

Disfunção endotelial e fator de necrose tumoral- $\alpha$ ;  
na malária grave

Leopoldo Luiz dos Santos Neto

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em  
Imunologia e Genética Aplicadas da Universidade  
de Brasília como requisito parcial para obtenção  
do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Carlos Eduardo Tosta

Brasília - DF  
1993

Disfunção endotelial e fator de necrose tumoral- $\alpha$   
na malária grave

Leopoldo Luiz dos Santos Neto

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em  
Imunologia e Genética Aplicadas da Universidade  
de Brasília como requisito parcial para obtenção  
do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Carlos Eduardo Tosta

Brasília - DF  
1993

"O pesquisador está acostumado à decepção - os meses perdidos num caminho errado, os muitos fracassos. Mas mesmo os fracassos tem sua utilidade, porque, adequadamente analisados, podem conduzir ao sucesso. Para o homem que se engaja na pesquisa não há alegria que se compare a descoberta, por mais insignificante que ela seja. E isso que o faz seguir adiante....."

Sir Alexander Fleming

O meu agradecimento especial ao Prof. Carlos Eduardo Tosta pelo seu grande exemplo de vida acadêmica. Ele com o seu entusiasmo, me abriu as portas à pesquisa clínica e ao deleite da exposição oral.

A Clarice e Gabriela, minha esposa e filha,  
por todo apoio, estímulo, compreensão,  
sacrifícios, paciência e carinho  
que foram decisivos para a realização  
deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Muitos colaboraram, direta e indiretamente, para a conclusão final deste trabalho. A todos a minha grande gratidão, em particular:

- A Sra. Dora Cioce e administradores da Cistron Biotechnology, Pine Brook, NJ, USA, pela doação do kit de fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ .

-Sra Patricia Olson e dirigentes da Chiron Corporation, Emmerlyville, Ca, USA, pela doação do kit de fator de necrose tumoral- $\alpha$ .

-Ao Dr Joseph M Davis, Diretor de Serviços Técnicos da Biosource International Inc., Camarillo, Ca, USA, pela doação do kit para detecção da seéctina-E.

-Ao Dr. Alexandre Gabriel Junior, Maria Cristina de Martino e Fábio Lopes Viscardi, respectivamente Diretor, Supervisora Técnica e técnico, da CIRESP (Centro de Imunologia e Reumatologia de São Paulo), pela efeciência na execução da determinação do teste de Imunoensaio Enzimático do fator von Willebrand.

-Ao Dr. Nobuhiro Suzuki, do Laboratório de Pesquisa Tsukube, Indústria Química de Takeda Ltda., Ibareki-Ken, Japão, pelo doação de anticorpos anti-endotelina-1.

-A Profa. Vanize Macedo do *núcleo* de Medicina Tropical e Nutrição, *Universidade de Brasília*, grande incentivadora, pela ajuda na obtenção de alguns reagentes importados.

-Ao Prof Emílio Francisquetti, Laboratório de cultura de Células, Hospital Pedro Ernesto, UERJ, Rio de Janeiro, por ter permitido o treinamento sobre cultura de célula endotelial.

-Ao Sr. Francisco da Chagas Oliveira, Chefe do Laboratório de Microscopia de Malária, do núcleo de Medicina Tropical e Nutrição-UnB, pela ajuda inestimável na obtenção dos casos de malária de Brasília e da reavaliação dos níveis de parasitemia.

-Ao Prof. Horácio Friedman da Universidade de Brasília e o Prof. Luiz Dias da Universidade de Milwaukee, USA pelo fornecimento do fator de estimulação endotelial.

-Ao Dr. William Knaus da Universidade de George Washington, Washington, USA, pela gentileza em ter fornecido o programa "APACHE II".

-Dr. A B Kabi, da Vitrum, Suécia, pelo fornecimento do cromógeno S-2423.

-Ao Sr Swamir Jorge de Azevêdo Campos, Diretor do Departamento de Importação de Material, da Universidade de Brasília, pela presteza no despacho alfandegário de todo o material importado.

-A Prof a. Maria Imaculada Muniz Junqueira pela grande colaboração na execução das técnicas de laboratório, assim como pelo fornecimento de algumas amostras de sangue de seus pacientes.

-A Prof Edina Miazaki pela inestimável colaboração na análise estatística dos meus resultados.

-Ao Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo pela gentileza em ter cedido algumas amostras de sangue do seu material da Tese de Mestrado

-Ao Dr. Joaquim Caetano de Almeida, Dra. Christiane Reis Kobal (Residente), Dra Doralice de Barros Capuzzo (Residente) do Hospital de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Góias, por ter fornecido amostras de pacientes com malária grave.

-Ao Prof Pedro Tauil, Dept. Saúde Pública da Universidade de Brasília; e Dr. Paulo S S Beraldo, do CIS/CENEPI/FNS, Ministério da Saúde, pelos fornecimento de dados epidemiológicos sobre a malária.

-A Dra. P J McLaughlin, Departamento de Imunologia da Universidade de Liverpool, pela fornecimento de anticorpo monoclonal anti-fator de necrose tumoral- $\alpha$ .

-Dr. Luiz Vicente Rizzo pelo fornecimento de fator de necrose recombinante e alguns conjugados.

-Ao Dr. A. Meager, Divisão de Imunologia do National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, England, pelo fornecimento dos padrões de fator de necrose-a: recombinante.

-A todos os funcionários do Laboratório de Imunologia Celular e Malária, em particular a René de Oliveira Pires pela grande colaboração na execução das técnicas.

-Aos colegas do Curso de Posgraduação Maria Cecília Brandi, Roberto Ronalde de Almeida, João Paccini, Fátima Ribeiro Dias pelo convívio profícuo durante o curso de Pós-graduação.

- Antonio Cláudio MacDowell e Paulo H B Leite pelo realização das fotos.

-José Cals da Rocha pela realização dos desenhos.

-Orestes Brandi e Alberto Yasuda pela ajuda na parte de informática.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO. . . . .	1
1.1. Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos na malária grave. . . . .	3
1.2. Modelos experimentais na malária grave. . . . .	4
1.3. Imunopatogenia da forma grave de malária. . . . .	6
2. OBJETIVOS. . . . .	9
3. GRUPOS DE ESTUDO E MÉTODOS. . . . .	10
3.1. Tipo de estudo e formação dos grupos. . . . .	11
3.2. Grupo de estudo. . . . .	13
3.3. Grupo controle. . . . .	20
3.4. Considerações éticas. . . . .	20
3.5. Critérios de gravidade. . . . .	20
3.6. Colheita e processamento do sangue. . . . .	21
3.7. Imunoensaio enzimático para detecção do fator de necrose tumoral- $\alpha$ : (FNT- $\alpha$ ). . . . .	21

3.8. Imunoensaio enzimático para detecção da interleucina-1a (IL-1a) . . . . .	22
3.9. Imunoensaio enzimático para detecção da selectina-E . . . . .	22
3.10. Imunoensaio enzimático para detecção do fator de von Willebrand (FVW) . . . . .	23
3.11. Testes estatísticos . . . . .	24
4. RESULTADOS . . . . .	25
5. DISCUSSÃO . . . . .	41
6. CONCLUSÕES . . . . .	55
7. RESUMO . . . . .	58
8. ABSTRACT . . . . .	61
9. BIBLIOGRAFIA . . . . .	64
10. ANEXO I . . . . .	78
11. ANEXO II . . . . .	80

## INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

A malária representa um grande problema de saúde pública mundial, apresentando anualmente mais de 110 milhões de novos casos, segundo dados da Organização Mundial da Saúde<sup>131</sup>. Isto representa a morte de cerca de 1 a 3 milhões de indivíduos por ano, principalmente devido a infecção pelo *Plasmodium falciparum*. Estudos realizados na Gâmbia, mostraram que a infecção pelo *P.falciparum* é responsável por cerca de  $\frac{1}{4}$  de todas as mortes, em crianças com a faixa etária de 1 a 4 anos<sup>45</sup>. Avaliações epidemiológicas apontam para aumento no número de casos de internações no Brasil devido a infecção pelo plasmodio, de 6.761 para 55.332 indivíduos entre os anos de 1984 à 1992<sup>37</sup>. O número de casos de óbitos registrados pelo Ministério da Saúde, também está aumentando de 815 para 1.150, entre o período de 1983 à 1987<sup>36</sup>.

A hiperparasitemia, assim como a presença das formas maduras do parasito no sangue circulante, têm sido descritos como sinal de mau prognóstico<sup>48 107</sup>. Os grupos mais susceptíveis para desenvolver a forma grave são crianças, idosos e gestantes<sup>130</sup>, porque o sistema imune dos indivíduos nesses três grupos apresenta disfunção associada, respectivamente, à maturação, senescência ou processo de adaptação ligado à gestação. Os indivíduos primoinfectados, assim como aqueles que estejam fora da área endêmica há mais de um ano, correm maior risco de apresentar complicações na malária.<sup>130</sup> Episódios repetidos de malária favorecem a indução de resposta imune capaz de controlar as manifestações clínicas da infecção pelo *P. falciparum*, com diminuição da frequência das formas graves. Em áreas malarígenas consideradas de baixa endemicidade, a imunidade da população é baixa, podendo ocorrer as formas graves em qualquer faixa etária<sup>129</sup>.

