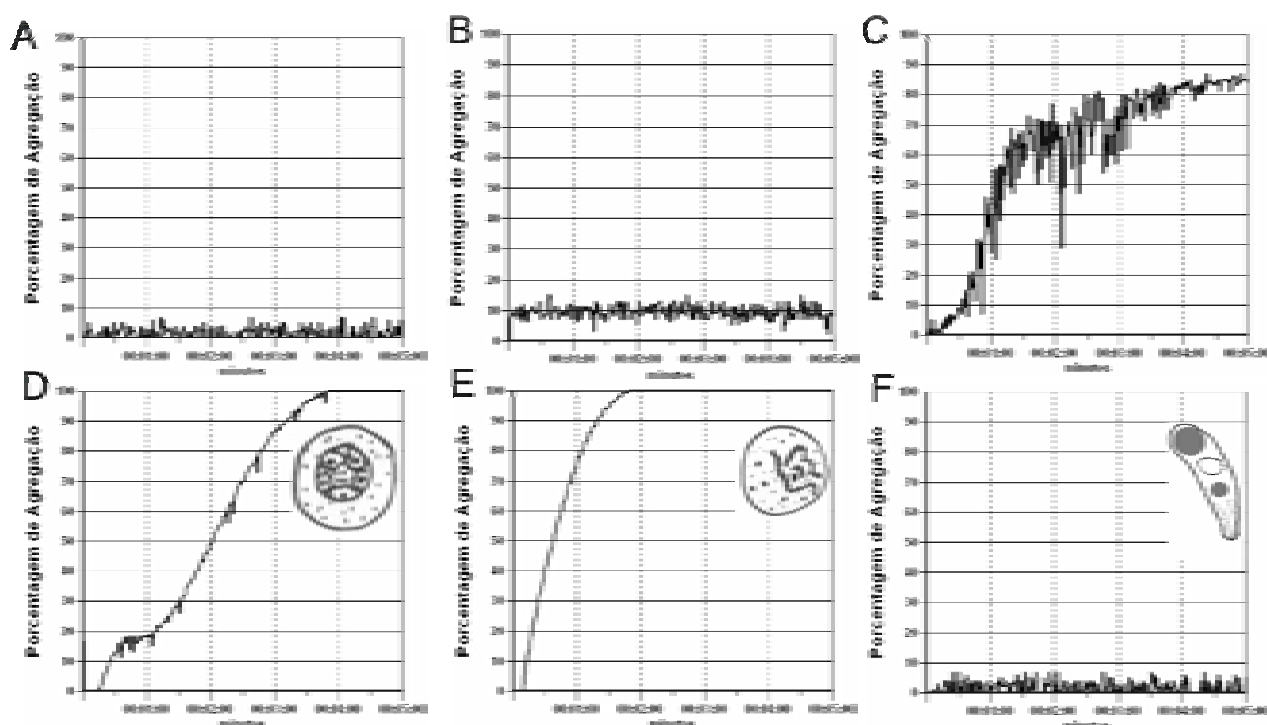


Figura 46: Curvas de agregação de plaquetas normais (n=3), na presença de PBS (A) e lisado de hemácias não parasitadas (B) (controles negativos), ristocetina (C) (controle positivo), lisado de hemácias parasitadas por *P. falciparum* (D) e *P. vivax* (E) e esporozoítos de *P. vivax* (F)

Na figura 47, observa-se que os lisados de hemácias parasitadas por *P. falciparum* e por *P. vivax* induziram agregação plaquetária superior à agregação induzida pela ristocetina, nas concentrações de 3,5 e 3,0 µg/mL, respectivamente.

Não se observou agregação quando se adicionou lisado de esporozoítos de *P. vivax*.

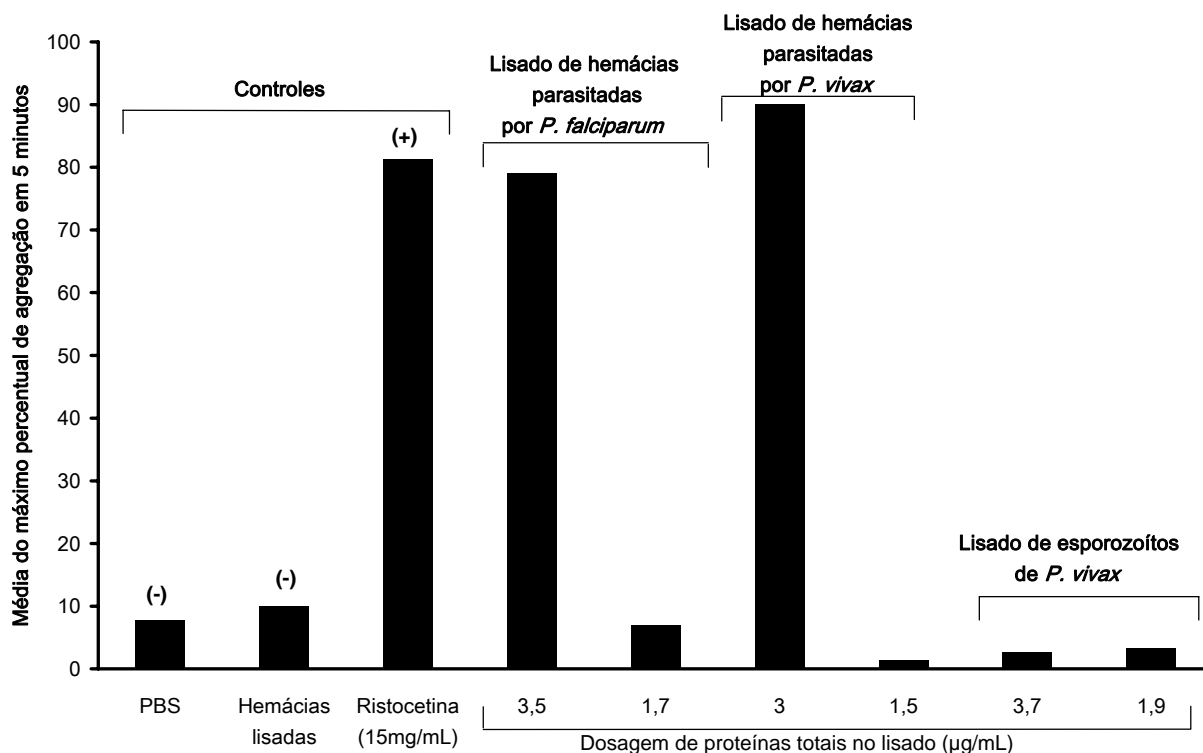


Figura 47: Média do máximo percentual de agregação de plaquetas normais (n=3), ao final de 5 minutos, na presença de lisado de hemácias parasitadas por *P. falciparum* e *P. vivax* e esporozoítos de *P. vivax*, em diferentes concentrações

5.12 SUBFAMÍLIAS DOS GENES *VIR* DE *P. VIVAX*

A seguir, são apresentados os dendogramas correspondentes à análise de distâncias filogenéticas obtidas a partir do seqüenciamento das subfamílias A (Figura 48), B (Figura 49), C (Figura 50), D (Figura 51) e E (Figura 52) dos genes *vir*, nos pacientes com malária vivax grave (n=2) e em outros pacientes com malária vivax não-grave (n=3). Não se observou o predomínio de nenhuma subfamília em especial nos casos graves, bem como nenhuma mutação ou expansão clonal.

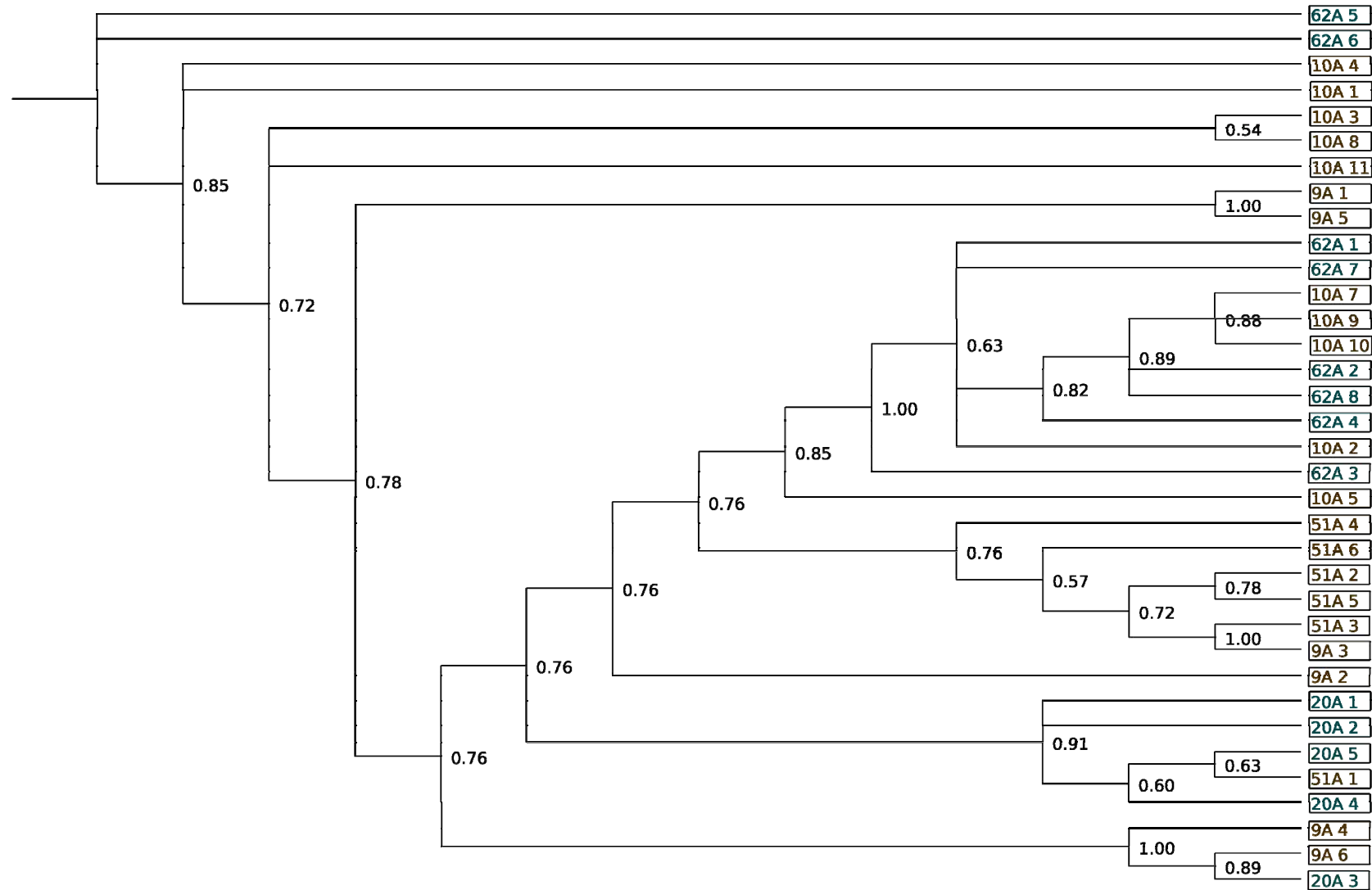


Figura 48: Dendrograma com distâncias genéticas entre as seqüências da subfamília A dos genes *vir* de *P. vivax* isolado de pacientes com gravidade (9 e 10) e sem gravidade (20, 51 e 62)

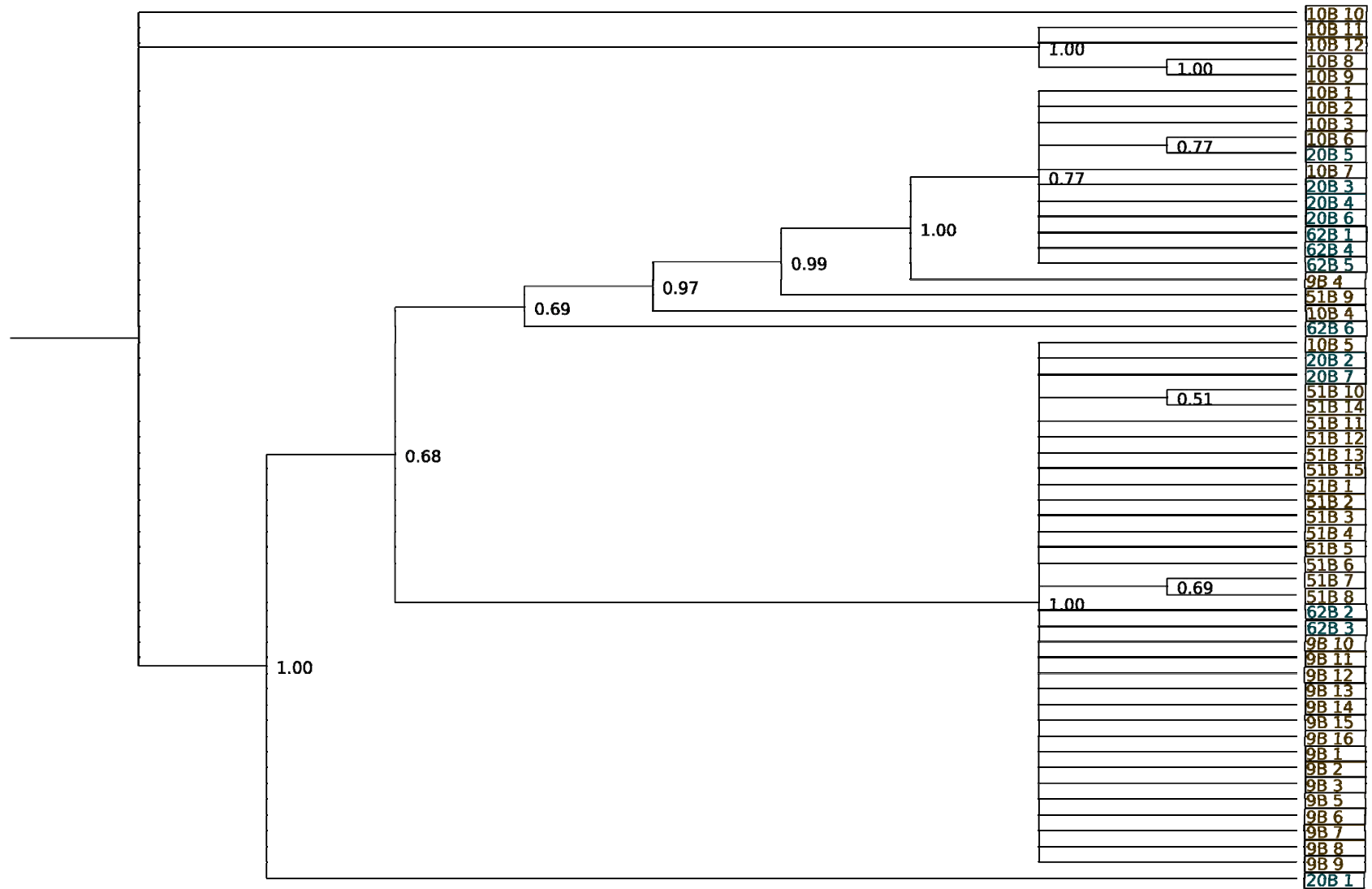


Figura 49: Dendrograma com distâncias genéticas entre as seqüências da subfamília B dos genes *vir* de *P. vivax* isolado de pacientes com gravidade (9 e 10) e sem gravidade (20, 51 e 62)

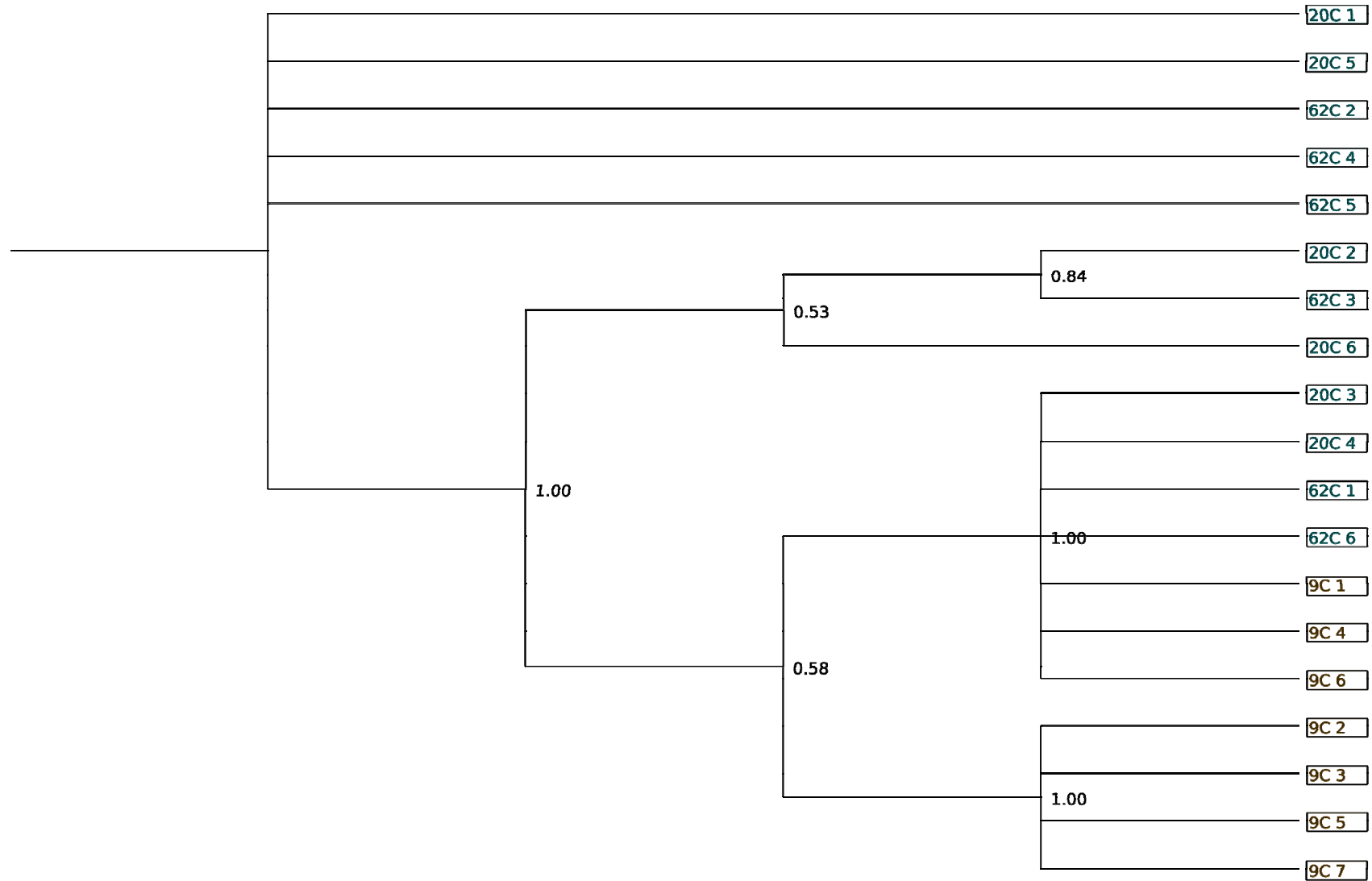


Figura 50: Dendrograma com distâncias genéticas entre as seqüências da subfamília C dos genes *vir* de *P. vivax* isolado de pacientes com gravidade (9 e 10) e sem gravidade (20, 51 e 62)

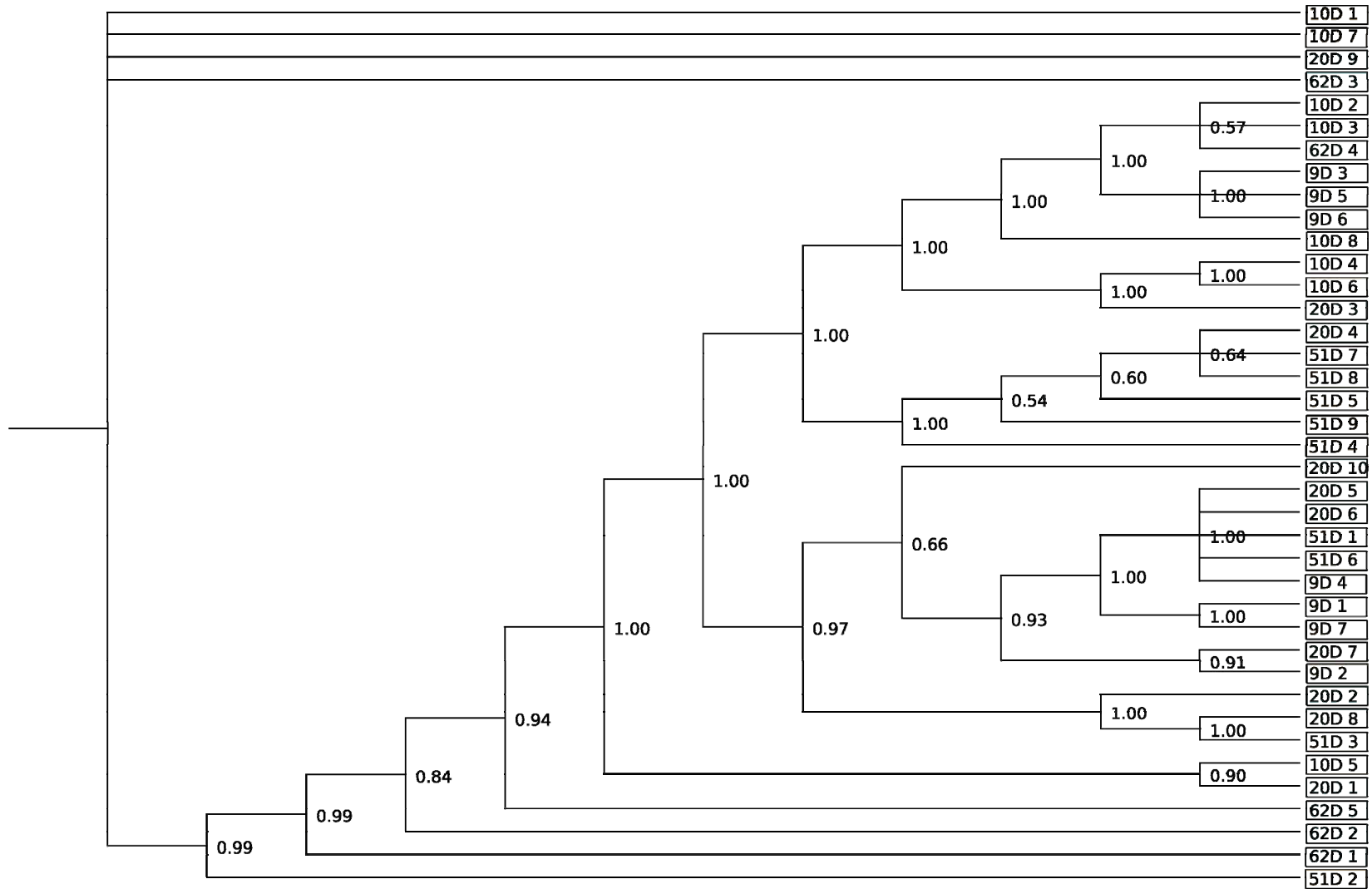


Figura 51: Dendograma com distâncias genéticas entre as seqüências da subfamília D dos genes *vir* de *P. vivax* isolado de pacientes com gravidade (9 e 10) e sem gravidade (20, 51 e 62)

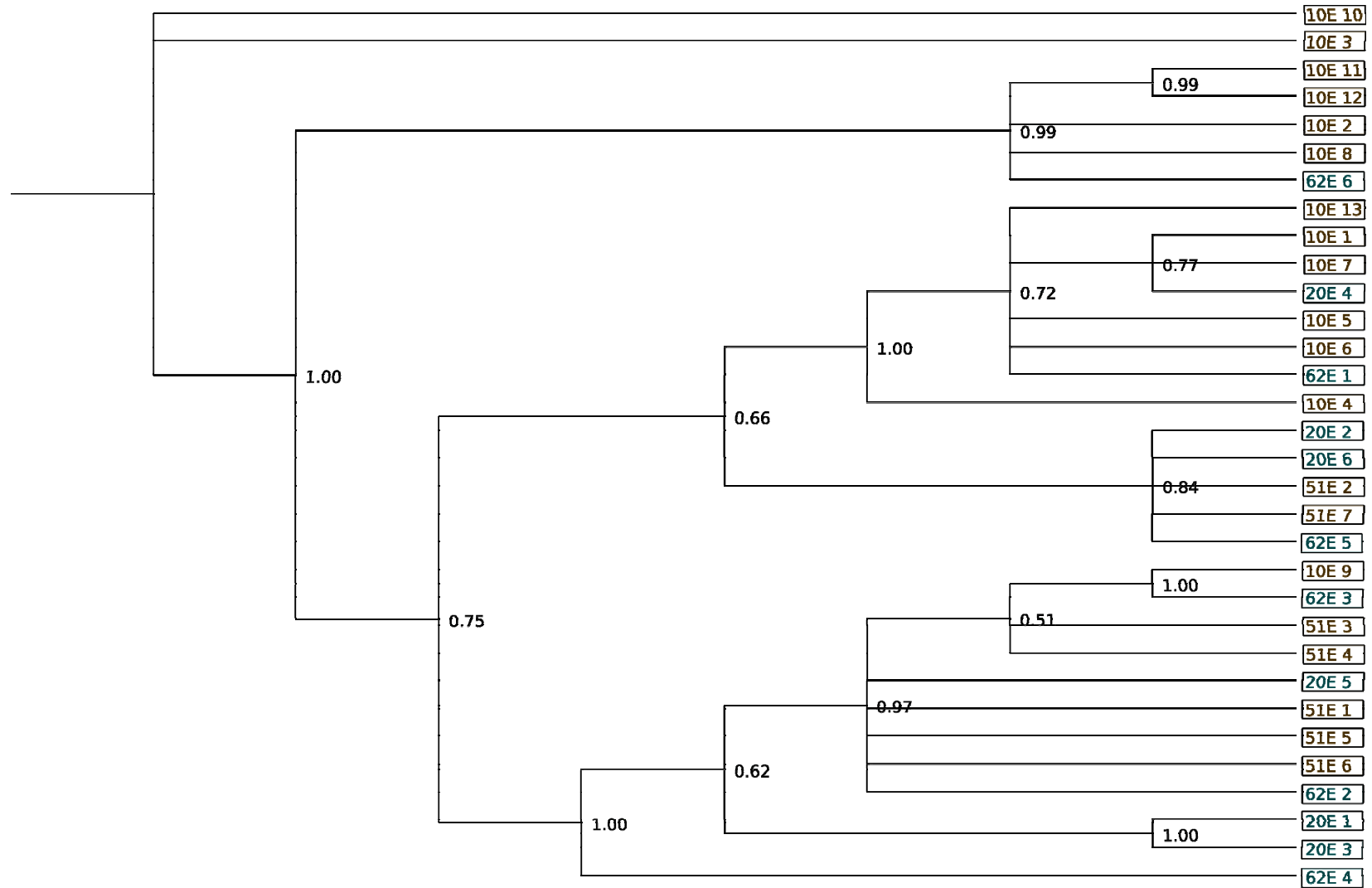


Figura 52: Dendrograma com distâncias genéticas entre as seqüências da subfamília E dos genes *vir* de *P. vivax* isolado de pacientes com gravidade (9 e 10) e sem gravidade (20, 51 e 62)

6 DISCUSSÃO

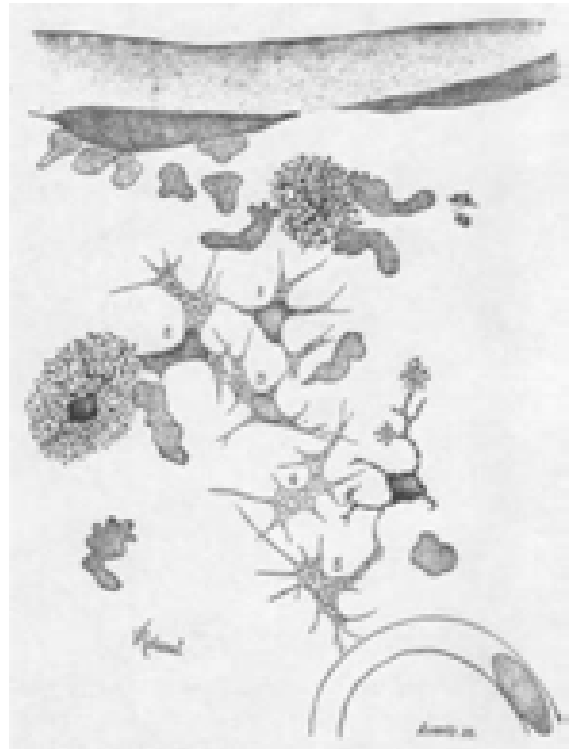


Ilustração de Ilyich Metchnikoff, onde se evidenciam fagócitos durante a inflamação, cinco horas após a cauterização com nitrato de prata da barbatana caudal de embrião de caramujo marinho. Há pequenos fragmentos sugestivos de plaquetas, não descritas originalmente nesses locais de inflamação.

Metchnikoff I. *Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation* (Tradução de FA Starling e EH Starling). New York: Dover; 1968.

6.1 PACIENTES EXCLUÍDOS

Na maior parte dos estudos em que as plaquetas são avaliadas, na infecção malárica, não há o cuidado metodológico de se afastar outras causas concomitantes de plaquetopenia, especialmente porque a maior parte das áreas tropicais endêmicas para malária também são endêmicas para outras doenças, como dengue e HBV. Assim, em muitos destes estudos, o impacto de outras doenças que podem evoluir com plaquetopenia é desprezado, podendo justificar a grande variabilidade das frequências de plaquetopenia na malária.

Em parte, a exclusão de outras doenças não é realizada rotineiramente nestes estudos pelo aumento considerável dos custos com exames sorológicos, além de não se constituir uma tarefa fácil a escolha das doenças mais relevantes. Excluir todas as doenças que evoluem potencialmente com alteração do número ou da função plaquetária é um desafio metodológico.

Pacientes na vigência de tratamento para malária também foram excluídos porque antimaláricos, como o quinino, podem ser causa direta de plaquetopenia (54).

O primeiro passo na tentativa de não se atribuir erroneamente a plaquetopenia à infecção malárica foi a exclusão de pseudo-plaquetopenia, uma causa de plaquetopenia considerada relativamente rara, apesar de já ter sido descrita em até 15,3% dos casos de plaquetopenia isolada (328). Em geral, trata-se de um evento raro, ocorrendo entre 0,07 e 0,11%, o que pode explicar por que em nenhum dos pacientes tenha ocorrido tal fenômeno.

Com todos os pacientes, teve-se o cuidado de evitar erros pré-analíticos, como a coleta traumática da amostra de sangue ou a mistura incorreta ou retardada do sangue com o anticoagulante. No caso da aglutinação mediada por anticorpos, a principal causa é a aglutinação dependente de EDTA, anticoagulante usado na prática clínica, por ser superior aos demais anticoagulantes disponíveis no mercado (387). Apenas na suspeita de pseudo-plaquetopenia por EDTA, deve-se coletar nova amostra de sangue usando o citrato de sódio. Todos os pacientes tiveram um esfregaço de sangue examinado com a finalidade de se descartar a presença de satelitismo plaquetário, que se constitui uma evidência indireta *in vitro* de plaquetopenia espúria induzida por EDTA. Trata-se de um fenômeno de agregação plaquetária em volta dos polimorfonucleares neutrófilos, exclusivamente em sangue tratado com EDTA, à temperatura ambiente. As possíveis explicações para o evento são: ligação, através do EDTA, de auto-anticorpos IgG anti-plaquetários e anti-neutrófilos dirigidos contra os receptores GPIIb/IIIa das plaquetas e FcR dos neutrófilos; adesão não-imune mediada por trombospondina ou proteínas dos α -grânulos de outras plaquetas. Eventualmente, se vê fagocitose das plaquetas pelos fagócitos (322). A pseudo-plaquetopenia também tem sido descrita em pacientes com malária, tendo como causa a adesão de plaquetas a hemácias parasitadas (320).

A contagem de plaquetas foi realizada em um mesmo aparelho, em todos os pacientes, a fim de se evitar a variação da plaquetimetria com o uso de diferentes aparelhos ou métodos (270).

Pacientes com história de sangramento espontâneo caracterizaram um dos critérios de exclusão, apesar de nenhum paciente ter sido excluído por esta razão. A justificativa era excluir não apenas pacientes com distúrbios congênitos de coagulação, p.ex., hemofilia, mas também aqueles com plaquetopatias congênitas, como a tromboastenia de Glanzmann ou a síndrome de Bernard-Soulier. Esta última síndrome compreende uma desordem hemorrágica hereditária que afeta a linhagem megacariocítica/plaquetária e se caracteriza por tendência a sangramentos mucocutâneos, plaquetopenia e presença de megaplaquetas, condição muito semelhante ao que se vê na malária. Ocorre em função de um defeito no complexo GPIb/V/IX. Entretanto, a doença é rara, tendo sido descritos cerca de 100 casos em toda a literatura (203), motivo pelo qual sua exclusão se deu tão somente pela história patológica pregressa não-sugestiva. O mesmo aconteceu com a tromboastenia de Glanzmann, deficiência da GPIIb/IIIa, caracterizada por diátese hemorrágica, com pobre retração do coágulo e contagem normal de plaquetas, que geralmente requer transfusão de plaquetas (264).

A doença de May-Hegglin decorre de uma mutação do gene MYH9, que codifica a cadeia pesada 9 da miosina não-muscular, indispensável à secreção de grânulos intracitoplasmáticos. Assim, observa-se a presença de megaplaquetas com inclusões citoplasmáticas em plaquetas e granulócitos, pela impossibilidade de secreção dos grânulos. Costuma evoluir com falsa plaquetopenia, pois o tamanho da plaqueta a faz ser confundida com uma hemácia (112). Também é uma doença relativamente rara.

Considerando que o lúpus eritematoso sistêmico e a cirrose hepática são doenças de natureza crônica, que podem evoluir com plaquetopenia, em função de auto-imunidade e/ou hiperesplenismo, os dois pacientes incluídos no estudo não foram analisados.

Um paciente que usava AAS regularmente, após episódio de acidente vascular cerebral, também não foi analisado em função desta droga ser potente antiagregante plaquetário, podendo alterar a contagem periférica de plaquetas, assumindo-se que, na malária, o aumento da agregação das plaquetas pode levar ao seqüestro destas partículas na circulação.

A exclusão de pacientes cuja PCR diagnosticou infecção mista (*P.f./P.v.*) se justifica por vários motivos: 1) impossibilidade de quantificação da parasitemia periférica separadamente, por espécie; 2) possibilidade de PCR falso-positiva, em função da chance de contaminação; 3) falta de estudos que estabeleçam a PCR como padrão-ouro no diagnóstico da malária mista, já que a infecção assintomática prévia por uma espécie poderia ser diagnosticada quando do diagnóstico da outra espécie, de fato responsável pelo quadro clínico no momento do exame.

A sensibilidade da técnica da PCR é superior à da gota espessa. Em estudo onde se padronizou uma técnica de PCR para detecção de *P. vivax*, tendo como alvo o gene da cisteína-proteinase, para utilização em banco de sangue, em Manaus, a sensibilidade da técnica foi 0,019 parasitos/ μ L (352). Mas sua especificidade para o diagnóstico de espécies relacionadas com o quadro clínico febril ainda merece investigação. Por exemplo, a PCR detectou 13 vezes mais

infecções mistas do que a gota espessa, em estudo realizado em Manaus (226). Entretanto, não houve registro, neste estudo, de pacientes que, tendo sido diagnosticados inicialmente com malária vivax pela gota espessa e tratados com cloroquina, tenham retornado posteriormente com quadro febril por *P. falciparum* não tratado. Esse dado levanta a possibilidade de que portadores assintomáticos de uma espécie de plasmódio podem se infectar por outra espécie responsável pelo quadro clínico, permitindo a detecção dos dois parasitos pela PCR, no corte transversal. Além do mais, como a PCR faz uma amplificação de fragmento de DNA, não é possível a distinção entre a presença de formas sangüíneas patogênicas (esquizontes) e não-patogênicas (gametócitos).

Assim, para se evitar considerações ainda controversas sobre a sensibilidade e a especificidade das técnicas da gota espessa e da PCR, a definição de caso de malária no estudo foi baseada na positividade da gota espessa, com a devida confirmação pela técnica da PCR.

Mesmo assim, admitindo-se que as infecções mistas pela PCR eram verdadeiras infecções mistas, a média da contagem de plaquetas nestes pacientes (115.000/ μ L) não foi muito diferente da média observada nos casos de malária vivax ou falciparum à gota espessa e PCR (119.000 e 122.000 plaquetas/ μ L, respectivamente).

Pacientes com cirrose hepática possuem diminuição da produção de TPO, comprometendo a produção de plaquetas (129), à semelhança do que acontece com a série vermelha, em pacientes com doença renal crônica, pela deficiência de

eritropoietina, além de se observar nestes pacientes destruição de plaquetas imuno-mediada (97).

Os pacientes com HBsAg foram excluídos da análise final. Os que apresentavam anti-HBc total positivo e HBsAg negativo foram incluídos, por sua maior parte corresponder aos casos de resultados falso-positivos de anti-HBc total ou contato prévio com HBV, sendo rara a condição de janela imunológica da infecção aguda.

Não se realizou o diagnóstico de infecção oculta por HBV, pela detecção de HBV-DNA positivo nos pacientes positivos para anti-HBc total, com HBsAg negativo. Assim, possivelmente, foram incluídos alguns pacientes com infecção por HBV, uma vez que se estima a infecção oculta entre 0 e 10% dos indivíduos sem doença hepática (70).

Áreas consideradas hiperendêmicas para HBV, como o Acre, registram 61,8% de positividade para anti-HBc total e 3,3% para HBsAg (362), sendo o anti-HBc total um marcador de contato prévio com o vírus, e o HBsAg um marcador de infecção por HBV. Inquérito sorológico, de base populacional, para HBV, realizado no Município de Lábrea (Amazonas), a 680 km de Manaus, em linha reta, área considerada de alta endemicidade para o vírus, mostrou 3,3% de portadores do HBsAg e 49,9% positivos para o anti-HBc total (43).

No Município de Coari (Amazonas), a 363 km de Manaus, em linha reta, uma amostra aleatória de 545 pacientes, selecionados pelo diagnóstico de malária, foi investigada para a infecção por HBV. Os resultados mostraram 48% de

positividade para anti-HBc total e 4,2% para HBsAg (44, 45), sendo muito semelhantes aos resultados do presente estudo, onde se observou 48,5% de positividade para anti-HBc total e 4,8% para HBsAg. Naquele trabalho, também foram evidenciados menor parasitemia e maior índice de reatividade de anticorpos IgG anti-lisado total de plasmódio, em pacientes HBsAg positivos. Não fez parte dos métodos do trabalho a plaquetimetria. Investigação semelhante, também sem a plaquetimetria, em pacientes com diagnóstico de malária e HBsAg positivo, foi realizada em Porto Velho (Rondônia), em 1993, mas não houve diferença de parasitemia ou de anticorpos antimaláricos entre os grupos estudados, entretanto, a amostra era de apenas 122 indivíduos (55).