Abreviaturas: FNT- $\alpha$ = fator de necrose tumoral- $\alpha$ ; Rs-FNT- $\alpha$ = receptor solúvel do fator de necrose tumoral- $\alpha$ ; FVW= fator de von Willebrand;; IL-1 $\alpha$ = interleucina- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$ = interferon- $\gamma$ , IL-2= interleucina-2; IL-6 = interleucina-6; IL-8= interleucina-8; GM-CSF= granulocyte-macrophage-colony- stimulating factor.

O quadro clínico da forma grave da malária é bastante pleomórfico, dependendo das manifestações da síndrome de inflamação sistêmica. Essa síndrome também tem sido detectada nas mais diferentes condições clínicas de origem infecciosa e não infecciosa, como sepse, parasitemias, fungemias, viremias, pancreatite, politraumatismo e choque hemorrágico<sup>4</sup>. A administração endovenosa de endotoxina bacteriana<sup>108</sup> ou fator de necrose tumoral (FNT- $\alpha$ )<sup>61</sup> também induz quadro semelhante. Uma complicação frequente dessa síndrome é o desenvolvimento de disfunções de órgãos ou sistemas, tais como lesão pulmonar aguda, choque, insuficiência renal e a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, que representa o comprometimento de pelo menos dois órgãos<sup>4</sup>. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa síndrome são múltiplos, mas pode ser destacado o aumento do FNT- $\alpha$ : e a disfunção endotelial<sup>4</sup>

### 1.1. Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos na malária grave:

A forma cerebral da malária é uma das manifestações clínicas mais frequentes e sua taxa de mortalidade pode alcançar até 50% dos casos<sup>125 126 130</sup>. Os pacientes com lesões neurológicas podem apresentar sequelas como ataxia, afasia, hemiplegia ou cegueira cortical<sup>10</sup><sup>17</sup>. A ataxia tem sido correlacionada com o desenvolvimento de lesões localizadas na região cerebelar que se expressa histopatologicamente pela alta prevalência de seqüestro de hemácias parasitadas na microcirculação, assim como hemorragia perivascular<sup>103</sup>. O aumento da pressão intracraniana, aferida por punção lombar, foi identificada em crianças com malária cerebral<sup>79</sup>, mas não foi confirmado na tomografia computadorizada de crânio em pacientes adultos<sup>70</sup>. Para controlar as lesões neurológicas era utilizado corticosteróides, que entretanto não reduzia a mortalidade<sup>50 126</sup>, mas prolongava o período do coma, quando o seu efeito foi comparado com o do placebo<sup>126</sup>.

As lesões pulmonares apresentam uma frequência de 3 a 10% e geralmente se manifestam por alterações hemodinâmicas e radiológicas semelhante ao quadro de síndrome de angústia respiratória do adulto (SARA)<sup>9</sup>. O edema pulmonar tem sido associado à administração excessiva de líquidos e à diminuição da pressão oncótica<sup>19</sup>, mas a redução da resistência vascular pulmonar acompanhou a maioria dos pacientes que desenvolveu essa síndrome<sup>19</sup>. O mais

provável é que o edema pulmonar na malária esteja relacionado com a disfunção da unidade alvéolo-capilar<sup>97</sup>, devido a lesão das células endoteliais ou do pneumócito II<sup>29</sup>. Sequestro de hemácias parasitadas pode estar presente em 51% dos pacientes que foram a óbito por insuficiência respiratória<sup>2</sup>. De qualquer forma, a presença de lesão pulmonar representa um mau prognóstico, visto que a sua mortalidade pode atingir até 70% dos casos<sup>9</sup>.

A frequência de insuficiência renal aguda na malária pode alcançar até 94% dos casos nas forma graves<sup>110</sup>. Essa complicação é geralmente diagnosticada entre o 4º e T\_ dia após o início da febre, acompanhada de hipermetabolismo e aumento rápido da creatinina<sup>110</sup>. A lesão fundamental é a necrose tubular aguda, mas pode ocorrer uma ampla gama de apresentações histopatológicas, que varia da glomerulopatia a outras formas de tubulopatias<sup>110</sup>. A insuficiência renal pode ampliar ou mesmo causar disfunções em outros órgãos, o que explica a frequente associação entre a lesão renal e a presença de edema pulmonar ou lesões no sistema nervoso central<sup>29 5871</sup>.

Na infecção pelo *P. falciparum* tem sido encontrada trombocitopenia<sup>51</sup> e alterações relacionadas à hemostasia<sup>4889</sup>, o que sugere ter ocorrido um estado de hipercoagulação. De fato, Hemmer e cols<sup>48</sup> mostraram que na disfunção de múltiplos órgãos na malária havia diminuição da atividade plasmática da proteína C e do inibidor-1 da proteína C, associado com elevação da concentração do complexo trombina-anti-trombina **III**. Todas essas alterações apresentam forte correlação com o grau de parasitemia, tendo se normalizado após a eliminação dos parasitos. Fenômenos hemorrágicos, como epistaxe, hemorragia subconjuntival e hemorragia gengival podem ocorrer em até 9% dos pacientes com malária cerebral<sup>125 127</sup>. Por outro lado, a coagulação intravascular disseminada não tem sido relatada com muita frequência na malária<sup>130</sup>.

Os mecanismos envolvidos na fisiopatogenia da síndrome de inflamação sistêmica na malária ainda são pouco conhecidos. Os principais eventos relacionados com esse processo têm sido avaliados através dos achados experimentais e clínicos.

## **1.2. Modelos experimentais na malária grave:**

Os modelos experimentais tentam simular o desenvolvimento da forma grave de malária humana. Na infecção produzida pelo *P. berghei* Anka em camundongos susceptíveis do tipo CBA, ocorre o aparecimento de lesões neurológicas a partir do 6º dia de infecção. Estudo empregando técnicas de microperfusão mostrou que as lesões mais características foram o

aumento da permeabilidade capilar, intensa congestão vascular e presença de numerosos monócitos ativados aderidos ao endotélio<sup>18</sup>. Nesse modelo não foi possível determinar se a disfunção endotelial foi causada por ativação ou lesão. Outros autores<sup>22</sup> não confirmaram essas alterações na integridade da barreira hémato-encefálica. De qualquer forma, as lesões da forma grave da malária murina tem sido atribuída ao aumento na produção do FNT- $\alpha$ <sup>41 42</sup>. O desenvolvimento da lesão neurológica depende da cooperação de linfócito T<sup>2042</sup>, assim como da participação de outras citocinas como interferon-7, interleucina-3 e GM-CSF<sup>41 42</sup>. Durante a infecção pelo *P. berghei* em murinos tem sido detectado aumento de produção pelos macrófagos de FNT- $\alpha$ <sup>41a</sup> e radicais livres<sup>60</sup>. O uso de anticorpo anti-FNT- $\alpha$  nesses animais bloqueia o desenvolvimento das lesões neurológicas<sup>41</sup>. A injeção endovenosa de FNT- $\alpha$  reproduz os achados de disfunção de múltiplos órgãos do paciente com a forma grave de malária<sup>3072</sup>. O FNT- $\alpha$  pode, também, estimular a produção de óxido nítrico nas células endoteliais<sup>66</sup>, que possui a propriedade de se difundir pelo tecido nervoso e interferir com a transmissão sináptica normal.

Ainda não foi esclarecido porque ocorre aumento na produção do FNT- $\alpha$  na malária murina, mas especula-se que seja através da estimulação pelos antígenos do parasito. Tais antígenos, que funcionam como exotoxinas, possuem propriedades semelhantes às das endotoxinas bacterianas<sup>54</sup>, podendo estimular os macrófagos a aumentar a produção e liberação do FNT- $\alpha$ <sup>55 62 115</sup>. Um dos efeitos do FNT- $\alpha$  nos fagócitos é a indução da produção de enzimas proteolíticas e radicais livres do oxigênio<sup>35</sup>, assim como do aumento da expressão das moléculas de aderência na superfície celular<sup>34</sup>. O fagócito ativado reconhece receptores na superfície do endotélio, e nesse íntimo contato intercelular pode ocorrer disfunção das células endoteliais<sup>98</sup>. De fato a depleção prévia dos fagócitos produz uma redução significativa na frequência da disfunção de múltiplos órgãos, quando foi feita injeção endovenosa de TNF- $\alpha$  nos animais<sup>72</sup>.

Apesar da malária cerebral murina apresentar vários pontos em comum com a forma grave humana, existem pelo menos duas grandes diferenças. A elevada taxa de mortalidade nos modelos murinos, alcançando mais de 95% dos animais<sup>18 41 42</sup>, em contrapartida com a forma humana que é em torno de 20% dos casos. A outra diferença fundamental é que na malária murina o monócito é a principal célula aderida à superfície do endotélio<sup>18</sup>, enquanto na forma humana são as hemácias parasitadas<sup>71</sup>. Deste modo, se faz necessário o desenvolvimento de metodologia que possibilite estudar os mecanismos envolvidos na forma grave da malária no próprio paciente.

### 1.3. Imunopatogenia da forma grave de malária:

Os principais achados histopatológicos encontrados nos pacientes que foram a óbito por malária, tem sido a presença de hemácias parasitadas na microcirculação<sup>2 71</sup>. O seqüestro dessas células tem sido considerado uma característica obrigatória na infecção pelo *P. falciparum*, independente do tipo de evolução clínica do paciente. Esse processo fornece ao parasito pelo menos duas vantagens teóricas: favorece o seu crescimento condições microaerófilas<sup>100</sup>, presentes na região venular pós-capilar, assim como permite que o parasito possa se evadir dos mecanismos de eliminação esplênicos.

A capacidade do parasito de se ligar às células endoteliais envolve a presença de estruturas na superfície das hemácias parasitadas<sup>105</sup>. A citoaderência está associada com a presença de protuberâncias, que são deformações na superfície da membrana, induzidas pelo *P. falciparum* durante o seu desenvolvimento intraeritrocitário<sup>6</sup>. Entretanto, foi mostrado que hemácias parasitadas sem protuberâncias, também podem aderir à superfície de outras células<sup>95</sup>. O fenômeno de formação de rosetas, que consiste na aderência entre hemácias parasitadas e não parasitadas<sup>16</sup>, ocorre de maneira muito intensa quando está associado com a lentificação do fluxo sanguíneo<sup>57</sup>, como é observado na região venular pós-capilar. Especula-se que o fenômeno de aderência dessas células produza obstrução do fluxo sanguíneo na microcirculação, gerando anóxia tissular que pode evoluir para disfunção de múltiplos órgãos. De fato, a obstrução dos vasos sanguíneos pelas rosetas foi observado em modelo *ex vivo*<sup>57</sup> e a gravidade das lesões neurológicas tem sido correlacionada com a intensidade do fenômeno de aderência associada as hemácias parasitadas<sup>16</sup>.

Recentemente, tem sido detectado aumento na concentração plasmática de FNT- $\alpha$  nos pacientes com malária por *falciparum* (Tabela 1). Uma grande variabilidade nos resultados foi observada nos diversos estudos sobre o FNT-a e a malária grave. Esse fato deve-se aos diferentes critérios de inclusão adotados e aos diferentes tipos de testes empregados. Após a negatificação da parasitemia e da recuperação clínica do paciente tem ocorrido a normalização nos níveis dessa citocina<sup>44 63 109</sup>. Além da detecção no sangue periférico o FNT- $\alpha$ : tem sido identificado no liquor de pacientes com a lesão neurológica<sup>109</sup>, mas outros autores mostraram que em crianças com malária cerebral o nível liquórico estava normal<sup>44</sup>.



Tabela 1. Concentração de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (FNT-a) na infecção pelo *P. faicparum* no adulto

Ref.	Forma Clínica	FNT-a (pg/mL) (técnica)	Observações
-Adultos-			
14	NE	5-495 (IEE e RIE)	A concentração de FNT-a no grupo faicparum foi maior que no vivax IFN- $\gamma$ e 1L-1 estavam normais
21	M	28,5% > 50 (IEE)	
35	G	120 $\pm$ 65* (IEE)	IL-6=44 pg/mL(média) IL8= 216 pg/ml (média)
48	G	142** (RIE)	
58	G	970** (RIE)	FNT-a mais elevado na forma grave
91	M	35 $\pm$ 30* (RIE)	A concentração do Rs-IL2 e GM-CSF foi maior na forma grave
109	G	NE (IEE)	O nível do FNT-a, IL-6 e IL-2 estavam mais elevados na forma grave
-Crianças-			
44	G	148 $\pm$ 25* (RIE)	O nível de FNT-a foi maior na forma grave
63	G	NE (IEE)	O nível de FNT-a foi maior na fase aguda normalizando no período de convalescência
64	G	NE (IEE)	O risco relativo de óbito foi de 4,1 para concentração de FNT-a maior que 500
83	NE	260* (IEE)	
105	G	110* (IEE)	O nível de FNT-a foi maior no grupo grave

\*Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão; \*\* corresponde a mediana  
 Abreviaturas: Ref.= referências; G= grave; M= moderada; NE= Não especificado;  
 (EE= Imunoensaio Enzimático; RIE= Rádio Imunoensaio; IFN- $\gamma$ = Interferon- $\gamma$ ;  
 IL-1 -6 -8= Interleucina-1 -6 -8.

O FNT- $\alpha$  tem sido correlacionado com a gravidade da lesão neurológica e foi calculado um risco relativo de 4,1 para concentração de FNT- $\alpha$  maior que 500 pg/ml<sup>63</sup>. O aumento da concentração plasmática do FNT- $\alpha$  tem sido correlacionada com outras variáveis, como hiperparasitemia<sup>44 58 63 105</sup>, trombocitopenia<sup>48</sup>, anemia<sup>105</sup> e hipoglicemia<sup>44 63</sup>.

Outras citocinas, também, estão envolvidas na forma grave da malária. Foi detectado aumento da concentração plasmática de IL-6<sup>35 58</sup>, IL-8<sup>35</sup>, IL-1 $\alpha$ <sup>63</sup>, receptor solúvel de IL-2<sup>91</sup> e GM-CSF<sup>91</sup>. Os mecanismos envolvidos na desregulação das citocinas na malária grave ainda não foram esclarecidos, mas os macrófagos obtidos de pacientes com malária por falciparum produzem significativamente mais FNT- $\alpha$  do que as células obtidas do controle<sup>62</sup>. Esse aumento de produção ocorre com a célula em repouso e de maneira significativa quando ela é estimulada com endotoxina bacteriana<sup>62</sup>. A elevação do FNT- $\alpha$  no sangue periférico dos pacientes com malária antecede o desenvolvimento da febre<sup>56</sup> e pode ser controlada com a administração de anticorpo anti-FNT- $\alpha$ <sup>64</sup>. Além disso, essa citocina participa da resposta imune anti-parasitária, inibindo a proliferação do plasmódio de forma direta<sup>34 116</sup> ou indireta através da ativação dos fagócitos<sup>34</sup>.

Até o momento, não foi esclarecido se a disfunção endotelial está presente na malária grave. A detecção do aumento global da permeabilidade capilar<sup>5 27 75</sup> faz supor que tenha ocorrido disfunção das células endoteliais. De fato, tem sido detectado através da microscopia eletrônica edema endotelial, ou até células endoteliais em processo de degeneração, em material obtido de pacientes que foram a óbito<sup>25 29 71</sup>. No entanto, a maioria das células apresentavam morfologia normal<sup>71</sup>. Recentemente, Hviid e cols<sup>53</sup> mostraram que pacientes com a forma moderada de malária apresentaram elevação na concentração plasmática da molécula de aderência intercelular-1 e da selectina-E, também chamada de molécula de aderência dos leucócitos e endotélio-1. A detecção dessas moléculas de aderência serve para avaliar a disfunção endotelial e nesse estudo houve normalização dos níveis após o controle da parasitemia. No entanto, esse estudo não avaliou a participação do aumento do FNT- $\alpha$  ou do fenômeno de aderência associado às hemácias parasitadas. Existe a necessidade de estudar a ocorrência da disfunção endotelial na malária grave e suas relações com o FNT- $\alpha$ .

## **OBJETIVOS**

- 2.1. Principais:** - Estudar a disfunção do endotélio na forma grave de malária, através da detecção de selectina-E e fator de von Willebrand
- Correlacionar a disfunção do endotélio com o nível de fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interleucina-1 $\alpha$
- 2.2 Secundário:** - Correlacionar a disfunção do endotélio e o nível de FNT- $\alpha$ : com parâmetros clínicos e laboratoriais

## GRUPOS DE ESTUDO E MÉTODOS

## GRUPOS DE ESTUDO E MÉTODOS

### 3.1. Tipo de estudo e formação dos grupos:

Estudo de série de casos realizado durante o 1º semestre de 1990 até o 1º semestre de 1993. O principal critério de inclusão foi a presença da forma grave de malária causada pelo *Plasmodium falciparum*. Pacientes de ambos os sexos, com idade compreendida entre 15 e 65 anos, que foram admitidos nas Unidades de Terapia Intensiva ou Pronto Socorros dos seguintes Hospitais: Hospital Universitário de Brasília (DF), Hospital de Base (DF), Hospital Regional de Sobradinho (DF), Hospital Regional de Taguatinga (DF), Hospital Regional da Asa Norte (DF), Hospital Santa Lúcia (DF), Hospital de Doenças Tropicais (GO) e CEMETRON (RO).

A malária foi definida pela presença de formas assexuadas de *P. falciparum* no sangue periférico. O quadro clínico foi considerado grave quando estivesse presente, pelo menos, um dos seguintes critérios, de acordo com a proposta da OMS<sup>130</sup>:

#### I. Síndrome de Angústia Respiratória do Adulto (SARA):

# Critérios de Inclusão: Pressão parcial de O<sub>2</sub> arterial (PaO<sub>2</sub>) < 70 mm de Hg, para uma fração inspirada de O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub>) > 40%; e/ou Rx simples de tórax compatível com edema pulmonar (infiltrado pulmonar bilateral).

# Critérios de exclusão: pacientes portadores de doença pulmonar crônica e/ou cardiopatia.

#### II. Malária cerebral:

# Critérios de inclusão: coma que não possa ser atribuído a outras causas, inclusive hipoglicemia.

# Critérios de exclusão: Presença de doenças neurológicas prévias.

III. Anemia grave:

# Hematócrito < 15% ou hemoglobina < 5 g/dL.

IV. Insuficiência renal aguda:

# Débito urinário < 400 mL/24 h ou creatininemia > 3mg/dL.

V. Hipoglicemia:

# Glicemia < 40 mg/dL.

VI. Choque:

# Pressão arterial sistólica < 70 mm de Hg, associada a má perfusão das extremidades.

VII. Hiperparasitemia:

# Parasitemia > 5% em indivíduos não imunes, ou > 10% ou >250.000 parasitos//xL nos semi-imunes.

VIII. Aumento da bilirrubinemia:

# Bilirrubinemia total > 3 mg/dL.

IX. Hemorragias:

# Sangramentos espontâneos em mucosas ou associado com a coagulação intravascular disseminada (tempo de protrombina e tempo de sangramento acelerados, presença de produtos derivados da fibrina).