Em análise de pacientes vietnamitas com malária falciparum grave, observou-se prevalência de HBsAg de 23,8%, sendo esta positividade associada à malária cerebral. Aventa-se a possibilidade de papel importante de HBV como fator de risco para a malária grave, apesar de ainda não se conhecer os mecanismos envolvidos (29).

Assumindo que estes pacientes portadores de HBV apresentam imunidade diferenciada ao plasmódio, os mesmos foram excluídos da análise final, a fim de que os dados representassem apenas os pacientes com malária. Mesmo assim, a média da plaquetimetria entre pacientes com HBsAg positivo não foi muito diferente da média observada nos demais pacientes incluídos no estudo (130.000/ μ L x 120.000/ μ L).

Pacientes portadores de HCV também podem ter somada ao quadro clínico inespecífico, a plaquetopenia, especialmente naqueles com doença hepática crônica (361). A prevalência de infecção por HCV foi 4,3%, sendo esta prevalência acima daquela relatada para a população da Amazônia, entre 1,1 e 2,4%, não diferente, por sua vez, da relatada no resto do mundo (290). Entre doadores de sangue, na Amazônia Ocidental, esta prevalência pode, entretanto, chegar a 5,9% (118). Em área malarígena de garimpo, no Município de Apicás (Mato Grosso), estudo com 520 pessoas expostas à infecção malárica mostrou prevalência de HCV de 4,2%, em ensaio imunoenzimático (EIA), sendo esta prevalência reduzida para 2,1% após a realização de ensaio *imunoblot* recombinante (RIBA), teste considerado mais específico (336). Aventa-se a possibilidade de produção de anticorpos policlonais durante infecções repetidas pelo plasmódio, que podem levar a resultados falso-positivos no EIA (2). Atualmente, se realiza a quantificação de HCV-RNA como alternativa diagnóstica mais específica, de acordo com recomendação do Ministério da Saúde do Brasil (47), contudo, este exame não foi realizado nos pacientes positivos ao ELISA, pela indisponibilidade no serviço onde o estudo foi conduzido. Assim, é possível que esta frequência esteja hiperestimada nesta amostra.

Como a plaquetopenia é um achado comum em pacientes com HIV (316), é preciso que a interpretação da plaquetopenia como um marcador de evolução clínica em áreas malarígenas leve em consideração o estado sorológico dos pacientes estudados, para esta infecção. Mesmo nos portadores não-imunodeprimidos, a plaquetopenia pode variar entre 5 e 10% (201). Certamente, os erros de

interpretação das alterações plaquetárias seriam muito mais expressivos em áreas endêmicas para malária como a África, onde a prevalência de HIV é muito superior àquela encontrada na América Latina. Mesmo assim, todos os pacientes incluídos no estudo realizaram o teste sorológico anti-HIV. Os três pacientes positivos foram excluídos da análise. Há também que se levar em consideração a possibilidade de reação cruzada entre anticorpos antimaláricos e anticorpos anti-HIV, o que reforça a realização de testes mais específicos para o diagnóstico final, em um segundo momento, especialmente em áreas endêmicas para malária (119).

No caso do dengue, afastar esta infecção simultânea não é tarefa das mais simples. Os sintomas clínicos da malária e do dengue são, de fato, muito semelhantes, motivo pelo qual, a abordagem dos pacientes com síndrome febril aguda inclui o diagnóstico diferencial sistemático de ambas doenças, em áreas endêmicas. Geralmente, nos pacientes com gota espessa negativa para hematozoários, investiga-se a possibilidade de infecção pelo vírus do dengue. Não há nenhum motivo especial para acreditar que pacientes com uma infecção tenham maior probabilidade de adquirir a outra, exceto pela maior atração de vetores por pacientes febris. O diagnóstico rápido de dengue pode ser falsamente positivo em pacientes com malária, devido à reatividade não-específica (69). Quando houver suspeita de co-infecção malária/dengue, testes mais específicos para a detecção de infecção pelo vírus do dengue devem ser preferidos, como o teste sorológico pareado (quando o paciente estiver acessível para seguimento clínico), RT-PCR e isolamento viral no sangue periférico ou imunohistoquímica e hibridização *in situ* em

amostras *post mortem* (166, 282). Em áreas tropicais semelhantes a Manaus, na Amazônia Ocidental Brasileira, a co-infecção deve ser um evento raro, em função da oposição de sazonalidade destas duas doenças, com mais casos de dengue ocorrendo durante a estação chuvosa e mais casos de malária durante o período de estiagem (117). Além disso, nesta cidade, a malária é ainda uma doença mais rural (apesar de sua tendência à peri-urbanização), enquanto o dengue é uma doença de distribuição essencialmente urbana.

A associação entre dengue e malária não parece ser muito comum, mesmo com o uso de boas ferramentas diagnósticas. Muitos trabalhos realizam apenas teste sorológico (IgM) para dengue durante a fase febril aguda, o que poderia diagnosticar a fase de convalescença desta infecção, sem, entretanto, provar a infecção aguda (14, 24, 176). Existem apenas três casos de infecção simultânea por plasmódio e vírus do dengue registrados, com adequada confirmação laboratorial por exame sorológico pareado, isolamento viral e/ou RT-PCR (68, 95, 350). Recentemente, na Tailândia, área endêmica tanto de dengue como de malária, 29 pacientes com diagnóstico de infecção malárica por *P. falciparum* foram testados para dengue por teste sorológico pareado e todos foram negativos (331).

Assim, pela escassez de estudos com métodos adequados, é desconhecido o impacto desta co-infecção em áreas endêmicas. Nos casos avaliados, onde se realizou o teste IgM anti-dengue, apenas dois pacientes foram positivos. Não é possível dizer se este teste sorológico faz o diagnóstico da co-infecção, pelos motivos expostos anteriormente. Pela indisponibilidade do isolamento viral e RT-

PCR do vírus do dengue em todos os pacientes com menos de cinco dias de doença febril, é possível que tenha havido subestimação das co-infecções.

Entretanto, caso sejam verdadeiras estas supostas co-infecções, a frequência do evento deve ser muito baixa, provavelmente não superior a 2,3%. Há que se considerar, entretanto, que a seleção dos pacientes não aconteceu de maneira uniforme ao longo do ano, sendo a maior parte dos casos selecionada durante o período não-chuvoso, portanto, com menor ocorrência esperada de casos de dengue.

Doenças como leptospirose e febre tifóide, que também são endêmicas na região, e cursam com plaquetopenia, não foram investigadas, em função de sua baixa incidência na população. Além do mais, a plaquetopenia nestas infecções costuma ser observada em fases mais tardias da história natural da doença, em concomitância com outras complicações clínicas mais características da afecção.

Possivelmente, se os critérios de exclusão não tivessem sido aplicados, não haveria uma frequência de plaquetopenia muito diferente da encontrada, entre os pacientes com malária. Apesar da exclusão ter ocorrido em 22,8% dos pacientes selecionados inicialmente, a média de plaquetas entre os pacientes excluídos foi semelhante à média dos pacientes incluídos (114.000/ μ L x 120.000/ μ L). Entretanto, para efeitos de discussão das manifestações clínicas e estudo da patogênese da plaquetopenia na malária, a necessidade de exclusão de casos com suspeita de outras comorbidades faz-se mister.

A grande variabilidade da frequência de plaquetopenia pode estar relacionada à seleção distinta de pacientes e populações expostas a doenças endêmicas de ocorrências variáveis, diminuindo sua validade externa. Quando se estuda a patogênese da plaquetopenia na malária, a relevância do rigor metodológico deve ser ainda maior, pois co-infecções podem alterar significativamente a interpretação dos resultados. Para exemplificar, cita-se o caso de um homem de 61 anos de idade, procedente do Senegal, que desenvolveu malária falciparum grave e plaquetopenia de $9000/\mu\text{L}$. À citometria de fluxo, identificou-se a presença de auto-anticorpos que se ligaram à GPIIb/IIIa plaquetária (80). O relato de caso sugere que o desenvolvimento de auto-anticorpos plaquetários pode ser responsável pela plaquetopenia grave da malária, entretanto, não cita a realização do exame sorológico anti-HIV no paciente relatado, tendo em conta que a presença de anticorpos anti-GPIIb/IIIa, mais especificamente contra a porção 49-66 desta GP, está relacionada à destruição imuno-mediada de plaquetas na PTI encontrada em pacientes com infecção pelo HIV-1. Ou seja, qualquer consideração sobre a patogênese da plaquetopenia malárica deve, pelo rigor científico, afastar outras causas concomitantes de plaquetopenia, especialmente em se tratando de casuística reduzida.

Para fins epidemiológicos, entretanto, afastar estas outras causas de plaquetopenia pode interferir de maneira significativa no orçamento do estudo, sem muito impacto na estimativa do percentual de plaquetopenia.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

O predomínio de pessoas de cor parda reflete a característica étnica da maior parte da população da região. Até o momento, não se conhece qualquer variabilidade genética associada à raça que interfira na tendência à plaquetopenia.

Em relação ao local provável de infecção dos pacientes, a amostra é bastante representativa do total de pacientes atendidos na FMT-AM, no período, que, por sua vez, é uma amostra fidedigna do total de pacientes diagnosticados em Manaus. Apesar de sua localização na Zona Centro-Oeste da cidade, a FMT-AM tem atendido pacientes de todas as demais zonas malarígenas do município.

A representatividade se justifica pelo método aleatório de seleção de pacientes empregado no estudo. Em relação à FMT-AM, como não se presta apenas como unidade terciária, mas, historicamente, tem se comportado como uma unidade de atenção primária para pacientes com síndrome febril aguda, é uma amostra representativa dos casos de malária atendidos no Município de Manaus. A entrevista com os pacientes desta pesquisa, detectou que 70% dos pacientes procuraram aquela instituição como primeira opção para diagnóstico, sendo que 30% já haviam sido atendidos em outra unidade de saúde por ocasião de sua doença atual, tendo procurado a FMT-AM por encaminhamento de outro serviço ou por auto-referenciamento.

A FMT-AM tem atendido entre 30 e 50% dos casos de malária do município, nos últimos anos, em parte, em função de um lento processo de descentralização da rede diagnóstica de malária. Assim, é possível que os dados gerados neste trabalho

possam ser extrapolados a todos os pacientes com malária, de Manaus. Pacientes que adquiriram malária em municípios próximos a Manaus totalizaram 43,5% dos pacientes incluídos. Em função das grandes distâncias, pacientes dos diferentes municípios do Amazonas não são atendidos igualmente nesta instituição, motivo pelo qual a amostra estudada não é representativa do total de casos de malária do estado.

A distribuição dos pacientes por gênero e idade também é muito semelhante àquela observada na população de pacientes com malária, em Manaus, sustentando a observação de que a amostra é representativa desta população.

6.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Grande parte da literatura se volta quase que exclusivamente para a malária por *P. falciparum*, possivelmente em função da maior letalidade decorrente da infecção por esta espécie, especialmente no Continente Africano. Em áreas como América Latina e Sudeste Asiático, onde a incidência de malária por *P. vivax* é maior, a escassez de dados sobre esta infecção muitas vezes compromete não apenas o manejo clínico dos pacientes, mas o próprio controle da doença.

É absolutamente necessário que se façam avaliações da malária vivax separadamente, já que esta espécie de plasmódio tem se comportado como uma infecção emergente na Amazônia Brasileira, desde o final da década de 1980.

Assim, apesar do estudo não ter sido desenhado com o objetivo de se comparar pacientes com malária vivax e malária falciparum, quando pertinente, esta análise foi realizada. A distinção entre as duas infecções permite um melhor entendimento da abordagem clínica a ser tomada em áreas onde *P. vivax* é mais freqüente. Desta maneira, não se estará apenas reproduzindo *by proxy* o conhecimento acumulado para uma outra espécie de plasmódio, com características evolutivas, patogênicas e mecanismos de resistência aos antimaláricos completamente distintos.

No detalhamento clínico dos pacientes, houve três indivíduos afebris e com gota espessa positiva para malária vivax, com contagem normal de plaquetas. É importante lembrar que todos os pacientes foram tratados com antimaláricos, assim, não foi possível a observação da história natural para averiguar se se tratavam de casos de portadores assintomáticos de plasmódio, condição que tem sido descrita cada vez com maior freqüência no Brasil, em especial portadores assintomáticos de *P. vivax*, independentemente da maior incidência desta infecção na população (18).

Habitualmente, assume-se que a parasitemia periférica guarda relação com o quadro clínico, em especial a febre da malária, obviamente havendo grande variabilidade inter-pessoal, a depender do grau prévio de exposição e da espécie de plasmódio (232). O tempo de doença atual, quando do diagnóstico, foi em média 1 dia menor nos pacientes com malária vivax, possivelmente em decorrência do menor limiar de parasitemia de *P. vivax* para o desencadeamento da febre (148).

Aparentemente, não houve diferenças na apresentação clínica dos pacientes com malária vivax ou falciparum. Isso está de acordo com a abordagem atual do paciente com suspeita de malária, ou seja, o mesmo deve se submeter ao exame da gota espessa de sangue não apenas para o diagnóstico da doença como também para a distinção da espécie implicada na infecção, dado que os tratamentos são distintos.

Como o objetivo do estudo era a investigação da plaquetopenia e suas manifestações clínicas, talvez tenha havido um viés na busca de manifestações hemorrágicas, investigadas na história clínica e no exame físico, de maneira sistemática, pelo investigador. Assim, como a maior parte das manifestações hemorrágicas na malária é de pouca intensidade e geralmente encontrada em áreas periféricas, um exame físico não-minucioso possivelmente não detectará sangramentos mínimos.

A observação de petéquias em pessoas de cor preta pode ser um desafio para o examinador, em função da ausência de contraste na pele, entretanto, como o número de pessoas de cor preta foi apenas 6,5%, não deve ter havido viés na estimativa da frequência de sangramento, entre os pacientes em geral. Contudo, em pacientes africanos, onde a maior parte da população residente em áreas endêmicas é de cor preta, o relato de petéquias pode estar subestimado.

Não houve concomitância de vários sítios de sangramento, o que fala contra uma discrasia sangüínea como causa do sangramento.

6.4 AVALIAÇÃO DOS EXAMES COMPLEMENTARES

Para o diagnóstico rotineiro da malária, o método semi-quantitativo (dado em cruzes) é suficiente para o adequado manejo terapêutico. Entretanto, para fins de pesquisa clínica, é recomendada pela OMS a quantificação da parasitemia por microlitro (após contagem do número de parasitos em relação a uma determinada quantidade de leucócitos, na gota espessa) ou em percentual de hemácias parasitadas (contagem do percentual de hemácias parasitadas no esfregaço). Especialmente nos ensaios clínicos com drogas antimaláricas, a parasitemia de formas assexuadas periféricas é a principal variável de desfecho analisada. Desta maneira, os métodos empregados na quantificação da parasitemia são decisivos para a interpretação dos resultados de um estudo clínico.

Alguns fatores de erro na contagem da parasitemia por microscopia óptica são inerentes ao próprio método, que tem alta variabilidade interobservador. O cálculo da parasitemia por microlitro foi realizado com a contagem do número de parasitos em uma gota espessa, contando-se simultaneamente o número de leucócitos, até o número de 100. A parasitemia por microlitro é obtida secundariamente pelo número de leucócitos por microlitro que se obtém a partir do leucograma automatizado. Em alguns trabalhos, quando não existe a disponibilidade do hemograma, adota-se um número fixo de 6000 leucócitos/ μL , o que pode diferir significativamente da contagem de leucócitos real dos pacientes estudados, que muitas vezes podem apresentar leucopenia ou leucocitose, conduzindo, portanto, a uma falsa baixa ou alta parasitemia final. Nos 168 pacientes, a média observada de

leucócitos foi 5100 leucócitos/ μL (2200–17.300 leucócitos/ μL). Em recente trabalho, demonstrou-se que a variação interobservador dos resultados de quantificação da parasitemia esteve inversamente associada à parasitemia. Ou seja, a leitura de lâminas com baixas parasitemias esteve mais sujeita às variações de parasitemia analisadas por 27 diferentes microscopistas considerados experientes (292). Um outro aspecto relevante observado neste mesmo trabalho foi que a distribuição dos leucócitos na lâmina se dá de forma heterogênea, enquanto a distribuição dos parasitos se dá de forma mais homogênea. Além disso, a contagem da parasitemia em gota espessa revelou-se menor do que a contagem em esfregaço. A discrepância na média da parasitemia pode chegar a 17% quando dois examinadores vêem a mesma lâmina (265). Existem muitos determinantes de erros nesta técnica de aferição da parasitemia periférica, mas ainda se constitui a técnica mais consistente na literatura, recomendada para estudos de resistência a drogas antimaláricas *in vivo*, pela OMS (376). Na tentativa de controlar variáveis de erro, as lâminas (gota espessa) foram examinadas por um único microscopista considerado experiente.

As parasitemias médias semelhantes de pacientes com malária vivax e malária falciparum chamam a atenção. Pelo potencial de penetrar em todas as hemácias da circulação, produzir cerca de 24 novos merozoítos/hemácia parasitada, a cada ciclo eritrocítico, e se utilizar de diferentes receptores redundantes para a penetração intra-eritrocítica, a parasitemia de *P. falciparum* tem sido classicamente descrita como superior à parasitemia de *P. vivax*, que só invade hemácias jovens

(reticulócitos) e produz apenas 15 merozoítos/hemácia, a cada ciclo. Assim, teoricamente, *P. falciparum* poderia chegar a uma parasitemia máxima de 100% e *P. vivax* a um máximo de 2% (percentual normal de reticulócitos no sangue periférico). Entretanto, a biomassa de *P. falciparum* não costuma levar a parasitemias superiores a 20%. Na realidade, em população não-imune, o risco de malária grave é maior com parasitemias acima de 4% apenas (374). A parasitemia está diretamente relacionada ao tempo de doença. Em Manaus, onde o acesso ao sistema de saúde é relativamente fácil, os pacientes não costumam apresentar altas parasitemias quando de seu diagnóstico, o que pode explicar não apenas a média de parasitemia semelhante à de *P. vivax*, mas também a baixa ocorrência de malária grave na região, que está geralmente relacionada às altas parasitemias. Adicionalmente, pela capacidade das hemácias parasitadas por *P. falciparum* se aderirem às paredes da microcirculação pelo seqüestro vascular (238), a parasitemia medida na periferia deve estar subestimada.

A presença de gametócitos e esquizontes no sangue periférico, no caso da infecção por *P. falciparum*, denotam apenas um tempo maior de doença, o que se observou em 23,3% dos pacientes. Em geral, *P. falciparum* inicia a formação de formas sexuadas na corrente sangüínea após o sétimo dia de início da doença clínica (285).

Apesar de estar além do escopo deste estudo, a avaliação da anemia na malária foi incluída na análise dos dados disponíveis. O assunto tem sido alvo de vários estudos em áreas endêmicas, especialmente em crianças e gestantes, mais

suscetíveis a esta complicação hematológica, e ainda não estão completamente esclarecidos os mecanismos pelos quais um paciente com malária desenvolve anemia. Em relação à anemia secundária à malária vivax, praticamente não há estudos na América Latina. Considerando-se a média da parasitemia, fica evidente que a destruição de hemácias não acontece exclusivamente pela ruptura da hemácia no momento final da esquizogonia, já que o hematócrito cai vários pontos a mais do que o percentual de hemácias parasitadas. Assim, tem-se sugerido que a anemia da malária é multifatorial, participando de sua patogênese a ruptura direta das hemácias pelos parasitos, no momento da esquizogonia, a fagocitose de hemácias parasitadas e não-parasitadas (hemocaterese esplênica), a hemólise auto-imune mediada pela deposição de ICC, antígenos parasitários, anticorpos e proteínas do complemento sobre a superfície das hemácias, além da diseritropoiese medular mediada pelo aumento do TNF, que bloqueia a ação da eritropoietina (237, 372).

Comparando-se os índices hematimétricos entre pacientes com malária vivax e falciparum, não se encontrou qualquer diferença estatisticamente significativa. Há poucos trabalhos na literatura dedicados ao estudo da anemia na malária vivax. Em um deles, na Venezuela, houve um discreto maior percentual de anemia entre pacientes com malária vivax, mas o número de pacientes foi apenas 35 (307). Por outro lado, na Colômbia, na região da Costa Pacífica, a média de hemoglobina entre os pacientes com infecções por diferentes espécies não foi diferente, independente da faixa etária (386). É urgente a necessidade de avaliação

da anemia na malária vivax, considerando a endemicidade da área estudada. Em Manaus, há grande variação da endemicidade ao longo dos anos, a depender de políticas públicas não-sustentadas e alterações ambientais, fazendo com que estas populações não sejam comparáveis entre si. Além disso, aí, são atendidos pacientes com malária vivendo em áreas hiper-endêmicas, meso-endêmicas e áreas indenes, o que certamente contribui para a diversidade de exposição individual e, conseqüentemente, para as manifestações clínico-laboratoriais da infecção aguda.

Também, em relação aos glóbulos brancos, não houve nenhuma diferença entre malária vivax e malária falciparum, nem mesmo na contagem diferencial. Este resultado vai de encontro ao resultado de estudo multicêntrico realizado com 4697 pacientes, onde se evidenciou tendência à leucopenia em pacientes com malária falciparum (234). Não houve nenhuma correlação entre plaquetimetria e leucometria, conforme encontrado em estudo com 1369 crianças com malária falciparum, na África (200).

Classicamente, a plaquetopenia da malária foi, no passado, associada à CIVD que apresentavam alguns pacientes com malária. Entretanto, esta é uma complicação rara da doença, enquanto a plaquetopenia é muito mais freqüente, sugerindo que a patogênese da plaquetopenia pode estar dissociada desta condição, apesar da plaquetopenia ser, de fato, observada sistematicamente nos casos de CIVD. A presença de plaquetopenia sem evidência de CIVD já era descrita desde a década de 70, mesmo em pacientes com a forma grave da doença (365). Em estudo realizado em crianças nigerianas com malária falciparum cerebral,

detectou-se 46% de plaquetopenia e destas, apenas 4 apresentavam estado de hipercoagulabilidade, diagnosticado através da realização de TAP, TTPA e dosagem de fibrinogênio (7). Em um hospital de atenção terciária na Índia, plaquetopenia foi observada em 40,5% dos pacientes com malária falciparum avaliados e CIVD em 4,4% (254). Na Tailândia, um estudo com pacientes com malária vivax e com malária falciparum demonstrou que não há alterações de coagulação na malária vivax, mas sim na malária falciparum, correlacionadas com as altas parasitemias (310).

Para uma melhor investigação dos distúrbios da coagulação na malária, além dos testes globais de coagulação (TAP e TTPA), poderiam ter sido realizadas as dosagens de fatores da coagulação, inibidores da coagulação (AT e proteína C), marcadores de fibrinólise (plasminogênio, alfa-2-antiplasmina, PDF e dímeros-D) e marcadores da ativação da coagulação (fragmento 1+2 da protrombina e TAT), exames não realizados no presente estudo.

Por se tratar de uma amostra composta quase que exclusivamente de casos de malária não-grave, as alterações da coagulação observadas foram de pequena intensidade, mas ainda assim, utilizando-se como critério de distúrbio de coagulação o RNI > 1,26 ou o TTPA > 34 s, verificou-se alteração da coagulação em cerca de 80% dos pacientes estudados. Existe certa dificuldade em se comparar este dado com os demais disponíveis na literatura, em função de cada estudo se valer de um critério diferente, muitas vezes apenas realizando análises de correlação.

Apenas em três pacientes com malária grave (2 com malária vivax e 1 com malária falciparum) foram realizados o TAP e o TTPA, estando alterada pelo menos uma das provas em dois deles.

Testes mais rudimentares, contudo, de baixo custo e de fácil execução, foram realizados nos pacientes, nomeadamente PL, TS e TC. Apresentam baixa sensibilidade e baixa especificidade na detecção de alterações da hemostasia, motivo pelo qual vêm sendo abandonados na prática clínica atual. Nem PL nem TS tiveram alguma associação com a contagem de plaquetas, e TC não se correlacionou com RNI ou TTPA. Assim, diferentemente da utilidade que tem PL para o rastreamento de pacientes com suspeita de febre hemorrágica do dengue (143), estas provas não parecem ter qualquer utilidade prática, na malária.

Em nenhum dos pacientes avaliados, mesmo naqueles com plaquetopenia grave, observou-se TS prolongado. Habitualmente, TS não se prolonga até que a contagem de plaquetas seja inferior a 80.000/ μ L (137). Assim, não se recomenda este teste para a triagem de pacientes com plaquetopenia, idéia muito atraente para o uso em saúde pública, pois, ao se coletar a amostra de sangue para o exame da gota espessa, por punção digital, poder-se-ia ter, ao mesmo tempo, o tempo de sangramento avaliado.

Apesar de ter tido grande utilidade para os cirurgiões, no passado, na triagem pré-operatória de pacientes com predisposição ao sangramento, TS é um teste em progressivo desuso clínico, em parte por seu baixo desempenho, lição aprendida com os pacientes com doença de von Willebrand, em quem TS varia de

um dia para outro no mesmo paciente, TS é normal em cerca de 50% dos pacientes com a doença, a variação intra e interobservador é 15% e drogas, álcool e dieta podem interferir no resultado do teste (212).

O maior TS observado em pacientes com malária falciparum não parece ter qualquer relação com a contagem de plaquetas. Provavelmente está relacionado à diminuição da função de agregação plaquetária ou à lesão endotelial, sendo que ambas condições são mais encontradas na forma grave da doença (337). Uma possível explicação é a maior adesividade e o maior tamanho das plaquetas na malária vivax, o que, a despeito do número reduzido de plaquetas, evita o comprometimento da hemostasia primária, avaliado pelo TS. Em verdade, a relação inversa entre contagem de plaquetas e VPM só foi observada nos pacientes com malária vivax. Não se pode recomendar o uso do TS com a finalidade de distinção entre as espécies de plasmódio, porém, estudos com maiores amostras devem ser realizados para o melhor esclarecimento desta diferença.

6.5 MALÁRIA GRAVE

Como era de esperar, em uma amostra de seleção aleatória de pacientes com malária, a frequência de casos de malária falciparum grave (11,5%) foi maior do que a frequência nos pacientes com malária vivax (1,4%), apesar dos amplos intervalos de confiança, em função da pequena amostra. Ressalte-se que os pacientes incluídos foram selecionados a partir da busca passiva em uma instituição

de referência para atendimento dos pacientes com malária, o que pode resultar na hiperestimulação da frequência das formas graves.

Chama a atenção a média de tempo de doença não tão alta como se esperaria para pacientes com a forma grave da doença, além das parasitemias pouco elevadas. Quatro dos cinco pacientes eram primoinfectados e nos casos de malária vivax, observou-se apenas icterícia colestática. A ocorrência de um óbito (não submetido à necropsia) não permite qualquer tipo de avaliação de plaquetopenia como fator prognóstico, contudo, em todos os casos de malária grave observou-se plaquetopenia grave.

Apesar da controvérsia (161), há estudos que demonstraram que a plaquetopenia não esteve associada ao desfecho mais grave ou à malária cerebral, em crianças (246).

Discute-se muito a presença de leucocitose em pacientes graves, independente da ocorrência de infecções bacterianas associadas. Apenas em uma paciente com malária falciparum que se apresentava com insuficiência renal aguda, hiperbilirrubinemia e coma, a contagem de leucócitos foi 14.300/ μ L. Curiosamente, a paciente não era primoinfectada.

A malária vivax grave é uma observação rara na literatura, em função da incapacidade de hemácias parasitadas aderirem ao endotélio vascular, como faz *P. falciparum*. Entretanto, há uma recorrente descrição de casos de malária vivax com complicações (286). A primeira preocupação, em realidade, está em como se definir

um caso de malária grave, já que os critérios de gravidade estabelecidos pela OMS se aplicam exclusivamente à infecção por *P. falciparum* (374).

Um dos únicos artigos na literatura em que se faz uma descrição mais ou menos detalhada de 11 casos de malária vivax grave, confirmados por PCR, não há menção à contagem de plaquetas. Em um dos casos se faz menção à diátese hemorrágica (185). As complicações observadas não são distintas daquelas observadas classicamente na malária falciparum.

Em 2001 e 2002, foram revistos os prontuários de 43 pacientes com malária vivax com complicações clínicas (confirmados por PCR) e 293 pacientes sem complicações, internados na FMT-AM. A hiperbilirrubinemia foi a causa mais freqüente de hospitalização, seguida da anemia grave. Houve também um caso de malária algida, um caso de IRA e um caso de edema agudo de pulmão. A média da contagem de plaquetas foi significativamente menor nos pacientes com complicações (12). Anos antes, entre 1997 e 1999, em um estudo do tipo série de casos, com pacientes com malária vivax, hospitalizados, na mesma instituição, detectaram-se, entre outras complicações, um paciente com CIVD e outro com malária cerebral. A plaquetopenia grave foi observada em 28,3% dos casos considerados graves (11).

A FMT-AM registrou um total de 15 necropsias realizadas em pacientes com diagnóstico de malária vivax (dados não-publicados). Em nenhuma destas necropsias se evidenciou, à microscopia óptica, a citoaderência de hemácias parasitadas. Observou-se a freqüente ocorrência de outras comorbidades que podem, de

maneira sinérgica, ter contribuído, para o óbito. Fragmentos dos tecidos mais acometidos estão sendo, atualmente, analisados em relação à presença de marcadores de ativação endotelial e marcadores de adesão plaquetária.

Dos 11 casos de malária vivax grave, estudados na Pré-Amazônia Maranhense, 100% dos pacientes tinham plaquetopenia, tendo 4 deles plaquetopenia grave, ou seja, abaixo de 50.000/ μ L. Apenas dois pacientes apresentaram sangramento, um deles hemorragia conjuntival e outro hemorragia digestiva (suspeita não-confirmada de CIVD) (297).

Entretanto, em todos os pacientes descritos com malária grave na Amazônia Brasileira, a plaquetopenia é uma complicação freqüente, de modo que sua importância não deve ser desprezada na avaliação futura e detalhada destes casos.

Em um clássico artigo publicado com 288 casos de malária falciparum em crianças, no Senegal, observou-se claramente que existe associação entre a plaquetopenia e o diagnóstico de malária grave, além da associação com a evolução fatal dos casos de malária grave, de forma independente (128). É necessário que outros estudos sobre malária vivax, com maior número de pacientes, ou que uma revisão sistemática dos casos relatados até o momento, esclareça melhor o perfil de tais pacientes.

Levanta-se aqui a hipótese de que, à semelhança dos genes *var* e seus polimorfismos associados à gravidade clínica da malária falciparum (182), os genes

ortólogos *vir* de *P. vivax* poderiam impactar, de alguma maneira, a evolução clínica desta infecção.

A não-observância de maior número de subfamílias específicas dos genes *vir* ou a ocorrência de uma determinada subfamília, em especial, nos pacientes com malária vivax, com complicações, pode se justificar pelo pequeno número de pacientes em que se seqüenciaram os parasitos ou pela heterogeneidade dos pacientes estudados. Variáveis não controladas podem alterar potencialmente a expressão das proteínas VIR polimórficas, como o grau de imunidade à malária, a presença de esplenomegalia ou o tempo de doença referido pelos pacientes (271).

Assumindo-se que as proteínas VIR são expressas na superfície de reticulócitos e estão sujeitas à variação antigênica em resposta ao sistema imunitário, seria justificável uma análise da interação imunológica entre o parasito e o hospedeiro, tendo os genes *vir* como adjuvantes no desenvolvimento da doença grave. Adicione-se a isto o fato de que em áreas endêmicas para *P. vivax*, distintas cepas do parasito podem estar infectando uma pessoa, simultaneamente (76).

Apesar de várias limitações, este foi o primeiro estudo a avaliar a possível associação entre as complicações clínicas da infecção por *P. vivax* e a diversidade genética dos parasitos envolvidos. Contudo, nesta observação preliminar, com apenas dois pacientes graves, não foi possível obter nenhuma evidência de que uma subfamília dos genes *vir*, em particular, estivesse implicada isoladamente com a maior gravidade. Análise do papel dos genes *vir* com maior número de pacientes e a

busca de outros potenciais marcadores genéticos de gravidade da infecção por *P. vivax* se fazem necessárias.

Estudos de expressão gênica, com detecção de mRNA, podem esclarecer melhor o papel dos genes *vir* nestes pacientes.

A publicação do genoma do *P. vivax*, projeto coordenado pelo Instituto de Pesquisa Genômica (TIGR) (62), prevista para meados de 2007, poderá também contribuir para a busca de novos marcadores genéticos de gravidade.

6.6 AVALIAÇÃO DA PLAQUETIMETRIA

Questionam-se muito, na literatura especializada em malária, os valores hematológicos normais, em especial os de hemoglobina, uma vez que pessoas residentes em áreas malarígenas estão também expostas a parasitos e helmintos intestinais e à subnutrição, o que traz muita confusão na análise dos distúrbios hematológicos atribuíveis à malária, em uma referida população. Recentemente, em uma população de crianças de até 5 anos de idade, em Moçambique, tentou-se estimar os intervalos de referência de índices bioquímicos e hematológicos, e, aparentemente, o valor de plaquetas normal nestas crianças pode ir de 133.000 a 750.000 plaquetas/ μ L (296). Entretanto, neste estudo, admitiu-se como plaquetopenia a clássica contagem de plaquetas abaixo de 150.000/ μ L. Este limite permitiu a comparação com a maioria dos estudos publicados.

A freqüência de plaquetopenia encontrada foi 70,8 (IC_{95%} 66,7-74,9), semelhante a vários outros estudos locais (11, 228). É preciso lembrar que a variabilidade desta freqüência depende da idade dos pacientes estudados, da espécie de plasmódio e da forma de seleção, pois estudos realizados em pacientes internados tendem a incluir pacientes com complicações, favorecendo a inclusão de pacientes com plaquetopenia grave.

Em crianças com malária falciparum, na FMT-AM, detectou-se 51,8% de plaquetopenia (263), em contraste com 65,4% neste estudo, realizado com adultos. Outras pesquisas envolvendo crianças, no Brasil, são necessárias.

Detectou-se 8,9% de plaquetopenia grave nos pacientes estudados. Em Manaus, entre 1997 e 1999, em pacientes com malária vivax internados, detectou-se 5,8% de plaquetopenia grave (327). Nos últimos anos, tem havido na literatura um grande número de casos de pacientes com malária vivax e contagens de plaquetas abaixo de 50.000/ μ L, sendo relatados como eventos raros (4, 20, 151, 170, 176, 187, 192, 268, 344, 383). Na realidade, a freqüência de plaquetopenia grave entre pacientes com malária vivax e falciparum é muito semelhante. Possivelmente, a plaquetopenia grave como evento raro, na malária vivax, tem sua origem no senso comum de que a plaquetopenia é apenas uma característica laboratorial da CIVD das formas graves de malária falciparum. Assim, considerando que a freqüência de malária grave por *P. vivax* é muito inferior à de casos graves por *P. falciparum*, e com a evidência de que a plaquetopenia grave é semelhante nas infecções pelas

duas espécies, fica evidente que a plaquetopenia não deve ser explicada apenas com base nos raros distúrbios graves de coagulação.

Parece ainda haver uma indefinição na literatura quanto à ocorrência de plaquetopenia entre pacientes com malária vivax e falciparum. Em análise de 727 pacientes com malária, na Arábia Saudita, observou-se plaquetopenia em 74,7% dos pacientes com malária vivax e em 59,9% dos pacientes com malária falciparum, com diferença estatisticamente significativa (30). Em estudo realizado na FMT-AM, em 2004, houve maior frequência de plaquetopenia entre pacientes com malária vivax (228). Na presente amostra analisada, a tendência não foi significativa. Também não se observou diferença de plaquetopenia entre as espécies, na Índia, em 2004 (164).

Apesar de 8,9% dos pacientes com malária apresentarem algum tipo de sangramento, ou à história clínica ou ao exame físico, durante a fase aguda da doença (Tabela 18), a intensidade do sangramento foi leve e necessitou de busca acurada, ao exame físico. Nos 15 pacientes com plaquetopenia grave, 4 (26,6%) apresentaram algum tipo de sangramento, sendo que três deles tiveram sangramento em mais de um sítio anatômico. Em sua maioria, apresentaram sangramentos leves, sendo mais freqüente a menometrorragia, nas pacientes do gênero feminino. No geral, a gengivorragia foi mais freqüente, apesar de não se ter realizado uma avaliação dentária dos pacientes, uma vez que o precário estado dos dentes pode predispor um indivíduo ao sangramento espontâneo, em caso de apresentar plaquetopenia (218). Sangramentos mais extensos, como equimose e

hematêmese, foram observados apenas em dois pacientes, sendo que ambos apresentavam diagnóstico de malária grave.

Em pacientes internados com malária vivax, na FMT-AM, detectou-se 24% de petéquias, 8% de sangramento gengival e 8% de sangramento conjuntival nos pacientes com plaquetopenia grave (327). Sangramentos leves também foram observados em pacientes plaquetopênicos com malária, na República de Camarões (233). Em observação com grande número de pacientes com malária vivax e falciparum (1565 pacientes), realizada na Índia, não se verificou sangramento, mesmo naqueles com plaquetopenia grave (164).

A ocorrência de sangramento esteve associada, de forma independente da contagem de plaquetas, ao diagnóstico de malária grave. É importante lembrar que a simples presença de sangramento não caracteriza, *per se*, malária grave, de acordo com os critérios da OMS. Entretanto, em paciente com malária (por qualquer espécie), o sangramento, de qualquer intensidade, deve alertar o médico assistente para uma chance quase 55 vezes maior de desenvolvimento de malária grave, em comparação aos pacientes sem sangramento.

Assim, não parece razoável que todo paciente com diagnóstico de malária se submeta ao exame de contagem de plaquetas, a menos que apresente algum tipo de sangramento, à história clínica e/ou ao exame físico. O achado não dá suporte à rotina de solicitação sistemática de plaquetimetria, nos centros de atenção primária à saúde, a todo paciente com malária, uma vez que está o sangramento, e

não a plaquetopenia, associado à malária grave, de acordo com os dados apresentados.

Sugere-se, portanto, que pacientes apresentando qualquer tipo de sangramento sejam hospitalizados, independentemente da espécie responsável pela infecção. Isto não implica uma conduta terapêutica específica para a plaquetopenia, como a transfusão de concentrado de plaquetas, mas uma investigação clínica e laboratorial mais detalhada em busca de sinais de malária grave e o tratamento antimalárico mais agressivo, com o uso de esquizotomicidas rápidos, p. ex., derivados de artemisinina.

Há, nas unidades de referência para o diagnóstico e tratamento da malária, certa preocupação com o tratamento ambulatorial de pacientes com malária e plaquetopenia grave, pelo risco de sangramentos que coloquem em risco a vida do paciente. No presente estudo, não se verificou nenhum tipo de sangramento mais exuberante que requeresse medidas de suporte clínico. Pela raridade do sangramento grave, devem ser realizados mais estudos prospectivos. Entretanto, revisando todos os relatos de casos de malária vivax que evoluíram com plaquetopenia grave (Tabela 6), verificou-se que, em nenhum deles, há descrição de hemorragias exuberantes, sendo relatados, no máximo, episódios de gengivorragia e petéquias. Essa observação é contrária àquela observada nos casos de dengue clássico, p. ex., onde a frequência de sangramento espontâneo é maior (75,5%), com semelhante nível de contagem de plaquetas (96).