A síndrome de inflamação sistêmica foi definida segundo os critérios da ACCP/SCCM<sup>4</sup>

\*<sup>1</sup>, pela presença de pelo menos dois dos seguintes parâmetros: 1) temperatura retal > 38 °C ou < 36 °C; 2) frequência cardíaca > 90 batimentos por minuto; 3) frequência respiratória > 20 incursões respiratórias por minuto ou PaCO<sub>2</sub> < 32 mmHg; e 4) leucometria > 12.000 ou < 4.000/mm<sup>3</sup>, ou > 10% de formas jovens (bastões).

### 3.2. Grupo de estudo:

Foram estudados 19 pacientes com a forma grave de malária por *P. falciparum*. As principais características dos pacientes com falciparum estão descritas na Tabela 2 e Anexo II. A idade média foi de 29 anos, em ambos os grupos, sendo a grande maioria do sexo masculino. O número de episódio prévios de malária apresentou ampla variação, de nenhum caso até mais de 50. No entanto, não houve diferença significativa da frequência entre os dois grupos.

O local em que os pacientes contraíram a infecção foi bastante heterogêneo, havendo predominância dos Estados de Rondônia, Mato Grosso e Pará. O tempo decorrido entre o início dos sintomas e a data da colheita de sangue foi de 6,1 ± 3,2 na forma grave e 5,7 ± 6,5 dias. As pacientes graves #4 e #16 do grupo grave eram gestantes e se encontravam, respectivamente na 32<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> semana de gestação. A profissão que mais se destacou foi a de garimpeiro que correspondeu, respectivamente, a 21,1% e 42,1% da forma grave e moderada de malária.

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes da forma grave foram obtidos nas primeiras 24 h de internação (Tabela 3, tabela 4 e anexo II). Destacam-se a presença de hipotensão arterial (70,7 ± 12,6 mmHg), taquipnéia (24,7 irpm), febre e hepato-esplenomegalia em mais de 50% dos casos. Os achados laboratoriais mais significativos estão expressos na Tabela 3 e Anexo II. Foi detectado anemia (28,9 ± 8,5), retenção nitrogenada (creatininemia de 32 ± 1,8 mg/dL), hipoxemia (PaO<sub>2</sub> = 76,33 ± 25 mmHg) e acidose metabólica.

\* <sup>1</sup>ACCP/SCCM = American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine

Tabela 2. Dados epidemiológicos dos pacientes infectados pelo *Plasmodium falcioarum* \*

	Forma clínica	
	Crave	Moderada
Nº (masculino/feminino)	15/4	21/2
Idade (anos)	29 + 13	29 + 8
Nº de episódios anteriores de malária		
0	5	4
1 - 4	7	5
> 4	2	7
indeterminado	4	5
Local da infecção:		
-Góias	3	2
-Maranhão	1	0
-Mato Grosso	6	4
-Pará	1	7
-Rondônia	6	10
-Roraima	1	0
Tocantins	1	0
Demora para início do tratamento (dias)	6,4 + 3,3	6,2 + 6,6
Evolução (óbito/sobrevida)	4/15	0/23

\*Os valores ± definem a média + desvio padrão



Tabela 3. Achados laboratoriais em 19 pacientes com malária grave por *Plasmodium falciparum*

Variável	X ± desvio padrão (N)
Hematócrito	28,9 ± 8,5 (19)
Creatininemia (mg/dL)	3,2 ± 1,8 (18)
Glicemia (mg/dL)	99,9 ± 34,2 (15)
Bilirrubinemia (mg/dL)	10,3 ± 10,5 (13)
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	76,3 ± 25,7 (9)
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	26,9 ± 7,2 (9)
HCO <sub>3</sub> (mEq/L)	15,9 ± 6,9 (10)
pH	7,28 ± 0,23 (10)
Na sérico (mEq/L)	132,8 ± 8,7 (13)
K sérico (mEq/L)	4,1 ± 0,9 (16)

Tabela 4. Achados clínicos em 19 pacientes com malária grave por *Plasmodium falciparum*

Variável	Desvio padrão (N)
Frequência cardíaca(bpm)	101 ±, 18 (19)
Frequência respiratória (irpm)	24 ± 8 (19)
Temperatura axilar (°C)	37,3 ± 1,1 (19)
Pressão arterial (mmHg)	
-Sistólica	95,8 ± 12,3 (19)
-Diastólica	58,1 ± 12,8 (19)
-Média	70,7 ± 12,6 (19)
Hepatomegalia (%)	57,8 (19)
Esplenomegalia (%)	63,2 ± (19)
Escala de Glasgow	14,4 ± 0,6 (19)
APACHE II	15,4 ± 7,4 (9)

bpm= batimento por minuto; irpm= incursões respiratórias por minuto.

### **3.3. Grupo controle:**

Estes grupos foram formados pelos casos de malária por *P. falciparum* não grave (forma moderada) e pelos casos de infecção pelo *P. vivax*. Os controles hígidos foram definidos pela ausência de qualquer condição patológica ou uso de qualquer fármaco duas semanas que antecederam a colheita de sangue.

### **3.4 Considerações éticas:**

Por se tratar de pesquisa clínica com "risco mínimo" (Art. 7, Inciso II; e Artigo 13. Resolução N° 01/88, Conselho Nacional de Saúde, Ministério da saúde), foi solicitado apenas o consentimento pós-informação, sem a formulação por escrito. Esse consentimento foi obtido do próprio paciente, do seu Médico Assistente ou dos familiares.

O consentimento obtido permitiu colher amostra de sangue venoso e a consulta dos registros no prontuário. Em nenhum momento houve interferência na condução dos casos, exceto quando solicitado.

### **3.5. Critérios de gravidade:**

O sistema de classificação de critério de gravidade "APACHE II" (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) e o índice de Glasgow foram aplicados nos pacientes com a forma grave de malária. Os parâmetros necessários foram obtidos nas primeiras 24 h da admissão (Anexo 1), utilizando o programa APACHE II, versão 2,4.

A escala de coma de Glasgow varia de 3 a 15 pontos. A gravidade é inversamente relacionada o número de pontos obtidos para as seguintes variáveis: 1) abertura dos olhos; 2) performance da resposta motora; e 3) resposta aos comandos verbais.

O APACHE II varia de 11 a 59 pontos e a gravidade está diretamente relacionada com com o número de pontos obtidos. Os parâmetros necessários para o seu preenchimento forma os seguintes: 1) escala de Glasgow (15- o valor obtido); 2) temperatura retal; 3) D(A-a)O<sub>2</sub>; 4) PaO<sub>2</sub>; 5) PaCO<sub>2</sub>; 6) pH arterial; 7) sódio sanguíneo; 8) potássio sanguíneo; 9) creatinemia; 10)

hematócrito; e 11) leucometria.

### **3.6. Colheita e processamento do sangue:**

Cerca de 10 mL de sangue venoso foram colhidos em tubos com vácuo. O material foi centrifugado 750 x g, a 4 °C, durante 10 minutos. O plasma ou o soro foram aliqotados em tubos de Eppendorf e estocados a 70°C até o dia da realização dos testes. Todas as amostras foram processadas simultaneamente em cada teste

### **3.7. Imunoensaio Enzimático (IEE) para a determinação do fator de necrose tumoral- (FNT- $\alpha$ ):**

A técnica utilizada foi a descrita no manual do Kit de IEE para detecção do FNT- $\alpha$ : (TNF- $\alpha$  ELISA KIT, da Cistron Biotechnology, USA. Catalogo No.04-0096, lote No. GPT 195). O seu limite mínimo de detecção é de 10 pg/mL. A variabilidade intra- e inter-observador é, respectivamente, de 5,5 e 7,9%. Não apresenta reações cruzadas com FNT- $\beta$ , IL-1 $\alpha$  IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4 ou IL-6 As etapas técnicas foram as seguintes:

- 3.7.1. As escavações já haviam sido pré-tratadas com anticorpo monoclonal anti-FNT- $\alpha$
- 3.7.2. Todas as lavagens foram feitas com PBS-TWEEN-20 0,02%
- 3.7.3. Adição das amostras de plasma ou padrões (10 à 2.500 pg/mL), em duplicatas, por 2 h.
- 3.7.4. Lavagem
- 3.7.5. Anticorpo de coelho anti-FNT- $\alpha$ ; por 2 h.
- 3.7.6. Lavagem
- 3.7.7. Anticorpo anti-IgG de coelho, marcado com peroxidase por 30 min.
- 3.7.8. Substrato (Ortofenilalanidiamine (OPD) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%) por 15 min
- 3.7.9. Solução de interrupção: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N.
- 3.7.10. Leitura no espectrofotômetro utilizando filtro de 490 nm.

### **3.8. Imunoensaio Enzimático (IEE) para a detecção da interleucina-1 $\alpha$ (EL-1 $\alpha$ ):**

A técnica empregada foi do manual contido no Kit de IEE para detecção de IL-1 $\alpha$ : (Human

Interleukin- $\alpha$ : ELISA KIT, Lote OD74, Oncomembrane, Inc., Seattle, USA).

O limite mínimo de detecção desta técnica é 0,5 pg/mL, não apresentando reação cruzada com a IL-1 $\beta$ . A variabilidade intra-observador é de 3,7 à 4,6%, enquanto a inter-observador é de 3,8 a 4,4% .

A seqüência utilizada, de maneira resumida, foi a seguinte:

- 3.8.1 . Anticorpo de camundongo anti-IL $\alpha$  humano
- 3.8.2. Todas as lavagens foram realizadas com PBS Dulbecco
- 3.8.3. Solução de bloqueio por 4 h
- 3.8.4. Lavagem
- 3.8.5. Adicionado plasmas e padrões de IL-1 $\alpha$  humano recombinante (7,8 à 250 pg/mL) em duplicatas, por 12 h.
- 3.8.6. Lavagem
- 3.8.7. Segundo Anticorpo de coelho, anti-IL-1 $\alpha$  por 2 h
- 3.8.8. Terceiro Anticorpo de cabra, anti-IgG de coelho, marcada com peroxidase. Incubar durante 2 h.
- 3.8.9. Lavagem
- 3.8.10. Adição do substrato (OPD + Tampão Citrato-fosfato) por 20 min
- 3.8.11. Interrupção da reação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N
- 3.8.12. Leitura no espectrofotômetro de microplaca utilizando filtro de referência de 492 nm.

### **3.9. Imunoensaio enzimático (IEE) para detecção de selectina-E:**

Segundo o manual fornecido pelo fabricante(sELAM-1 ELISA, Lote 01/0393, Bender Medsystem, Viena, Austria) o limite mínimo de detecção do teste é de 1,6 ng/mL, enquanto a sua variabilidade intra-observador e inter-observador é, respectivamente, de 3,7% e 4%. Não é descrito nenhuma reação cruzada com outras citocinas ou receptores solúveis: IL-8, sICAM-1, sFNT-R, FNT- $\beta$ , CD<sub>8</sub>, IL-2R, 11-6 e LECAM-1.

As etapas adotadas neste teste foram as seguintes:

- 3.9.1. Lavagem das escavações previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal murino anti-selectina-E e bloqueadas.
- 3.9.2. Adição do plasma (diluição 1:5) e dos padrões de selectina-E (1,6 até 50 ng/mL)

- 3.9.3. Adição de anticorpo monoclonal murino anti-selectina-E marcado com conjugado. Incubação por 2 h.
- 3.9.4. Lavagem
- 3.9.5. Adição do substrato: Tetrametil-benzidina + peróxido de hidrogênio tamponado a 0,02%
- 3.9.6. Bloqueio da reação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N.
- 3.9.7. Leitura no espectrofotômetro de microplacas, utilizando filtro de leitura de 450nm e filtro de referência de 620 nm.

### 3.10. **Imunoensaio Enzimático (BEE) para a detecção do fator de von Willebrand (FVW):**

Esse teste foi realizado segundo a técnica padronizada no Laboratório CIRES (São Paulo) As etapas foram as seguintes:

- 3.10.1 Sensibilização das placas: Foram utilizadas placas de microtitulação de poliestireno descartáveis com 96 orifícios (Hemobag-Produtos Cirúrgicos Ltda.). Em todos os orifícios foram colocados anticorpo anti-FVW humano (Sigma, USA, Lote: 111H-4897) diluído 1:1.000 em PBS pH 7,2. A incubação foi por 12 h à 4°C, em câmara úmida.
- 3.10.2. Bloqueio com solução de albumina 3% em PBS por 30 min.
- 3.10.3. Diluição do plasma: O plasma dos pacientes e dos controles foram colocados em tubos de ensaio e diluídos em solução de albumina 1% em PBS, nas seguintes proporções: 1/50, 1/100, 1/500, 1/1.000, 1/2.000. O mesmo processo de diluições sucessivas foi utilizado com a solução padrão de crioprecipitado do fator VIII.
- 3.10.4. Adição do material a placa: Todas as lavagens foram feitas com soluções de PBS-TWEEN 20 0,05%. Em uma das colunas da placa foi colocado a solução padrão do crioprecipitado do fator VIII. Numa segunda coluna foi distribuído 100 µL de albumina 1% pura ("blank"). A Incubação durou 60 minutos, a 37 °C, em câmara úmida e escura.
- 3.10.5. Conjugado anti-FVW: O conjugado anti-FVW (1:750), marcado com peroxidase (Dakopatts, Lote 127, Dinamarca) foi diluído em albumina 1% em PBS e incubado durante 1h a 37°C.
- 3.10.6. Sistema revelador: Adição do substrato (OPD + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

3.10.7. Solução de Interrupção: HCl 1 N.

3.10.8. Leitura do resultado: Comparação das diluições com os controles positivos. O ponto de corte estabelecido foi de 1:50.

3.11. Testes estatísticos:

Todos os dados foram apresentados pela média  $\pm$  desvio padrão e quando possível o intervalo de confiança de 95%. O valor do P menor que 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo. Todos os resultados foram bicaudais. As variáveis descontínuas foram analisadas pelo teste Exato de Fisher<sup>111</sup>. As variáveis contínuas, com distribuição normal, foi utilizado a análise univariada associado com o teste de Duncan<sup>111</sup>.

O teste de regressão linear múltiplo foi utilizado para estudar a relação entre a concentração da selectina-E e as variáveis pressão arterial, creatinemia, glicemia e número prévios de malária. O teste de correlação foi utilizado na comparação entre o selectina-E, FVW, FNT-a e IL-1 $\alpha$ .

O programa estatístico utilizado foi o SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA).

## RESULTADOS



## RESULTADOS

Dos 42 pacientes infectados pelo *p. falciparum*, 45,2% desenvolveram as formas graves da malária, segundo a definição da OMS<sup>130</sup>. Esses pacientes apresentam a síndrome de inflamação sistêmica, associada à disfunção de *múltiplos órgãos* (Fig 1). A Insuficiência Renal Aguda foi a complicação que apresentou a maior frequência, comprometendo 63,2% dos pacientes. Outras manifestações foram a hiperbilirrubinemia, acidose metabólica, SARA, lesões do sistema nervoso central, hipoglicemia, hemorragia e anemia grave.

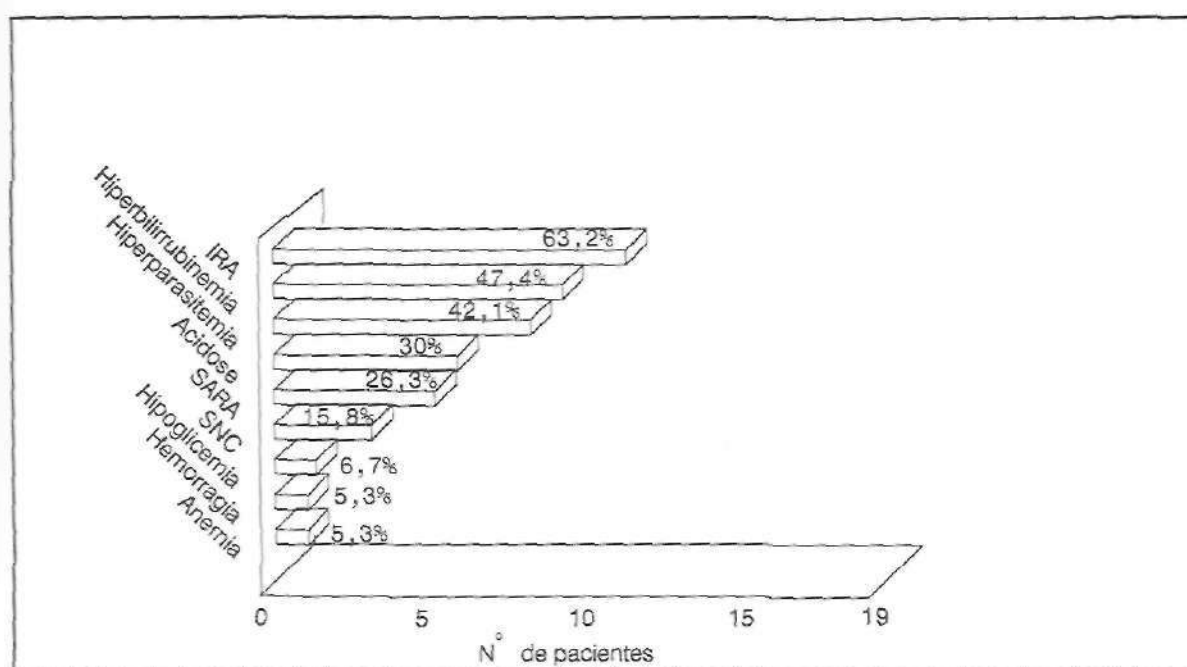


Figura 1. Apresentação das manifestações clínicas dos 19 pacientes com a forma grave de malária. O pH e a glicemia só foram detectados em, respectivamente, 10 e 15 pacientes. Os critérios foram os seguintes: IRA= Insuficiência Renal Aguda (creatininemia > 3 mg/dL e/ou óligo-anúria); Hiperbilirrubinemia (bilirrubina > 3 mg/dL); Hiperparasitemia (> 5% ou >250.000 parasitos/ $\mu$ L); acidose (pH<7,25 ou  $\text{HCO}_3^-$  plasmático< 15 mEq/L); SARA= Síndrome de Angústia Respiratória do Adulto (hipoxemia refrataria à oxigênio-terapia); SNC = Disfunções do Sistema Nervoso Central (convulsão, coma, etc); hipoglicemia (glicemia <40mg/dL); e anemia grave (anemia normocítica e normocrômica, com hematócrito < 15% ou hemoglobina < 5 g/dL). Critérios de gravidade de malária grave da OMS<sup>130</sup>.