O impacto dos custos, em saúde pública, com os pacientes de malária que cursam com plaquetopenia, deve também ser avaliado. Possivelmente, esta complicação aumentaria os DALY's associados à malária vivax.

A CIVD é uma complicação rara da malária e, em geral, a plaquetopenia é observada quando o processo já está em fase mais avançada. Possivelmente a investigação de distúrbio de coagulação em pacientes com malária e plaquetopenia grave não será de grande utilidade no diagnóstico precoce de CIVD, tendo em vista a alta frequência da plaquetopenia e a baixa ocorrência de CIVD. A CIVD poderia ser melhor monitorada pela ocorrência de malária falciparum em pacientes primoinfectados, com alta parasitemia e manifestações hemorrágicas mais exuberantes. No caso da malária vivax, o valor preditivo positivo da plaquetopenia no diagnóstico precoce de CIVD é ainda menor, considerando que não há mais do que três casos relatados na literatura mundial (11, 202).

Há um pequeno número de trabalhos disponíveis em que se realizou o exame da medula óssea em pacientes com malária. Nem mesmo transfusões de plaquetas são necessárias antes da aspiração da medula óssea ou de uma biópsia óssea, desde que seja aplicada pressão local adequada na superfície, após o procedimento (28).

Em avaliação da medula óssea de 45 pacientes com malária falciparum, em Goiânia (Goiás), de 1966 a 1970, 43 deles apresentaram série megacariocítica considerada normal, considerada diminuída em um paciente e considerada aumentada em um paciente (17). Ressalta-se que o paciente com série

megacariocítica diminuída estava em uso de antifólico. Trata-se de uma das maiores casuísticas de pacientes que se submeteram ao exame de medula óssea durante a fase aguda da malária, entretanto, naquele tempo, não era rotineira a realização da plaquetimetria, o que impossibilita qualquer associação entre a produção central de plaquetas e sua diminuição na periferia.

No Rio de Janeiro, em 1970, 19 pacientes com malária (*vivax* ou *falciparum*), procedentes de todas as regiões do país, se submeteram ao mielograma, com aspecto de normalidade dos megacariócitos, nos materiais examinados. Em um dos pacientes, foi encontrada uma hipersegmentação megacariocítica (259). Neste estudo, a contagem de plaquetas foi realizada em alguns poucos pacientes, pelo método de Mendel-Feissly.

Em outra avaliação de oito pacientes com malária (*vivax* ou *falciparum*), em Singapura, os megacariócitos estavam normais em número e qualidade em sete pacientes, e em um deles observou-se hiperplasia, com presença de pró-megacariócitos (33). Em paciente com malária *vivax* que desenvolveu PTI na FMT-AM, o exame de medula óssea revelou discreto aumento de megacariócitos (192). O modelo experimental clássico com camundongos CBA e *P. berghei* confirma o aumento de megacariócitos na medula óssea na vigência da infecção aguda e da plaquetopenia (135).

Assim, diferentemente do que acontece na série vermelha, na malária, mesmo na infecção por *P. vivax* (379), a medula óssea não parece estar comprometida no que se refere à série megacariocítica. Conhecendo-se a maneira

pela qual os megacariócitos produzem as plaquetas, é possível que em situação de destruição periférica, com a finalidade de compensar o número reduzido de plaquetas, os megacariócitos passam a liberar plaquetas maiores, conhecidas como megaplaquetas. A compensação acontece em função do maior volume e quantidade de α -grânulos e grânulos densos nas megaplaquetas, que proporcionam hemostasia primária igual ou semelhante. A concentração de TPO está aumentada na fase aguda da infecção malárica, regulando, assim, de maneira satisfatória, a produção de novas plaquetas pela medula óssea (190).

A interpretação clínica de parâmetros plaquetários, geralmente disponíveis em métodos de análise hematológica automática, como o VPM, o plaquetócrito (PCT) e a amplitude de distribuição do tamanho das plaquetas (PDW), são de pouco uso na prática clínica (381). Entretanto, buscou-se verificar se nos casos de redução da contagem de plaquetas, o VPM (que estima o tamanho das plaquetas) estava aumentado, partindo da hipótese de que a destruição, perda ou consumo das plaquetas, na circulação periférica, levaria à compensação medular. É o que se conhece por plaquetopenia regenerativa, na qual os megacariócitos medulares sofrem processo de hiperplasia vicariante (381).

De fato, houve uma significativa correlação negativa entre a plaquetimetria e VPM, observada apenas nos pacientes com malária vivax, apesar de haver uma tendência nos casos de malária falciparum. Já foi descrito maior VPM em crianças com malária falciparum e plaquetopenia, em comparação com crianças com malária falciparum não-plaquetopênicas (63). Neste estudo, houve normalização do VPM

após uma semana do início do tratamento. O mesmo foi confirmado na Arábia Saudita, com 24,1% dos pacientes apresentando VPM acima do valor normal (30).

Entretanto, não se deve esquecer de que o VPM pode sofrer alterações, a depender do anticoagulante utilizado na coleta da amostra, e do tempo decorrido entre a coleta e a análise (280). Estudos dessa natureza devem manter constante este tempo, como obedecido no presente trabalho, sob risco de importante alteração dos resultados.

VPM tem também se correlacionado de forma satisfatória com a ativação das plaquetas. Assim, já que o teste de agregação de plaquetas não foi possível nos pacientes com malária, em função de não disporem de quantidade suficiente de plaquetas para a agregometria, o aumento do VPM poderia constituir evidência desta maior ativação de plaquetas *in vivo*, na malária aguda (280). O aumento do VPM também sugere plaquetopenia imune (169), além de evidenciar a ausência de comprometimento dos megacariócitos na medula óssea (27, 41).

Pode-se atribuir a baixa ocorrência de sangramentos na malária a esta compensação medular, expressa na presença de megaplaquetas na circulação periférica, que, apesar de diminuídas em quantidade, parecem exercer adequada hemostasia primária. A maior capacidade de agregação pode, inclusive, estar relacionada à facilitação do processo de citoaderência de hemácias parasitadas aos vasos, na malária falciparum (276).

Nos casos de sangramento mais extensos, podem estar associados aos distúrbios de coagulação ou às alterações vasculares das formas graves da doença.

Assim, é possível que a compensação medular dos megacariócitos e o possível aumento da agregação plaquetária na presença de antígenos parasitários, justifiquem de *per se* a raridade dos sangramentos de grande relevância clínica nos pacientes com malária e plaquetopenia. Em função destas observações, a conduta expectante frente aos quadros de plaquetopenia parece razoável e segura, desde que se garanta o tratamento eficaz imediato e se afaste a possibilidade de malária grave.

É importante lembrar que transfusões de hemocomponentes não são isentas de risco, mesmo nos dias de hoje. Tem-se discutido amplamente o risco de transmissão transfusional de herpesvírus humano-8 (HHV-8), vírus SEN, vírus TT e de príons (40, 380). Também não se pode descartar a possibilidade de que uma transfusão de plaquetas possa inibir a produção de TPO, impedindo a adequada recuperação da contagem de plaquetas por compensação medular.

Até o momento, não há indicações claras de quando se deve transfundir (de forma profilática ou terapêutica) um paciente com plaquetopenia grave (299). Mais estudos com avaliação de eficácia transfusional são necessários.

Para efeito de comparação dos mecanismos patogênicos, avaliou-se a correlação entre hematimetria e VCM, correspondentes da plaquetimetria e do VPM, para a série vermelha. Nestse caso, observou-se uma tentativa de aumento de VCM, à medida em que cai a contagem de hemácias, nos pacientes com malária vivax, mas não na malária falciparum. Isso pode representar um maior efeito de citocinas

inflamatórias exercendo ação negativa sobre a eritropoiese, na medula óssea, nos casos de malária falciparum.

O fato de não se ter observado correlação significativa entre anemia e plaquetopenia sugere que mecanismos diferentes devem estar atuando na patogênese de cada evento. Os mecanismos de produção da anemia na malária são multifatoriais, incluindo desde a fagocitose de hemácias parasitadas mediada por anticorpos citofílicos (353) até a reconhecida diseritropoiese mediada pela hiperprodução de citocinas como o TNF (378).

Faz-se necessário, a fim de compreender melhor os mecanismos de formação da anemia na malária vivax, mais estudos nas áreas endêmicas para esta espécie. Maior número de pacientes poderá permitir a comparação dos mecanismos etiopatogênicos de cada espécie de plasmódio.

Em relação aos fatores preditores de plaquetopenia na malária, poucos têm-se ocupado desta avaliação. Em sua maioria, ou estudam a patogênese da alteração *in vitro* ou simplesmente descrevem sua freqüência.

Foram selecionados possíveis preditores de plaquetopenia, de acordo com indicações prévias da literatura, ou de forma meramente exploratória. Em uma fase inicial, de análise univariada, a ocorrência de plaquetopenia esteve associada à dieta rica em alho, tempo de doença menor de quatro dias, esplenomegalia, alta parasitemia e distúrbio de coagulação. Estiveram próximos da significância o gênero e o número de infecções maláricas prévias, motivo pelo qual foram incluídos no modelo de análise multivariada.

Em uma segunda etapa, na análise multivariada, após ajuste pelas variáveis preditoras da análise univariada, detectou-se associação da plaquetopenia com o gênero masculino, o número de infecções maláricas prévias e a parasitemia.

Trata-se da primeira vez em que os fatores de risco de plaquetopenia são analisados de forma multivariada, permitindo uma melhor interpretação dos dados.

Quanto ao gênero, pela primeira vez observou-se que o gênero masculino desenvolve mais plaquetopenia durante as infecções maláricas. É possível que alguns hormônios femininos exerçam papel protetor. Entretanto, o assunto ainda deve ser abordado de forma mais apropriada.

Não se pôde distinguir as espécies responsáveis pelas infecções prévias, pois os pacientes geralmente não se recordam, e seu atendimento não é centralizado em uma única unidade, com o adequado registro. Assim, admite-se que o número de episódios prévios deve se tratar mais provavelmente de infecção por *P. vivax*, em função da maior incidência desta espécie na região. A menor média de plaquetimetria entre os primoinfectados, em comparação com os que referiam ter tido mais de 5 episódios de malária, sugere, portanto, mecanismo de proteção adquirida contra a diminuição do número de plaquetas. O mecanismo não foi observado entre os pacientes com malária falciparum, provavelmente em função de, mesmo referindo ter tido mais de cinco infecções prévias, serem primoinfectados por *P. falciparum*. Seria importante que a mesma análise fosse realizada em áreas endêmicas exclusivamente para *P. falciparum*, semelhante ao que acontece na África.

Em estudo da hemostasia em pacientes com malária, com seleção igualmente aleatória de pacientes, na FMT-AM, pacientes com relato de primoinfecção por *P. falciparum* apresentaram plaquetimetria mais baixa em relação aos considerados imunes (228). Entretanto, não houve qualquer análise estatística para se ajustar a contagem de plaquetas pela parasitemia periférica.

A evidência de que pessoas que relatam ser primoinfectadas apresentam plaquetopenia mais intensa poderia se justificar pela maior parasitemia que estas pessoas desenvolvem ao longo de sua primeira infecção. Neste estudo, esta variável foi ajustada e, aparentemente, a primeira infecção está independentemente associada à plaquetopenia. O fenômeno pode encontrar suporte na aquisição de imunidade humoral. Pessoas expostas mais vezes à infecção pelo plasmódio apresentam maior quantidade de anticorpos protetores, p. ex., anticorpos contra a PvAMA-1, em especial os citofílicos IgG1 e IgG3 (244) e anticorpos IgG3 contra a MSP-1 de *P. falciparum* (319). Entendendo-se que a destruição de plaquetas na malária é proporcional à quantidade de antígenos parasitários circulantes, mas também à quantidade de anticorpos que contribuem para a formação dos IC na superfície das plaquetas, de acordo com o modelo proposto por Kelton (179), pode-se admitir que nos primoinfectados existe uma proporção ótima de antígeno e anticorpo, enquanto nos pacientes que já se expuseram a várias infecções maláricas (pessoas imunes), existe maior quantidade de anticorpos e menor quantidade de antígenos, desequilibrando a formação dos IC na superfície das plaquetas. Esta seria, portanto, uma evidência de que anticorpos, isoladamente, não devem

determinar a plaquetopenia na malária. Entretanto, em modelo experimental, a transfusão passiva de anticorpos de camundongo infectado por *P. berghei* plaquetopênico para camundongos normais determinou queda da contagem de plaquetas (135).

A ocorrência de plaquetopenia menos intensa em pacientes infectados por *P. vivax* com aminoácidos residuais Y¹⁹³ e S²¹⁰ na seqüência do gene do domínio I da PvAMA-1, em amostras brasileiras, sugere que o polimorfismo de genes que codificam proteínas imunogênicas do parasito pode determinar maior destruição plaquetária, em função de maior produção de anticorpos necessários à formação de IC sobre a superfície da plaqueta (Grynberg et al, Comunicação pessoal). Explicação alternativa para este fenômeno seria a mímica molecular entre antígenos parasitários e antígenos plaquetários.

Estudos com portadores assintomáticos do plasmódio raramente realizam a contagem de plaquetas como parte de seus métodos. Este grupo de pessoas geralmente apresenta baixas parasitemias periféricas, não superiores a 500 parasitos/ μ L (18), além de sua resposta humoral ser diferenciada, com aumento das titulações de IgG1 (42). Assim, seria de se esperar que os assintomáticos não fossem plaquetopênicos. De fato, na revisão de prontuários de 57 crianças (sintomáticas e assintomáticas) procedentes da Libéria, foi diagnosticada malária por gota espessa e esfregaço em 60% delas, sendo que apenas 16% apresentavam plaquetopenia, o que é inferior ao que comumente se descreve nos estudos de freqüência de plaquetopenia (227).

A teoria de uma concentração ótima de antígeno e anticorpo deve ser investigada não apenas *in vivo*, mas também com o moderno recurso de pesquisa *in silico*.

Demonstrou-se, em 1981, além da diminuição da meia-vida das plaquetas, na malária, a associação com a alta parasitemia (156). Desde então, a correlação entre plaquetimetria e parasitemia periférica tem sido evidenciada tanto na malária vivax como na malária falciparum (109, 301, 310). Em estudo com malária vivax, na Venezuela, entretanto, essa observação não foi evidenciada, apesar de não haver no artigo a descrição dos métodos de quantificação da parasitemia (306).

Em resumo, é possível que a plaquetopenia grave reflita altas parasitemias, cujo tratamento precoce e eficaz, com o uso de antimaláricos esquizotípicos rápidos, conseqüentemente levará ao aumento da contagem de plaquetas. Parece inadequada a busca de terapêutica de suporte para a plaquetopenia grave isolada, tais como o uso de imunoglobulina (103) ou a transfusão de concentrados de plaquetas, em especial pelos seus riscos (380). A maior parte dos consensos sobre transfusão de plaquetas recomenda a transfusão profilática quando a contagem de plaquetas está abaixo de 10.000/ μ L, que parece ser o limiar para sangramentos mais relevantes clinicamente (300). Entretanto, tal recomendação se baseia majoritariamente em estudos com pacientes oncológicos, cujo cenário clínico e etiopatogênico é totalmente diverso daquele observado nos pacientes com malária. Pelo fato de não existirem consensos de transfusão de plaquetas na malária, não parece adequado expor um paciente a uma hemotransfusão desnecessária,

seguindo recomendações validadas para doenças de outras naturezas (321). A transfusão de plaquetas, além de não ser inócua, pode interferir na recuperação das plaquetas, em função da inibição de maior produção pela medula óssea. Entretanto, sabendo que a alta parasitemia de *P. falciparum* traz consigo um maior risco de malária grave, talvez seja prudente que pacientes com malária falciparum desenvolvendo plaquetopenia grave sejam hospitalizados para a administração de antimaláricos por via parenteral, conduta habitualmente tomada nos casos de pacientes com altas parasitemias ou sinais e sintomas sugestivos de malária grave. No caso da malária vivax, pelo risco muito menor de complicações clínicas, a plaquetopenia grave não deve exigir maiores cuidados.

Na tentativa de se controlar os pacientes para o máximo de fatores que pudessem interferir na contagem de plaquetas, investigou-se, durante a coleta da história clínica, o uso de substâncias que pudessem interferir na capacidade de agregação das plaquetas. A maior adesividade destas partículas, durante a infecção malárica, poderia ser apontada como possível causa de seu seqüestro na microvasculatura, resultando na plaquetopenia. Assim, sistematicamente, a história de dieta rica em alho e cebola foi coletada de todos os pacientes incluídos. Na análise univariada, a dieta regularmente rica em alho esteve associada à proteção contra a plaquetopenia. Entretanto, quando se ajustou esta análise com a inclusão de outras variáveis, a associação não foi mais observada. É importante ressaltar que a melhor maneira de se abordar o efeito de *Allium* spp. sobre a função plaquetária,

teria sido através da dosagem sérica de substâncias já purificadas a partir dos bulbos, como a alicina ou o ajoene.

Inicialmente, acreditou-se que o alho pudesse ter interferido na capacidade de agregação plaquetária, já que é um potente antiagregante plaquetário, pela sua rica concentração de tio-sulfatos (13, 53, 67, 340, 348). Porém, após a análise multivariada, ficou evidente que o efeito do uso regular do alho aumentou a contagem de plaquetas por redução da parasitemia.

A alicina, um inibidor de protease de cisteína, contido nos extratos de alho, inibiu não apenas a invasão de esporozoítos em células de mamíferos, *in vitro*, como também reduziu *in vivo* a parasitemia de formas eritrocíticas, após administração oral ou intraperitoneal, em modelo experimental de malária por *P. berghei* em camundongos *Swiss Webster* (83). O uso de ajoene, um outro composto organossulfuroso derivado de extratos de alho, em modelo experimental semelhante ao anterior, controlou de forma significativa a parasitemia periférica (284). O ajoene tem também ação antifúngica, antiparasitária e antiviral. Em nenhum dos estudos descritos anteriormente, houve efeitos adversos relevantes nos animais. Em paralelo, o ajoene tem sido estudado como potente imunomodulador de funções imunitárias dependentes de membrana (311).

A forma de coleta desta informação, entretanto, foi um fator limitante, mas na presente observação clínica, ainda que imprecisa, pelo fato de se desconhecer a concentração sérica real das substâncias antiparasitárias derivadas do alho, nos pacientes, o efeito da dieta rica em alho regular teve impacto relevante sobre a

parasitemia da malária. Ainda que se desconheçam os mecanismos responsáveis por esta ação antiparasitária, trata-se da primeira vez em que se demonstra, por estudo observacional, o efeito do uso do alho na infecção malárica humana. O potencial uso terapêutico de substâncias derivadas desta planta merece investigação. Seu papel no controle de doenças cardiovasculares tem sido objeto de estudo de muitos autores, pela sua comprovada ação antiinflamatória e antiagregante somada à facilidade de obtenção e uso pela população (1).

Costumeiramente, no passado, os estudos que avaliavam a hemostasia na malária atribuíam a plaquetopenia aos distúrbios de coagulação próprios desta infecção (94). Se assim fosse, as manifestações clínicas da plaquetopenia deveriam ser mais exuberantes e acompanhadas de sangramentos mais profundos, em função do comprometimento da hemostasia secundária, mas não é o que se observa na prática. Nesta análise, quando se ajustou a associação da plaquetimetria com o RNI ou com o TTPA, pelo tempo de doença, parasitemia, gênero e espécie de plasmódio, verificou-se que a plaquetopenia não é dependente das alterações da coagulação.

Os distúrbios da coagulação estão, de fato, relacionados também à malária não-grave (293), mas não justificam, *per se*, a ocorrência da plaquetopenia. Uma das prováveis causas desta ativação da cascata da coagulação é a lesão endotelial que se observa nos quadros graves da doença, além da atividade pró-coagulante de hemácias infectadas e, possivelmente, dos próprios parasitos. Em acordo com a literatura, não houve associação entre ICC e provas de coagulação na malária,

sugerindo que esses ICC não devem ser os responsáveis pela lesão endotelial que ativa a cascata da coagulação (115).

O seqüestro de plaquetas no baço durante a infecção malárica tem sido uma das hipóteses para a diminuição da contagem de plaquetas na circulação periférica. Adicionalmente, a diminuição da vida média destas partículas estaria associada à destruição pelos macrófagos esplênicos. Entretanto, não se identificou a esplenomegalia como um preditor independente de plaquetopenia, afastando, portanto, a idéia de que o simples aumento do baço durante a infecção malárica poderia levar à plaquetopenia. Provavelmente, a esplenomegalia seja um co-fator associado à plaquetopenia.

Uma das limitações do estudo foi a definição de caso de esplenomegalia, baseada tão somente no exame físico, já que a esplenomegalia em adultos pode não ser detectada ao exame físico, a menos que exceda um certo limiar. Mas, mesmo na impossibilidade de realização de ultra-sonografia abdominal para medição do baço, em todos os pacientes incluídos, o exame físico detectou os casos de esplenomegalia mais exuberantes.

6.7 EVOLUÇÃO CLÍNICA DA ESPLENOMETRIA E DA PLAQUETIMETRIA

Pela impossibilidade de seguimento prolongado de maior número de pacientes com malária, uma amostra não-probabilística de sete pacientes, que permitiram a internação, foi avaliada diariamente, por sete dias.

De maneira muito semelhante, tanto para malária vivax como para malária falciparum, os pacientes evoluíram com aumento do número de plaquetas paralelamente à negatificação da parasitemia, sendo que em todos, a plaquetimetria estava normal já no sexto dia após o início da terapêutica. Não houve diferença na velocidade de recuperação dos pacientes que se apresentavam inicialmente com plaquetopenia grave.

Em um paciente, observou-se, a partir do sexto dia, aumento expressivo do número de plaquetas. Habitualmente, considera-se como plaquetose a contagem isolada de plaquetas acima de 500.000/ μ L (percentil 99% da população normal) (347). Entretanto, em alguns pacientes, mesmo sem se chegar a este limite, o aumento biologicamente relevante da contagem de plaquetas pode ser definido como plaquetose. Na prática clínica, a plaquetose reativa, como é conhecida, corresponde a cerca de 85% dos casos de plaquetose. Em grande parte das infecções, a plaquetose reativa é um epifenômeno de uma reação de fase aguda sistêmica, caracterizada por um excesso de fatores de crescimento trombopoiéticos, como IL-6, TPO, IL-1, IL-4 e TNF (347). Praticamente não há risco de fenômenos trombo-hemorrágicos. A distinção clínica entre uma plaquetose reativa e uma plaquetose primária deve se basear essencialmente no tempo de duração da plaquetose, sendo fugaz no primeiro caso (181).

Em análise de 52 adultos com malária falciparum, na Tailândia, independentemente de sua classificação clínica, todos os pacientes apresentaram plaquetimetria superior a 180.000 plaquetas/ μ L após o quarto dia de seguimento

clínico depois do início da terapêutica específica (293). Em Singapura, dados semelhantes foram observados, com níveis mais baixos de plaquetopenia entre o dia do diagnóstico e o quarto dia de tratamento (33). Não se descarta a possibilidade de que, durante a fase aguda da doença, haja o seqüestro de plaquetas em órgãos como baço e fígado. Assim, após a negatificação da parasitemia, as mesmas plaquetas seqüestradas seriam liberadas novamente na circulação periférica. Entretanto, já se demonstrou que nos pacientes com malária, a vida média de uma plaqueta passa de 10 dias para uma média de 2 dias, tornando essa hipótese pouco provável (172). Além do mais, ressalta-se a intensa capacidade de recuperação do número de plaquetas, a partir da geração de novas partículas pelos megacariócitos, na medula óssea, que estão normais ou em processo de hiperplasia, além de contarem com o estímulo de fatores de crescimento trombopoéticos, como já foi comentado acima.

A maioria dos estudos tem apontado para uma recuperação quase total do nível de plaquetas, após a eliminação da parasitemia periférica, semelhante ao que se observou nos sete pacientes hospitalizados e acompanhados por sete dias. Em crianças com malária vivax, na Venezuela, 17,9% dos pacientes hospitalizados permaneceram com plaquetopenia moderada (305), entretanto, não há menção sobre o tempo de seguimento clínico. A persistência da plaquetopenia após o tratamento específico deve sinalizar a ocorrência de processo auto-imune idiossincrático, como aquele relatado, em Manaus, em dois pacientes que desenvolveram PTI, após infecção por malária vivax (192, 363).

Há poucos trabalhos em que se avaliou a associação entre plaquetopenia e esplenomegalia. Em um deles, esta associação esteve presente em 69 pacientes com malária (260). Em outro estudo, entretanto, detectou-se plaquetopenia em 24/27 casos de malária vivax, inclusive com casos de plaquetopenia grave, sendo que nenhum dos pacientes se apresentava com esplenomegalia (191). A presença de esplenomegalia, ao exame físico, como se demonstrou na análise multivariada dos preditores de plaquetopenia, não esteve associada à plaquetopenia de forma independente. Na série de casos em que se acompanhou o tamanho do maior eixo do baço, à ultra-sonografia abdominal diária, observou-se que o tamanho do baço não diminuiu de forma considerável durante os sete primeiros dias após o início da terapêutica. Assim, fica evidente que este não é um fator suficiente ou necessário para a diminuição do número de plaquetas, em que pese o fato do paciente com menor contagem de plaquetas da série não ter apresentado esplenomegalia e o paciente que não desenvolveu plaquetopenia ter apresentado aumento deste órgão durante todo o período de seguimento.

Apesar disso, é possível que a destruição das plaquetas, modificadas previamente por mecanismos imunitários ainda desconhecidos, encontre no baço excelente meio para sua depuração mais acelerada, com abundância de fagócitos.

Mesmo em macacos rhesus esplenectomizados 36 dias antes da infecção por *P. cynomolgi*, a plaquetopenia foi identificada na evolução da doença, de forma semelhante aos animais não-esplenectomizados (335), mostrando que o baço, nesse modelo, *per se*, não é essencial para o evento da plaquetopenia. Entretanto,

nesse modelo, as plaquetas se recuperam independentemente do tratamento específico. É difícil a comparação com o modelo humano, pois não há dados de evolução da plaquetopenia na ausência de tratamento específico, por questões éticas. Pouco se comenta na literatura sobre o papel do baço na patogênese da plaquetopenia. Dos cinco pacientes esplenectomizados acompanhados com diagnóstico de malária falciparum, na FMT-AM, entre 1996 e 1999, três desenvolveram plaquetopenia, dois deles inclusive com plaquetopenia grave (198).

Em sofisticado estudo de cinética plaquetária em pacientes com malária (vivax ou falciparum), utilizando cintilografia com plaquetas autólogas marcadas com ¹¹¹In, demonstrou-se que a biodistribuição das plaquetas na malária não difere daquela observada em pessoas normais controles (172). Nesse estudo, demonstrou-se que as plaquetas, durante a infecção malárica, têm uma vida média significativamente menor, entre 0,64 e 3,58 dias apenas, apesar de não haver um seqüestro das mesmas no fígado ou no baço, conforme se pôde observar na cintilografia de abdome superior até 96 horas após a infusão das plaquetas marcadas. O mesmo achado de diminuição da vida média das plaquetas já havia sido demonstrado de modo semelhante, em 1973, porém, não foi realizada a cintilografia em topografia de baço, apesar da sugestão, por parte dos autores, de que seus dados indicavam maior seqüestro de plaquetas no baço (332).

Metodologicamente, os dados dos sete pacientes avaliados demonstraram que a palpação abdominal para o diagnóstico de esplenomegalia, mesmo utilizando a técnica de palpação correta, com o paciente na posição de Schuster, teve

sensibilidade limitada, o que faz questionar resultados de outros trabalhos, onde a esplenomegalia foi atribuída apenas com base no exame físico, sem a devida comprovação com exame de imagem.

Em resumo, não há suficientes evidências na literatura de que o aumento do baço é, de forma isolada, o determinante da plaquetopenia na malária. É possível que o antigo conceito de hiperesplenismo, utilizado para explicar a pancitopenia observada em pacientes com doenças hepáticas e aumento da pressão portal e esplenomegalia, tenha sido erroneamente aplicado, *by proxy*, ao modelo da malária. O aumento do órgão não deve ser um determinante do maior seqüestro ou destruição das plaquetas circulantes. Ao contrário, há que se buscar evidências de que o baço não exerce papel de compensação nos casos de anemia e plaquetopenia. É importante citar o viés de que todas as análises histopatológicas de baços de pacientes com malária só existem nos casos de malária grave, seguidos do óbito. E mesmo nestes casos, já se identificava, no início do século passado, a presença de hematopoiese (222). Não existe, portanto, nenhuma avaliação dos baços de pacientes com malária não-grave. O mesmo poderia acontecer com a trombopoiese, uma vez que durante o desenvolvimento dos mamíferos, células-tronco que formam os megacariócitos povoam não apenas a medula óssea, mas também o fígado e o baço do feto (163).

6.8 IMUNOCOMPLEXOS CIRCULANTES

Nesta parte experimental do estudo, as observações não tiveram amostras calculadas de forma probabilística. Os estudos de casos constituíram uma forma de investigação exploratória.

A avaliação do tamanho dos ICC, por espectrometria de massa, também seria uma informação de fundamental importância para o entendimento do seu papel na patogênese da plaquetopenia. ICC maiores, p. ex., poderiam ter explicado a inibição da fagocitose de plaquetas por células THP-1.

No caso dos ICC de pacientes com infecção pelo HIV-1 e PTI, os ICC são compostos de antígenos plaquetários (fragmentos de plaquetas) e anticorpos IgG anti-plaquetários. No presente trabalho, não se procurou identificar a presença de antígenos parasitários, anticorpos antimaláricos, ou a presença de IgM nos ICC, pois se queria apenas demonstrar a semelhança entre este mecanismo de PTI no paciente HIV e a plaquetopenia da malária.

Apesar de constituírem doenças com evoluções clínicas diferentes, a presença do agente infeccioso na circulação, em ambas, parece ser o fator desencadeador da plaquetopenia, hipótese que norteou o desenho experimental.

Talvez em função da pequena amostra, não houve diferença entre a média de ICC entre pacientes com menos e com mais de cinco infecções prévias por malária, conforme demonstrado em trabalho indiano, no qual a concentração de ICC esteve relacionada com a exposição prévia ao plasmódio, servindo de indicador de infecção recente ou passada (356). Entretanto, foram isolados ICC dirigidos contra

P. vivax e *P. falciparum*, especificamente, além da detecção da presença de IgM ou IgG nos ICC isolados. Nos 48 pacientes avaliados, não houve este nível de detalhamento sobre a composição dos ICC isolados.

Em outra amostra da Índia, pacientes com malária vivax e falciparum tiveram níveis de ICC semelhantes, sendo que os pacientes com malária falciparum grave tiveram níveis maiores (167).

A ausência de correlação entre a plaquetimetria e os ICC já havia sido demonstrada em dois clássicos estudos com pacientes com malária vivax e falciparum aguda (179, 354). Em um deles, os ICC tiveram correlação significativa apenas com o número de sítios de ligação de anticorpos radioativos humanos anti-globulinas, na superfície das plaquetas. Os autores sugeriram que os ICC poderiam auxiliar na fixação de auto-anticorpos sobre a superfície das plaquetas.

Apesar de ter havido apenas sete pacientes com *P. falciparum* que realizaram a dosagem de ICC, houve uma tendência à significância da correlação negativa com a plaquetimetria, devendo estudo com maior número de amostras ser realizado.

Em modelo de malária murina com *P. berghei*, não houve correlação entre ICC e parasitemia, possivelmente pelo fato de que durante o aumento expressivo da parasitemia, a velocidade de depuração dos ICC é maior (10). Na verdade, com o passar dos dias de infecção, observou-se que os ICC tinham maior quantidade de IgG. Neste modelo, observou-se também que existe uma grande variedade de antígenos parasitários formando os ICC.

Não se deve descartar a hipótese de que os ICC, induzindo a agregação plaquetária, podem contribuir para uma razoável hemostasia primária nos pacientes plaquetopênicos com malária, suficiente para evitar o sangramento clínico. De acordo com a revisão sobre o tema, por Lüscher, em 1970, os ICC, através da molécula de gamaglobulina, podem induzir desgranulação e agregação irreversíveis das plaquetas e contração dos agregados formados (219). Assim, é possível propor um modelo no qual o excesso de ICC induziria maior agregação plaquetária, o que pode contribuir para a formação das lesões vasculares e a adesão de hemácias parasitadas, na malária grave. À medida em que aumenta a parasitemia durante a história natural da doença, também aumenta a quantidade de IgG (ICC), sendo exatamente estas imunoglobulinas as responsáveis pela ativação plaquetária. Acredita-se que os ICC possam também estimular as plaquetas pela deformidade causada na membrana destas partículas.

Os ICC podem também se formar por antígenos e proteínas do sistema do complemento. Não se avaliou a presença de proteínas do complemento nos ICC, em função de não ter este modelo sido observado nos pacientes com PTI e HIV. Entretanto, é possível que este tipo de ICC possa contribuir para a destruição plaquetária, motivo pelo qual outros estudos são ainda necessários. ICC compostos de C3b ou C4b, por exemplo, são depurados através da ligação a receptores C3b/C4b, também conhecidos como CR1 ou CD35. Estes receptores são descritos em fagócitos, podócitos glomerulares, linfócitos, eritrócitos (em primatas) e plaquetas (em não-primatas). O CR1 presente nas hemácias serve como um capturador de

ICC, levando-os ao fígado, onde são depurados pelas células de Kupffer, e ao baço (258). Neste processo, a hemácia não sofre qualquer dano, pois sua afinidade pelos ICC é baixa, e a passagem do ICC de seu receptor CR1 para o receptor CR1 ou FcRII dos monócitos, é realizada simplesmente pela maior afinidade dos receptores CR1 de monócitos pelos ICC (105). Após o contato com as hemácias, os macrófagos podem promover proteólise dos receptores CR1 das hemácias (258). Isto justifica porque não se verificou relação entre anemia e níveis de ICC.

6.9 DETECÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS

6.9.1 Teste *in vitro*

No gráfico de seleção das plaquetas, à citometria de fluxo, nota-se a possível presença de micropartículas plaquetárias no canto inferior esquerdo do gráfico, de cerca de 0,1 a 1,0 μm (Figura 46), o que sugere a ativação das plaquetas coletadas de controle normal, durante seu processo de obtenção e marcação, mesmo utilizando o método de filtração em gel, o que garante maior pureza das plaquetas isoladas, diminuindo a quantidade de hemácias e leucócitos contaminantes. Para confirmar a ativação plaquetária, poderia ter sido realizada a dosagem de P-selectina.

Partindo de um modelo previamente estabelecido de demonstração da patogênese da PTI nos pacientes com infecção pelo HIV-1, empregaram-se métodos semelhantes para a demonstração de possível existência de auto-anticorpos

plaquetários nos pacientes com malária. Essencialmente, trata-se do isolamento de ICC do soro por ligação ao PEG, com conseqüente eluição de IgG (ICC) com a adição de solução ácida. Aparentemente, não houve redução da capacidade de ligação do anticorpo eluído às plaquetas normais, após tratamento ácido, pois o tratamento do ICC do paciente controle com HIV-1 e PTI foi semelhante e isso não impediu a ligação, com índice de ligação plaquetária muito superior aos controles negativos.

Apesar da pequena concentração do anticorpo primário utilizado na incubação com as plaquetas (0,6 µg/mL), o controle positivo reforça que esta concentração seria suficiente para a ligação do anticorpo secundário.

Esta foi uma abordagem diferente daquela tradicionalmente utilizada para o estudo da presença de anticorpos dirigidos contra plaquetas, na malária. A PAIgG que tem sido classicamente detectada na superfície das plaquetas de pacientes com malária se correlaciona de maneira inversa com a contagem de plaquetas (179, 268, 383). O primeiro problema está nos métodos de detecção de PAIgG, sendo a maioria deles muito sensíveis, mas pouco específicos (142). Um segundo problema está ligado à ativação das plaquetas durante o processo de preparação da amostra, quando as mesmas expressam em sua superfície imunoglobulinas armazenadas no interior de seus α -grânulos secretórios.

Plaquetas normais têm 5 fg de IgG por plaqueta, o equivalente a 20.000 moléculas. Isso é cerca de 200 vezes maior do que a quantidade de IgG na superfície das plaquetas, onde habitualmente não se encontra mais do que 100

moléculas de IgG. Esta IgG dos α -grânulos parece ser adquirida pelos megacariócitos, por endocitose, uma vez que refletem a mesma composição de IgG do plasma, em pessoas saudáveis. Em pacientes com PTI auto-imune, detecta-se sempre uma quantidade aumentada de PAIgG. Entretanto, com o uso da citometria de fluxo, método de escolha por permitir trabalhar com pequenas quantidades de plaquetas, a detecção de anticorpos antiplaquetários nem sempre tem sido correlacionada com a intensidade da plaquetopenia (359). Como existe uma compensação medular, com a liberação de plaquetas maiores na circulação periférica, e, portanto, com maior quantidade de α -grânulos, nas doenças com destruição periférica de plaquetas, a PAIgG está, portanto, aumentada (125). Kelton, entretanto, em 1979, demonstrou que não havia correlação entre PAIgG e o tamanho das plaquetas, em pacientes com plaquetopenia imune (180). Outro mecanismo responsável pelo aumento da IgG plaquetária seria uma endocitose seletiva aumentada de IgG plasmática pelos megacariócitos ou pelas próprias plaquetas (158).

A ligação de anticorpos à superfície plaquetária provavelmente acontece por meio dos receptores para o domínio Fc da IgG (Fc γ RII). É importante lembrar que a ligação específica ou não-específica de anticorpos a estes receptores ativa as plaquetas. Assim, parece que a simples eluição de anticorpos da superfície de plaquetas de pacientes com malária e plaquetopenia e sua ligação em plaquetas normais não comprovam a presença de auto-anticorpos e muito menos uma destruição de plaquetas decorrente desta ligação.

Considerando que no modelo de PTI em pacientes com HIV-1, a IgG (ICC) se liga à superfície plaquetária, levando à plaquetopenia, a ausência desta ligação nos pacientes com malária estudados sugere que o mecanismo de destruição plaquetária, na malária, não deve ser semelhante ao mecanismo do HIV-1. Como não se observou mecanismo semelhante, nos casos estudados, é possível que o mecanismo de auto-imunidade contra receptores plaquetários, caso seja observado em outros pacientes, não deve ser uma regra na explicação da plaquetopenia da malária.

Na realidade, este achado laboratorial confirma a observação clínica de que pacientes recuperam sua contagem de plaquetas logo após a negativação da parasitemia. Caso houvesse a presença de auto-anticorpos, considerando a prolongada meia-vida da IgG, podendo chegar a meses ou anos, esperar-se-ia que a plaquetopenia não regredisse antes de alguns meses após a infecção primária. A alternativa para esta refutação é o seqüestro e depuração dos auto-anticorpos, consumidos na formação de ICC, que se depositariam no tecido linfóide, ou seriam depurados pelos fagócitos do organismo. O período de permanência do estímulo imunológico do HIV é, de fato, muito superior ao do plasmódio, mas ainda assim não seria de se esperar uma recuperação tão rápida da contagem de plaquetas no caso da formação de auto-anticorpos do tipo IgG.

A presença de auto-anticorpos anti-GPIIb/IIIa na malária já foi descrita em um paciente com malária falciparum grave (80) e em outro paciente com malária mista (*P.f./P.v.*) (277). Contudo, em nenhum deles se avaliou o mecanismo de

destruição plaquetária, constituindo-se uma mera associação transversal a presença dos auto-anticorpos e a plaquetopenia durante a infecção malárica aguda. Também não há registro de que em algum destes pacientes se buscou a presença de auto-anticorpos em ICC.

A auto-imunidade na malária pode representar mais um mecanismo de adaptação do organismo do que um mecanismo de agressão. Ainda não se pode determinar o papel de auto-anticorpos anti-plaquetários (GPIIb/IIIa, GPIV, GPIb/IX, GPV e GPIa/IIa) descritos em paciente com malária (277), mas a formação de anticorpos contra antígenos da banda 3 de hemácias parasitadas por *P. falciparum*, p. ex., parece conferir proteção contra a citoaderência (154).

Em um dos estudos mais robustos, em que se buscou a presença de auto-anticorpos anti-plaquetários como causa da plaquetopenia da malária, realizado no Departamento de Antioquia (Colômbia), em 2005, ficou demonstrada a significativa maior presença de anticorpos anti-plaquetários em pacientes com malária não-grave e plaquetopenia. Contudo, não se pôde associar a recuperação da contagem de plaquetas à queda dos auto-anticorpos, durante o seguimento clínico dos pacientes, dificultando o estabelecimento de causa e efeito (302).

Conforme ilustrado na figura 8, sobre a participação da fagocitose na patogênese da PTI, é possível que a simples fagocitose aumentada de plaquetas, durante a infecção malárica aguda, possa estimular a formação de anticorpos anti-plaquetários, sem que os mesmos, entretanto, sejam os responsáveis diretos pela destruição destas partículas.

Como não se estudou a ligação de IgG (ICC) às plaquetas normais, em pacientes com malária falciparum, outros estudos devem complementar a observação ora realizada nestes poucos casos de malária vivax.

6.9.2 Teste *in vivo* em modelo experimental

A fim de confirmar a falta de ligação de IgG (ICC) de pacientes com malária e plaquetopenia grave às plaquetas normais, as mesmas IgG foram injetadas no peritônio de camundongos C57BL/6, cujos receptores GPIIIa têm semelhança de mais de 80% com os receptores de humanos. Novamente se observou que após a injeção de IgG (ICC) de paciente com HIV e PTI, houve uma queda de 75% na contagem de plaquetas. Quando se injetou IgG (ICC) de paciente com malária e plaquetopenia grave, praticamente não houve alteração. Nem mesmo a injeção do próprio ICC ou de IgG sérica de paciente com malária teve qualquer repercussão sobre a plaquetimetria. Entretanto, não foram testadas concentrações maiores de IgG, ICC ou IgG (ICC), considerando a possibilidade de uma menor afinidade pelas plaquetas de camundongos.

Pela restrição do número de animais, não foi possível a realização de testes com ICC de pacientes com malária falciparum, mecanismo que não pode, portanto, ser descartado para explicar a plaquetopenia encontrada na infecção por esta espécie.

Também não se deve abandonar a idéia de que haja imunidade cruzada, na malária, contra outro receptor plaquetário, diferente do complexo GPIIb/IIIa. Uma

outra hipótese é a participação da imunidade celular (linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺) como determinante da plaquetopenia, como sugere estudo em modelo animal infectado por *P. berghei* (133).

6.10 TESTE DE FAGOCITOSE DE PLAQUETAS *IN VITRO*

No modelo de fagocitose empregado neste trabalho, optou-se pela utilização de células THP-1 (linhagem de monócitos comercial), pela possibilidade de reprodutibilidade dos experimentos. O isolamento de monócitos de voluntários poderia sofrer a influência das características individuais das células de cada doador.

O uso de células pré-estimuladas com PMA, um potente ativador da diferenciação em macrófagos, deveu-se à maior possibilidade de detecção do fenômeno de estudo, em relação a células não-estimuladas.

Possivelmente, o uso de células fagocíticas dos próprios pacientes com malária, permitiria conclusões adicionais sobre o mecanismo de fagocitose das plaquetas. Também não se pode garantir que os achados da fagocitose por fagócitos da circulação periférica pudessem ser extrapolados para o que acontece com os macrófagos esplênicos, células cujo isolamento se reveste de maior complexidade técnica.

Em 1985, Jaff e cols. relataram um caso de paciente com malária falciparum resistente à cloroquina, procedente do Quênia, evoluindo com plaquetopenia (165).

No esfregaço do sangue periférico, verificou-se que 80% dos monócitos mostravam fagocitose de plaquetas. Os autores sugeriram que a fagocitose de plaquetas poderia ser um importante mecanismo envolvido na plaquetopenia da malária. O aumento da fagocitose de plaquetas por fagócitos esplênicos iria ao encontro da hipótese de que a esplenomegalia poderia propiciar a destruição de plaquetas.

A síndrome hemofagocítica também já foi relatada em infecções tropicais, entre elas a malária, apesar de aparentemente este ser um evento raro (21, 330).

No teste padronizado, a fagocitose de plaquetas por células THP-1 estimuladas com PMA aconteceu de forma satisfatória, entretanto, a hipótese de que os ICC poderiam aumentar a fagocitose de plaquetas na malária não foi confirmada.

O papel imunossupressor dos ICC na malária murina por *P. berghei* é bem conhecido (9). A inibição da fagocitose *in vitro* de hemácias parasitadas e de plasmódios livres, por ICC de animais com malária aguda, já havia sido demonstrada desde a década de 1980 (56, 57, 274). Acredita-se que o mecanismo de inibição da fagocitose aconteça em função da ligação do ICC ao FcR dos macrófagos esplênicos de camundongos infectados por *P. berghei* (323). Os macrófagos, ao ingerirem os ICC, são ativados, e se tornam menos aptos à apresentação de antígenos, comparados com macrófagos em repouso. Um outro mecanismo possível é o seqüestro de anticorpos antiparasitários pelos ICC, diminuindo, portanto, a fagocitose específica.

Há um estudo que sugere que os ICC de animais infectados por *P. berghei* são capazes de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio pelos

fagócitos (209). Não se conhece o papel deste estímulo sobre a destruição de plaquetas, entretanto.

6.11 TESTE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA *IN VITRO*

A relação entre as plaquetas e o parasito da malária tem sido estudada já há algum tempo. Plaquetas normais colocadas em contato com hemácias parasitadas por *P. falciparum* por 30 minutos mostraram maior agregação quando da adição de ADP exógeno, mas não houve agregação espontânea. O mesmo aumento de agregação foi observado quando se adicionou o sobrenadante obtido da solução de hemácias parasitadas (162).

Estudo de lumiagregação realizado em pacientes com malária demonstrou, de maneira semelhante, que a agregação plaquetária induzida por ADP estava aumentada nos pacientes com malária falciparum. A agregação espontânea, em pacientes com malária, entretanto, não foi evidenciada (110).

Em 1991, Osim e cols. mediram a agregação de plaquetas em pacientes com malária, utilizando uma técnica rústica de coleta de sangue em tubos com EDTA/formalina e tubos com EDTA apenas, subtraindo-se a contagem de plaquetas entre um e outro tubo após contagem em câmara de Neubauer. Comparando com pessoas sadias normais, verificou-se que pacientes com malária apresentaram maior agregação plaquetária e esta agregação se correlacionava com a densidade parasitária dos pacientes (272). Não é especificada, entretanto, a espécie de

plasmódio dos pacientes incluídos. Isto, portanto, traduz *in vivo* o que foi evidenciado neste estudo *in vitro*, com o uso de lisado total de formas sangüíneas de *P. vivax* e de *P. falciparum*. Apesar de mais antiga e rústica, esta medição grosseira da agregação plaquetária não depende da contagem de plaquetas dos pacientes. A plaquetopenia observada em grande parte dos pacientes com malária inviabiliza o teste de lumiagregometria plaquetária, onde se requer um número mínimo de plaquetas para a realização do teste. A técnica se vale do efeito de propinquidade, no qual as plaquetas devem ter um contato mínimo entre si para que se agreguem, o que é dificultado quando não há plaquetas suficientes na amostra a ser testada pela lumiagregometria (373). Em pacientes com malária e plaquetopênicos, a tentativa de concentração de plaquetas para a execução do teste, por centrifugação, pode ativar de maneira não-específica, porém, reversível, as plaquetas, alterando, sobremaneira, os resultados, como se demonstrou em análise do método de centrifugação de plaquetas para o preparo dos concentrados de plaquetas, para transfusão (100).

Estudo de agregação plaquetária realizado com pacientes com malária grave e não-grave, na Tailândia, evidenciaram diminuição da agregação plaquetária nos pacientes com malária, após a adição de ADP, o que provavelmente se verificou pela pouca quantidade de plaquetas disponíveis para o teste, obtidas dos pacientes, em sua maioria, plaquetopênicos (338). Não há, portanto, qualquer evidência consistente de que a agregação plaquetária na malária esteja diminuída, mas sim o contrário.

Neste tipo de investigação, é importante ressaltar que o cuidado com o preparo da amostra em temperatura ambiente, por não mais do que seis horas, é decisivo para os resultados. Fatores como gênero, idade, VPM, tempo e temperatura de armazenamento podem interferir nos testes de agregação plaquetária (152).

A hipótese de que o ADP liberado pelas hemácias durante a hemólise causa a hipersensibilidade das plaquetas na malária não pode ser descartada, mas os resultados desta tese mostram que, independentemente do ADP eritrocitário, o parasito, de *per se*, provoca agregação de plaquetas.

O estudo da agregação de plaquetas, *ex vivo*, em pacientes com malária, permitiria o esclarecimento da função plaquetária nos pacientes plaquetopênicos. Poder-se-ia optar por uma nova geração de testes de agregação, tal como a da medida da agregação por citometria de fluxo (298), o que possibilitaria a confirmação do achado *in vivo* de maior agregação plaquetária na presença *in vitro* de lisado de hemácias parasitadas.

Essas concordantes observações *in vitro* e *in vivo* podem justificar não apenas a relativa baixa frequência de sangramentos em pacientes com malária, mas também podem ser mais uma justificativa para o estudo das plaquetas enquanto partículas decisivas na patogênese da malária grave. A maior adesividade das plaquetas, induzida diretamente pelos parasitos, poderia predispor à lesão endotelial e à agregação de hemácias parasitadas, quando se tratar de infecção por *P. falciparum*.

O fato de, no experimento, terem sido utilizadas hemácias parasitadas por *P. falciparum*, cultivadas *in vitro*, e hemácias parasitadas por *P. vivax*, *ex vivo*, provavelmente não interferiu nos resultados, pois os mesmos testes de agregação foram realizados com hemácias não-parasitadas de cultura e hemácias de pessoa sadia. Em ambos os casos, não houve agregação significativa. Nestas duas formas de obtenção das formas sangüíneas, obtém-se tanto esquizontes como trofozoítos, sendo mais complicado o isolamento de cada forma.

Possivelmente o lisado de gametócitos não deve induzir agregação, tal qual aconteceu com os esporozoítos, uma vez que se encontram, rotineiramente, pacientes portadores desta forma, totalmente assintomáticos, e com contagem de plaquetas normal.

A observação de que esporozoítos de *P. vivax* não induzem agregação plaquetária *in vitro*, corrobora a observação clínica de ausência de relação entre a inoculação dos esporozoítos pelos vetores e a diminuição do número ou da função plaquetária. Em estudo experimental realizado em 1964, com nove voluntários infectados por *P. vivax*, quatro por picadas de mosquitos infectados e cinco por inoculação intravenosa de sangue infectado, a plaquetopenia só foi observada no momento em que foi detectada a presença de formas assexuadas no sangue periférico (151). Essa informação só é passível de ser analisada em modelos experimentais como esse, pois, habitualmente, não se podem identificar pacientes recém-expostos às picadas infectantes, a fim de avaliar sua plaquetimetria. Em outro estudo onde se induziu malária vivax, com formas sangüíneas, em pacientes

HIV-positivos (malarioterapia para aumento da contagem de células CD4⁺), detectou-se plaquetopenia em 30% dos 20 pacientes (71).

Na malária de transmissão perinatal, cuja característica essencial é a falta de contato com o esporozoíto, pois a infecção vertical acontece a partir de formas sangüíneas, os neonatos experimentam igual plaquetopenia (111), mais uma vez sugerindo que não é o esporozoíto a forma que desencadeia a referida alteração hematológica.

A quantidade de TRAP presente nos esporozoítos pode não ser suficiente para induzir agregação plaquetária, ou a produção desta proteína pelo esporozoíto pode acontecer próxima do momento da penetração nos hepatócitos. Como foram utilizados esporozoítos retirados das glândulas salivares do mosquito, é possível que a quantidade de TRAP não fosse semelhante àquela observada no interior do hospedeiro intermediário, imediatamente antes da penetração nos hepatócitos.

A variedade genética de haplótipos de proteína TRAP de *P. vivax*, conforme demonstrado em amostras procedentes da Tailândia e do Brasil (294), portanto, não deve justificar as diferentes freqüências de plaquetopenia encontradas na literatura, de acordo com a região geográfica.

Recentemente, entretanto, descobriu-se que os merozoítos possuem uma proteína TRAP homóloga a TRAP do esporozoíto, conhecida com MTRAP. Trata-se de uma proteína micronemal que compartilha características chaves com TRAP, incluindo um domínio repetitivo de TSP. Esta proteína tem-se mostrado importante para o processo de penetração ativa dos merozoítos (32). Considerando que não

houve agregação plaquetária induzida por esporozoítos, é pouco provável que a MTRAP seja a responsável pela agregação induzida pelas formas sangüíneas, entretanto, o conhecimento mais detalhado da MTRAP pode esclarecer esta observação.

É importante ressaltar que outro parasito do filo *Apicomplexa*, *Babesia*, também cursa com plaquetopenia durante a infecção em cães e bovinos. Recentemente, se demonstrou que também o merozoíto de *Babesia bovis* possui proteína homóloga a TRAP, nos micronemas (BbTRAP) (121).

Uma outra especulação é a possibilidade de anticorpos anti-TRAP, que sabidamente têm efeito protetor contra a malária cerebral, de acordo com estudo realizado na África Ocidental (98), exercerem sua proteção por bloqueio cruzado de TSP liberada pelas plaquetas durante a infecção por *P. falciparum*, diminuindo sua capacidade adesiva na microvasculatura. Mais estudos considerando como hipótese a mímica molecular entre TSP plaquetária e TRAP de plasmódios são necessários.

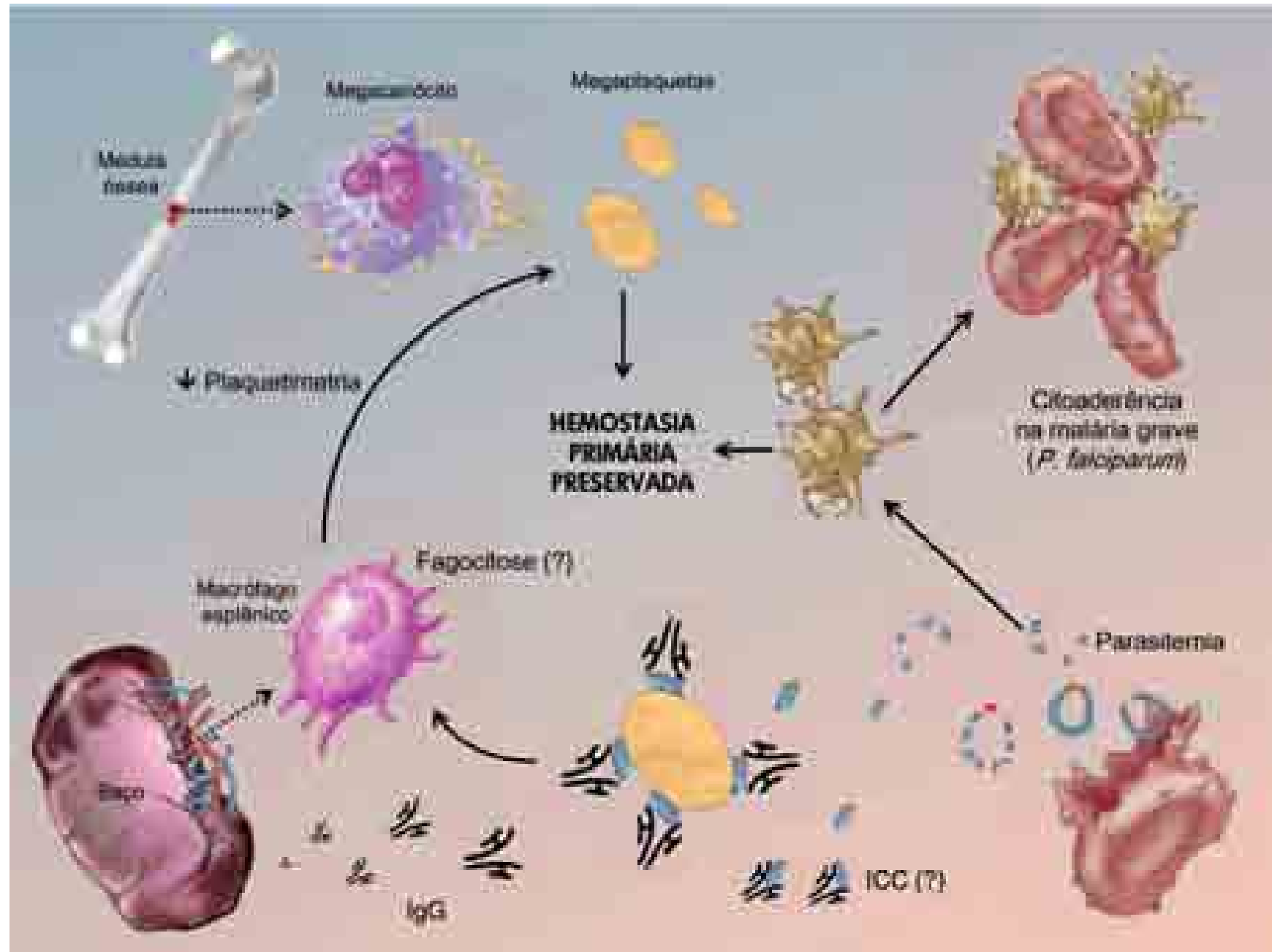
Um aspecto não abordado no estudo foi a caracterização dos sistemas de antígeno plaquetário humano (HPA), geralmente relacionados aos distúrbios plaquetários imunes (64). Há uma distribuição bastante heterogênea destes alelos, na população (65), o que poderia ajudar a explicar também as diferentes freqüências de plaquetopenia na malária, em diferentes áreas endêmicas. Outros polimorfismos, como o do receptor para Fc γ , não devem ser olvidados.

O desenvolvimento de um modelo experimental para a plaquetopenia da malária, semelhante ao modelo da infecção humana, poderia permitir estudos

experimentais de patogênese. Encontra-se em processo de padronização em Cali (Colômbia), um modelo para o estudo da anemia da malária, em primata não-humano (*Aotus lemurinus griseimembra*) (213).

Na figura 53, está esquematizado o provável mecanismo da patogênese da plaquetopenia da malária e de suas manifestações clínicas de pequena intensidade, de acordo com os dados da literatura, somados às evidências obtidas nesta tese.

Figura 53 (página 287): Provável patogênese da plaquetopenia da malária e de suas manifestações clínicas. O aumento de parasitemia é responsável pela liberação de antígenos que podem tanto ser substrato para a formação de imunocomplexos *in situ* na superfície de plaquetas (juntamente com IgG), como podem estimular a agregação plaquetária, como evidenciado *in vitro*. O papel dos imunocomplexos circulantes (ICC) ainda é desconhecido, mas não se associam com a destruição de plaquetas em pacientes com malária. Plaquetas recobertas com imunocomplexos podem ser fagocitadas no baço por macrófagos esplênicos. A diminuição das plaquetas pode sinalizar para a medula óssea a necessidade de reposição de mais partículas, a partir do megacariócitos, que passam a liberar megaplaquetas na circulação periférica. Estas megaplaquetas, por apresentarem maior quantidade de α -grânulos, são mais reativas e, em conjunto com a ativação plaquetária desencadeada por antígenos derivados do plasmódio, contribuem para a preservação da hemostasia primária, na malária, possivelmente justificando a baixa ocorrência de sangramento clínico. A maior agregação de plaquetas pode também ajudar a explicar a citoaderência na malária grave desencadeada por *P. falciparum*. Não parece haver diferença entre esta espécie e o *P. vivax*, em relação à patogênese da plaquetopenia, exceto pelo fato desta última espécie não proporcionar citoaderência.



CONCLUSÕES

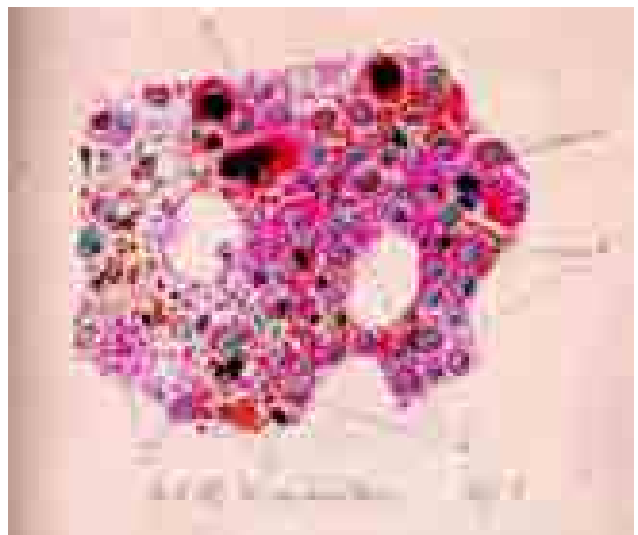
“Dizia Chagas que, na Amazônia onde melhor produz a terra, mais adoece o homem, porque o micro-organismo patogênico também beneficia, nêe aumentando a virulência, facilitando a difusão, multiplicando as espécies – os elementos mesológicos que fazem a uberidade do solo, o vigor da floresta e a abundância da terra. Por isto a vida exuberante está constantemente ameaçada pela morte”.

Djalma Batista. *O paludismo na Amazônia*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; 1946.

1. A plaquetopenia (plaquetimetria $<150.000/\mu\text{L}$) foi um evento freqüente na malária, tendo ocorrido em 70,8% dos pacientes estudados. A plaquetopenia grave (plaquetimetria $<50.000/\mu\text{L}$) ocorreu em 8,9% deles.
2. A plaquetopenia na malária esteve associada, de forma independente, à parasitemia periférica, ao gênero masculino e à primoinfecção.
3. Não houve diferença na freqüência de plaquetopenia ou plaquetopenia grave, entre pacientes com malária vivax e malária falciparum, sugerindo mecanismos semelhantes de destruição plaquetária, pelos dois parasitos.
4. Entre os pacientes com malária, detectou-se algum tipo de sangramento em 8,9%; entre os pacientes com plaquetopenia grave, 26,6% apresentaram sangramentos de pequena intensidade, que estiveram, por sua vez, associados à malária grave. A intensidade leve dos sangramentos pode se dever ao aumento proporcional do tamanho das plaquetas liberadas pelos megacariócitos, na medula óssea, sugerindo um mecanismo de compensação medular. Não parece haver justificativa para a internação sistemática ou a transfusão de concentrado de plaquetas, em pacientes com plaquetopenia grave, a menos que apresentem algum sangramento ou contagem de plaquetas abaixo de $10.000/\mu\text{L}$, o que deve justificar sua hospitalização e o uso de antimaláricos de ação rápida.
5. Não houve diferença entre manifestações clínicas de plaquetopenia dos pacientes com malária vivax e malária falciparum.

6. Não houve correlação entre imunocomplexos circulantes (ICC) e plaquetimetria.
7. Nos casos de malária vivax estudados, as imunoglobulinas da classe IgG extraídas dos ICC não reconheceram antígenos da superfície plaquetária, nem induziram plaquetopenia, *in vivo*, em camundongos C57BL/6, sugerindo que não existe a formação sistemática de auto-anticorpos anti-plaquetários semelhantes ao da infecção pelo HIV. Contudo, o número de casos estudados foi pequeno, não permitindo qualquer conclusão.
8. Os ICC diminuíram a capacidade de fagocitose de plaquetas, por células THP-1. Este mecanismo de imunossupressão deve ser melhor explorado, mas sugere que não tenha relação com a plaquetopenia da malária.
9. As formas sangüíneas assexuadas de *P. vivax* e de *P. falciparum* induziram maior agregação plaquetária *in vitro*, o que não se observou com os esporozoítos de *P. vivax*. Este dado corrobora o achado de correlação entre plaquetimetria e parasitemia periférica, nos pacientes estudados.
10. Analisando-se apenas dois pacientes com malária vivax complicada, não foi possível detectar associação com a presença de polimorfismos das subfamílias dos genes *vir* do *P. vivax*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



“Medulla ossea, fixada pelo sublimado acido e colorida pelo triacido de Ehrlich. (...) e) megacaryocyto ou cellula gigante da medulla ossea”.

Carlos Chagas. *Estudos hematologicos no impaludismo (These inaugural)*. Rio de Janeiro; 1903.

1. Abib Júnior E. Estudo clínico do alho fresco em voluntários sadios: avaliação da agregação plaquetária *in vitro* e *in vivo* e comportamento da pressão arterial através da MAPA *in vivo*. Doutorado [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2004.
2. Aceti A, Taliani G, de Bac C, Sebastiani A. Anti-HCV false positivity in malaria. *Lancet* 1990;336:1442-3.
3. Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:961-8.
4. Aggarwal A, Rath S, Shashiraj. *Plasmodium vivax* malaria presenting with severe thrombocytopenia. *J Trop Pediatr* 2005;51:120-1.
5. Akhavan D, Musgrove P, Abrantes A, d AGR. Cost-effective malaria control in Brazil. Cost-effectiveness of a Malaria Control Program in the Amazon Basin of Brazil, 1988-1996. *Soc Sci Med* 1999;49:1385-99.
6. Akhouri RR, Bhattacharyya A, Pattnaik P, Malhotra P, Sharma A. Structural and functional dissection of the adhesive domains of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein (TRAP). *Biochem J* 2004;379:815-22.
7. Akingbola TS, Shokunbi WA, Olumese PE. Coagulation profile in nigerian children with cerebral malaria. *Niger Postgrad Med J* 2006;13:195-9.
8. Albuquerque Modesto JC, Spencer PJ, Fritzen M, Valença RC, Oliva ML, Silva MB, et al. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 2006;72:377-84.
9. Alder JD, Kreier JP. Effects of immune complexes on immunity to *Plasmodium berghei* infection. *Tropenmed Parasitol* 1984;35:253-9.

10. Alder JD, Kreier JP. Immune complexes in serum of rats during infection with *Plasmodium berghei*. Parasitol Res 1989;76:119-26.
11. Alecrim MGC. Estudo clínico, resistência e polimorfismo parasitário na malária pelo *Plasmodium vivax*, em Manaus (AM). Doutorado [tese]. Brasília: Universidade de Brasília; 2000.
12. Alexandre MAA. Estudo clínico e epidemiológico dos casos graves de malária vivax em pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Brasil. Mestrado [dissertação]. Manaus: Universidade do Estado do Amazonas; 2004.
13. Ali M, Bordia T, Mustafa T. Effect of raw versus boiled aqueous extract of garlic and onion on platelet aggregation. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1999;60:43-7.
14. Ali N, Nadeem A, Anwar M, Tariq WUZ, Chotani RA. Dengue fever in endemic malaria areas. J Coll Physicians Surg Pak 2005;16:340-2.
15. Allison AC, Hendrickse RG, Edington GM, Houba V, De Petris S, Adeniyi A. Immune complexes in the nephrotic syndrome of African children. Lancet 1969;1:1232-8.
16. Almeida AJ. Trombocitopenia associada ao HCV: aspectos clínico-laboratoriais e virológicos. Mestrado [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2003.
17. Almeida Netto JC. Malária por *Plasmodium falciparum* - correlação da densidade parasitária com as repercussões sistêmicas da doença e a resposta à terapêutica. Doutorado [tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 1970.

18. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:641-8.
19. American Veterinary Medical Association. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc* 2001;218:669-96.
20. Anstey NM, Currie BJ, Dyer ME. Profound thrombocytopenia due to *Plasmodium vivax* malaria. *Aust N Z J Med* 1992;22:169-70.
21. Aouba A, Noguera ME, Clauvel JP, Quint L. Haemophagocytic syndrome associated with *Plasmodium vivax* infection. *Br J Haematol* 2000;108:832-3.
22. Araújo CF, Costa CM, Lacerda MVG, Lima ES. Avaliação do estresse oxidativo das plaquetas e a parasitemia em pacientes com malária. *Anais do XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Campos do Jordão; Rev Soc Bras Med Trop* 2007;40(Sup.I):no prelo.
23. Araújo Filho JA, Bressan FR, Tourinho TM, Souza MVL, Pereira LI. Plaquetopenia acentuada associada à malária pelo *P. vivax*. *Anais do XIII Congresso Brasileiro de Infectologia; Goiânia; Braz J Infect Dis* 2003;7(Sup.1):25.
24. Arboleda M, Campuzano M, Restrepo BN, Cartagena G. The clinical behavior of dengue in patients hospitalized in the Antonio Roldan Betancur Hospital of Apartado, Antioquia, 2000. *Biomedica* 2006;26:286-94.
25. Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol* 2003;133:145-52.

26. Associação Médica Mundial. Declaração de Helsinki. 1964-1996 [acesso em 20 de janeiro de 2007]; Disponível em:
<http://acessibilidade.mct.gov.br/index.php/content/view/7863.html>
27. Babu E, Basu D. Platelet large cell ratio in the differential diagnosis of abnormal platelet counts. *Indian J Pathol Microbiol* 2004;47:202-5.
28. Bain BJ. Bone marrow aspiration. *J Clin Pathol* 2001;54:657-63.
29. Barcus MJ, Hien TT, White NJ, Laras K, Farrar J, Schwartz IK, et al. Short report: hepatitis b infection and severe *Plasmodium falciparum* malaria in Vietnamese adults. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:140-2.
30. Bashawri LA, Mandil AA, Bahnassy AA, Ahmed MA. Malaria: hematological aspects. *Ann Saudi Med* 2002;22:372-6.
31. Batista D. O paludismo na Amazônia: contribuição à epidemiologia, à protozoologia e à clínica; estudo sobre a febre biliosa-hemoglobinúrica; síntese. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; 1946.
32. Baum J, Richard D, Healer J, Rug M, Krnjanski Z, Gilberger TW, et al. A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *J Biol Chem* 2006;281:5197-208.
33. Beale PJ, Cormack JD, Oldrey TB. Thrombocytopenia in malaria with immunoglobulin (IgM) changes. *BMJ* 1972;1:345-9.
34. Beardsley DS. ITP in the 21st Century. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2006;402-7.

-
35. Becchi C, Al Malyan M, Fabbri LP, Marsili M, Boddi V, Boncinelli S. Mean platelet volume trend in sepsis: is it a useful parameter? *Minerva Anestesiol* 2006;72:749-56.
36. Bizzozero G. Sul midollo delle ossa. Nápoles: Tipografia Italiana; 1869.
37. Bizzozero G. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e della sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. *L'Osservatore* 1881;17:785-7.
38. Bizzozero G. Über einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Virchows Archs Pathol Anat Physiol* 1882;90:261-332.
39. Blajchman MA. Substitutes and alternatives to platelet transfusions in thrombocytopenic patients. *J Thromb Haemost* 2003;1:1637-41.
40. Blajchman MA, Vamvakas EC. The continuing risk of transfusion-transmitted infections. *N Engl J Med* 2006;355:1303-5.
41. Bowles KM, Cooke LJ, Richards EM, Baglin TP. Platelet size has diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia. *Clin Lab Haematol* 2005;27:370-3.
42. Braga EM, Barros RM, Reis TA, Fontes CJ, Morais CG, Martins MS, et al. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:461-6.
43. Braga WS, Silva EB, Souza RA, Tosta CE. Seroprevalence of hepatitis B and malaria infection in Labrea, Brazilian western Amazon: estimates of coinfection rates. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38:218-23.

44. Braga WS, Souza RA, Silva EB, Fonseca JC, Tosta CE. Coinfection between hepatitis B virus and malaria: clinical, serologic and immunologic aspects. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39:27-31.
45. Braga WSM. Aspectos epidemiológicos, clínicos e sorológicos da associação entre as infecções humanas pelo plasmódio e pelo vírus da hepatite B em populações de áreas endêmicas de ambas enfermidades na Amazônia Brasileira. Doutorado [tese]. Brasília: Universidade de Brasília; 2003.
46. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de terapêutica da malária. 2001 [acesso em 26 de dezembro de 2006]; Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu_terapeutica_malaria.pdf
47. Brasil. Ministério da Saúde. Hepatites virais: o Brasil está atento. 2005 [acesso em 10 de outubro de 2006]; Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/hepatites_virais_brasil_atento.pdf
48. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. 2005 [acesso em 26 de dezembro de 2006]; Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_diag_malaria.pdf
49. Brasil. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, ano de 2005. 2005 [acesso em 26 de janeiro de 2007]; Disponível em:
http://portalweb05.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2006_web.pdf
50. Brasil. Ministério da Saúde. Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. 2006 [acesso em 12 de dezembro de 2006]; Disponível em:
<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISD94061BAPTBRIE.htm>
51. Brasil. Ministério da Saúde. IBGE. 2007 [acesso em 2 de fevereiro de 2007]; Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>

-
52. Breddin HK. Can platelet aggregometry be standardized? *Platelets* 2005;16:151-8.
53. Briggs WH, Xiao H, Parkin KL, Shen C, Goldman IL. Differential inhibition of human platelet aggregation by selected *Allium* thiosulfinates. *J Agric Food Chem* 2000;48:5731-5.
54. Brinker AD, Beitz J. Spontaneous reports of thrombocytopenia in association with quinine: clinical attributes and timing related to regulatory action. *Am J Hematol* 2002;70:313-7.
55. Brito JDU. Características clínico-laboratoriais da associação entre malária humana e a infecção pelo vírus da hepatite B. Mestrado [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 1995.
56. Brown KM, Kreier JP. *Plasmodium berghei* malaria: blockage by immune complexes of macrophage receptors for opsonized plasmodia. *Infect Immun* 1982;37:1227-33.
57. Brown KM, Kreier JP. Effect of macrophage activation on phagocyte-*Plasmodium* interaction. *Infect Immun* 1986;51:744-9.
58. Bull PC, Berriman M, Kyes S, Quail MA, Hall N, Kortok MM, et al. *Plasmodium falciparum* variant surface antigen expression patterns during malaria. *PLoS Pathog* 2005;1:e26.
59. Bussel JB, Kunicki TJ, Michelson AD. Platelets: new understanding of platelet glycoproteins and their role in disease. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2000;222-40.

60. Carbonara S, Fiorentino G, Serio G, Maggi P, Ingravallo G, Monno L, et al. Response of severe HIV-associated thrombocytopenia to highly active antiretroviral therapy including protease inhibitors. *J Infect* 2001;42:251-6.
61. Cardoso CVP. Leis Referentes à Experimentação Animal no Brasil - Situação Atual. 2004 [acesso em 18 de fevereiro de 2005]; Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>
62. Carlton J. The *Plasmodium vivax* genome sequencing project. *Trends Parasitol* 2003;19:227-31.
63. Casals-Pascual C, Kai O, Newton CR, Peshu N, Roberts DJ. Thrombocytopenia in falciparum malaria is associated with high concentrations of IL-10. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:434-6.
64. Castro V, Oliveira GB, Origa AF, Annichino-Bizzacchi JM, Arruda VR. The human platelet alloantigen 5 polymorphism as a risk for the development of acute idiopathic thrombocytopenia purpura. *Thromb Haemost* 2000;84:360-1.
65. Castro V, Origa AF, Annichino-Bizzacchi JM, Soares M, Menezes RC, Goncalves MS, et al. Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1-5 in three distinct ethnic groups in Brazil. *Eur J Immunogenet* 1999;26:355-60.
66. Chagas C. Estudos hematologicos no impaludismo. *Medicina* [tese inaugural]. Rio de Janeiro: Instituto de Manguinhos; 1903.
67. Chang HS, Yamato O, Sakai Y, Yamasaki M, Maede Y. Acceleration of superoxide generation in polymorphonuclear leukocytes and inhibition of platelet aggregation by alk(en)yl thiosulfates derived from onion and garlic in dogs and humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;70:77-83.

-
68. Charrel RN, Brouqui P, Foucault C, Lamballerie X. Concurrent dengue and malaria. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1153-4.
69. Charrel RN, Lamballerie X. Low specificity of an immunochromatographic serological assay for diagnosis of dengue fever in travelers returning with malaria. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1400.
70. Chen CJ. Time-dependent events in natural history of occult hepatitis B virus infection: the importance of population-based long-term follow-up study with repeated measurements. *J Hepatol* 2005;42:438-40.
71. Chen X, Xiao B, Xu H, Shi W, Gao K, Rao J. Procedure and clinical assessments of malariotherapy: recent experience in 20 HIV patients. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:1016-21.
72. Chotivanich K, Sritabal J, Udomsangpetch R, Newton P, Stepniewska KA, Ruangveerayuth R, et al. Platelet-induced autoagglutination of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells and disease severity in Thailand. *J Infect Dis* 2004;189:1052-5.
73. Chulay JD, Ockenhouse CF. Host receptors for malaria-infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43:6-14.
74. Clark IA, Schofield L. Pathogenesis of malaria. *Parasitol Today* 2000;16:451-4.
75. Clemetson KJ. Platelet receptors. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. Califórnia: Elsevier Academic Press; 2002, 65-84.
76. Cole-Tobian JL, Biasor M, King CL. High complexity of *Plasmodium vivax* infections in Papua New Guinean children. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:626-33.