#### 4.1. Detecção do fator de necrose tumoral- $\alpha$ (FNT- $\alpha$ ) por Imunoensaio Enzimático (IEE):

##### A. Determinação da curva padrão:

A curva padrão foi obtida utilizando os padrões de FNT- $\alpha$ : recombinante fornecidos pelo fabricante. Os testes foram feitos em duplicata e apresentou uma correlação linear de 0,995152 (Fig 2).

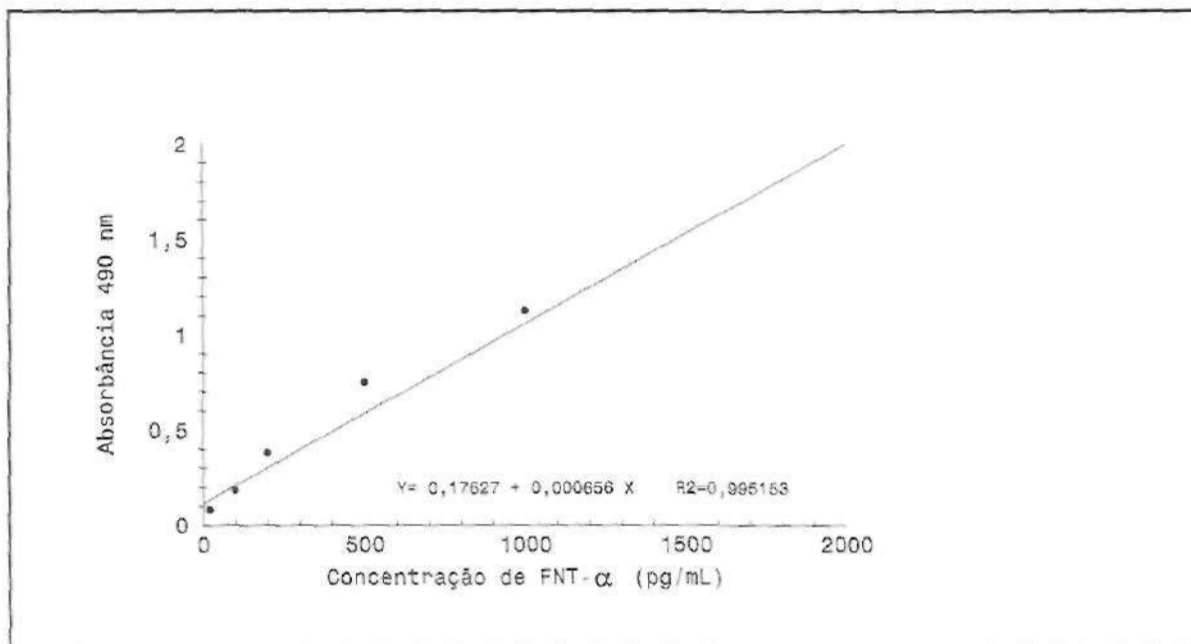


Figura 2. Curva padrão da *detecção* do Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ), através do Imunoensaio Enzimático.

## B. Resultados do IEE:

A média geométrica da concentração plasmática de FNT- $\alpha$  na forma grave foi de  $104 \pm 279$  pg/mL, enquanto os outros grupos não foram detectados produção dessa citocina, porque se encontravam abaixo do limite de detecção de 10 pg/mL. Além disso, as maiores concentrações de FNT- $\alpha$  foram detectadas em dois pacientes com a forma grave que evoluíram para óbito: pacientes #3 e #10, respectivamente, com 1.115 e 522 pg/mL. Foi utilizado teste estatístico não paramétrico para avaliar a diferença entre esses 2 grupos, comparando a concentração plasmática do FNT- $\alpha$   $>$  ou  $<$  10 pg/mL (Tabela 5). O aumento da concentração plasmática do FNT- $\alpha$  foi maior no grupo grave, tendo sido detectado aumento em 26,3% a concentração do FNT- $\alpha$   $>$  10 pg/mL, enquanto todos os pacientes com a forma moderada e vivax foi  $<$  10 pg/mL. Esta diferença entre os grupos foi altamente significativa ( $P=0,01$ ). No entanto, não foi possível demonstrar relação entre os níveis de FNT-a e a evolução para óbito ou recuperação ( $P> 0,05$ ) (Tabela 6).

Tabela 6. Detecção do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ) e do fator de von Willbrand (FVW) em relação com a evolução da forma grave

Teste	Sobrevida	Óbito P*
FNT- $\alpha$ (pg/mL)		
< 10	12	
> 10	2	<b>0,3</b>
VFW (Título)		
< 100		
> 100		<b>0,2</b>

\*Teste Exato de Fisher

#### 4.2 Detecção de interleucina- $1\alpha$ (IL- $1\alpha$ ) por Imunoensaio Enzimático(IEE)

##### A. Determinação da curva padrão:

Com curva padrão de IL- $1\alpha$  foi obtido um coeficiente de correlação de 0,9890 (Figura 3)

##### B. Resultado do IEE da IL- $1\alpha$ :

Na tabela 7 estão expressos os resultados da detecção de IL- $1\alpha$ . A média geométrica da concentração plasmática de IL- $1\alpha$  foi de  $99 \pm 242$  pg/mL na forma moderada de malária. Nos outros grupos a concentração foi menor do que o limite de detecção de 0,5 pg/mL. A frequência de detecção de IL- $1\alpha$  foi de 28,6% na forma moderada e nenhum no grupo grave. Essa diferença não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) (Tabela 7).

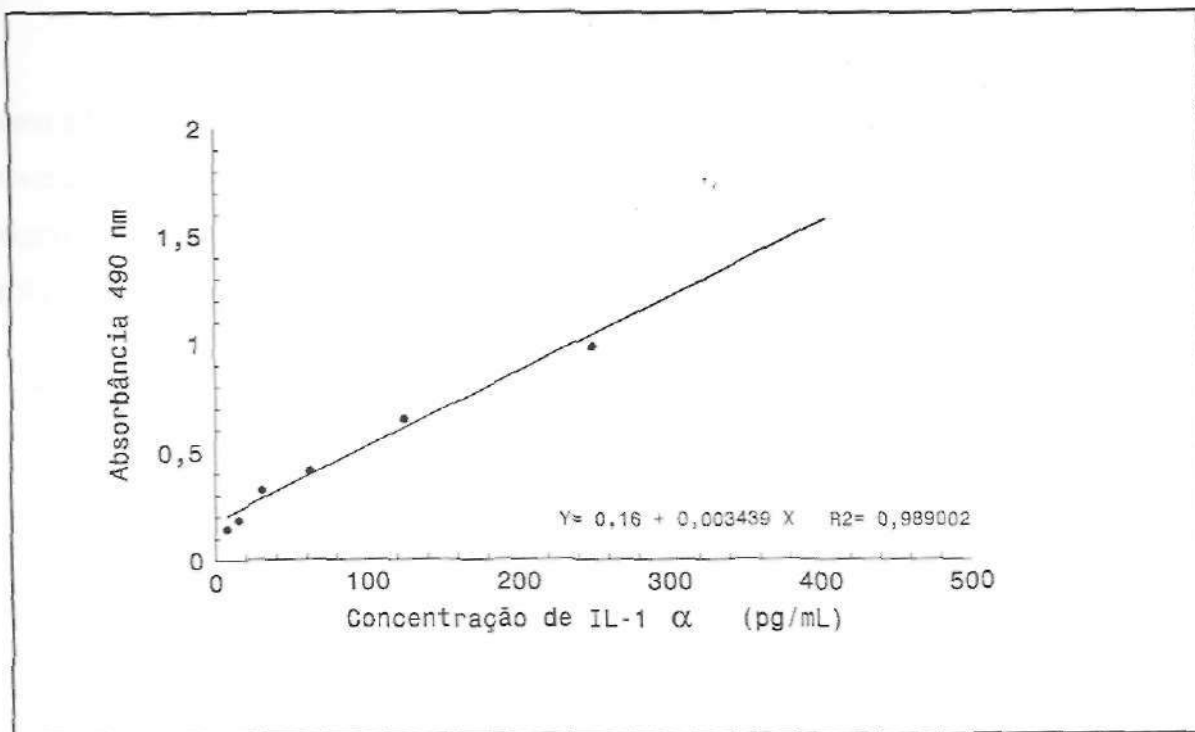


Figura 3. Curva padrão da interleucina-1α por imunensaio enzimático

Tabela 7. Concentração plasmática de Interleucina-1α (IL-1α), em indivíduos com malária

(pg/mL)	<i>P. falciparum</i> (forma clínica) (%)		<i>P. vivax</i> (%)
	Grave (8)	Moderada (7)	
≤ 0,5	100	71,4	100
>0,05	0	28,6	0

Teste Exato de Fisher  
a- Grave X Moderada P > 0,05  
b- Grave X vivax P > 0,05

### 4.3. Detecção do fator de von Willebrand (FVW) por Imunoensaio Enzimático (IEE)

Os maiores títulos de FVW ocorreram na forma grave de malária, quando comparado com a forma moderada ( $P=0,02$ )(Tabela 8)(Fig 4). Dois pacientes do grupo grave (#3 e #16) tiveram os maiores títulos do FVW e foram a óbito. No entanto, não apresentou diferença significativa quando foi comparado a frequência dos títulos e a evolução para óbito ou sobrevida ( $P > 0,05$ )(Tabela 6).