77. Coller BS. A brief history of ideas about platelets in health and disease. In: Michelson AD, editor. Platelets. Califórnia: Elsevier Academic Press; 2002, xxiii-xlii.
78. Coller BS, Schneiderman PI. Clinical evaluation of hemorrhagic disorders: the bleeding history and differential diagnosis of purpura. In: Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al., editores. Hematology: basic principles and practice. 4ª ed. Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone; 2005, 1975-2000.
79. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 196/96. 1996 [acesso em 20 de janeiro de 2007]; Disponível em: <http://www.unb.br/fs/clm/labcor/etic196.htm>
80. Conte R, Tassi C, Belletti D, Ricci F, Tazzari PL. Autoimmune thrombocytopenia in malaria. Vox Sang 2003;85:221.
81. Cooke BM, Berendt AR, Craig AG, MacGregor J, Newbold CI, Nash GB. Rolling and stationary cytoadhesion of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*. separate roles for ICAM-1, CD36 and thrombospondin. Br J Haematol 1994;87:162-70.
82. Cooke BM, Nash GB. *Plasmodium falciparum*: characterization of adhesion of flowing parasitized red blood cells to platelets. Exp Parasitol 1995;80:116-23.
83. Coppi A, Cabinian M, Mirelman D, Sinnis P. Antimalarial activity of allicin, a biologically active compound from garlic cloves. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:1731-7.
84. Cronkite EP, Jacobs GJ, Brecher G. The hemorrhagic phase of the acute radiation syndrome due to exposure of the whole body to penetrating ionizing radiation. Am J Roentgen Rad Ther Nucl Med 1952;67:796-803.

-
85. Cummins D, Faint R, Yardumian DA, Dawling S, Mackie I, Machin SJ. The *in vitro* and *ex vivo* effects of chloroquine sulphate on platelet function: implications for malaria prophylaxis in patients with impaired haemostasis. *J Trop Med Hyg* 1990;93:112-5.
86. D'Acremont V, Landry P, Mueller I, Pecoud A, Genton B. Clinical and laboratory predictors of imported malaria in an outpatient setting: an aid to medical decision making in returning travelers with fever. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:481-6.
87. Daniel-Ribeiro CT. Is there a role for autoimmunity in immune protection against malaria? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95:199-207.
88. Daniel-Ribeiro CT, Zanini G. Autoimmunity and malaria: what are they doing together? *Acta Trop* 2000;76:205-21.
89. Davidson RA. Immunology of parasitic infections. *Med Clin North Am* 1985;69:751-8.
90. de Gaetano G. A new blood corpuscle: an impossible interview with Giulio Bizzozero. *Thromb Haemost* 2001;86:973-9.
91. de Paula LV, Klafke A, Bordin R, Pereira JPM, Job FM. Avaliação da eficácia da transfusão de concentrado de plaquetas nos serviços de hematologia e hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Bol Soc Bras Hematol Hemater* 1993;XV:9-13.
92. del Portillo HA, Fernandez-Becerra C, Bowman S, Oliver K, Preuss M, Sanchez CP, et al. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature* 2001;410:839-42.

93. del Portillo HA, Lanzer M, Rodriguez-Malaga S, Zavala F, Fernandez-Becerra C. Variant genes and the spleen in *Plasmodium vivax* malaria. Int J Parasitol 2004;34:1547-54.
94. Dennis LH, Eichelberger JW, Inman MM, Conrad ME. Depletion of coagulation factors in drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Blood 1967;29:713-21.
95. Deresinski S. Concurrent *Plasmodium vivax* malaria and dengue. Emerg Infect Dis 2006;12:1802.
96. Diaz-Quijano FA, Villar-Centeno LA, Martinez-Vega RA. Complications associated to severe thrombocytopenia in patients with dengue. Rev Med Chil 2006;134:167-73.
97. Doi T, Homma H, Mezawa S, Kato J, Kogawa K, Sakamaki S, et al. Mechanisms for increment of platelet associated IgG and platelet surface IgG and their implications in immune thrombocytopenia associated with chronic viral liver disease. Hepatol Res 2002;24:23.
98. Dolo A, Modiano D, Doumbo O, Bosman A, Sidibe T, Keita MM, et al. Thrombospondin related adhesive protein (TRAP), a potential malaria vaccine candidate. Parasitologia 1999;41:425-8.
99. Duke WW. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. Description of a method for determining the bleeding time and the coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by transfusion. JAMA 1910;55:1185-92.
100. Dzik WH. The preparation of platelet concentrates by the light-spin/hard-spin technique. Transfus Sci 1991;12:171-81.
101. Dzikowski R, Templeton TJ, Deitsch K. Variant antigen gene expression in malaria. Cell Microbiol 2006;8:1371-81.

-
102. Echeverri M, Tobon A, Alvarez G, Carmona J, Blair S. Clinical and laboratory findings of *Plasmodium vivax* malaria in Colombia, 2001. Rev Inst Med Trop São Paulo 2003;45:29-34.
103. Elawad M, Jobran J, Duya A. Immunoglobulin therapy for severe thrombocytopenia complicating falciparum malaria. Trop Med Int Health 1999;4:812-3.
104. Elzey BD, Sprague DL, Ratliff TL. The emerging role of platelets in adaptive immunity. Cell Immunol 2005;238:1-9.
105. Emlen W, Carl V, Burdick G. Mechanism of transfer of immune complexes from red blood cell CR1 to monocytes. Clin Exp Immunol 1992;89:8-17.
106. Engwerda CR, Beattie L, Amante FH. The importance of the spleen in malaria. Trends Parasitol 2005;21:75-80.
107. Erel O, Kocyigit A, Bulut V, Avci S, Aktepe N. Role of lipids, lipoproteins and lipid peroxidation in thrombocytopenia in patients with vivax malaria. Haematologia (Budap) 1998;29:207-12.
108. Erel O, Vural H, Aksoy N, Aslan G, Ulukanligil M. Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with vivax malaria. Clin Biochem 2001;34:341-4.
109. Erhart LM, Yingyuen K, Chuanak N, Buathong N, Laoboonchai A, Miller RS, et al. Hematologic and clinical indices of malaria in a semi-immune population of Western Thailand. Am J Trop Med Hyg 2004;70:8-14.
110. Essien EM, Ebhota MI. Platelet hypersensitivity in acute malaria (*Plasmodium falciparum*) infection in man. Thromb Haemost 1981;46:547-9.

111. Evangelista NMA, Aragão DS, Magela Tavares A, Magalhães L, Alexandre MA, Alecrim MGC, et al. Malária neonatal por *Plasmodium vivax* na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Anais do XXXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Foz do Iguaçu; Rev Soc Bras Med Trop 2002;35(Sup.I):344.
112. Fabry U, Lammert F, Osieka R. Thrombocytopenia or giant platelets? Lancet 2003;361:735.
113. Fajardo LF, Tallent C. Malarial parasites within human platelets. J Am Med Assoc 1974;229:1205-7.
114. Fernandes M. Interação entre plaquetas de camundongos e *Trypanosoma cruzi*. Mestrado [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1995.
115. Fernandez N, Jancar S, Sanchez Crespo M. Blood and endothelium in immune complex-mediated tissue injury. Trends Pharmacol Sci 2004;25:512-7.
116. Fidler E, Jaques LB. The effect of commercial heparin on the platelet count. J Lab Clin Med 1948;33:1410-3.
117. Figueiredo RMP, Thatcher BD, Lima ML, Almeida TC, Alecrim WD, Guerra MVF. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. Rev Soc Bras Med Trop 2004;37:476-9.
118. Fonseca JCF, Brasil LM. Infecção pelo vírus da hepatite C na Região Amazônica Brasileira. Rev Soc Bras Med Trop 2004;37(Sup.II):1-8.
119. Fonseca MO, Pang L, Ávila SL, Arruk VG, Tozetto-Mendoza TR, Ferreira AW, et al. Cross-reactivity of anti-*Plasmodium falciparum* antibodies and HIV tests. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000;94:171-2.

-
120. Gaetano G. Historical overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. *Haematologica* 2001;86:349-56.
121. Gaffar FR, Yatsuda AP, Franssen FF, Vries E. A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in *Plasmodium* sporozoites. *Mol Biochem Parasitol* 2004;136:25-34.
122. Garcia-Gómez LJ, Sánchez-Muniz FJ. Revisión: Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *Arch Lat Am Nutr* 2000;50:219-29.
123. Garcia JE, Puentes A, Patarroyo ME. Developmental biology of sporozoite-host interactions in *Plasmodium falciparum* malaria: implications for vaccine design. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:686-707.
124. Gaur D, Mayer DC, Miller LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol* 2004;34:1413-29.
125. George JN. Platelet immunoglobulin G: its significance for the evaluation of thrombocytopenia and for understanding the origin of alpha-granule proteins. *Blood* 1990;76:859-70.
126. George JN, Rizvi MA. Thrombocytopenia. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editores. *Williams Hematology*. New York: McGraw-Hill; 2000, 1495-540.
127. George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996;88:3-40.

128. Gerardin P, Rogier C, Ka AS, Jouvencel P, Brousse V, Imbert P. Prognostic value of thrombocytopenia in African children with falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:686-91.
129. Giannini EG. Review article: thrombocytopenia in chronic liver disease and pharmacologic treatment options. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1055-65.
130. Girolami A, Luzzatto G, Varvarikis C, Pellati D, Sartori R, Girolami B. Main clinical manifestations of a bleeding diathesis: an often disregarded aspect of medical and surgical history taking. *Haemophilia* 2005;11:193-202.
131. Gonçalves MJF, Alecrim WD. Non-planned urbanization as a contributing factor for malaria incidence in Manaus-Amazonas, Brazil. *Rev Salud Publica (Bogota)* 2004;6:156-66.
132. Gonzalez LM, Guzman M, Carmona J, Lopera T, Blair S. Clinical and epidemiologic characteristics of 291 hospitalized patients for malaria in Medellin (Colombia). *Acta Méd Colomb* 2000;25:163-70.
133. Gramaglia I, Sahlin H, Nolan JP, Frangos JA, Intaglietta M, van der Heyde HC. Cell rather than antibody-mediated immunity leads to the development of profound thrombocytopenia during experimental *Plasmodium berghei* malaria. *J Immunol* 2005;175:7699-707.
134. Grau GE, Mackenzie CD, Carr RA, Redard M, Pizzolato G, Allasia C, et al. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J Infect Dis* 2003;187:461-6.
135. Grau GE, Piguet PF, Gretener D, Vesin C, Lambert PH. Immunopathology of thrombocytopenia in experimental malaria. *Immunology* 1988;65:501-6.

-
136. Graves P, Gelband H. Vaccines for preventing malaria (pre-erythrocytic). *Cochrane Database Syst Rev* 2006;CD006198.
137. Greaves M. Assessment of haemostasis. *Vox Sang* 2004;87(Sup.1):47-50.
138. Greenwood BM. Autoimmune disease and parasitic infections in Nigerians. *Lancet* 1968;2:380-2.
139. Grobusch MP, Kremsner PG. Uncomplicated malaria. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;295:83-104.
140. Guerra CA, Snow RW, Hay SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol* 2006;22:353-8.
141. Hackett LW. Spleen measurement in malaria. *J Nat Mal Soc* 1944;3:11-3.
142. Hagenstrom H, Schlenke P, Hennig H, Kirchner H, Kluter H. Quantification of platelet-associated IgG for differential diagnosis of patients with thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2000;84:779-83.
143. Halstead SB. Dengue. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:471-6.
144. Harrington WJ, Sprague CC, Minnich V. Immunologic mechanisms in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 1953;38:433.
145. Hartwig J, Italiano J, Jr. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 2003;1:1580-6.
146. Hartwig JH. Platelet structure. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. Califórnia: Elsevier Academic Press; 2002, 37-52.

147. Hato T, Ginsberg MH, Shattil SJ. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. In: Michelson AD, editor. Platelets. Califórnia: Elsevier Academic Press; 2002, 105-16.
148. Hemmer CJ, Holst FG, Kern P, Chiwakata CB, Dietrich M, Reisinger EC. Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or *ovale* than in *Plasmodium falciparum* malaria. Trop Med Int Health 2006;11:817-23.
149. Hendrickse RG, Adeniyi A. Quartan malarial nephrotic syndrome in children. Kidney Int 1979;16:64-74.
150. Hernandez-Valladares M, Naessens J, Iraqi FA. Genetic resistance to malaria in mouse models. Trends Parasitol 2005;21:352-5.
151. Hill GJ, Knight V, Jeffery GM. Thrombocytopenia in vivax malaria. Lancet 1964;39:240-1.
152. Ho CH, Chan IH. The influence of time of storage, temperature of storage, platelet number in platelet-rich plasma, packed cell, mean platelet volume, hemoglobin concentration, age, and sex on platelet aggregation test. Ann Hematol 1995;71:129-33.
153. Hoffman SL, Rustama D, Punjabi NH, Surampaet B, Sanjaya B, Dimpudus AJ, et al. High-dose dexamethasone in quinine-treated patients with cerebral malaria: a double-blind, placebo-controlled trial. J Infect Dis 1988;158:325-31.
154. Hogh B, Petersen E, Crandall I, Gottschau A, Sherman IW. Immune responses to band 3 neoantigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in subjects living in an area of intense malaria transmission are associated with low parasite density and high hematocrit value. Infect Immun 1994;62:4362-6.
155. Holland BH, Walker AN, Collier L, Stephens JL. Severe thrombocytopenia and epistaxis secondary to *Plasmodium vivax* infection. Internet J Infect Dis 2004;3.

-
156. Horstmann RD, Dietrich M, Bienzle U, Rasche H. Malaria-induced thrombocytopenia. *Blut* 1981;42:157-64.
157. Huang DB, DuPont HL. Problem pathogens: extra-intestinal complications of *Salmonella enterica* serotype Typhi infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5:341-8.
158. Hughes M, Hayward CP, Horsewood P, Warkentin TE, Kelton JG. Measurement of endogenous and exogenous alpha-granular platelet proteins in patients with immune and nonimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1999;106:762-70.
159. Hurtado S, Salas ML, Romero JF, Zapata JC, Ortiz H, Arevalo-Herrera M, et al. Regular production of infective sporozoites of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in laboratory-bred *Anopheles albimanus*. *Ann Trop Med Parasitol* 1997;91:49-60.
160. Hymes K, Nardi M, Leaf A, Karpatkin S. Role of leuCAM integrins and complement in platelet-monocyte rosette formation induced by immune complexes of human immunodeficiency virus- type 1-immune thrombocytopenic purpura patients. *Blood* 1993;81:2375-80.
161. Imbert P, Rogier C, Gerardin P. Letter to the editor. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68:380-1.
162. Inyang AL, Sodeinde O, Okpako DT, Essien EM. Platelet reactions after interaction with cultured *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Br J Haematol* 1987;66:375-8.
163. Italiano Jr JE, Hartwig JH. Megakaryocyte development and platelet formation. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. Califórnia: Elsevier Academic Press; 2002, 21-36.
164. Jadhav UM, Patkar VS, Kadam NN. Thrombocytopenia in malaria - correlation with type and severity of malaria. *J Assoc Physicians India* 2004;52:615-8.

165. Jaff MS, McKenna D, McCann SR. Platelet phagocytosis: a probable mechanism of thrombocytopenia in *Plasmodium falciparum* infection. J Clin Pathol 1985;38:1318-9.
166. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. J Infect Dis 2004;189:1411-8.
167. Jhaveri KN, Ghosh K, Mohanty D, Parmar BD, Surati RR, Camoens HM, et al. Autoantibodies, immunoglobulins, complement and circulating immune complexes in acute malaria. Natl Med J India 1997;10:5-7.
168. June CH, Contreras CE, Perrin LH, Lambert PH, Miescher PA. Circulating and tissue-bound immune complex formation in murine malaria. J Immunol 1979;122:2154-61.
169. Kaito K, Otsubo H, Usui N, Yoshida M, Tanno J, Kurihara E, et al. Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. Br J Haematol 2005;128:698-702.
170. Kakar A, Bhoi S, Prakash V, Kakar S. Profound thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria. Diagn Microbiol Infect Dis 1999;35:243-4.
171. Kakoma I, James MA, Whiteley HE, Montelegrè F, Buese M, Fafjar-Whestone CJ, et al. Platelet kinetics and other hematological profiles in experimental *Plasmodium falciparum* infection: a comparative study between Saimiri and Aotus monkeys. Kisaengchunghak Chapchi 1992;30:177-82.
172. Karanikas G, Zedwitz-Liebenstein K, Eidherr H, Schuetz M, Sauerman R, Dudczak R, et al. Platelet kinetics and scintigraphic imaging in thrombocytopenic malaria patients. Thromb Haemost 2004;91:553-7.

-
173. Karparkin S. HIV-1 related thrombocytopenia. In: Michelson AD, editor. Platelets. Califórnia: Elsevier Academic Press; 2002, 559-70.
174. Karparkin S, Nardi MA, Hymes KB. Sequestration of anti-platelet GPIIIa antibody in rheumatoid factor immune complexes of human immunodeficiency virus 1 thrombocytopenic patients. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:2263-7.
175. Karunaweera ND, Wijesekera SK, Wanasekera D, Mendis KN, Carter R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. Trends Parasitol 2003;19:188-93.
176. Katira B, Shah I. Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* infected children. J Vector Borne Dis 2006;43:147-9.
177. Kaur D, Wasir V, Gulati S, Bagga A. Unusual presentation of *Plasmodium vivax* malaria with severe thrombocytopenia and acute renal failure. J Trop Pediatr 2007.
178. Kelton JG. Heparin-induced thrombocytopenia: an overview. Blood Rev 2002;16:77-80.
179. Kelton JG, Keystone J, Moore J, Denomme G, Tozman E, Glynn M, et al. Immune-mediated thrombocytopenia of malaria. J Clin Invest 1983;71:832-6.
180. Kelton JG, Neame PB, Bishop J, Ali M, Gauldie J, Hirsh J. The direct assay for platelet-associated IgG (PAIgG): lack of association between antibody level and platelet size. Blood 1979;53:73-80.
181. Kiladjian JJ. Diagnosis and treatment of primary thrombocythemia. Rev Prat 2005;55:1671-9.

182. Kirchgatter K, del Portillo HA. Association of severe noncerebral *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil with expressed PfEMP1 DBL1 alpha sequences lacking cysteine residues. *Mol Med* 2002;8:16-23.
183. Kirchgatter K, del Portillo HA. Clinical and molecular aspects of severe malaria. *An Acad Bras Cienc* 2005;77:455-75.
184. Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22:913-22.
185. Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerg Infect Dis* 2005;11:132-4.
186. Koh KH, Chew PH, Kiyu A. A retrospective study of malaria infections in an intensive care unit of a general hospital in Malaysia. *Singapore Med J* 2004;45:28-36.
187. Komoda M, Fujimoto T, Kawaguchi Y, Tsushima H, Fukushima T, Hata T, et al. *Plasmodium vivax* malaria with clinical presentation mimicking acute type idiopathic thrombocytopenic purpura (abstract). *Rinsho Ketsueki* 2006;47:1453-6.
188. Kortepeter M, Brown JD. A review of 79 patients with malaria seen at a military hospital in Hawaii from 1979 to 1995. *Mil Med* 1998;163:84-9.
189. Kouri YH, Basch RS, Karpatkin S. B-cell subsets and platelet counts in HIV-1 seropositive subjects. *Lancet* 1992;339:1445-6.
190. Kreil A, Wenisch C, Brittenham G, Looareesuwan S, Peck-Radosavljevic M. Thrombopoietin in *Plasmodium falciparum* malaria. *Br J Haematol* 2000;109:534-6.
191. Kumar A, Shashirekha. Thrombocytopenia-an indicator of acute vivax malaria. *Indian J Pathol Microbiol* 2006;49:505-8.

192. Lacerda MV, Alexandre MA, Santos PD, Arcanjo AR, Alecrim WD, Alecrim MGC. Idiopathic thrombocytopenic purpura due to vivax malaria in the Brazilian Amazon. *Acta Trop* 2004;90:187-90.
193. Lacerda MVG, Alecrim MGC, Alecrim WD. Malária. In: Marinho LAC, Tavares W, editores. Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2007, no prelo.
194. Lacerda MVG, Arcanjo ARL, Farias AF, Alecrim WD, Alecrim MGC. O papel das citocinas nas alterações hematológicas da malária por *P. vivax* e *P. falciparum*. Anais da 8ª Reunião Nacional de Pesquisa em Malária; Porto Velho 2002:33.
195. Lacerda MVG, Cavalcante TB, Silva AC, Macêdo VO. Avaliação das indicações de transfusão de concentrado de plaquetas. Anais do XLII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Teresina; Rev Soc Bras Med Trop 2006;39(Sup.I):104.
196. Lacerda MVG, Magela Tavares A, Mourão MPG. Manual de Rotinas da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. 2003 [acesso em 03 de janeiro de 2007]; Disponível em: <http://www.fmt.am.gov.br/manual/index.htm>
197. Lacerda MVG, Manso MRS, Ferreira LCL, Silva FM, Santos PJT, Alecrim WD, et al. Paciente com malária vivax e edema agudo de pulmão, na Amazônia Brasileira - relato de caso e revisão da literatura. Anais do XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Belém do Pará; Rev Soc Bras Med Trop 2003;36(Sup.I):281.
198. Lacerda MVG, Mourão MPG, Alecrim WD, Alecrim MGC. Clinical study of patients with falciparum malaria admitted to the Tropical Medicine Foundation of Amazonas - Brazil. *Annals of the 50th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*; Atlanta (USA); *Am J Trop Med Hyg* 2001;65(3):336.

199. Lacerda MVG, Oliveira SL, Alecrim MGC. Splenic hematoma in a patient with *Plasmodium vivax* malaria. Rev Soc Bras Med Trop 2007;no prelo.
200. Ladhani S, Lowe B, Cole AO, Kowuondo K, Newton CR. Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome. Br J Haematol 2002;119:839-47.
201. Lage OR. Prevalência e fatores de risco de plaquetopenia no paciente HIV+ atendido no serviço público. Mestrado profissionalizante [monografia]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2003.
202. Lakhkar BB, Babu S, Shenoy V. DIC in vivax malaria. Indian Pediatr 1996;33:971-2.
203. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (Hemorrhagic thrombocytic dystrophy). Orphanet J Rare Dis 2006;1:46.
204. Lathia TB, Joshi R. Can hematological parameters discriminate malaria from nonmalarious acute febrile illness in the tropics? Indian J Med Sci 2004;58:239-44.
205. Lee RI, White PD. A clinical study of the coagulation time of blood. Am J Med Sci 1913;145:495.
206. Lee SH, Looareesuwan S, Chan J, Wilairatana P, Vanijanonta S, Chong SM, et al. Plasma macrophage colony-stimulating factor and P-selectin levels in malaria-associated thrombocytopenia. Thromb Haemost 1997;77:289-93.
207. Levin J. The evolution of mammalian platelets. In: Michelson AD, editor. Platelets. Califórnia: Elsevier Academic Press; 2002, 3-20.
208. Leytin V, Freedman J. Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. Transfus Apher Sci 2003;28:285-95.

209. Li M, Li YJ. Effect of murine malarial circulating immune complexes on the production of reactive oxygen species by peritoneal exudate cells of normal mice (abstract). *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 1989;7:85-8.
210. Li PS, Ying M, Chan KH, Chan PW, Chu KL. The reproducibility and short-term and long-term repeatability of sonographic measurement of splenic length. *Ultrasound Med Biol* 2004;30:861-6.
211. Li Z, Nardi MA, Karpatkin S. Role of molecular mimicry to HIV-1 peptides in HIV-1-related immunologic thrombocytopenia. *Blood* 2005;106:572-6.
212. Lind SE. The bleeding time. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. Califórnia: Elsevier Academic Press; 2002, 283-90.
213. Llanos C, Quintero G, Castellanos A, Arévalo-Herrera M, Herrera S. Surgical bone marrow aspiration in *Aotus lemurinus griseimembra*. *J Med Primatol* 2006;35:131-5.
214. Loiola CC, Silva CJ, Tauil PL. Malaria control in Brazil: 1965 to 2001. *Rev Panam Salud Publica* 2002;11:235-44.
215. Lomar AV, Vidal JE, Lomar FP, Barbas CV, Matos GJ, Boulos M. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review. *Braz J Infect Dis* 2005;9:425-30.
216. Lou J, Donati YR, Juillard P, Giroud C, Vesin C, Mili N, et al. Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. *Am J Pathol* 1997;151:1397-405.

217. Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:810-20.
218. Luo Y, McGrath C. Oral health status of homeless people in Hong Kong. *Spec Care Dentist* 2006;26:150-4.
219. Luscher EF. Induction of platelet aggregation by immune complexes. *Ser Haematol* 1970;3:121-9.
220. MacDonald JA, Marchand ME, Langler RF. Improving upon the *in vitro* biological activity of antithrombotic disulfides. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004;15:447-50.
221. Mackinnon MJ, Read AF. Virulence in malaria: an evolutionary viewpoint. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004;359:965-86.
222. Maegraith B. Pathological processes in malaria and blackwater fever. Springfield: Charles C. Thomas; 1948.
223. Makkar RP, Mukhopadhyay S, Monga A, Gupta AK. *Plasmodium vivax* malaria presenting with severe thrombocytopenia. *Braz J Infect Dis* 2002;6:263-5.
224. Malcon MC, Menezes AM, Chatkin M. Prevalence and risk factors for smoking among adolescents. *Rev Saude Publica* 2003;37:1-7.
225. Mannel DN, Grau GE. Role of platelet adhesion in homeostasis and immunopathology. *Mol Pathol* 1997;50:175-85.
226. Manso MRFC. Aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da malária. Mestrado [dissertação]. Manaus: Universidade do Estado do Amazonas; 2004.

227. Maroushek SR, Aguilar EF, Stauffer W, Abd-Alla MD. Malaria among refugee children at arrival in the United States. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:450-2.
228. Marques HO. Alterações da hemostasia em pacientes com malária. Mestrado [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2004.
229. Marques HO, Alexandre MAA, Oliveira VM, Marreira L, Lacerda MVG, Alecrim MGC, et al. Hemostatic changes in patients with malaria. *Annals of the XX Congress of the International Society on Thrombosis and Hemostasis; Sydney (Australia); J Thromb Haemost* 2005;3(Sup.I):P1452.
230. Marson P, Pasero G. The Italian contributions to the history of salicylates. *Reumatismo* 2006;58:66-75.
231. Martinez-Espinosa FE, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim WD. Malaria during pregnancy in a reference centre from the Brazilian Amazon: unexpected increase in the frequency of *Plasmodium falciparum* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99:19-21.
232. Mason DP, Pattarapotikul J, Chindanond D, Supavej S, Wongcharoenyong S, Naing, et al. Malaria in southern Thailand: relationship between parasitaemia and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95:418-9.
233. Mbanya D, Tapko JB, Azowe F, Kaptue L. Aetiologic factors and clinical features associated with thrombocytopenia in Cameroonesse adults: the importance of *Plasmodium falciparum* malaria. *Santé* 2002;12:331-5.
234. McKenzie FE, Prudhomme WA, Magill AJ, Forney JR, Permpnich B, Lucas C, et al. White blood cell counts and malaria. *J Infect Dis* 2005;192:323-30.
235. Mehta KS, Halankar AR, Makwana PD, Torane PP, Satija PS, Shah VB. Severe acute renal failure in malaria. *J Postgrad Med* 2001;47:24-6.

236. Meirelles E. Das reacções espleno-hepato-osteo-medullares no paludismo. In: Couto M, editor. Impaludismo por autores brasileiros. Rio de Janeiro: Rodrigues & C.; 1927, 77-93.
237. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today* 2000;16:469-76.
238. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002;415:673-9.
239. Mohanty D, Ghosh K, Nandwani SK, Shetty S, Phillips C, Rizvi S, et al. Fibrinolysis, inhibitors of blood coagulation, and monocyte derived coagulant activity in acute malaria. *Am J Hematol* 1997;54:23-9.
240. Mohanty D, Marwaha N, Ghosh K, Sharma S, Garewal G, Shah S, et al. Functional and ultrastructural changes of platelets in malarial infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988;82:369-75.
241. Mohanty S, Patel DK, Pati SS, Mishra SK. Adjuvant therapy in cerebral malaria. *Indian J Med Res* 2006;124:245-60.
242. Mohapatra MK, Padhiary KN, Mishra DP, Sethy G. Atypical manifestations of *Plasmodium vivax* malaria. *Indian J Malariol* 2002;39:18-25.
243. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* 2001;1:11-20.
244. Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettli AU, Braga EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:582-7.
245. Morris L, Distenfeld A, Amorosi E, Karpatkin S. Autoimmune thrombocytopenic purpura in homosexual men. *Ann Intern Med* 1982;96:714-7.

246. Moulin F, Lesage F, Legros AH, Maroga C, Moussavou A, Guyon P, et al. Thrombocytopenia and *Plasmodium falciparum* malaria in children with different exposures. Arch Dis Child 2003;88:540-1.
247. Mourão MPG, Lacerda MVG, Macêdo VO, Santos JB. Thrombocytopenia in patients with dengue virus infection in the Brazilian Amazon. Platelets 2007; no prelo.
248. Mourão MPG, Lacerda MVG, Magalhães L, Alecrim WD, Alecrim MGC. Estudo clínico em crianças internadas com malária (*P. falciparum*) na FMT-AM. Anais do XXXVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Salvador; Rev Soc Bras Med Trop 2001;34(Sup.I):71.
249. Mu J, Joy DA, Duan J, Huang Y, Carlton J, Walker J, et al. Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria in humans. Mol Biol Evol 2005;22:1686-93.
250. Muniz-Junqueira MI. Immunomodulatory therapy associated to anti-parasite drugs as a way to prevent severe forms of malaria. Curr Clin Pharmacol 2007;2:59-73.
251. Muniz-Junqueira MI, Moraes MA, Marsden PD. Reduction of spleen size in a child with hyperreactive malarious splenomegaly (HMS) treated outside the Brazilian endemic area of malaria with only one course of quinine. Rev Soc Bras Med Trop 1992;25:257-9.
252. Muniz-Junqueira MI, Santos-Neto LL, Tosta CE. Influence of tumor necrosis factor-alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in vitro. Cell Immunol 2001;208:73-9.
253. Muniz-Junqueira MI, Silva FO, de Paula Júnior MR, Tosta CE. Thalidomide influences the function of macrophages and increases the survival of *Plasmodium berghei*-infected CBA mice. Acta Trop 2005;94:128-38.

254. Murthy GL, Sahay RK, Srinivasan VR, Upadhaya AC, Shantaram V, Gayatri K. Clinical profile of falciparum malaria in a tertiary care hospital. J Indian Med Assoc 2000;98:160-2, 9.
255. Nardi M, Feinmark SJ, Hu L, Li Z, Karparkin S. Complement-independent Ab-induced peroxide lysis of platelets requires 12-lipoxygenase and a platelet NADPH oxidase pathway. J Clin Invest 2004;113:973-80.
256. Nardi M, Tomlinson S, Greco MA, Karparkin S. Complement-independent, peroxide-induced antibody lysis of platelets in HIV-1-related immune thrombocytopenia. Cell 2001;106:551-61.
257. Nardi MA, Liu LX, Karparkin S. GPIIIa(49-66) is a major pathophysiologically relevant antigenic determinant for anti-platelet GPIIIa of HIV-1-related immunologic thrombocytopenia. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:7589-94.
258. Nardin A, Lindorfer MA, Taylor RP. How are immune complexes bound to the primate erythrocyte complement receptor transferred to acceptor phagocytic cells? Mol Immunol 1999;36:827-35.
259. Naveira JB. Malária - aspectos hematológicos. Livre docência [tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1970.
260. Niazi GA. Haematological aspect of malaria in a population based hospital, Saudi Arabia. J Egypt Soc Parasitol 1995;25:787-93.
261. Nicodemo AC. Análise de aspectos microscópicos, imuno-histoquímicos e ultra-estruturais do pulmão na leptospirose para a compreensão da patogênese da plaquetopenia. Doutorado [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1993.
262. Nimri LF, Lanners NH. Immune complexes and nephropathies associated with *Plasmodium inui* infection in the rhesus monkey. Am J Trop Med Hyg 1994;51:183-9.

-
263. Noronha EF. Estudo clínico-epidemiológico da malária falciparum em crianças de 0 a 14 anos, atendidas no Instituto de Medicina Tropical do Amazonas em Manaus - AM - Brasil. Mestrado [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 1998.
264. Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis* 2006;1:10.
265. O'Meara WP, McKenzie FE, Magill AJ, Forney JR, Permpanich B, Lucas C, et al. Sources of variability in determining malaria parasite density by microscopy. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:593-8.
266. Ockenhouse CF, Tandon NN, Magowan C, Jamieson GA, Chulay JD. Identification of a platelet membrane glycoprotein as a falciparum malaria sequestration receptor. *Science* 1989;243:1469-71.
267. Oh MD, Shin H, Shin D, Kim U, Lee S, Kim N, et al. Clinical features of vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:143-6.
268. Ohtaka M, Ohyashiki K, Iwabuchi H, Iwabuchi A, Lin KY, Toyama K. A case of vivax malaria with thrombocytopenia suggesting immunological mechanisms (abstract). *Rinsho Ketsueki* 1993;34:490-2.
269. Oliveira MS. Caracterização hematológica em crianças, com malária vivax, diagnosticadas e tratadas na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT-AM. Mestrado [dissertação]. Manaus: Universidade do Estado do Amazonas; 2004.
270. Oliveira RAG. Estudo comparativo entre dois métodos diretos para contagem de plaquetas, tendo como parâmetro a automação. Mestrado [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2000.

271. Oliveira TR, Fernandez-Becerra C, Jimenez MC, del Portillo HA, Soares IS. Evaluation of the acquired immune responses to *Plasmodium vivax* VIR variant antigens in individuals living in malaria-endemic areas of Brazil. *Malar J* 2006;5:83.
272. Osim EE, Adegunloye BJ, Emeribe AO. *In vivo* platelet aggregation in acute malaria. *Acta Trop* 1991;49:227-32.
273. Osler W. On certain problems in the physiology of the blood corpuscles. *The Medical News* 1886;48:421-5.
274. Packer BJ, Kreier JP. *Plasmodium berghei* malaria: effects of acute-phase serum and erythrocyte-bound immunoglobulins on erythrophagocytosis by rat peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1986;51:141-6.
275. PAHO. Status report on malaria programs in the Americas. 2002 [acesso em 07 de fevereiro de 2007]; Disponível em:
<http://www.paho.org/English/GOV/CSP/csp26-inf3-e.pdf>
276. Pain A, Ferguson DJ, Kai O, Urban BC, Lowe B, Marsh K, et al. Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1805-10.
277. Panasiuk A. Autoimmune thrombocytopenia in recurrent polietiological malaria (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*) (abstract). *Wiad Parazytol* 2001;47:85-9.
278. Park CHL, Ferreira CB, Bianchi CP, Fazio FS, Costa JC, Padilha A, et al. Plaquetopenia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax*. *Anais do XXXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; Foz do Iguaçu; *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35(Sup.I):370.

-
279. Park JW, Park SH, Yeom JS, Huh AJ, Cho YK, Ahn JY, et al. Serum cytokine profiles in patients with *Plasmodium vivax* malaria: a comparison between those who presented with and without thrombocytopenia. *Ann Trop Med Parasitol* 2003;97:339-44.
280. Park Y, Schoene N, Harris W. Mean platelet volume as an indicator of platelet activation: methodological issues. *Platelets* 2002;13:301-6.
281. Patel U, Gandhi G, Friedman S, Niranjana S. Thrombocytopenia in malaria. *J Natl Med Assoc* 2004;96:1212-4.
282. Paula SO, Fonseca BA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis* 2004;8:390-8.
283. Peck-Radosavljevic M. Hypersplenism. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:317-23.
284. Perez HA, de la Rosa M, Apitz R. *In vivo* activity of ajoene against rodent malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:337-9.
285. Pessoa SB. *Parasitologia Médica*. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1993.
286. Picot S. Is *Plasmodium vivax* still a paradigm for uncomplicated malaria? *Med Mal Infect* 2006;36:406-13.
287. Piguet PF, Da Laperrousaz C, Vesin C, Tacchini-Cottier F, Senaldi G, Grau GE. Delayed mortality and attenuated thrombocytopenia associated with severe malaria in urokinase- and urokinase receptor-deficient mice. *Infect Immun* 2000;68:3822-9.

288. Piguet PF, Kan CD, Vesin C. Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. *Apoptosis* 2002;7:91-8.
289. Polasek J. Three modes of platelet degranulation? *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006;35:408-9.
290. Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. *J Hepatol* 2006;45:607-16.
291. Prudencio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:849-56.
292. Prudhomme O'meara W, Barcus M, Wongsrichanalai C, Muth S, Maguire JD, Jordan RG, et al. Reader technique as a source of variability in determining malaria parasite density by microscopy. *Malar J* 2006;5:118.
293. Pukrittayakamee S, White NJ, Clemens R, Chittamas S, Karges HE, Desakorn V, et al. Activation of the coagulation cascade in falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989;83:762-6.
294. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tia T, Ferreira MU, Kanbara H, Tanabe K. Diversity in the thrombospondin-related adhesive protein gene (TRAP) of *Plasmodium vivax*. *Gene* 2001;268:97-104.
295. Qi R, Liao F, Inoue K, Yatomi Y, Sato K, Ozaki Y. Inhibition by diallyl trisulfide, a garlic component, of intracellular Ca²⁺ mobilization without affecting inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃) formation in activated platelets. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1475-83.

-
296. Quinto L, Aponte JJ, Sacarlal J, Espasa M, Aide P, Mandomando I, et al. Haematological and biochemical indices in young African children: in search of reference intervals. *Trop Med Int Health* 2006;11:1741-8.
297. Ramos CCBSR. Malária vivax na Pré-Amazônia Maranhense: aspectos epidemiológicos e características clínicas. Mestrado [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2006.
298. Rand ML, Leung R, Packham MA. Platelet function assays. *Transfus Apher Sci* 2003;28:307-17.
299. Rebullá P. Trigger for platelet transfusion. *Vox Sang* 2000;78(Sup.2):179-82.
300. Rebullá P. Revisitation of the clinical indications for the transfusion of platelet concentrates. *Rev Clin Exp Hematol* 2001;5:288-310.
301. Richards MW, Behrens RH, Doherty JF. Short report: hematologic changes in acute, imported *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:859.
302. Rios-Orrego A, Alvarez-Castillo T, Carmona-Fonseca J, Blair-Trujillo S. Temporal evolution of platelets and anti-platelet antibodies in patients of endemic area with non complicated malaria. *An Med Interna* 2005;22:561-8.
303. Roberts DD, Sherwood JA, Spitalnik SL, Panton LJ, Howard RJ, Dixit VM, et al. Thrombospondin binds falciparum malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. *Nature* 1985;318:64-6.
304. Robinson P, Jenney AW, Tachado M, Yung A, Manitta J, Taylor K, et al. Imported malaria treated in Melbourne, Australia: epidemiology and clinical features in 246 patients. *J Travel Med* 2001;8:76-81.