Tabela 8. concentração plasmática do fator de von Willebrand em indivíduos com malária

FVW (Título)	<i>R. falciparum</i> (forma clínica)(%) Grave (19)	<i>P. vivax</i> (%) Moderada (19)	<i>P. vivax</i> (%) (6)
< 100	58,3	73,9	83,3
> 100	41,7	26,1	16,7
Teste Exato de Fisher			
a-Grave X Moderada		P= 0,02	
b-Grave X Vivax		P= 0,07	
c- Grave X Moderada + vivax		P= 0,008	

Distribuição da frequência dos títulos do FVW (%)

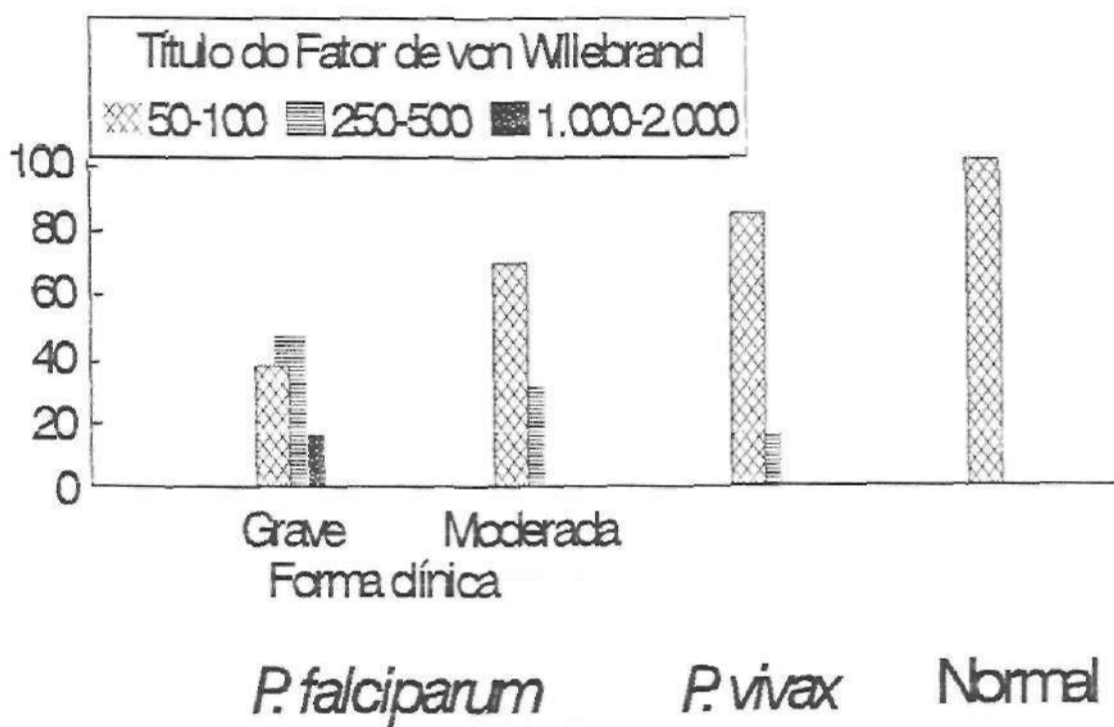


Figura 4. Distribuição da frequência dos títulos do fator de von Willebrand pelo IEE nos pacientes com malária.

#### 4.4. Detecção da selectina-E plasmática por Imunoensaio enzimático (IEE):

##### A. Determinação da curva padrão:

A curva padrão de selectina-E foi definida através da utilização dos valores de referência fornecidos pelo fabricante. Os testes foram realizados em triplicata e foi obtido um coeficiente de correlação de 0,996 (Fig. 5)

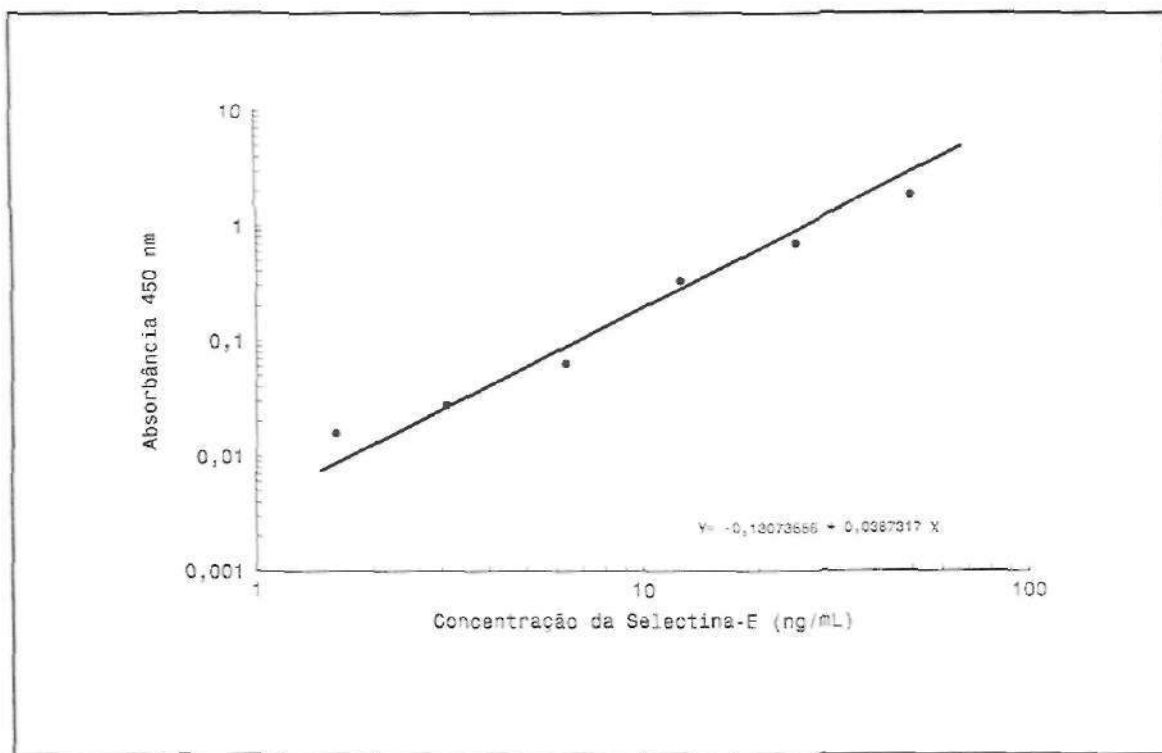


Figura 5. Curva padrão da selectina-E obtida através de Imunoensaio enzimático, O coeficiente de Pearson foi 0,9960.



## B. Resultados do IEE da selectina-E:

A média geométrica da concentração plasmática da selectina-E na forma grave de Malária foi  $52,1 \pm 34,9$  ng/mL, enquanto na moderada  $34,6 \pm 16,1$  ng/mL. Essa diferença foi altamente significativa entre os 2 grupos ( $P < 0,05$ ). A concentração da selectina-E no grupo vivax e controle Normal foi, respectivamente,  $26,9 \pm 6,8$  e  $22,1 \pm 3,8$  ng/mL, mas a diferença não foi significativa ( $P > 0,05$ ) (Fig. 7) (Tabela 9). Por outro lado, nas duas formas de infecção pelo falciparum a concentração de selectina-E foi maior do que no grupo Normal (Fig. 7)(Tabela 9).

Tabela 9. Concentração plasmática de selectina-E nos indivíduos com malária

	N	média $\pm$ desvio padrão (ng/mL)	IC 95%
<i>P. falciparum</i> (forma clínica)			
Grave	19	$52,1 \pm 34,9$ *	35,3 - 68,9
Moderada	23	$34,6 \pm 16,0$ *	27,6 - 41,5
<i>P. vivax</i>	6	$26,9 \pm 2,8$ * †	19,8 - 34,1
Normal	13	$22,1 \pm 3,8$ * †	19,8 - 24,4

Análise Univariada e o teste de Duncan

\*  $P < 0,05$

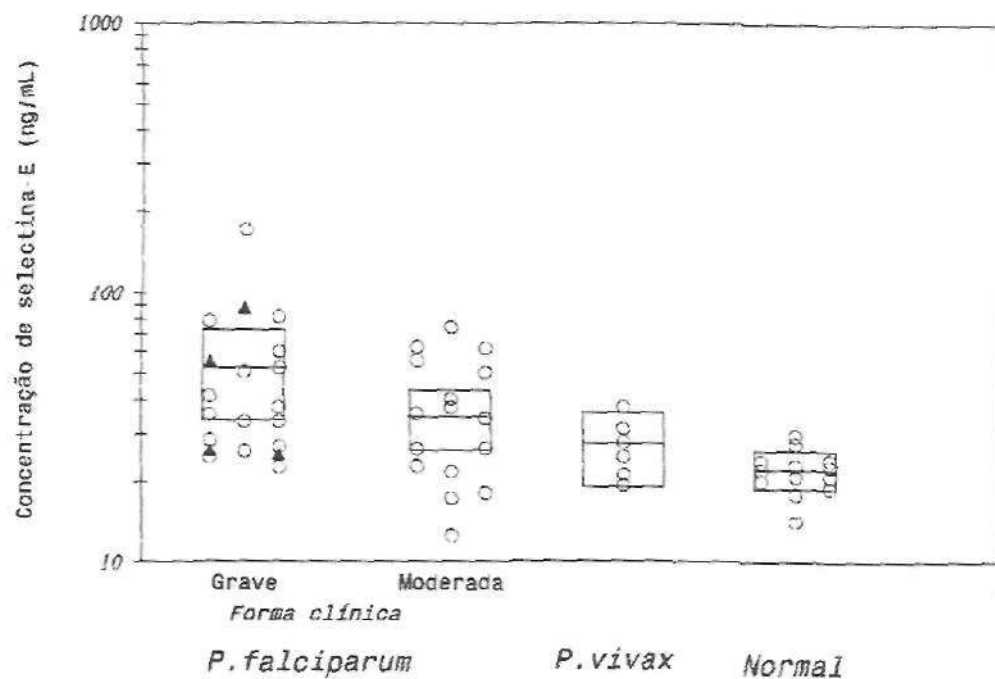


Figura 6. Concentração plasmática de selectina-E nos pacientes com malária por *P. falciparum*. A linha horizontal representa a média e a região superior e inferior do retângulo o intervalo de confiança de 95 %. Houve diferença significativa entre a forma grave e moderada ( $P < 0,05$ ). As duas formas clínicas da infecção pelo *p. falciparum* apresentaram concentração de selectina-E maior do que o controle normal ( $P < 0,05$ ) (Análise univariada/Teste de Duncan)

Não houve diferença entre a concentração de selectina-E nos pacientes com malária grave que foram a óbito ou sobreviveram ( $P < 0,05$ ).