305. Rodriguez-Morales AJ, Sanchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M. Anemia and thrombocytopenia in children with *Plasmodium vivax* malaria. J Trop Pediatr 2006;52:49-51.
306. Rodriguez-Morales AJ, Sanchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M, et al. Occurrence of thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria. Clin Infect Dis 2005;41:130-1.
307. Rodriguez-Morales AJ, Sanchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M, et al. Is anemia in *Plasmodium vivax* malaria more frequent and severe than in *Plasmodium falciparum*? Am J Med 2006;119:e9-10.
308. Rogerson SJ, Grau GE, Hunt NH. The microcirculation in severe malaria. Microcirculation 2004;11:559-76.
309. Rogier C, Gerardin P, Imbert P. Thrombocytopenia is predictive of lethality in severe childhood falciparum malaria. Arch Dis Child 2004;89:795-6.
310. Rojanasthien S, Surakamollearat V, Boonpucknavig S, Isarangkura P. Hematological and coagulation studies in malaria. J Med Assoc Thai 1992;75(Sup.1):190-4.
311. Romano EL, Montano RF, Brito B, Apitz R, Alonso J, Romano M, et al. Effects of ajoene on lymphocyte and macrophage membrane-dependent functions. Immunopharmacol Immunotoxicol 1997;19:15-36.
312. Ross A, Smith T. The effect of malaria transmission intensity on neonatal mortality in endemic areas. Am J Trop Med Hyg 2006;75:74-81.
313. Samuel H, Nardi M, Karpatkin M, Hart D, Belmont M, Karpatkin S. Differentiation of autoimmune thrombocytopenia from thrombocytopenia associated with immune complex disease: systemic lupus erythematosus, hepatitis-cirrhosis,

and HIV-1 infection by platelet and serum immunological measurements. Br J Haematol 1999;105:1086-91.

314. Santos MC, Lacerda MVG, Benedetti SM, Albuquerque BC, Aguiar Filho AA, Elkhoury MR, et al. Human hantavirus infection, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis 2006;12:1165-7.

315. Santos PD. Correlação entre níveis séricos de Intermediários Reativos de Nitrogênio (IRN) e malária em pacientes da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT/IMT-AM). Mestrado [dissertação]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2000.

316. Scaradavou A. HIV-related thrombocytopenia. Blood Rev 2002;16:73-6.

317. Schlossberg HR, Herman JH. Platelet dosing. Transfus Apher Sci 2003;28:221-6.

318. Schmitt A, Guichard J, Masse JM, Debili N, Cramer EM. Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. Exp Hematol 2001;29:1295-302.

319. Scopel KK, Fontes CJ, Ferreira MU, Braga EM. Factors associated with immunoglobulin G subclass polarization in naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins: a cross-sectional survey in Brazilian Amazonia. Clin Vaccine Immunol 2006;13:810-3.

320. Scott CS, Van Zyl D, Ho E, Ruivo L, Mendelow B, Coetzer TL. Thrombocytopenia in patients with malaria: automated analysis of optical platelet counts and platelet clumps with the Cell Dyn CD4000 analyser. Clin Lab Haematol 2002;24:295-302.

321. Sekhon SS, Roy V. Thrombocytopenia in adults: a practical approach to evaluation and management. *South Med J* 2006;99:491-8.
322. Shahab N, Evans ML. Images in clinical medicine. Platelet satellitism. *N Engl J Med* 1998;338:591.
323. Shear HL. Murine malaria: immune complexes inhibit Fc receptor-mediated phagocytosis. *Infect Immun* 1984;44:130-6.
324. Sherman IW, Eda S, Winograd E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes Infect* 2003;5:897-909.
325. Shibao S, Kim NJT, Oliveira IRS, Cerri GG. O baço. In: Cerri GG, Oliveira IRS, editores. *Ultra-Sonografia Abdominal*. Rio de Janeiro: Revinter; 2002, 295-323.
326. Silva IBA. Malária vivax: manifestações clínicas e laboratoriais relacionadas com o fator de necrose tumoral alfa. Doutorado [tese]. Belém: Universidade Federal do Pará; 2004.
327. Silva SL, Santana Filho FS, Arcanjo ARL, Alecrim WD, Alecrim MGC. Perfil clínico e hematológico dos pacientes internados com malária por *Plasmodium vivax* e plaquetopenia, na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, no período de janeiro de 1997 a setembro de 1999. *Anais do XXXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; São Luís do Maranhão; Rev Soc Bras Med Trop* 2000;33(Sup.I):348.
328. Silvestri F, Virgolini L, Savignano C, Zaja F, Velisig M, Baccarani M. Incidence and diagnosis of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a consecutive outpatient population referred for isolated thrombocytopenia. *Vox Sang* 1995;68:35-9.

329. Singh RK. Hyperreactive malarial splenomegaly in expatriates. *Travel Med Infect Dis* 2007;5:24-9.
330. Singh ZN, Rakheja D, Yadav TP, Shome DK. Infection-associated haemophagocytosis: the tropical spectrum. *Clin Lab Haematol* 2005;27:312-5.
331. Singhsilarak T, Phongtananant S, Jenjittikul M, Watt G, Tangpakdee N, Popak N, et al. Possible acute coinfections in Thai malaria patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006;37:1-4.
332. Skudowitz RB, Katz J, Lurie A, Levin J, Metz J. Mechanisms of thrombocytopenia in malignant tertian malaria. *BMJ* 1973;2:515-8.
333. Smith DC, Sanford LB. Laveran's germ: the reception and use of a medical discovery. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34:2-20.
334. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993;61:315-20.
335. Sodeman WA, Jffrey GM. Primary malarial thrombocytopenia in the rhesus monkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1966;60:70.
336. Souto FJ, Fontes CJ, Gaspar AM. Prevalence of hepatitis B and C virus markers among malaria-exposed gold miners in Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:751-5.
337. Srichaikul T. Hemostatic alterations in malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993;24(Sup.1):86-91.
338. Srichaikul T, Pulket C, Sirisatepisarn T, Prayoonwiwat W. Platelet dysfunction in malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1988;19:225-33.

339. Srichaikul T, Puwasatien P, Karnjanajetanee J, Bokisch VA, Pawasatien P. Complement changes and disseminated intravascular coagulation in *Plasmodium falciparum* malaria. Lancet 1975;1:770-2.
340. Steiner M, Li W. Aged garlic extract, a modulator of cardiovascular risk factors: a dose-finding study on the effects of AGE on platelet functions. J Nutr 2001;131:980S-4.
341. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. Science 2006;313:1287-90.
342. Sun G, Chang WL, Li J, Berney SM, Kimpel D, van der Heyde HC. Inhibition of platelet adherence to brain microvasculature protects against severe *Plasmodium berghei* malaria. Infect Immun 2003;71:6553-61.
343. Szabo J, Cervenak L, Toth FD, Prohaszka Z, Horvath L, Kerekes K, et al. Soluble gC1q-R/p33, a cell protein that binds to the globular "heads" of C1q, effectively inhibits the growth of HIV-1 strains in cell cultures. Clin Immunol 2001;99:222-31.
344. Takaki K, Aoki T, Akeda H, Kajiwara T, Honda S, Maeda Y, et al. A case of *Plasmodium vivax* malaria with findings of DIC (abstract). Kansenshogaku Zasshi 1991;65:488-92.
345. Tatewaki W, Morinaga S, Yamaguchi H, Asai I, Tsukada T, Matsuya S. Splenectomy made possible by administration of a massive dosage of IgG in refractory ITP associated with *Plasmodium vivax* malaria (abstract). Rinsho Ketsueki 1983;24:213-7.
346. Tauil PL. Avaliação de uma nova estratégia de controle da malária na Amazônia Brasileira. Doutorado [tese]. Brasília: Universidade de Brasília; 2002.

347. Tefferi A. Thrombocytosis and essential thrombocythemia. In: Michelson AD, editor. Platelets. Califórnia: Elsevier Academic Press; 2002, 667-80.
348. Teranishi K, Apitz-Castro R, Robson SC, Romano E, Cooper DKC. Inhibition of baboon platelet aggregation in vitro and in vivo by the garlic derivative, ajoene. *Xenotransplantation* 2003;10:374-9.
349. Terrazzano G, Cortese L, Piantedosi D, Zappacosta S, Di Loria A, Santoro D, et al. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;110:331-7.
350. Thangaratham PS, Jeevan MK, Rajendran R, Samuel PP, Tyagi BK. Dual infection by dengue virus and *Plasmodium vivax* in Alappuzha District, Kerala, India. *Jpn J Infect Dis* 2006;59:211-2.
351. Thomson M, Mustafa T, Ali M. Thromboxane-B2 levels in serum of rabbits receiving a single intravenous dose of aqueous extract of garlic and onion. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000;63:217-21.
352. Torres KL, Figueiredo DV, Zalis MG, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim W, Ferreira-da-Cruz MF. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. *Parasitol Res* 2006;98:519-24.
353. Tosta CE. Imunidade na malária experimental: interferência de anticorpos sobre a fagocitose de *Plasmodium berghei*. Mestrado [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1976.
354. Touze JE, Mercier P, Rogier C, Hovette P, Schmoor P, Dabanian C, et al. Platelet antibody activity in malaria thrombocytopenia. *Pathol Biol (Paris)* 1990;38:678-81.

355. Tribulatti MV, Mucci J, Van Rooijen N, Leguizamón MS, Campetella O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infect Immun* 2005;73:201-7.
356. Tyagi P, Biswas S. Naturally occurring plasmodia-specific circulating immune complexes in individuals of malaria endemic areas in India. *Indian J Malariol* 1999;36:12-8.
357. Udomsanpetch R, Thanikkul K, Pukrittayakamee S, White NJ. Rosette formation by *Plasmodium vivax*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89:635-7.
358. Urban BC, Hien TT, Day NP, Phu NH, Roberts R, Pongponratn E, et al. Fatal *Plasmodium falciparum* malaria causes specific patterns of splenic architectural disorganization. *Infect Immun* 2005;73:1986-94.
359. Valério IMR. Pesquisa de anticorpos anti-plaquetários em púrpura trombocitopênica imune por citometria de fluxo. Mestrado [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 1995.
360. van der Heyde HC, Gramaglia I, Sun G, Woods C. Platelet depletion by anti-CD41 (α IIb) mAb injection early but not late in the course of disease protects against *Plasmodium berghei* pathogenesis by altering the levels of pathogenic cytokines. *Blood* 2004.
361. Vasconcelos RR. Contribuição ao estudo epidemiológico, clínico e laboratorial das infecções pelo vírus da hepatite C. Mestrado [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.
362. Viana S, Parana R, Moreira RC, Compri AP, Macêdo V. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:808-14.

363. Victoria MB, Victoria F, Coelho AHV, Santos LO, Alecrim MGC. Púrpura trombocitopênica em paciente com malária por *Plasmodium vivax*: relato de caso. Anais do XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Manaus; Rev Soc Bras Med Trop 1998;31(Sup.I):55.
364. Vigliani R. Giulio Bizzozero: a remembrance 100 years after his death. Pathologica 2002;94:206-15.
365. Vreeken J, Cremer-Goote TM. Haemostatic defect in non-immune patients with falciparum malaria: no evidence of diffuse intravascular coagulation. Br Med J 1978;2:533-5.
366. Ward PA, Kibukamusoke JW. Evidence for soluble immune complexes in the pathogenesis of the glomerulonephritis of quartan malaria. Lancet 1969;1:283-5.
367. Warrell DA, Looareesuwan S, Warrell MJ, Kasemsarn P, Intaraprasert R, Bunnag D, et al. Dexamethasone proves deleterious in cerebral malaria. A double-blind trial in 100 comatose patients. N Engl J Med 1982;306:313-9.
368. Wassmer SC, Combes V, Candal FJ, Juhan-Vague I, Grau GE. Platelets potentiate brain endothelial alterations induced by *Plasmodium falciparum*. Infect Immun 2006;74:645-53.
369. Wassmer SC, Lepolard C, Traore B, Pouvelle B, Gysin J, Grau GE. Platelets reorient *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadhesion to activated endothelial cells. J Infect Dis 2004;189:180-9.
370. Wassmer SC, Souza JB, Frere C, Candal FJ, Juhan-Vague I, Grau GE. TGF-beta1 released from activated platelets can induce TNF-stimulated human brain endothelium apoptosis: a new mechanism for microvascular lesion during cerebral malaria. J Immunol 2006;176:1180-4.

371. Watier H, Verwaerde C, Landau I, Werner E, Fontaine J, Capron A, et al. T-cell-dependent immunity and thrombocytopenia in rats infected with *Plasmodium chabaudi*. *Infect Immun* 1992;60:136-42.
372. Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, et al. Malaria and the red cell. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2002;35-57.
373. White MM, Jennings LK. Platelet protocols: research and clinical laboratory procedures. San Diego: Academic Press; 1999.
374. WHO. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;94(Sup.1):S1-90.
375. WHO. Handbook for Good Clinical Research Practice (GCP): guidance for implementation. 2002 [acesso em 03 de janeiro de 2007]; Disponível em: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/gcp1.pdf
376. WHO. Monitoring antimalarial drug resistance, Report of a WHO consultation. 2002 [acesso em 29 de abril de 2006]; Disponível em: http://www.who.int/malaria/cmc_upload/0/000/015/800/200239.pdf
377. WHO. World Malaria Report 2005. 2005 [acesso em 25 de janeiro de 2007]; Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241593199_eng.pdf
378. Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000;13:277-99.
379. Wickramasinghe SN, Looareesuwan S, Nagachinta B, White NJ. Dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in *Plasmodium vivax* malaria. *Br J Haematol* 1989;72:91-9.

380. Williamson LM, Lowe S, Love EM, Cohen H, Soldan K, McClelland DB, et al. Serious hazards of transfusion (SHOT) initiative: analysis of the first two annual reports. *BMJ* 1999;319:16-9.
381. Wiwanitkit V. Plateletcrit, mean platelet volume, platelet distribution width: its expected values and correlation with parallel red blood cell parameters. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10:175-8.
382. Wright JH. The origin and nature of blood plates. *Boston Med Surg J* 1906;154:643-5.
383. Yamaguchi S, Kubota T, Yamagishi T, Okamoto K, Izumi T, Takada M, et al. Severe thrombocytopenia suggesting immunological mechanisms in two cases of vivax malaria. *Am J Hematol* 1997;56:183-6.
384. Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol* 2007; no prelo.
385. Yeaman MR. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin Infect Dis* 1997;25:951-68.
386. Zamora F, Ramirez O, Vergara J, Arévalo-Herrera M, Herrera S. Hemoglobin levels related to days of illness, race, and *Plasmodium* species in Colombian patients with uncomplicated malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:50-4.
387. Zucatto M. Avaliação comparativa da contagem de plaquetas em sangue contendo EDTA ou citrato de sódio como anticoagulantes. Mestrado Profissionalizante [Monografia]. Santo Amaro: Universidade de Santo Amaro; 2002.

OBRAS CONSULTADAS

Afifi A, Clark VA, May S. Computer-aided multivariate analysis. 4ª ed. New York: Chapman & Hall/CRC; 2004.

Bolfarine H, Bussab WO. Elementos de amostragem. São Paulo: Editora Edgard Blücher; 2005.

Diniz D, Guilhem D, Schüklenk U, editores. Ética na pesquisa: experiência de treinamento em países sul-africanos. Brasília: Editora da UnB; 2005.

Eco U. Como se faz uma tese. 20ª ed. São Paulo: Perspectiva; 2005.

Ferreira ABH. Novo Dicionário Eletrônico Aurélio versão 5.11, 3ª ed. [CD-ROM]: Editora Positivo; 2004.

Furasté PA. Normas técnicas para o trabalho científico: elaboração e formatação. 14ª ed. Porto Alegre: Gráfica e Editora Brasul Ltda.; 2006.

Gibbins JM, Mahaut-Smith MP, editores. Platelets and megakaryocytes, Vol. 1: Functional tests. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2004.

Gibbins JM, Mahaut-Smith MP, editores. Platelets and megakaryocytes, Vol. 2: Perspectives and techniques. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2004.

Merriam-Webster OnLine Search. 2005 [acesso em 20 de janeiro de 2007]; Disponível em: <http://www.m-w.com/>

Miller CC, Reardon MJ, Safi HJ. Risk stratification: a practical guide for clinicians. Cambridge: Cambridge University Press; 2001.

Moreira DA. O método fenomenológico na pesquisa. São Paulo: Pioneira Thomson Learning; 2002.

Motta VT. Redação de artigos científicos biomédicos. Caxias do Sul: EDUCS; 2006.

Rey L. Dicionário de termos técnicos de Medicina e Saúde. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2003.

Spector N. Manual para a redação de teses, projetos de pesquisa e artigos científicos. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002.

Vieira S. Análise de variância. São Paulo: Editora Atlas; 2006.

Watson SP, Authi KS, editores. Platelets: a practical approach. New York: Oxford University Press; 1996.

Zar JH. Biostatistical analysis. 4ª ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall; 1998.

ANEXOS

ANEXO A

TABELA DE DÍGITOS RANDÔMICOS

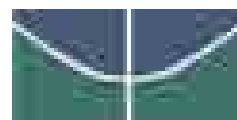
11164	36318	75061	37674	26320	75100	10431	20418	19228	91792
21215	91791	76831	58678	87054	31687	93205	43685	19732	08468
10438	44482	66558	37649	08882	90870	12462	41810	01806	02977
36792	26236	33266	66583	60881	97395	20461	36742	02852	50564
73944	04773	12032	51414	82384	38370	00249	80709	72605	67497
49563	12872	14063	93104	78483	72717	68714	18048	25005	04151
64208	48237	41701	73117	33242	42314	83049	21933	92813	04763
51486	72875	38605	29341	80749	80151	33835	52602	79147	08868
99756	26360	64516	17971	48478	09610	04638	17141	09227	10606
71325	55217	13015	72907	00431	45117	33827	92873	02953	85474
65285	97198	12138	53010	94601	15838	16805	61004	43516	17020
17264	57327	38224	29301	31381	38109	34976	65692	98566	29550
95639	99754	31199	92558	68368	04985	51092	37780	40261	14479
61555	76404	86210	11808	12841	45147	97438	60022	12645	62000
78137	98768	04689	87130	79225	08153	84967	64539	79493	74917
62490	99215	84987	28759	19177	14733	24550	28067	68894	38490
24216	63444	21283	07044	92729	37284	13211	37485	10415	36457
16975	95428	33226	55903	31605	43817	22250	03918	46999	98501
59138	39542	71168	57609	91510	77904	74244	50940	31553	62562
29478	59652	50414	31966	87912	87154	12944	49862	96566	48825
96155	95009	27429	72918	08457	78134	48407	26061	58754	05326
29621	66583	62966	12468	20245	14015	04014	35713	03980	03024
12639	75291	71020	17265	41598	64074	64629	63293	53307	48766
14544	37134	54714	02401	63228	26831	19386	15457	17999	18306
83403	88827	09834	11333	68431	31706	26652	04711	34593	22561
67642	05204	30697	44806	96989	68403	85621	45556	35434	09532
64041	99011	14610	40273	09482	62864	01573	82274	81446	32477
17048	94523	97444	59904	16936	39384	97551	09620	63932	03091
93039	89416	52795	10631	09728	68202	20963	02477	55494	39563
82244	34392	96607	17220	51984	10753	76272	50985	97593	34320
96990	55244	70693	25255	40029	23289	48819	07159	60172	81697
09119	74803	97303	88701	51380	73143	98251	78635	27556	20712
57666	41204	47589	78364	38266	94393	70713	53388	79865	92069
46492	61594	26729	58272	81754	14648	77210	12923	53712	87771
08433	19172	08320	20839	13715	10597	17234	39355	74816	03363
10011	75004	86054	41190	10061	19660	03500	68412	57812	57929
92420	65431	16530	05547	10683	88102	30176	84750	10115	69220
35542	55865	07304	47010	43233	57022	52161	82976	47981	46588
86595	26247	18552	29491	33712	32285	64844	69395	41387	87195
72115	34985	58036	99137	47482	06204	24138	24272	16196	04393
07428	58863	96023	88936	51343	70958	96768	74317	27176	29600
35379	27922	28906	55013	26937	48174	04197	36074	65315	12537
10982	22807	10920	26299	23593	64629	57801	10437	43965	15344
90127	33341	77806	12446	15444	49244	47277	11346	15884	28131
63002	12990	23510	68774	48983	20481	59815	67248	17076	78910
40779	86382	48454	65269	91239	45989	45389	54847	77919	41105
43216	12608	18167	84631	94058	82458	15139	76856	86019	47928
96167	64375	74108	93643	09204	98855	59051	56492	11933	64958
70975	62693	35684	72607	23026	37004	32989	24843	01128	74658
85812	61875	23570	75754	29090	40264	80399	47254	40135	69916

ANEXO B

FICHA CLÍNICA



ESTUDO CLÍNICO DA PLAQUETOPENIA ENCONTRADA EM PACIENTES COM MALÁRIA



Tese de Doutorado
Aluno responsável: Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda

FICHA CLÍNICA

Número

Data de inclusão: / /

IDENTIFICAÇÃO

Nome:		Registro:	
Cor/Raça: 1-branca 2-parda 3-preta 4-indígena 5-amarela <input type="checkbox"/>			
Data de nascimento: / /		Idade: <input type="checkbox"/> anos	Gênero: 1-M 2-F <input type="checkbox"/>
Residência:			
Referência:			
Bairro:		Município:	
Telefone residencial:		Telefone celular:	
Endereço provisório:			
Profissão:			

CARACTERÍSTICAS INDIVIDUAIS

Procedência: 1-domicílio 2-rede de saúde <input type="checkbox"/>	
Local provável de infecção:	
1-Manaus 2-Outro município 3-Outro estado <input type="checkbox"/> Qual? <input type="text"/>	
Em Manaus, zona: 1-leste 2-oeste 3-norte 4-sul 5-centro-sul 6-centro-oeste 7-rural <input type="checkbox"/>	
Sua exposição à área endêmica é eventual? 1-sim 2-não <input type="checkbox"/>	
Se não, há quanto tempo vive em área endêmica? 1-< 6m 2-6m-1a 3-1a-2a 4->2a <input type="checkbox"/>	
Tem ou já teve alguma doença hematológica? 1-sim 2-não <input type="checkbox"/> Tipo: <input type="text"/>	
Algum familiar já teve alguma doença hematológica? 1-sim 2-não <input type="checkbox"/> Tipo: <input type="text"/>	
Já precisou fazer alguma hemotransfusão? 1-sim 2-não <input type="checkbox"/> Há <input type="text"/> anos	
Tem facilidade em sangrar após trauma? 1-sim 2-não <input type="checkbox"/>	
Já teve algum sangramento espontâneo? 1-sim 2-não <input type="checkbox"/> Tipo: <input type="text"/>	
Número de episódios prévios de malária: <input type="text"/> Última vez há <input type="text"/> meses	
Tipo: 1-V 2-F 3-F+V 4-não sabe <input type="checkbox"/> Já ficou internado com malária? 1-sim 2-não <input type="checkbox"/>	
Teve algum sangramento quando teve malária no passado? 1-sim 2-não 3-não se aplica <input type="checkbox"/>	
Local do sangramento: <input type="text"/>	

Algum parente já teve malária?	1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>
Algum parente teve sangramento quando teve malária no passado?	1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>
Alguma outra doença crônica? 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Qual? <input type="text"/>
A doença está em atividade nos últimos dias?	1-sim 2-não 3-não se aplica	<input type="checkbox"/>
Usa alguma medicação regular?	1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>
Qual? <input type="text"/>		
Uso de AAS nos últimos 7 dias?	1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>
Uso de alguma medicação antimalárica nos últimos 60 dias?	1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>
Qual? <input type="text"/>		
Qual? <input type="text"/>		
Dieta rica em alho? 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Dieta rica em cebola? 1-sim 2-não <input type="checkbox"/>
Tabagista? 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Uso regular de álcool? 1-sim 2-não <input type="checkbox"/>

HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL

Doença atual há <input type="text"/> dias		
Febre 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Mioartralgia 1-sim 2-não <input type="checkbox"/>
Cefaléia 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	
Vômitos 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Desmaio 1-sim 2-não <input type="checkbox"/>
Convulsão 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	
A/Oligúria 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Dispnéia 1-sim 2-não <input type="checkbox"/>
Tontura 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	
Diarréia 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Dor abdominal 1-sim 2-não <input type="checkbox"/>
Colúria 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	
Epistaxe 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Gengivorragia 1-sim 2-não <input type="checkbox"/>
Petéquia 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	
Hemorragia conjuntival 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Equimose 1-sim 2-não <input type="checkbox"/>
Hematoma 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Menometrorragia 1-sim 2-não 3-não se aplica <input type="checkbox"/>
Hematúria 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Hematêmese 1-sim 2-não <input type="checkbox"/>
Hemoptise 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	
Hematoquezia 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Melena 1-sim 2-não <input type="checkbox"/>

EXAME FÍSICO

Mucosas hipocoradas 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Mucosas ictericas 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>
Hemorragia conjuntival 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Gengivorragia 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>
Petéquia 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Equimose 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>
Hematoma 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>		
Baço na classificação de Hackett		1-I 2-II 3-III 4-IV 5-V	<input type="checkbox"/>
Hepatomegalia 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Dor abdominal 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>

EXAME ULTRA-SONOGRÁFICO

Esplenomegalia na USG 1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>	Volume do baço na USG: <input type="text"/> cm ³
Presença de hematoma subcapsular esplênico?	1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>
Presença de baço(s) acessório(s)?	1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>

EXAMES LABORATORIAIS


Tipo de malária (GE):	1- V 2- F 3- negativo	<input type="checkbox"/>
Tipo de malária (PCR):	1- V 2- F 3- F+V 4- negativo	<input type="checkbox"/>
Parasitemia:	1- <1/2+ 2- 1/2+ 3- + 4- ++ 5- +++ 6- ++++	<input type="checkbox"/>
Esquizontes? 1-sim 2-não 3-não se aplica	<input type="checkbox"/>	Gametócitos? 1-sim 2-não 3-não se aplica <input type="checkbox"/>
Parasitas/100 leucócitos:	<input type="text"/>	Parasitas/ μL :
Bilirrubina total:	<input type="text"/> mg/dL	Glicemia: <input type="text"/> mg/dL
		Creatinina: <input type="text"/> mg/dL
Hemoglobina:	<input type="text"/> g/dL	Hematócrito: <input type="text"/> %
		Leucócitos: <input type="text"/> $\times 10^3/\mu\text{L}$
Linfócitos:	<input type="text"/> %	Monócitos: <input type="text"/> %
		Neutrófilos: <input type="text"/> %
Eosinófilos:	<input type="text"/> %	Bastões: <input type="text"/> %
		Hemácias: <input type="text"/> $\times 10^6/\mu\text{L}$
MCV:	<input type="text"/> μm^3	MCH: <input type="text"/> pg
		MCHCM: <input type="text"/> g/dL
RDW:	<input type="text"/> %	Plaquetas: <input type="text"/> $\times 10^3/\mu\text{L}$
		MPV: <input type="text"/> μm^3
PCT:	<input type="text"/> %	PDW: <input type="text"/> %
TAP:	<input type="text"/> segundos <input type="text"/> % de atividade	RNI: <input type="text"/> TTPA: <input type="text"/> segundos
Tempo de sangramento:	<input type="text"/> segundos	Tempo de coagulação: <input type="text"/> segundos
Prova do laço:	1- Positiva 2-Negativa	<input type="checkbox"/>
Presença de satelitismo plaquetário no esfregaço:	1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>
IgG anti-HIV (ELISA):	1-positivo 2-negativo 3-não-realizado	<input type="checkbox"/>
Anti-HBc total (ELISA):	1-positivo 2-negativo 3-não-realizado	<input type="checkbox"/>
HBsAg (ELISA):	1-positivo 2-negativo 3-não-realizado	<input type="checkbox"/>
Anti-HCV (ELISA):	1-positivo 2-negativo 3-não-realizado	<input type="checkbox"/>
IgM anti-dengue (ELISA):	1-positivo 2-negativo 3-não-realizado	<input type="checkbox"/>

CONCLUSÕES

Preenche algum critério de malária grave da OMS (2000)?	1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>
Teve algum sangramento?	1-sim 2-não	<input type="checkbox"/>
Classificação da contagem de plaquetas:		<input type="checkbox"/>
1-plaquetopenia grave		
2-plaquetopenia moderada		
3-plaquetopenia leve		
4-normal		

ANEXO C

PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO (POP)

	<p>MAL/PLA-POP-001</p> <p>PROCEDIMENTO PARA DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA PELO MÉTODO DE WALKER</p>
<p>Unidade: Gerência de Malária</p> <p>Subunidade: Laboratório de Plaquetologia</p>	
<p>Revisado e aprovado por:</p> <p>Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda (Coordenador do Laboratório de Plaquetologia)</p>	<p>Data:</p> <p>10/03/2005 (DD/MM/AAAA)</p>

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento de diagnóstico da malária pelo método de Walker.

2. ALCANCE

O procedimento se aplica à pesquisa clínica e também ao diagnóstico.

3. RESPONSABILIDADE

Gerente da unidade, coordenador da subunidade e pessoal técnico.

4. DEFINIÇÕES

Método de Walker: técnica padrão recomendada pela Organização Mundial da Saúde e pelo Ministério da Saúde do Brasil para o diagnóstico rotineiro de malária (1).

5. RECURSOS NECESSÁRIOS

5.1 Materiais

5.1.1 Lâmina de vidro limpa desengordurada

5.1.2 Lanceta estéril

5.1.3 Algodão embebido em álcool a 70%

5.1.4 Óleo de imersão

5.2 Equipamentos

5.2.1 Destilador de água

5.2.2 Balança semi-analítica

5.2.3 Microscópio óptico com objetiva de 100x e ocular de 10x (aumento de 1000x)

5.3 Reagentes

Azul de metileno fosfatado

Solução alcoólica de Giemsa estoque

Solução alcoólica de Giemsa diluída 1:10

Água tamponada

5.3.1 Preparação

Azul de metileno fosfatado

Azul de metileno medicinal em pó	$C_{16}H_{18}ClN_3S$	200 mg
Fosfato de sódio monobásico	NaH_2PO_4	600 mg
Fosfato de potássio bibásico	K_2HPO_4	200 mg
Água destilada	H_2O	250 mL

Filtrar para retirar as impurezas.

Solução alcoólica de Giemsa estoque

Corante Giemsa em pó	$C_{14}H_{14}ClN_3S$	750 mg
Álcool metílico PA	CH_3OH	65 mL
Glicerina PA	$CH_2(OH)CH(OH)CH_2OH$	35 mL

Agitar bem (várias vezes por dia) em garrafa contendo pérolas de vidro.

Manter o recipiente tampado em forma de estoque.

Filtrar quando necessário.

Solução alcoólica de Giemsa diluída 1:10

Solução alcoólica de Giemsa estoque	1 gota
Água tamponada	1 mL

Água tamponada

Fosfato bibásico de sódio Na_2HPO_4 6 g

Fosfato monobásico de potássio KH_2PO_4 4 g

Misturar em gral de porcelana.

Diluir 1 g da mistura em 1000 mL de água destilada.

5.3.2 Armazenamento

Os reagentes utilizados nesse procedimento devem ser armazenados em temperatura ambiente.

6. PROCEDIMENTO**6.1 Coleta do sangue**

6.1.1 Identificar a lâmina de vidro com o nome do paciente e o código do serviço.

6.1.2 Limpar a polpa do dedo anelar com algodão embebido em álcool a 70%.

6.1.3 Fazer a punção digital com lanceta estéril.

6.1.4 Desprezar a primeira gota, enxugando-a com gaze ou algodão.

6.1.5 Comprimir o dedo suavemente.

6.1.6 Confeccionar uma gota espessa homogênea de 1,5 x 1,0 cm na lâmina de vidro.

6.1.7 Deixar secar em temperatura ambiente.

6.2 Desemoglobinização

6.2.1 Fazer breve imersão (dois segundos) em solução de azul de metileno fosfatado.

6.2.2 Escorrer o excesso de azul de metileno e lavar a lâmina em água tamponada (sem jato forte).

6.3 Coloração da lâmina

6.3.1 Cobrir a gota com solução alcoólica de Giemsa diluída, por 10 minutos.

6.3.2 Lavar o excesso de corante em água tamponada (sem jato forte).

6.3.3 Deixar secar à temperatura ambiente.

6.4 Determinação da parasitemia

6.4.1 Método de avaliação semi-quantitativa (em cruces)

Examinam-se 100 campos em aumento de 1000 x. Quando houver um número inferior a 40 parasitos nos 100 campos examinados, anotar o número encontrado, por exemplo, 37 V. Quando o número total de parasitos contados situar-se entre 40 e 60 parasitos por 100 campos, registrar +/2 (meia cruz). A partir de um parasito por campo, o resultado será registrado como uma, duas, três ou quatro cruces, conforme o quadro a seguir.

Número de parasitos contados/campo	Parasitemia qualitativa	Parasitemia quantitativa (por mm ³)
40 a 60 por 100 campos	+/2	200-300
1 por campo	+	301-500
2-20 por campo	++	501-10.000
21-200 por campo	+++	10.001-100.000
200 ou mais por campo	++++	> 100.00

6.4.2 Método de avaliação quantitativa relativa à contagem de leucócitos por campo

Examina-se um número de campos que leve ao alcance de 100 leucócitos em aumento de 1000x. Contar simultaneamente o número de parasitos assexuados, até alcançar 100 leucócitos. A seguir, realiza-se uma regra de três para obter a parasitemia/ μ L de sangue, tendo-se como base o número de leucócitos/ μ L, a partir do leucograma automatizado realizado em cada paciente. Por exemplo, se encontrarmos 50 parasitos assexuados em 100 leucócitos, teremos x parasitos/ μ L para 6000 leucócitos/ μ L (resultado do leucograma). Assim, x é igual a $(6000 \times 50) / 100$, ou seja, 3000 parasitos/ μ L.

7. RESTRIÇÕES E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

A sensibilidade da técnica é de 5-10 parasitos/ μ L e tem grande variação inter-observador. A técnica requer experiência para a identificação de espécies, uma vez que a morfologia do parasito altera-se durante o processo de desmembramento. Requer processamento parcial ou total relativamente rápido depois de coletada a amostra, para evitar a fixação de hemoglobina, a supercoloração ou a descoloração.

8. BIOSSEGURANÇA

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (2).

9. DOCUMENTOS RELACIONADOS

Não se aplica.

10. JUSTIFICATIVA DE MUDANÇAS NO DOCUMENTO ATUAL

Não se aplica.

11. PADRONIZAÇÃO ORIGINAL DO PROCEDIMENTO


Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.

12. ANEXOS

Não se aplica.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde; 2005.
2. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

	<p style="text-align: center;">MAL/MOL-POP-001</p> <p style="text-align: center;">PROCEDIMENTO PARA REALIZAÇÃO DE PCR PARA DETECÇÃO DE PLASMÓDIO</p>
<p>Unidade: Gerência de Malária</p> <p>Subunidade: Laboratório de Biologia Molecular</p>	
<p>Revisado e aprovado por:</p> <p>Dr. Pedro Paulo Ribeiro Vieira (Coordenador do Laboratório de Biologia Molecular)</p>	<p>Data:</p> <p>15/10/1999 (DD/MM/AAAA)</p>

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento de realização de PCR para detecção de plasmódio. Para a detecção dos dois principais parasitos que infectam humanos, foi padronizada uma reação de *nested PCR* baseada no gene que codifica a pequena sub-unidade do rRNA (1). O limiar de detecção da técnica é muito superior ao da gota espessa (técnica padrão utilizada no diagnóstico rotineiro da malária), cerca de 0,004 parasitos/ μ L.

2. ALCANCE

O procedimento se aplica apenas a protocolos de pesquisa clínica.

3. RESPONSABILIDADE

Gerente da unidade, coordenador da subunidade e pessoal técnico.

4. DEFINIÇÕES

PCR: a reação em cadeia da polimerase é definida como uma técnica molecular que permite a amplificação de pequenas quantidades de um DNA específico a partir de um molde do DNA, usando uma reação enzimática simples, sem um organismo vivo, tal como *E. coli* ou fermento.

PCR aninhado (nested PCR): quando uma segunda reação de PCR é realizada a partir do produto de uma reação de PCR anterior.

Iniciador (primer): uma pequena seqüência de DNA ou RNA a partir da qual pode começar a replicação do DNA.

5. RECURSOS NECESSÁRIOS

5.1 Papa de hemácias ou sangue total de paciente a ser testado.

5.2 Materiais

5.2.1 Tubos de vidro de 4,5mL, com K₂EDTA, para a coleta de sangue a vácuo (BD Vacutainer®)

5.2.2 Garrote

5.2.3 Adaptador de plástico para tubo de coleta a vácuo

5.2.4 Pipetas automáticas de 20 µL, 200 µL e 1000 µL

5.2.5 Ponteiras protegidas para pipetas automáticas

5.2.6 Mini kit QIAGEN® QIAamp DNA blood

5.2.7 Tubos para microcentrifuga de 1,5 mL

5.3 Equipamentos

5.3.1 Banho-maria

5.3.2 Centrífuga

5.3.3 Termociclador

5.3.4 Transiluminador com luz ultravioleta (UV)

5.3.5 *Scanner*

5.4 Reagentes

PBS 1x

Protease QIAGEN®

Tampão AL

Etanol 96-100%

Tampão AW1

Tampão AW2

Tampão AE

Iniciadores (*primers*) da reação primária:

PLU6 - 5' TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG 3'

PLU5 - 5' CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC 3'

Iniciadores (*primers*) da reação secundária:

Plasmodium vivax

VIV1 – 5' CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC 3'

VIV2 – 5' ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA 3'

Plasmodium falciparum

FAL1 – 5' TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT 3'

FAL2 – 5' ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC 3'

Agarose 2%

Brometo de etídio

Tampão TBE

5.5.1 Preparação

PBS 10x

Fosfato de sódio bibásico	Na ₂ HPO ₄	11,94 g
Fosfato de sódio hidratado	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2,56 g
Cloreto de sódio	NaCl	87,66 g
Água destilada	H ₂ O	1 L

Adicionar aproximadamente 900 mL de água destilada estéril em um Erlenmeyer.

Colocar o fosfato de sódio e o fosfato de sódio hidratado até que se dissolvam completamente.

Ajustar o pH para 7,2-7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

Depois de ajustar o pH, adicionar o NaCl até que se dissolva completamente.

Ajustar para 1 L com água destilada.

Fracionar em frascos para armazenamento de reagentes estéreis.

PBS 1x

Fazer uma diluição 1:10 com água destilada.

Ajustar o pH para 7,2-7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

5.6.2 Armazenamento

Os reagentes utilizados nesse procedimento devem ser armazenados entre 2 e 8° C.

6. PROCEDIMENTO**6.1 Obtenção da papa de hemácias**

6.1.1 Coleta do sangue venoso a vácuo.

6.1.2 Centrifugar o sangue coletado a 1000 g por 15 minutos.

6.1.3 Retirar do fundo a papa de hemácias.

6.1.4 Armazenar a -70°C.

Opcionalmente se pode utilizar o sangue total do paciente, apesar disso aumentar a possibilidade de contaminação da reação com DNA humano dos leucócitos.

6.2 Extração de DNA

6.2.1 Adicionar 20 µL de protease QIAGEN® (ou proteinase K) e 200 µL da amostra em um tubo (se a amostra for menor que 200 µL completar com PBS).

6.2.2 Adicionar 200 µL de tampão AL à mistura. Agitar em vórtex por 15 segundos (não adicionar QIAGEN protease ou proteinase K diretamente ao tampão AL).

6.2.3 Incubar a 56°C por 10 minutos.

6.2.4 Centrifugar os tubos a 8000 rpm por 10 s, para remover as gotículas da tampa.

6.2.5 Adicionar 200 µL de etanol (96-100%) à amostra e misturar novamente em vórtex por 15 segundos. Após misturar, centrifugar novamente a 8000 rpm por 10 s, para remover as gotículas da tampa.

6.2.6 Aplicar cuidadosamente a mistura formada à coluna de centrifugação (em um tubo coletor de 2 mL), sem molhar as bordas.

6.2.7 Tampar e centrifugar a 8000 rpm, por 1 minuto.

6.2.8 Colocar a coluna em um tubo coletor novo e descartar o que contém o filtrado.

6.2.9 Abrir a coluna cuidadosamente e adicionar 500µL de tampão AW1 sem molhar as

bordas.

6.2.10 Tampar e centrifugar a 8000 rpm, por 1 minuto.

6.2.11 Colocar a coluna em um tubo coletor novo de 2 mL, e descartar o tubo coletor com o filtrado.

6.2.12 Abrir cuidadosamente a coluna e adicionar 500 µL de tampão AW2 sem molhar as bordas.

6.2.13 Tampar e centrifugar na velocidade máxima (14000 rpm), por 3 minutos.

6.2.14 Incubar a coluna com tampão AE ou água, por 5 minutos, em temperatura ambiente.

6.2.15 Para estocar o DNA por longo tempo, eluir com tampão AE e armazenar a – 20°C.

6.3 Reação em cadeia da polimerase aninhada (*nested PCR*)

Os iniciadores (*primers*) usados na reação primária amplificam um fragmento de 1,2 Kb comum a todas as quatro espécies de plasmódio que causam doença no homem. Esta etapa primária é seguida de uma secundária, que usa iniciadores espécie-específicos para *P. vivax* e *P. falciparum*.

6.3.1 Reação primária

Extrato de DNA	9 µL
Tampão de PCR	1x
MgCl ₂	3,6 mM
dNTPs	125 µM de cada dNTP
Iniciador PLU5	250 nM
Iniciador PLU6	250 nM
Taq DNA polimerase	1,5 U
H ₂ O para PCR qsp	50 µL

Condições de amplificação no termociclador:

1: 95°C/5 minutos

2: 55°C/2 minutos

3: 72°C/2 minutos

4: 94°C/1 minuto

5: 72°C/5 minutos

6: 20°C - total de 30 ciclos

6.3.2 Reação secundária

Produto da reação primária	2 µL
Tampão de PCR	1x
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	125 µM de cada dNTP
Iniciador de avanço	250 nM (VIV1 ou FAL1)
Iniciador de retorno	250 nM (VIV2 ou FAL2)
Taq DNA polimerase	1,5 U
H ₂ O para PCR qsp	20 µL

Condições de amplificação no termociclador:

1: 95°C/5 minutos

2: 55°C/2 minutos

3: 72°C/2 minutos

4: 94°C/1 minuto

5: 72°C/5 minutos

6: 20°C - total de 30 ciclos

6.3.3 Para evitar a contaminação das amostras com produtos de reações anteriores, as salas e equipamentos utilizados na preparação das amostras devem ser diferentes daqueles usados no manuseio dos produtos amplificados.

6.3.4 Em cada reação, é realizado um controle negativo e um controle positivo (padrões do laboratório).

6.3.5 Os produtos da amplificação da reação secundária são aplicados em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio, e depois da corrida dos produtos em eletroforese, em tampão TBE 1x, a observação é feita em transiluminador, sob luz ultravioleta. A imagem pode ser varrida por *scanner*, para arquivamento.

6.3.6 Obtém-se, ao final da reação primária, um fragmento de DNA de 1,2 Kb; ao final da

reação secundária, um fragmento de DNA de 205 pb (*P. falciparum*) ou 120 pb (*P. vivax*).

7. RESTRIÇÕES E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Como se faz a amplificação de DNA, a técnica não permite distinguir as diferentes formas biológicas do parasito (trofozoíto, esquizonte, merozoíto ou gametócito). Existe a possibilidade de contaminação da reação no momento da extração do DNA e no momento da amplificação, dada a sensibilidade de amplificação da técnica.

8. BIOSSEGURANÇA

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (2).

9. DOCUMENTOS RELACIONADOS

Não se aplica.

10. JUSTIFICATIVA DE MUDANÇAS NO DOCUMENTO ATUAL

Não se aplica.

11. PADRONIZAÇÃO ORIGINAL DO PROCEDIMENTO


Laboratório de Biologia Molecular da Gerência de Malária da FMT-AM.

12. ANEXOS

Não se aplica.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993;61:315-20.
2. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

	MAL/PLA-POP-002 PROCEDIMENTO PARA ISOLAMENTO DE IMUNOCOMPLEXOS CIRCULANTES NO SORO E ELUIÇÃO DE IgG
Unidade: Gerência de Malária Subunidade: Laboratório de Plaquetologia	
Revisado e aprovado por: Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda (Coordenador do Laboratório de Plaquetologia)	Data: 10/02/2005 (DD/MM/AAAA)

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento de isolamento de imunocomplexos circulantes (ICC) no soro e eluição de IgG dos mesmos.

2. ALCANCE

O procedimento se aplica apenas à pesquisa clínica e experimental.

3. RESPONSABILIDADE

Gerente da unidade, coordenador da subunidade e pessoal técnico.

4. DEFINIÇÕES

Imunocomplexo circulante (ICC): produto de uma reação antígeno-anticorpo, que também pode conter componentes do sistema complemento, encontrado no soro

IgG: imunoglobulina (anticorpo), monomérica, geralmente encontrada no soro (parte da imunidade humoral)

Poli(etil)enoglicol (PEG): polímero formado pela adição de óxido de etileno e água, mais conhecido por ser um adjuvante farmacotécnico, e que quando adicionado ao soro, faz precipitar os imunocomplexos circulantes

Proteína G: proteína bacteriana (estreptocócica) que se liga com alta afinidade à porção Fc de várias classes e subclasses de imunoglobulinas, de várias espécies

5. RECURSOS NECESSÁRIOS

5.1 Materiais

5.1.1 Tubos de vidro de 4,5 mL, com gel separador, para a coleta de sangue a vácuo (BD Vacutainer®)

5.1.2 Garrote

5.1.3 Adaptador de plástico para tubo de coleta a vácuo

5.1.4 Pipetas automáticas de 20 µL, 200 µL e 1000 µL

5.1.5 Ponteiras para pipetas automáticas

5.1.6 Pipetas tipo Pasteur

5.1.7 Tubos de ensaio de 5 mL

5.2 Equipamentos

5.2.1 Destilador de água

5.2.2 Balança semi-analítica

5.2.3 Geladeira ou câmara fria

5.2.4 Centrífuga refrigerada

5.2.5 Agitador

5.3 Reagentes

PBS 1x

Tampão de EDTA

Tampão de borato

PEG

PBS/azido

Proteína G em gel de agarose 4% (Sigma®)

Tampão de lavagem

Tampão de eluição

Solução neutralizante

5.3.1 Preparação

PBS 10x

Fosfato de sódio bibásico	Na_2HPO_4	11,94 g
Fosfato de sódio hidratado	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,56 g
Cloreto de sódio	NaCl	87,66 g
Água destilada	H_2O	1 L

Adicionar aproximadamente 900 mL de água destilada estéril em um Erlenmeyer.

Colocar o fosfato de sódio e o fosfato de sódio hidratado até que se dissolvam completamente.

Ajustar o pH para 7,2-7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

Depois de ajustar o pH, adicionar o NaCl até que se dissolva completamente.

Ajustar para 1 L com água destilada.

Fracionar em frascos para armazenamento de reagentes estéreis.

PBS 1x

Fazer uma diluição 1:10 com água destilada.

Ajustar o pH para 7,2-7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

Tampão de EDTA 0,2 M

EDTA dissódico	$\text{Na}_2 \cdot \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	6,7 g
PBS 1x		100 mL

Ajustar o pH para 7,4 com NaOH.

Tampão de borato 0,1 M

Ácido bórico	H_3BO_3	6,2 g
Borato de sódio anidro	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	9,5 g
Água destilada	H_2O	1 L

Ajustar o pH para 8,4 com H_3BO_4 0,1 M.

PEG 6%

PEG		6 g
Tampão de borato		100 mL

PBS/azido 0,1%

Azido de sódio	NaN_3	2 g
PBS 1x		200 mL

Tampão de lavagem

Fosfato de sódio bibásico	Na_2HPO_4	1,55 g
Cloreto de sódio	NaCl	15,9 g
EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	2,92 g
Água destilada	H_2O	1 L

Ajustar o pH para 7,0.

Tampão de eluição

Ácido acético glacial 2% PA	CH_3COOH	150 μL
Água destilada	H_2O	9850 μL

Ajustar o pH para 3,0 com NaOH 1 N.

Solução neutralizante

Tris base	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	1210 mg
Água destilada	H_2O	10 mL

5.3.2 Armazenamento

Os reagentes utilizados nesse procedimento devem ser armazenados à temperatura de 2 – 8° C.

6. PROCEDIMENTO**6.1 Obtenção do soro**

6.1.1 Coleta do sangue venoso a vácuo, evitando-se hemólise, sucção excessiva e contaminação por fluidos teciduais.

6.1.2 Aguardar cerca de 20 minutos para a coagulação do sangue.

6.1.3 Centrifugar o sangue coletado a 1000g por 15 minutos.

6.1.4 Retirar o soro.

6.1.5 Armazenar a -20°C .

6.2 Isolamento dos ICC's

6.2.1 Misturar em um tubo de ensaio 50 μL de soro, 150 μL de tampão de EDTA e 1 mL de PEG 6%.

6.2.2 Incubar a 4°C por 12 horas.

6.2.3 Centrifugar a 3000 g por 15 minutos, a 4°C .

6.2.4 Descartar o sobrenadante por inversão simples.

6.2.5 Lavar o *pellet* com PEG 6% duas vezes, centrifugando a 2500 g, por 20 minutos.

6.2.6 Re-suspender o *pellet* em 200 μL de PBS/azido 0,1%.

6.2.7 Deixar em temperatura ambiente por 20 minutos.

6.2.8 Dosar o conteúdo protéico pelo método do biureto (ver MAL/PLA-POP-003).

6.3 Eluição do IgG dos ICC's

6.3.1 A solução que contém o IgG deve ser diluída para uma concentração de 5 mg/mL ou menos e seu pH ajustado para 6,5-7,5.

6.3.2 Calcular a quantidade de agarose necessária para a eluição de IgG na amostra, considerando que a saturação é de cerca de 20 mg de IgG/mL de gel de agarose com proteína G. Assim, deve-se estimar previamente a quantidade de IgG que se quer eluir.

6.3.3 Misturar o gel e a solução e deixar durante 1 hora, em leve agitação, em temperatura ambiente.

6.3.4 Lavar em microcentrífuga, três vezes, em 500 μL do tampão de lavagem.

6.3.5 Adicionar 150 μL do tampão de eluição e deixar em leve agitação por 15 minutos.

6.3.6 Adicionar a quantidade de solução neutralizante suficiente para neutralizar o pH. Para cada 1 mL de tampão de eluição, deve-se adicionar 550 μL de solução neutralizante.

Calcular a quantidade necessária por regra de três simples.

6.3.7 Dosar o conteúdo protéico do eluído pelo método do biureto (ver MAL/PLA-POP-003).

O gel de agarose pode ser re-utilizado desde que lavado com uma solução de ácido acético 1 M, pH 2,5.

7. RESTRIÇÕES E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Os ICC's estudados podem se tratar de ICC's com IgM, assim, deve-se utilizar a proteína M para a sua eluição.

8. BIOSSEGURANÇA

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (1).

9. DOCUMENTOS RELACIONADOS

MAL/PLA-POP-003: procedimento para dosagem de proteínas pelo método do biureto

10. JUSTIFICATIVA DE MUDANÇAS NO DOCUMENTO ATUAL

Não se aplica.

11. PADRONIZAÇÃO ORIGINAL DO PROCEDIMENTO


Divisão de Hematologia da Universidade de Nova York (EUA).

12. ANEXOS

Não se aplica.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

	<p style="text-align: center;">MAL/PLA-POP-003</p> <p style="text-align: center;">PROCEDIMENTO PARA DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DO BIURETO</p>
<p>Unidade: Gerência de Malária</p> <p>Subunidade: Laboratório de Plaquetologia</p>	
<p>Revisado e aprovado por:</p> <p>Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda (Coordenador do Laboratório de Plaquetologia)</p>	<p>Data:</p> <p>10/02/2005 (DD/MM/AAAA)</p>

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento de dosagem de proteínas totais pelo método do biureto.

2. ALCANCE

O procedimento se aplica à pesquisa clínica e experimental e ao diagnóstico.

3. RESPONSABILIDADE

Gerente da unidade, coordenador da subunidade e pessoal técnico.

4. DEFINIÇÕES

Biureto: solução de sulfato de cobre utilizada para a dosagem de proteínas, pela sua capacidade de se tornar violácea, na presença das mesmas.

5. RECURSOS NECESSÁRIOS

5.1 Solução em que se deseja dosar a concentração de proteínas totais.

5.2 Materiais

5.2.1 Pipetas automáticas de 20 µL e 200 µL

5.2.2 Ponteiras para pipetas automáticas

5.2.3 Tubos de ensaio de 5 mL

5.3 Equipamentos

5.3.1 Espectrofotômetro para leitura a 530 nm

5.4 Reagentes

Sulfato de cobre (biureto)

Sulfato de sódio

Albumina

5.4.1 Preparação

Sulfato de cobre 6 g/L (biureto)

Solução padrão comercial Merck®

Sulfato de sódio 22,6%

Sulfato de sódio

NaHSO₃

22,6g

Água destilada

H₂O

100mL

5.4.2 Armazenamento

Os reagentes utilizados nesse procedimento devem ser armazenados em temperatura ambiente, exceto a albumina, que deve permanecer armazenada entre 2 e 8°C.

6. PROCEDIMENTO

6.1 Dosagem de proteínas totais

6.1.1 Pipetar em tubos de ensaio identificados e homogeneizar:

	Branco	Teste	Padrão
Sulfato de sódio 22,6%	1 mL	—	—
Teste	—	250 µL	—
Albumina*	—	—	1 mL
Biureto	4 mL	4 mL	4 mL

* Fazer 3 diluições conhecidas de albumina, em PBS.

6.1.2 Deixar os tubos em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente.

6.1.3 Fazer a leitura em espectrofotômetro com filtro a 530 nm, zerando com o branco.

6.1.4 A absorbância lida no tubo teste deve ser subtraída da absorbância do branco.

6.1.5 Construir uma curva padrão de absorbância por concentração de albumina e estimar uma equação linear, por meio da qual se calcula a concentração de proteínas no tubo teste, a partir do valor da absorbância.

7. RESTRIÇÕES E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Embora altamente específico para peptídios e proteínas, o método de biureto está sujeito a interferências por parte de compostos presentes nas amostras que reajam com Cu^{2+} (por exemplo, açúcares redutores) e outros que possuam grupos $-\text{CO}-\text{NH}-$ (por exemplo, uréia). Entretanto, estas interferências geralmente são detectadas apenas na leitura ao espectrofotômetro a 270 nm. Este método apresenta como principal vantagem o fornecimento de resultados semelhantes para proteínas diferentes, e como principal defeito a sua baixa sensibilidade (1).

8. BIOSSEGURANÇA

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (2).

9. DOCUMENTOS RELACIONADOS

Não se aplica.

10. JUSTIFICATIVA DE MUDANÇAS NO DOCUMENTO ATUAL

Não se aplica.

11. PADRONIZAÇÃO ORIGINAL DO PROCEDIMENTO


Laboratório de Sorologia da Gerência de Malária da FMT-AM.

12. ANEXOS

Não se aplica.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Zaia DAM, Zaia CTBV, Lichtig J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. Quim Nova 1998;21:787-93.
2. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

	<p>MAL/PLA-POP-004</p> <p>PROCEDIMENTO PARA INDUÇÃO DE PLAQUETOPENIA EM CAMUNDONGOS C57BL/6</p>
<p>Unidade: Gerência de Malária</p> <p>Subunidade: Laboratório de Plaquetologia</p>	
<p>Revisado e aprovado por:</p> <p>Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda (Coordenador do Laboratório de Plaquetologia)</p>	<p>Data:</p> <p>18/02/2005 (DD/MM/AAAA)</p>

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento de indução de plaquetopenia mediada por anticorpos em camundongos C57BL/6.

2. ALCANCE

O procedimento se aplica apenas à pesquisa experimental em camundongos.

3. RESPONSABILIDADE

Gerente da unidade, coordenador da subunidade e pessoal técnico.

4. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

5. RECURSOS NECESSÁRIOS

5.1 Camundongos (*Mus musculus*) isogênicos da linhagem C57BL/6

5.2 Indutor de destruição plaquetária

5.3 Materiais

5.3.1 Éter em vidro com gaze

5.3.2 Pinça

5.3.3 Seringas de 1 mL com agulhas hipodérmicas

5.3.4 Unopettes® (BD®) para contagem de plaquetas

5.3.5 Câmara de Neubauer

5.3.6 Contador de células

5.4 Equipamentos

5.4.1 Microscópio óptico com lente objetiva de aumento de 100x

6. PROCEDIMENTO

6.1 Injeção de solução com indutor de destruição plaquetária

6.1.1 Sedar o animal em vidro fechado com gaze e éter por 30 segundos.

6.1.2 Injetar a solução no peritônio com seringa de 1 mL (volume variável, dependendo da concentração de da solução) (Figura 1).

6.1.3 Massagear o peritônio do animal.

6.2 Contagem de plaquetas

6.2.1 As plaquetas são contadas antes da injeção intraperitoneal e 2 e 4 horas após.

6.2.2 Sedar o animal novamente em vidro fechado com gaze e éter por 30 segundos.

6.2.3 Coletar 10 µL de sangue venoso do seio orbital, lateralmente, através da ponta da pipeta capilar do Unopette® (Figura 2).

6.2.4 Com a ponta da capa da pipeta capilar, perfurar o diafragma do reservatório plástico com diluente (Figura 3).

6.2.5 Aspirar o sangue contido no capilar, lavando várias vezes o mesmo com o diluente, que faz uma diluição de 1:100 do sangue aspirado e lisa hemácias e leucócitos (Figura 4).

6.2.6 A seguir, misture o sangue com o diluente (Figura 5).

6.2.7 Com o próprio Unopette®, encher a câmara de Neubauer coberta com a lamínula (Figura 6).

6.2.8 Deixar a câmara de Neubauer coberta com a lamínula dentro de uma placa de Petri fechada com uma gaze úmida (câmara úmida) por 30 minutos (Figura 7).

6.2.9 Contar em microscópio óptico com aumento de 1000x o número de plaquetas em 5 campos menores do centro da câmara de Neubauer, utilizando um contador de células (Figura 8).

6.2.10 Multiplicar então o número de plaquetas contadas nos 5 campos por 5, dividir pelo volume da área central (0,1 μ L), multiplicar pelo fator de diluição (100). Assim, obtém-se o número de plaquetas/ μ L.

6.2.11 Considera-se a solução como indutora de plaquetopenia quando há queda de mais de 20% da contagem basal do número de plaquetas.

6.3 Eutanásia dos animais

6.3.1 Sedar o animal novamente em vidro fechado com gaze e éter por 30 segundos.

6.3.2 Realizar o estiramento cervical com pinça, por pessoa experiente.

7. RESTRIÇÕES E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

A contagem de plaquetas em câmara de Neubauer pode subestimar o número de plaquetas caso haja agregação no momento da contagem ou contagem errônea de partículas ou debris celulares.

8. BIOSSEGURANÇA

Todo o procedimento deve se realizar observando-se as considerações éticas de experimentação em animais (1, 2).

9. DOCUMENTOS RELACIONADOS

Não se aplica.

10. JUSTIFICATIVA DE MUDANÇAS NO DOCUMENTO ATUAL

Não se aplica.

11. PADRONIZAÇÃO ORIGINAL DO PROCEDIMENTO

Divisão de Hematologia da Universidade de Nova York (EUA).

12. ANEXOS

Figuras

13. BIBLIOGRAFIA

1. Cardoso CVP. Leis Referentes à Experimentação Animal no Brasil - Situação Atual. 2004 [acesso em 18 de fevereiro de 2005]; Disponível em:
<http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>
2. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. J Am Vet Med Assoc 2001;218:669-96.

ANEXO

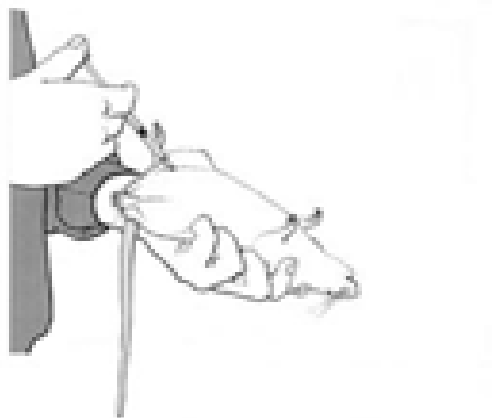


Figura 1. Injeção intraperitoneal

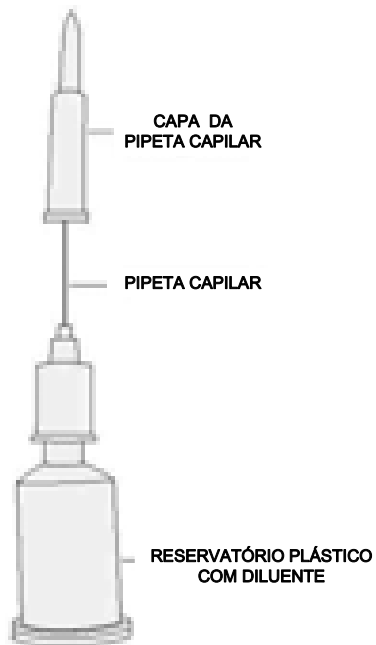


Figura 2. Pipeta capilar do Unopette®

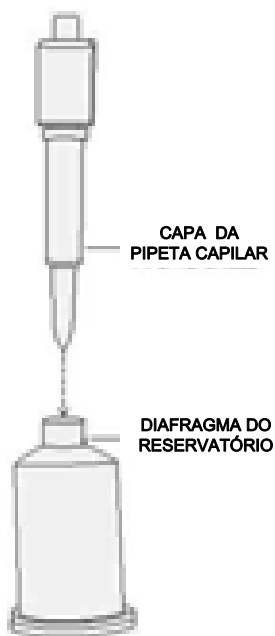


Figura 3. Reservatório plástico com diluente

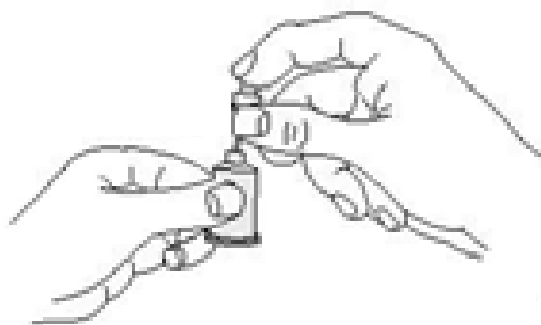


Figura 4. Aspiração do sangue no capilar



Figura 5. Diluição do sangue com o diluente

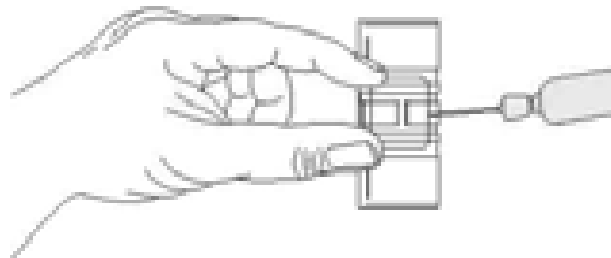


Figura 6. Preenchimento da câmara de Neubauer

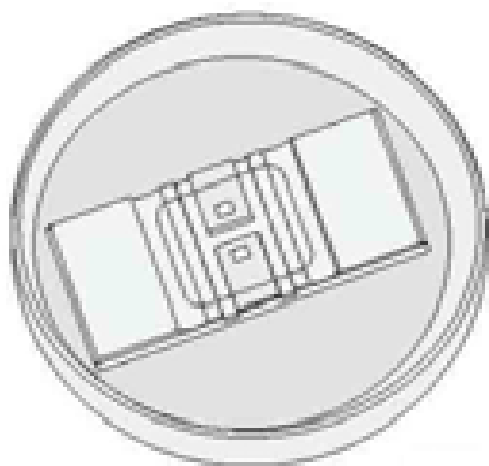


Figura 7. Câmara úmida em placa de Petri

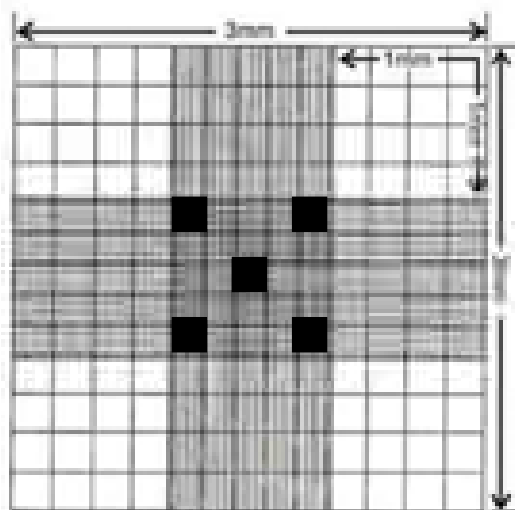



Figura 8. Contagem de plaquetas em 5 campos

	<p style="text-align: center;">MAL/PLA-POP-005</p> <p style="text-align: center;">PROCEDIMENTO PARA FAGOCITOSE DE PLAQUETAS</p>
<p>Unidade: Gerência de Malária</p> <p>Subunidade: Laboratório de Plaquetologia</p>	
<p>Revisado e aprovado por:</p> <p>Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda (Coordenador do Laboratório de Plaquetologia)</p>	<p>Data:</p> <p>10/02/2005 (DD/MM/AAAA)</p>

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento de fagocitose de plaquetas por células THP-1.

2. ALCANCE

O procedimento se aplica apenas à pesquisa experimental.

3. RESPONSABILIDADE

Gerente da unidade, coordenador da subunidade e pessoal técnico.

4. DEFINIÇÕES

Fagocitose: processo no qual partículas estranhas são envolvidas e destruídas por células especializadas ou fagócitos

THP-1: linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana (1)

PMA: forbol 12-miristato 13-acetato, potente estimulador da NADPH oxidase, que promove a diferenciação das células THP-1 em células macrófago-símile (2)

CMFDA: diacetato de 5-clorometilfluoresceína, marcador fluorescente verde lipofílico, que entra no citoplasma das células e, por conta de ligações covalentes, não volta ao extracelular

Citometria de fluxo: Técnica biofísica de análise qualitativa e quantitativa de partículas, biológicas ou não, em suspensão monodispersa em meio líquido

5. RECURSOS NECESSÁRIOS

5.1 Materiais

5.1.1 Células THP-1 mantidas em meio de cultura RPMI 1640 com SFB 10% a 37°C

5.1.2 Placa de cultura de tecido com 6 escavações

5.1.3 Tubos de vidro siliconados de 4,5 mL, com citrato de sódio a 3,2%, para a coleta de sangue a vácuo (BD Vacutainer®)

5.1.4 Garrote

5.1.5 Adaptador de plástico para tubo de coleta a vácuo

5.1.6 Pipetas automáticas de 20 µL, 200 µL e 1000 µL

5.1.7 Ponteiras para pipetas automáticas

5.1.8 Coluna de plástico com filtro

5.1.9 Pipetas tipo Pasteur

5.1.10 Tubos de ensaio de polipropileno de 5 mL

5.1.11 Gelo

5.2 Equipamentos

5.2.1 Destilador de água

5.2.2 Balança semi-analítica

5.2.3 Estufa a 37°C

5.2.4 Centrífuga refrigerada

5.2.5 Capela de fluxo laminar

5.2.6 Bomba a vácuo

5.2.7 Agitador

5.2.8 Citômetro de fluxo (BD FACSCalibur®)

5.2.9 Câmara de Neubauer

5.3 Reagentes

PBS 1x

Meio de cultura RPMI 1640 (Gibco BRL®)

Soro fetal bovino (SFB) 10%

PMA 10 µM

CellTracker® Green CMFDA (Molecular Probes – Invitrogen®) 50 µg/frasco

DMSO

Solução BSGC

Gel de sefarose 2B

Paraformaldeído 4%

5.3.1 Preparação

PBS 10x

Fosfato de sódio bibásico	Na ₂ HPO ₄	11,94 g
Fosfato de sódio hidratado	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2,56 g
Cloreto de sódio	NaCl	87,66 g
Água destilada	H ₂ O	1 L

Adicionar aproximadamente 900mL de água destilada estéril em um Erlenmeyer.

Colocar o fosfato de sódio e o fosfato de sódio hidratado até que se dissolvam completamente.

Ajustar o pH para 7,2-7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

Depois de ajustar o pH, adicionar o NaCl até que se dissolva completamente.

Ajustar para 1 L com água destilada.

Fracionar em frascos para armazenamento de reagentes estéreis.

PBS 1x

Fazer uma diluição 1:10 com água destilada.

Ajustar o pH para 7,2-7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

SFB 10%

Soro fetal bovino (solução estoque - Gibco BRL®)	10 mL
RPMI 1640	90 mL

PMA 10µM

Solução estoque de PMA 100 µg/mL (Sigma®)	120 µL
Soro fetal bovino 10%	20 mL

Durante as manipulações do PMA, fazê-las em condições de baixa luminosidade.

Tampão BSGC

Fosfato de sódio bibásico	Na_2HPO_4	1.220 mg
Fosfato de potássio	KH_2PO_4	217,7 mg
Cloreto de sódio	NaCl	7,0 g
EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	263 mg
Citrato de sódio	$\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,0 g
Glicose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	2,0 g
Água destilada	H_2O	1 L

Ajustar o pH para 7,3 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

5.3.2 Armazenamento

Os reagentes utilizados nesse procedimento devem ser armazenados à temperatura de 2 – 8° C, exceto o CMFDA, que deve permanecer armazenado a -20°C, sem exposição à luz.

6. PROCEDIMENTO

6.1 Separação das plaquetas

6.1.1 Coleta do sangue venoso a vácuo, evitando-se hemólise, sucção excessiva e contaminação por fluidos teciduais.

6.1.2 Inverter gentilmente para misturar o anticoagulante.

6.1.3 Centrifugar o sangue coletado a 130 g por 10 minutos.

6.1.4 Retirar o PRP.

6.1.5 Lavar a coluna de sefarose 2B com tampão BSGC.

6.1.6 Pipetar com pipeta tipo Pasteur o PRP obtido pela centrifugação na coluna com gel de sefarose 2B e aguardar a filtração no gel, por gravidade. Após cerca de 30 minutos, coletar, com tubo de ensaio, o concentrado de plaquetas, gota a gota (líquido opaco que se forma pela filtração no gel).

6.1.7 Contar o número de plaquetas por método automatizado ou em câmara de Neubauer (MAL/PLA-POP-004).

6.1.8 Armazenar a 4°C até a marcação com CMFDA.

6.2 Marcação das plaquetas com CMFDA

6.2.1 Preparar uma diluição de $6,4 \times 10^7$ plaquetas/mL de BSGC.

6.2.2 Deixar o frasco de CMFDA em temperatura ambiente por 20 minutos e reconstituir em DMSO (dimetilsulfóxido anídrico).

6.2.3 Colocar em um tubo de ensaio 5 mL da diluição e adicionar 50 µg de CMFDA (concentração final de 21,5 µM de CMFDA).

6.2.4 Deixar à temperatura ambiente, protegido da luz, por 60 minutos, com leve agitação.

6.2.5 Lavar duas vezes com 5mL de BSGC (centrifugar a 1000 g por 7 minutos, a 4°C).

6.2.6 Deixar em temperatura ambiente, protegido da luz, por 60 minutos, para eliminar o excesso de CMFDA.

6.2.7 Contar o número de plaquetas marcadas finais por método automatizado ou manualmente, em câmara de Neubauer.

6.2.8 Armazenar a 4°C até o teste de fagocitose.

6.3 Estimulação das células THP-1

6.3.1 Lavar as células (centrifugação a 228 g por 10 minutos) com PBS 1x, três vezes.

6.3.2 Incubar as células (em concentração de 5×10^5 células/mL – usar câmara de Neubauer para contagem), em placa de cultura de tecidos com 6 escavações, com RPMI 1640 enriquecido com SFB 10% e PMA 10 µM, por 72 horas, a 37°C. Colocar, em capela de fluxo laminar, 3 mL em cada escavação. O número de escavações depende do número de testes de fagocitose que se deseja realizar.

6.4 Teste de fagocitose

6.4.1 Em capela de fluxo laminar, após 72 horas de incubação com PMA, aspirar o sobrenadante em cada escavação da placa de cultura.

6.4.2 Lavar cada escavação três vezes com 3 mL de PBS 1x.

6.4.3 Adicionar 10×10^6 plaquetas marcadas com CMFDA, diluídas em 3 mL de BSGC, em cada escavação.

6.4.4 Incubar a placa a 37°C por 60 minutos.

6.4.5 A fagocitose pode ser interrompida colocando-se a placa em uma vasilha com gelo.

6.5 Leitura da fagocitose com citometria de fluxo

6.5.1 Com a adição de EDTA ao tampão BSGC, as células THP-1 ativadas pelo PMA, durante a fagocitose, se destacam da superfície da placa e devem ser diretamente aspiradas e transferidas para um tubo de ensaio.

6.5.2 Contar o número de células THP-1 em câmara de Neubauer e fazer uma diluição em PBS para a leitura em citometria de fluxo (1×10^6 células/mL). A leitura pode ser realizada com 0,5 mL.

6.5.3 Caso a leitura não for realizada imediatamente, fixar as células com paraformaldeído 4%.

6.5.4 Em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur®), fazer uma seleção prévia (*gating*) das células THP-1, pelo volume (*forward scatter*/FSC-H) e pela densidade interna das células contidas no tubo de ensaio (*side scatter*/SSC-H), excluindo-se, portanto, as plaquetas marcadas não fagocitadas.

6.5.5 Fazer e leitura no canal de fluorescência 1 (FL1-H).

6.5.6 A variável analisada foi a média de fluorescência emitida em FL1-H por cada célula THP-1 contada no *gate*.

7. RESTRIÇÕES E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

As células marcadas com CMFDA ficam fluorescentes e viáveis por até 24 horas.

A fluorescência medida pela citometria de fluxo nas células THP-1 corresponde não apenas às plaquetas internalizadas durante a fagocitose, mas também às plaquetas aderidas à superfície das células THP-1.

8. BIOSSEGURANÇA

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (3).

9. DOCUMENTOS RELACIONADOS

MAL/PLA-POP-004: indução de plaquetopenia em camundongos C57BL/6

10. JUSTIFICATIVA DE MUDANÇAS NO DOCUMENTO ATUAL

Não se aplica.

11. PADRONIZAÇÃO ORIGINAL DO PROCEDIMENTO


Laboratório de Plaquetologia da Gerência de Malária da FMT-AM.

12. ANEXOS

Não se aplica.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 1991;47:22-31.
2. Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y. Production of proinflammatory cytokines by phorbol myristate acetate-treated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages after phagocytosis of apoptotic CTLL-2 cells. *J Immunol* 1998;161:6245-9.
3. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

	<p>MAL/PLA-POP-006</p> <p>PROCEDIMENTO PARA INDUÇÃO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA <i>IN VITRO</i></p>
<p>Unidade: Gerência de Malária</p> <p>Subunidade: Laboratório de Plaquetologia</p>	
<p>Revisado e aprovado por:</p> <p>Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda (Coordenador do Laboratório de Plaquetologia)</p>	<p>Data:</p> <p>21/04/2006 (DD/MM/AAAA)</p>

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento de indução de agregação plaquetária *in vitro*.

2. ALCANCE

O procedimento se aplica à pesquisa clínica e experimental e ao diagnóstico.

3. RESPONSABILIDADE

Gerente da unidade, coordenador da subunidade e pessoal técnico.

4. DEFINIÇÕES

Teste de agregação plaquetária: o teste de agregação plaquetária é um procedimento *in vitro* usado para medir a taxa em que as plaquetas, em uma amostra de plasma, formam um aglomerado, sob o estímulo de um agente indutor (agonista).

5. RECURSOS NECESSÁRIOS

5.1 Amostra de sangue venoso periférico.

5.2 Materiais

5.2.1 Tubos de vidro siliconados de 4,5 mL, com citrato de sódio a 3,2%, para a coleta de sangue a vácuo (BD Vacutainer®)

5.2.2 Garrote

5.2.3 Adaptador de plástico para tubo de coleta a vácuo

5.2.4 Pipetas automáticas de 200 µL e 1000 µL

5.2.5 Ponteiras para pipetas automáticas

5.2.6 Cuvetas de vidro

5.2.7 Agitadores magnéticos

5.3 Equipamentos

5.3.1 Agregômetro de plaquetas (Qualitem Eletrônica LTDA®)

5.3.2 Centrífuga

5.3.3 Câmara de Neubauer

5.4 Reagentes

5.4.1 Indutores da agregação plaquetária (Bio/Data Corporation®)

Ristocetina (15 mg/mL)

Ácido araquidônico (5 mg/mL)

Colágeno (1,9 mg/mL)

ADP (adenosina difosfato) (0,2 mM)

Epinefrina (1 mM)

5.4.2 Preparação

Reconstituir cada frasco do reagente com 0,5 mL de água destilada (pH 5,3-7,2).

Após a reconstituição, deixar os reagentes em repouso por 30 minutos antes do uso.

Misture bem os reagentes antes de usar.

5.4.3 Armazenamento

Os reagentes utilizados nesse procedimento devem ser armazenados a 2 - 8° C antes da reconstituição em água destilada. ADP, colágeno, ácido araquidônico e epinefrina são estáveis por 30 dias quando armazenados a 2° - 8°C. A ristocetina reconstituída é

estável por 7 dias a 2° - 8°C, ou pode ser congelada a -20° C por até 8 semanas.
Antes do uso a solução deve ser mantida em temperatura ambiente.

6. PROCEDIMENTO

6.1 Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma pobre em plaquetas (PPP)

6.1.1 Coleta do sangue venoso a vácuo, evitando-se hemólise, sucção excessiva e contaminação por fluidos teciduais.

6.1.2 Inverter gentilmente para misturar o anticoagulante.

6.1.3 Centrifugar o sangue coletado a 130 g por 10 minutos.

6.1.4 Retirar o PRP.

6.1.5 Centrifugar os mesmos tubos a 1500 g por 10 minutos, para obtenção do PPP.

6.1.6 Ajustar o PRP obtido para a concentração de 250.000 plaquetas/ μ L, utilizando o PPP para a diluição. Contar o número de plaquetas em equipamento automatizado ou em câmara de Neubauer (MAL/PLA-POP-004).

6.2 Teste de agregação plaquetária

6.2.1 Ligar o agregômetro durante o tempo necessário para atingir a temperatura de 37° C.

6.2.2 Verificar o funcionamento do agitador magnético do sistema registrador e outros itens recomendados pelo fabricante.

6.2.3 Pipetar 400 μ L do PPP na cuveta.

6.2.4 Calibrar a transmitância máxima com o PPP do paciente.

6.2.5 Retirar a cuveta com o PPP.

6.2.6 Pipetar 400 μ L do PRP na cuveta e adicionar o agitador magnético.

6.2.7 Calibrar a transmitância mínima com PRP com agitador magnético em funcionamento.

6.2.8 Aguardar 1 minuto para estabilização da temperatura.

6.2.9 Adicionar 50 μ L do indutor desejado e iniciar imediatamente o registro da curva por 5 minutos. A curva é registrada em software AgregPic® (vide figuras das telas em anexo).

6.2.10 A cada novo teste, repetir a manobra de calibração. Sempre realizar um teste controle normal a cada bateria de testes, pois os reagentes podem frequentemente não

apresentar resultados adequados.

6.2.11 Os pequenos imãs do agitador magnético devem ser lavados após cada uso. Para evitar a perda é conveniente esvaziar as cuvetas em uma peneira (tipo peneira de chá) e lavá-los em água corrente. Após lavar as cuvetas, não enxugar em superfície áspera, sob risco de danificar a mesma.

6.2.12 Apesar do registro do percentual de agregação a cada minuto, durante 5 minutos, avalia-se o percentual máximo de agregação ao longo deste tempo, para fins de análise.

7. RESTRIÇÕES E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

As plaquetas a serem testadas devem ser armazenadas em temperatura ambiente, pois o seu resfriamento prévio pode levar a agregação espontânea no momento do re-aquecimento ou hiper-resposta de agregação ao agonista utilizado. As plaquetas devem permanecer em tubos de plástico (de preferência polipropileno) ou de vidro siliconado, para evitar sua ativação. Deve haver uma concentração mínima de plaquetas no PRP para que seja possível o teste de agregação. Pelo efeito de propinquidade, as plaquetas devem estar próximas o suficiente para se agregar, daí a necessidade de um agitador no momento do teste, utilizado a uma velocidade compatível com o aparelho utilizado. Pode haver uma diminuição no percentual de agregação plaquetária caso haja contaminação do PRP por hemácias, bem como a presença de lipídeos. O teste deve ser realizado em até 3 horas após a coleta do sangue (1).

8. BIOSSEGURANÇA

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (2).

9. DOCUMENTOS RELACIONADOS

MAL/PLA-POP-004: indução de plaquetopenia em camundongos C57BL/6

10. JUSTIFICATIVA DE MUDANÇAS NO DOCUMENTO ATUAL

Não se aplica.

11. PADRONIZAÇÃO ORIGINAL DO PROCEDIMENTO

Departamento de Análises Clínicas e Farmacológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

12. ANEXOS

Telas do software AgregPic®

13. BIBLIOGRAFIA


1. White MM, Jennings LK. Platelet protocols: research and clinical laboratory procedures. San Diego: Academic Press; 1999.
2. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

ANEXO

Telas do software AgregPic®





	<p style="text-align: center;">MAL/PLA-POP-007</p> <p style="text-align: center;">PROCEDIMENTO PARA LISE DE FORMAS SANGÜÍNEAS DE <i>Plasmodium sp.</i></p>
<p>Unidade: Gerência de Malária</p> <p>Subunidade: Laboratório de Plaquetologia</p>	
<p>Revisado e aprovado por:</p> <p>Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda (Coordenador do Laboratório de Plaquetologia)</p>	<p>Data:</p> <p>21/04/2006 (DD/MM/AAAA)</p>

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento de lise de formas sangüíneas de *Plasmodium sp.*

2. ALCANCE

O procedimento se aplica à pesquisa clínica e experimental e também ao diagnóstico.

3. RESPONSABILIDADE

Gerente da unidade, coordenador da subunidade e pessoal técnico.

4. DEFINIÇÕES

Lise: destruição ou dissolução de tecidos por métodos físico-químicos

5. RECURSOS NECESSÁRIOS

5.1 Concentrado de hemácias de sangue venoso periférico de pacientes primoinfectados com diagnóstico microscópico de malária por *P. vivax*, à gota espessa, com mais de 10 parasitos por campo de grande aumento; ou concentrado de hemácias infectadas obtidas de cultura de *P. falciparum* em RPMI 1640, em fase de sincronização de esquizontes (1).

5.2 Materiais

5.2.1 Tubos de vidro siliconados de 4,5 mL, com K₂EDTA, para a coleta de sangue a vácuo (BD Vacutainer®)

5.2.2 Garrote

5.2.3 Adaptador de plástico para tubo de coleta a vácuo

5.2.4 Pipetas automáticas de 20 µL, 200 µL e 1000 µL

5.2.5 Ponteiras para pipetas automáticas

5.2.6 Tubos de ensaio

5.2.7 Criotubos de 1,5 mL

5.3 Equipamentos

5.3.1 Destilador de água

5.3.2 Balança semi-analítica

5.3.3 pHmetro

5.3.4 Centrífuga refrigerada

5.4 Reagentes

PBS 1x

Saponina 0,04%

Tris-HCl 0,001 M

Desoxicolato de sódio 1% em Tris-HCl + inibidores de proteases

5.4.1 Preparação

PBS 10x

Fosfato de sódio	Na ₂ HPO ₄	11,94 g
Fosfato de sódio hidratado	NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	2,56 g
Cloreto de sódio	NaCl	87,66 g
Água destilada	H ₂ O	1 L

Adicionar aproximadamente 900 mL de água destilada estéril em um Erlenmeyer.

Colocar o fosfato de sódio e o fosfato de sódio hidratado até que se dissolvam completamente.

Ajustar o pH para 7,2-7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

Depois de ajustar o pH, adicionar o NaCl até que se dissolva completamente.

Ajustar para 1 L com água destilada.

Fracionar em frascos para armazenamento de reagentes estéreis.

PBS 1x

Fazer uma diluição 1:10 com água destilada.

Ajustar o pH para 7,2-7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

Saponina 0,04%

Saponina 40 mg

PBS 1x 100 mL

Tris-HCl 0,001 M

Tris-HCl 1,576 g

Água destilada H₂O 100 mL

Ajustar o pH para 8,2 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

Desoxicolato de sódio 1% em Tris-HCl + inibidores de proteases

Desoxicolato de sódio 0,04 g

Solução Tris-HCl 3,2 mL

Antipainá 4,0 µL

Leupeptina 4,0 µL

Aprotinina 4,6 µL

5.4.2 Armazenamento

Os reagentes utilizados nesse procedimento devem ser armazenados a uma temperatura entre 2 e 8°C.

6. PROCEDIMENTO

6.1 Lise das hemácias

6.1.1 Centrifugar a amostra a 2000 g por 15 minutos, a 4°C.

6.1.2 Em seguida, desprezar o sobrenadante.

6.1.3 Lavar o sedimento três vezes com PBS 1x (pH 7,2) a 2000 g por 15 minutos, a 4°C.

6.1.4 Após cada centrifugação, desprezar o sobrenadante.

6.1.5 Adicionar saponina 0,04%, por 20 minutos, em vórtex, à temperatura ambiente.

6.1.6 Centrifugar por 15 minutos a 2000 g.

6.1.7 Lavar 3 vezes com PBS 1x (pH 7,2), centrifugando a 2000 g por 15 minutos, a 4°C.

6.1.8 Após cada centrifugação, desprezar o sobrenadante.

6.1.9 O sedimento poderá ser armazenado a -20°C por 48 horas ou a -70°C por 2 meses, até o momento da extração do antígeno.

6.2 Extração do antígeno

6.2.1 Ressuspender o sedimento obtido na etapa 6.1 em 4 mL de desoxicolato de sódio 1% em Tris- HCl 0,01 M (pH 8,2) + inibidores de proteases.

6.2.2 Agitar em vórtex por 15 minutos e deixar em repouso por 30 minutos.

6.2.3 Centrifugar por 1 hora a 2000 g a 4°C.

6.2.4 Dosar o conteúdo protéico do sobrenadante pelo método do biureto (ver MAL/PLA-POP-003).

6.2.5 Aliquotar e estocar a -70°C.

6.3 PCR em amostras de *P. vivax*

(ver MAL/MOL-POP-001)

7. RESTRIÇÕES E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Quando se realiza a lise de esquizontes de *P. vivax* a partir de sangue humano infectado, também se lisam trofozoítos e eventualmente gametócitos, pela não possibilidade de sincronização, como no caso da cultura de *P. falciparum*. É importante sempre realizar a PCR na amostra de sangue de pacientes com diagnóstico microscópico de *P. vivax*, pela possibilidade de infecção mista não detectada à gota espessa.

8. BIOSSEGURANÇA

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (2).

9. DOCUMENTOS RELACIONADOS

MAL/PLA-POP-003: procedimento para dosagem de proteínas pelo método do biureto

MAL/MOL-POP-001: procedimento para realização de PCR

10. JUSTIFICATIVA DE MUDANÇAS NO DOCUMENTO ATUAL

Não se aplica.

11. PADRONIZAÇÃO ORIGINAL DO PROCEDIMENTO


Laboratório de Sorologia da Gerência de Malária da FMT-AM.

12. ANEXOS

Não se aplica.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Schuster FL. Cultivation of *Plasmodium* spp. Clin Microbiol Rev 2002;15:355-64.
2. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

	<p>MAL/PLA-POP-008</p> <p>PROCEDIMENTO PARA LISE DE ESPOROZOÍTOS DE <i>Plasmodium</i> sp.</p>
<p>Unidade: Gerência de Malária</p> <p>Subunidade: Laboratório de Plaquetologia</p>	
<p>Revisado e aprovado por:</p> <p>Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda (Coordenador do Laboratório de Plaquetologia)</p>	<p>Data:</p> <p>21/04/2006 (DD/MM/AAAA)</p>

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento de lise de esporozoítos de *Plasmodium* sp.

2. ALCANCE

O procedimento se aplica apenas à pesquisa experimental.

3. RESPONSABILIDADE

Gerente da unidade, coordenador da subunidade e pessoal técnico.

4. DEFINIÇÕES

Lise: destruição ou dissolução de tecidos por métodos físico-químicos.

5. RECURSOS NECESSÁRIOS

5.1 Esporozoítos obtidos a partir de dissecção de glândulas salivares de mosquitos infectados com *P. vivax* ou *P. falciparum* (1).

5.2 Materiais

5.2.1 Pipetas automáticas de 20 µL e 200 µL

5.2.2 Ponteiras para pipetas automáticas

5.2.3 Criotubos de 1,5 mL

5.3 Equipamentos

5.3.1 Destilador de água

5.3.2 Balança semi-analítica

5.3.3 pHmetro

5.3.4 Centrífuga

5.4 Reagentes

PBS 1x

100 mM de Tris-HCl (pH 8,5)

Carbonato de sódio 0,1 M (pH 11,6)

5.4.1 Preparação

PBS 10x

Fosfato de sódio	Na_2HPO_4	11,94 g
Fosfato de sódio hidratado	$\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$	2,56 g
Cloreto de sódio	NaCl	87,66 g
Água destilada	H_2O	1 L

Adicionar aproximadamente 900 mL de água destilada estéril em um Erlenmeyer.

Colocar o fosfato de sódio e o fosfato de sódio hidratado até que se dissolvam completamente.

Ajustar o pH para 7,2-7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

Depois de ajustar o pH, adicionar o NaCl até que se dissolva completamente.

Ajustar para 1 L com água destilada.

Fracionar em frascos para armazenamento de reagentes estéreis.

PBS 1x

Fazer uma diluição 1:10 com água destilada.

Ajustar o pH para 7,2-7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

Tris HCl 100 mM

Tris HCl		15,76 g
Água destilada	H ₂ O	1 L

Ajustar o pH para 8,5 com NaOH ou HCl.

Carbonato de sódio 0,1 M

Carbonato de sódio	Na ₂ CO ₃	10,6 g
Água destilada	H ₂ O	1 L

Ajustar o pH para 11,6 com NaOH ou HCl.

5.4.2 Armazenamento

Os reagentes utilizados nesse procedimento devem ser armazenados a uma temperatura entre 2 e 8°C.

6. PROCEDIMENTO

6.1 Lise de esporozoítos

6.1.1 Tomar 1×10^7 esporozoítos suspensos em PBS 1x.

6.1.2 Diluir o *pellet* 10 vezes em 100 mM de Tris-HCl (pH 8,5) e incubar em gelo por uma hora.

6.1.3 Centrifugar a 18.000g por 30 minutos e guardar o sobrenadante.

6.1.4 Lavar o *pellet* com 2 volumes de carbonato de sódio 0,1 M (pH 11,6).

6.1.5 Centrifugar a 18.000g por 30 minutos.

6.1.6 Juntar os sobrenadantes obtidos nos passos da centrifugação.

6.1.7 Dosar o conteúdo protéico do sobrenadante pelo método do biureto (ver MAL/PLA-POP-003).

6.1.8 Guardar as proteínas obtidas a -70°C.

7. RESTRIÇÕES E LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Não se aplica.

8. BIOSSEGURANÇA

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (2).

9. DOCUMENTOS RELACIONADOS

MAL/PLA-POP-003: procedimento para dosagem de proteínas pelo método do biureto

10. JUSTIFICATIVA DE MUDANÇAS NO DOCUMENTO ATUAL

Não se aplica.

11. PADRONIZAÇÃO ORIGINAL DO PROCEDIMENTO

Unidade de Entomologia do *Instituto de Imunologia del Valle* (Cali – Colômbia).

12. ANEXOS

Não se aplica.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Hurtado S, Salas ML, Romero JF, Zapata JC, Ortiz H, Arevalo-Herrera M, et al. Regular production of infective sporozoites of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in laboratory-bred *Anopheles albimanus*. *Ann Trop Med Parasitol* 1997;91:49-60.
2. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

	<p style="text-align: center;">POP-USP PROCEDIMENTO PARA SEQÜENCIAMENTO DOS GENES <i>VIR</i></p>
<p>Unidade: Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo Subunidade: Departamento de Parasitologia</p>	
<p>Revisado e aprovado por: Dr. Hernando Antonio del Portillo Obando</p>	<p>Data: (DD/MM/AAAA)</p>

1. OBJETIVO

Descrever o procedimento de seqüenciamento genético dos genes *vir* do *Plasmodium vivax*.

2. ALCANCE

O procedimento se aplica apenas a protocolos de pesquisa clínica e experimental.

3. RESPONSABILIDADE

Gerente da unidade, coordenador da subunidade e pessoal técnico.

4. DEFINIÇÕES

Seqüenciamento genético: descrição da seqüência de bases nitrogenadas que constituem um determinado segmento do DNA

Genes vir: genes que codificam antígenos variantes (polimórficos) que são expressos na superfície de reticulócitos parasitados pelo *P. vivax* (1)

5. RECURSOS NECESSÁRIOS

5.1 Sangue total de paciente infectado a ser testado.

5.2 Materiais

5.2.1 Tubos de vidro de 4,5 mL, com K₂EDTA, para a coleta de sangue a vácuo (BD Vacutainer®)

5.2.2 Garrote

5.2.3 Adaptador de plástico para tubo de coleta a vácuo

5.2.4 Pipetas automáticas de 20 µL, 200 µL e 1000 µL

5.2.5 Ponteiras protegidas para pipetas automáticas

5.2.6 Tubos para microcentrífuga de 1,5 mL

5.2.7 Gelo

5.2.8 Nitrogênio líquido

5.2.9 Placa de 96 escavações com fundo em U

5.2.10 Placa de 96 escavações com fundo em V

5.2.11 Placa com 96 escavações com filtro

5.2.12 *E. coli* (DH10B)

5.2.13 Placa LB

5.2.14 Placa LB/Amp/Xgal/IPTG

5.3 Equipamentos

5.3.1 Banho-maria

5.3.2 Centrífuga refrigerada

5.3.3 Termociclador

5.3.4 Transiluminador com luz ultravioleta

5.3.5 *Scanner*

5.3.6 Espectrofotômetro Gene Quant® GE Healthcare

5.3.7 Estufa

5.3.8 Centrífuga com rotor de placa

5.3.9 Seqüenciador de DNA (ABI Prism 3100 DNA Analyser® Applied Biosystems)

5.4 Reagentes

PBS1x

Saponina 1,5% em PBS

TE

TE-fenol

TE-fenol/clorofórmio

Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1)

Na-acetato 3 M

EtOH 100% gelado

EtOH 75% gelado

Solução de extração de DNA

Tampão de PCR 10x

MgCl₂

dNTPs (10 mM)

Taq DNA polimerase

Iniciador F (10 mM)

Iniciador R (10 mM)

TAE

Agarose 1%

Brometo de etídio

Kit pra purificação de produtos de PCR (GFX Amershan Biociences®)

Solução de NaOH 0,2 N

Tampão *Save Money*

CaCl₂ 0,1 M

Glicerol 15%

Meio de cultura SOC

Solução GTE

Isopropanol absoluto

EtOH 70%

Kit de seqüenciamento *Big Dye Terminator* versão 3.1®

Isopropanol 66%

Isopropanol 75%

Formamida *Hi D*® (Applied Biosystems do Brasil LTDA®)

5.4.1 Preparação

PBS10x

Fosfato de sódio bibásico	Na_2HPO_4	11,94 g
Fosfato de sódio hidratado	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,56 g
Cloreto de sódio	NaCl	87,66 g
Água destilada	H_2O	1 L

Adicionar aproximadamente 900 mL de água destilada estéril em um Erlenmeyer.

Colocar o fosfato de sódio e o fosfato de sódio hidratado até que se dissolvam completamente.

Ajustar o pH para 7,2-7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

Depois de ajustar o pH, adicionar o NaCl até que se dissolva completamente.

Ajustar para 1 L com água destilada.

Fracionar em frascos para armazenamento de reagentes estéreis.

PBS1x

Fazer uma diluição 1:10 com água destilada.

Ajustar o pH para 7,2-7,4 com NaOH 1 N ou HCl 1 N.

Solução de extração de DNA

Tris-HCl 1 M (pH8,0)	2 mL
EDTA 500 nM (pH8,0)	2 mL
NaCl 5 M	4 mL
SDS 10%	10 mL
Proteinase K 10 mg/mL	4 mL
Água bidestilada	178 mL

Solução GTE

Glicose 20%	23 mL
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	10 mL
Tris HCl 1 M (pH 7,4)	13 mL
H_2O MilliQ autoclavada	454 mL

Solução de NaOH 0,2 N/SDS 1%

NaOH 10 N	10 mL
SDS 10%	50 mL
H ₂ O MilliQ autoclavada	440 mL

Tampão *Save Money*

Tris-HCl 1 M (pH 9,0)	2 mL
MgCl ₂ 50 mM	1 mL
H ₂ O MilliQ autoclavada	10 mL
Armazenar a – 20°C	

5.4.2 Armazenamento

Os reagentes utilizados nesse procedimento devem ser armazenados à temperatura de 2 – 8° C.

6. PROCEDIMENTO**6.1 Obtenção do sangue total**

6.1.1 Coleta do sangue venoso a vácuo.

6.1.2 Armazenar a -70°C.

6.2 Extração de DNA de plasmódio a partir de sangue total

6.2.1 Adicionar a 300 mL da amostra de sangue, 30 mL de saponina 1,5% e deixar a 25°C por 5 minutos.

6.2.2 Adicionar 1 mL de PBS1x e centrifugar a 13.000 rpm por 12 minutos, a 4°C.

6.2.3 Remover o sobrenadante e lavar com 1 mL de PBS1x por centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos, a 4°C (repetir uma vez).

6.2.4 Adicionar ao precipitado 200 mL de solução de extração de DNA.

6.2.5 Incubar a 50°C por 12 horas.

6.2.6 Adicionar 250 mL de TE-fenol e agitar por 10 minutos.

6.2.7 Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos.

- 6.2.8 Remover a fase aquosa (superior) para outro tubo.
- 6.2.9 Adicionar 250 mL de TE-fenol/clorofórmio e agitar por 10 minutos.
- 6.2.10 Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos.
- 6.2.11 Remover a fase aquosa (superior) para outro tubo.
- 6.2.12 Adicionar 250 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e agitar por 10 minutos.
- 6.2.13 Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos.
- 6.2.14 Remover a fase aquosa (superior) para outro tubo.
- 6.2.15 Adicionar 20 µL de Na-acetato 3M (pH 5,2) e 500 µL de EtOH 100% gelado, agitar brevemente e deixar à -20 °C por 12 horas.
- 6.2.16 Centrifugar a 13.000 rpm por 15 minutos, a 4°C.
- 6.2.17 Remover o sobrenadante.
- 6.2.18 Adicionar 500 mL de EtOH 75% gelado.
- 6.2.19 Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos, a 4°C.
- 6.2.20 Remover o sobrenadante.
- 6.2.21 Secar a 37°C.
- 6.2.22 Adicionar 25 mL de TE (ou H₂O MilliQ autoclavada).

6.3 Reação de amplificação dos genes *vir* por PCR

Tampão de PCR 10x	2,5 mL
MgCl ₂	1,0 mL
dNTPs (10 mM)	0,5 mL
Taq DNA polimerase	0,25 mL
Iniciador F (10 mM)	0,8 mL
Iniciador R (10 mM)	0,8 mL
H ₂ O	18,15 mL
Solução de DNA extraído	1,0 mL

Condições de amplificação no termociclador:

Sub-família A	94°C/5 minutos
	94°C/0,3 minuto
	55°C/1,3 minutos

	72°C/1 minuto
	72°C/10 minutos
Sub-famílias B e C	94°C/5 minutos
	94°C/0,3 minuto
	50°C/1,3 minutos
	72°C/1 minuto
	72°C/10 minutos
Sub-famílias D e E	94°C/5 minutos
	94°C/0,3 minuto
	48°C/1,45 minutos
	72°C/1 minuto
	72°C/10 minutos

6.4 Eletroforese em gel de agarose

6.4.1 Os produtos da amplificação da reação são aplicados em gel de agarose 1% com 100 mL de TAE.

6.4.2 Aquecer por 5 minutos e completar com H₂O para 100 mL.

6.4.3 Colocar 1 µL do produto da amplificação para cada 50 mL de brometo de etídio.

6.4.4 Colocar na placa para polimerizar (não esquecer de fechar as bordas com fita).

6.4.5 Colocar o tampão para corrida (TAE).

6.4.6 Colocar 1/6 de tampão de preenchimento 6x nas amostras e aplicar no gel polimerizado.

6.4.7 Esperar a corrida dos produtos em eletroforese até que as bandas se separem (mais ou menos 30 minutos) e analisar no transiluminador, sob luz ultravioleta. A imagem pode ser varrida por *scanner*, para arquivamento.

6.5 Purificação de produtos de PCR a partir do gel (Kit Amershan®)

6.5.1 Adicionar 300 µL de tampão de captura ao tubo contendo o gel com o DNA.

6.5.2 Misturar e incubar a 60°C até a agarose estar totalmente dissolvida (aproximadamente 15 minutos).

6.5.3 Durante a incubação, colocar a coluna GFX no tubo coletor para cada purificação a ser feita.

6.5.4 Centrifugar brevemente para coletar a amostra do fundo do tubo.

6.5.5 Transferir a amostra para a coluna GFX e incubar à temperatura ambiente por 1 minuto.

6.5.6 Centrifugar à máxima velocidade, por 30 segundos.

6.5.7 Descartar o filtrado esvaziando o tubo coletor e recolocar a coluna de volta no mesmo.

6.5.8 Adicionar 500 µL de tampão de lavagem à coluna.

6.5.9 Centrifugar à máxima velocidade, por 30 segundos.

6.5.10 Descartar o tubo coletor e colocar a coluna GFX em um tubo novo de 1,5 mL.

6.5.11 Aplicar 30 µL de TE pH 8,0 no centro do tubo.

6.5.12 Incubar à temperatura ambiente, por 1 minuto.

6.5.13 Centrifugar à máxima velocidade, por 1 minuto.

6.5.14 Descartar a coluna GFX.

6.6 Quantificação de DNA

6.6.1 Preparar a amostra com 5 µL de DNA e 495 µL de H₂O MilliQ autoclavada e um controle somente com 500 µL de H₂O MilliQ autoclavada.

6.6.2 Aplicar no *Gene Quant*[®] para quantificar.

6.7 Digestão enzimática

DNA (100 ng)	1 µL
<i>Buffer</i> 10x	1 µL
<i>Eco RI</i>	0,3 µL
H ₂ O MilliQ autoclavada	7,7 µL

6.7.1 Incubar a 37°C, por 2 horas.

6.7.2 Aplicar em gel de agarose 1%.

6.8 Clonagem (protocolo oferecido pela Promega[®] para o vetor pGEM Ò -T Easy)

<i>Rapid Ligation Buffer</i> 2x	5 mL
---------------------------------	------

pGEM Ò -T Easy	1 mL
Produto de PCR	3 mL
T4 DNA ligase	1 mL

6.8.1 Incubar a reação à temperatura ambiente, durante 1 hora, ou por 12 horas a 4°C.

6.9 Produção de células competentes

6.9.1 Fazer uma placa com LB com as bactérias a serem utilizadas (DH10B).

6.9.2 Coletar uma colônia e colocar em 5 mL de meio LB (no agitador por 12 horas).

6.9.3 Adicionar o pré-inóculo (5mL) em 200 mL de meio LB (no agitador por 12 horas).

6.9.4 Crescer até atingir densidade ótica entre 0,5 -1,0 (aproximadamente 3 horas).

6.9.5 Transferir para tubos autoclavados.

6.9.6 Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos, a 4°C.

6.9.7 Descartar o sobrenadante.

6.9.8 Ressuspender em 100 mL de CaCl₂ 0,1 M gelado.

6.9.9 Incubar a 4°C por 15 minutos, no gelo.

6.9.10 Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos, a 4°C.

6.9.11 Descartar o sobrenadante imediatamente.

6.9.12 Ressuspender em 6,6 mL de solução de CaCl₂ 0,1 M em glicerol 15% gelado.

6.9.13 Aliquotar em tubos de 1,5 mL e congelar em nitrogênio líquido.

6.9.14 Conservar em – 80°C.

6.9.15 Transformar 0,01 ng/μL e 0,10 ng/μL de pGEM em 50 μL de células competentes.

6.9.16 Semear em meio LB e contar as colônias.

6.9.17 Calcular a eficiência: **$Ef = \text{número de colônias}/\mu\text{g de DNA}$**

6.10 Transformação

6.10.1 Adicionar 50mL de *E. coli* competente (DH10B)

6.10.2 Deixar no gelo por 30 minutos.

6.10.3 Aquecer a 42°C, no bloco, por 1 minuto.

6.10.4 Deixar no gelo por 2 minutos.

6.10.5 Adicionar 300mL de meio SOC.

6.10.6 Agitar a 37°C, por 30 minutos.

6.10.7 Semear 350mL em placa LB/Amp/Xgal/IPTG.

6.11 Extração e purificação de plasmídeos

6.11.1 Ligar estufa a 90°C.

6.11.2 Centrifugar a placa *deep well*, após pelo menos 18 horas de incubação, por 6 minutos, a 3700 rpm (centrífuga Eppendorf com rotor de placa).

6.11.3 Remover o adesivo, descartar o sobrenadante e inverter a placa sobre papel absorvente por 5 minutos.

6.11.4 Adicionar a cada escavação 240 mL de solução GTE, selar a placa com adesivo e agitar por 2 minutos.

6.11.5 Centrifugar por 6 minutos a 3700 rpm.

6.11.6 Descartar o sobrenadante e deixar a placa invertida em papel absorvente por 5 minutos.

6.11.7 Preparar a solução com 8 mL de GTE e 125 mL de RNase (20mg/mL) e homogeneizar suavemente.

6.11.8 Adicionar a cada escavação 80 mL da solução GTE+RNase, selar a placa com adesivo e agitar por 2 minutos.

6.11.9 Transferir 60 mL de cada suspensão celular para a placa com fundo em U.

6.11.10 Adicionar a cada escavação 60 mL de NaOH 0,2 N/SDS 1%.

6.11.11 Selar a placa com adesivo resistente e misturar 10x por inversão.

6.11.12 Incubar por 10 minutos em temperatura ambiente.

6.11.13 Centrifugar por 1 minuto a 500 rpm.

6.11.14 Adicionar a cada escavação 60 µL de KOAc 3M gelado.

6.11.15 Selar a placa com adesivo resistente e misturar 10x por inversão.

6.11.16 Incubar por 10 minutos em temperatura ambiente.

6.11.17 Centrifugar por 1 minuto a 500 rpm.

6.11.18 Remover o adesivo e incubar a 90°C por 30 minutos.

6.11.19 Recolocar o adesivo.

6.11.20 Resfriar a placa em gelo por 10 minutos.

6.11.21 Centrifugar por 4 minutos, a 3700 rpm, a 20°C.

6.11.22 Transferir os 180 mL de cada escavação para a placa de filtro, acoplada à placa de fundo em V.

6.11.23 Centrifugar por 4 minutos, a 3700 rpm, a 20°C.

6.11.24 Remover e descartar a placa filtro.

6.11.25 Adicionar ao volume filtrado na placa de fundo em V 110 mL de isopropanol absoluto.

6.11.26 Selar a placa com adesivo resistente e misturar 10 a 20x por inversão.

6.11.27 Centrifugar por 45 minutos, a 3700 rpm, a 20°C.

6.11.28 Descartar o sobrenadante e adicionar 200 mL de EtOH 70% gelado.

6.11.29 Centrifugar por 5 minutos, a 3700 rpm, a 20°C.

6.11.30 Remover o sobrenadante.

6.11.31 Inverter a placa sobre papel absorvente e centrifugar por 1 minuto a 500 rpm.

6.11.32 Deixar a placa secar por 1 hora em temperatura ambiente.

6.11.33 Ressuspender o DNA em 60 mL de H₂O MilliQ autoclavada.

6.11.34 Cobrir a placa com adesivo e deixar em temperatura ambiente por 12 horas.

6.12 Seqüenciamento

6.12.1 Realizado em Applied Biosystems ABI Prism 3100 DNA Analyser® com o kit de seqüenciamento *Big Dye Terminator* versão 3.1® (dNTP, ddNTP, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl₂ e tampão Tris-HCl).

6.12.2 Misturar:

<i>Big Dye Terminator</i>	0,75 mL
Tampão <i>Save Money</i>	3,25 mL
Iniciador (5 mM)	1,0 mL
DNA	100-200 ng
H ₂ O MilliQ	4 mL

6.12.3 Condições do termociclador (rampa de 1°C por segundo):

Desnaturação inicial	96°C/1 minuto
Desnaturação	96°C/0,25 minuto
Anelamento	50°C/0,25 minuto

8. BIOSSEGURANÇA

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (2).

9. DOCUMENTOS RELACIONADOS

Não se aplica.

10. JUSTIFICATIVA DE MUDANÇAS NO DOCUMENTO ATUAL

Não se aplica.

11. PADRONIZAÇÃO ORIGINAL DO PROCEDIMENTO

Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo.

12. ANEXOS

Não se aplica.

13. BIBLIOGRAFIA

1. del Portillo HA, Fernandez-Becerra C, Bowman S, Oliver K, Preuss M, Sanchez CP, et al. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. Nature 2001;410:839-42.
2. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

ANEXO D

PROCESSO DE APROVAÇÃO DO PROJETO



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

IDENTIFICAÇÃO

Número do Processo: 2692/2003

Título do Projeto: Estudo clínico e laboratorial da plaquetopenia encontrada em pacientes com malária vivax, na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

Coordenador (a): Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda

Relator (a) do Processo: Dr. Eucides Batista da Silva

Dia da Sessão: 24/11/2003

DECISÃO

Nesta data, acatando, por unanimidade, o voto do relator, a plenária do Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU plenamente o projeto intitulado "Estudo clínico e laboratorial da plaquetopenia encontrada em pacientes com malária vivax, na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas".

Plenária do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, em Manaus 24 de novembro de 2003.



DR. LUIZ CARLOS DE LIMA FERREIRA
Coordenador de Ética em Pesquisa

ANEXO E

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AO
PACIENTE (TCLEP)

Etiqueta com o código de pesquisa do paciente

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AO PACIENTE (TCLEP)

NOME DA PESQUISA

ESTUDO CLÍNICO E LABORATORIAL DA PLAQUETOPENIA ENCONTRADA EM PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX, NA FMT-AM

Patrocinadores: Universidade de Brasília (UnB)
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM)

Equipe responsável: Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda (Médico)
Dra. Vanize de Oliveira Macêdo (Médica)

OBJETIVO E DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Este é um estudo que estamos fazendo no *Hospital Tropical (FMT-AM)*, com o objetivo de **estudar o sangue das pessoas com malária**.

A malária é uma doença transmitida pela picada do carapanã, desde as 6 horas da tarde até as 6 horas da manhã. No Brasil existem dois tipos de malária: a malária **vivax** e a malária **falciparum**. Nos dois tipos, o paciente pode ter só febre, mas também pode morrer se não for tratado.



A picada do carapanã (*Anopheles darlingi*) pode transmitir a malária *vivax* ou *falciparum* durante a noite.

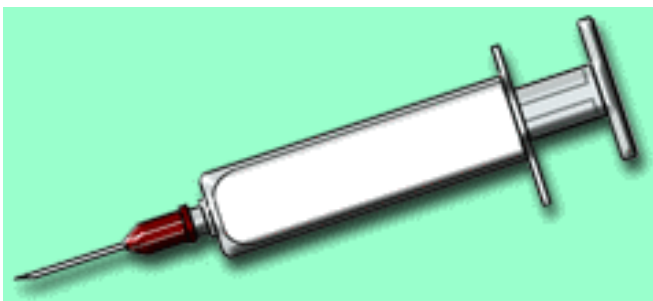
Às vezes a malária pode dar sangramento na pele, nariz ou na boca e a pessoa tem que ficar internada no hospital. Não se sabe ainda por que as pessoas com malária sangram, mas este sangramento pode ser muito grave e o paciente precisa fazer transfusão de sangue.



A malária pode dar febre, mal-estar, calafrios, vômitos, diarreia e até sangramento na pele, nariz ou na boca.

Para podermos estudar o motivo deste sangramento na malária, precisamos analisar o sangue dos pacientes. Estudaremos, portanto, uma pequena célula do sangue, chamada **plaqueta**, e faremos outros **testes para avaliar a coagulação do sangue**, além dos exames de rotina de bioquímica e hemograma. Poderemos também realizar exames para excluir outras causas de sangramento: **teste de HIV, teste de hepatites e teste para dengue**.

Para isso, é preciso que sejam colhidos, além do exame da malária, que foi colhido no dedo, **15 ml de sangue da veia do braço**.



Depois de colher o sangue do braço, ele pode doer um pouco e até ficar com uma mancha roxa.

Depois que os resultados dos exames estiverem prontos, a pessoa que participar da pesquisa poderá ver estes resultados, que ficarão arquivados no seu prontuário do Hospital Tropical. **O sangue colhido que sobrar será guardado no freezer com um número (sem o nome da pessoa) e poderá ser utilizado para outro estudo no futuro.**

Além dos exames de laboratório, **a pessoa será consultada e examinada por um médico responsável pela pesquisa**, que poderá pedir outros exames, caso ache necessário.

Se o paciente apresentar algum sangramento fora do corpo que possa ser fotografado, **o médico poderá fazer uma foto**, sem qualquer identificação, para poder depois publicar em alguma revista só para médicos.

Os **remédios para malária, que são de distribuição gratuita**, vão depender do tipo da malária e da gravidade do caso. Se a malária for grave, o paciente deverá ficar internado, como acontece com todos os outros pacientes graves que chegam ao Hospital Tropical.

Em alguns casos, se a pessoa concordar, deverá ficar **internada por 7 (sete) dias** para que o médico possa avaliar diariamente o aparecimento de algum sangramento e realizar estudos do sangue. Neste caso, em cada dia serão colhidos 10 ml de sangue.

QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS EM PARTICIPAR DA PESQUISA?

Além de ter um médico especializado em malária que vai acompanhar o paciente durante toda a crise de malária, ao participar deste estudo, **você não receberá qualquer benefício adicional, nem ganhará dinheiro**, mas estará contribuindo para o estudo desta doença, que ainda mata muitas pessoas.

Se tiver algum prejuízo participando da pesquisa, **os pesquisadores poderão lhe ajudar de alguma maneira, basta conversar com eles !!!!!**

Você também receberá uma cartilha educativa e informações sobre os mecanismos de como se pega a doença e as formas de evitar uma próxima infecção.

QUEM VAI FICAR SABENDO DO RESULTADO DOS MEUS EXAMES?

A participação nesse estudo será confidencial e os resultados dos exames serão mostrados às pessoas do Hospital Tropical que trabalham com malária ou pesquisadores de outras cidades ou países, mas o nome da pessoa que participa nunca será revelado.

O QUE ACONTECE SE EU QUISER DESISTIR DE PARTICIPAR DA PESQUISA?

A pessoa que aceitou participar da pesquisa tem todo o direito de dizer que não quer mais participar. E mesmo que isso aconteça, a pessoa será tratada e terá direito ao atendimento no Hospital Tropical sempre que precisar.

ATENÇÃO: NENHUM PESQUISADOR PODE DEIXAR DE ME TRATAR BEM SE EU DISSER QUE NÃO QUERO ENTRAR NA PESQUISA OU QUERO SAIR DELA, DEPOIS DE ALGUNS DIAS!!!!

EU GUARDAREI COMIGO ALGUM PAPEL DIZENDO QUE PARTICIPEI DA PESQUISA?

A pessoa que aceitar participar da pesquisa **assinará duas cópias deste documento**, uma cópia ficará com o pesquisador, na Gerência de Malária, e a outra ficará com o paciente.

E O QUE FAZER SE ACONTECER ALGUMA COISA COMIGO DEPOIS DA PESQUISA?

Para qualquer esclarecimento ou ajuda, o paciente poderá falar com o **Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Tropical** (grupo de pessoas que avalia os projetos de pesquisa que são realizados em um hospital): **Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira (Telefone: 3238-1711, ramal 319)** ou com o médico abaixo:



O **Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda**, cujo número de telefone é **3656-0620**, ou **9114-7633**, terá disponibilidade para atender e esclarecer quaisquer dúvidas.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu,, maior de 18 anos, recebi a explicação de que serei um dos participantes dessa pesquisa e entendo todas as suas etapas e objetivos. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome e a data do preenchimento.

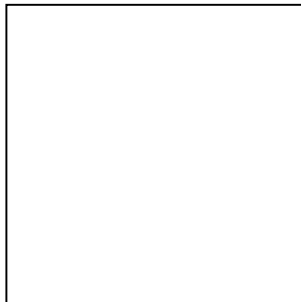
E por estar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expresso meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

.....

Assinatura do paciente

...../...../.....

Data



Impressão do polegar direito do paciente,
caso este não saiba escrever seu nome.

.....

Nome do pesquisador que conversou com o paciente

.....

Assinatura do pesquisador que conversou com o paciente

...../...../.....

Data