#### 4.5. Regressão linear múltipla.

A selectina-E foi a única varável que se ajustou ao estudo da regressão linear múltipla. A sua concentração plasmática foi comparada com a pressão arterial média, hematócrito, creatinemia, glicemia e o tempo decorrido para o início do tratamento. Não houve correlação entre as variáveis testadas.

#### 4.6. Correlação entre FNT- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , FVW e selectina-E:

A única correlação com significância estatística ( $P=0,047$ ) ocorreu entre os níveis de FNT- $\alpha$  e os títulos do FVW ( $R^2= 0,4736$ ) no forma grave de malária (Fig. 7).

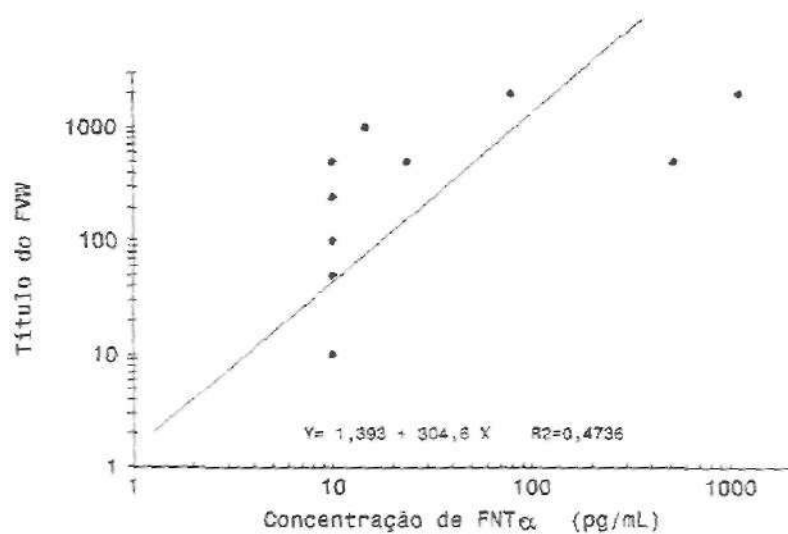


Figura 7. Correlação entre o título do fator de von Willebrand(VFW) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ). O coeficiente de Pearson foi 0,476 ( $P=0,047$ ).

Os resultados totalizado da detecção da concentração plasmática do FNT- $\alpha$ ., FvW, IL-1 $\alpha$ ; e selectina-E estão na Tabela 10. A selectina-E foi a única variável que apresentou distribuição normal tendo sido avaliada pela análise univariada (item 4.4.B).

TABELA 10. Concentração plasmática do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ), interleucina-1- $\alpha$  (IL-1- $\alpha$ ) e fator de von Willebrand (FW) na malária grave

Teste	<i>P. falciparum</i> (forma)		<i>P. vivax</i>
	Grave	Moderada	
FNT- $\alpha$			
≤ 10	14*	24*	6*
> 10	5	0	0
.....			
IL-1 $\alpha$			
≤ 0,5	8	5	6
> 0,5	0	2	0
.....			
FvW			
≤ 100	7 *	18 *	5*
> 100	12	6	1
.....			
Selectina-E			
≤ 30	3	11	2
> 30	16	12	4

\* Teste Exato de Fisher  $P < 0,05$

**4.7. Estudo evolutivo dos níveis de FNT-a, FVW, selectina-E e parasitemia em 10 pacientes com infecção pelo *P. falciparum*:**

Foram seguidos 10 pacientes com infecção pelo *P. falciparum*, tendo sido classificado 5 na forma grave e 5 na forma moderada, tendo sido colhido 2 amostras num intervalo de aproximadamente 7 dias (Tabela 11) (Fig. 8). O paciente grave # 3 (Fig. 9), as amostras foram colhidas num intervalo de 12 h. O tamanho da amostra foi pequeno para se realizar testes estatísticos.

Tabela 11. Evolução da concentração plasmática de FNT-a, FVW, selectina-E e parasitemia nos pacientes com malária\*

	Dia 0	Dia 7
	(Forma grave)	
FNT-α	48,9 ± 62,0	25.8 ± 9,2
FVW	250 ± 165	100 ± 230
Selectina-E	51,4 ± 9,3	38.9 ± 3,8
Parasitemia	550.000	0
	(Forma Moderada)	
FNT-a	NR	NR
FVW	NR	NR
Selectina-E	34,6 ± 20,4	29,2 ± 18,3
Parasitemia	8.800	0

\*Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão; NR= não foi realizado; FNT-a em pg/mL; FVW em título, selectina-E em ng/mL e a parasitemia em parasitos/μL

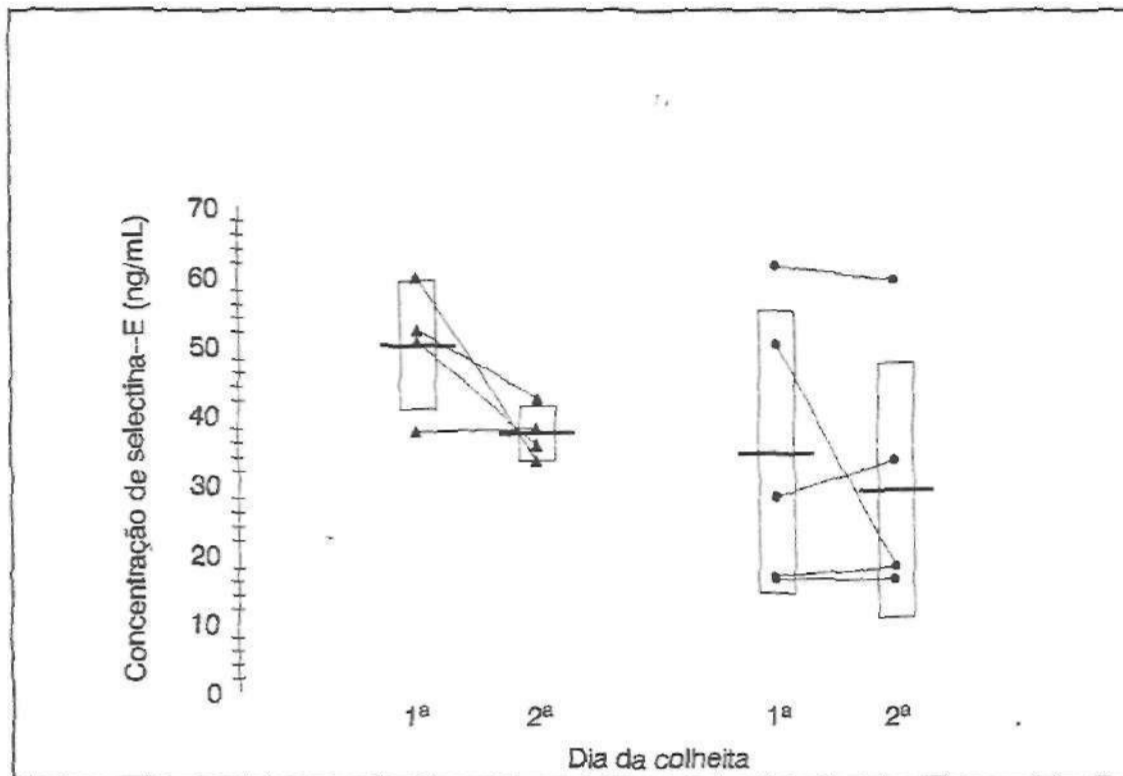


Figura 8. Concentração plasmática de selectina-E em pacientes com infecção por *P. falciparum*. Foram estudados 4 pacientes com a forma grave (triângulos) e 5 com a forma moderada (círculos). A linha horizontal representa média, enquanto os extremos do retângulo o desvio padrão. O intervalo entre a primeira e a segunda colheita foi de cerca de 7 dias.

A concentração da selectina-E e a parasitemia foram mais elevadas na forma grave. O tratamento específico do plasmódio produziu negativacão da parasitemia e redução dos níveis de selectina-E num período de 7 dias.

A Figura 9 representa a evolução do paciente #3 que apresentou parasitemia de 9% e evolução fatal em 24 h de internação. Foram colhidos duas amostras de sangue num intervalo de 24 h. Foi detectado aumento da concentração plasmática da selectina-E, FNT-cr e FVW. Após 12 h houve redução dos níveis de FNT-cr e FVW, mas sem alcançar o valor da concentração do controle normal.

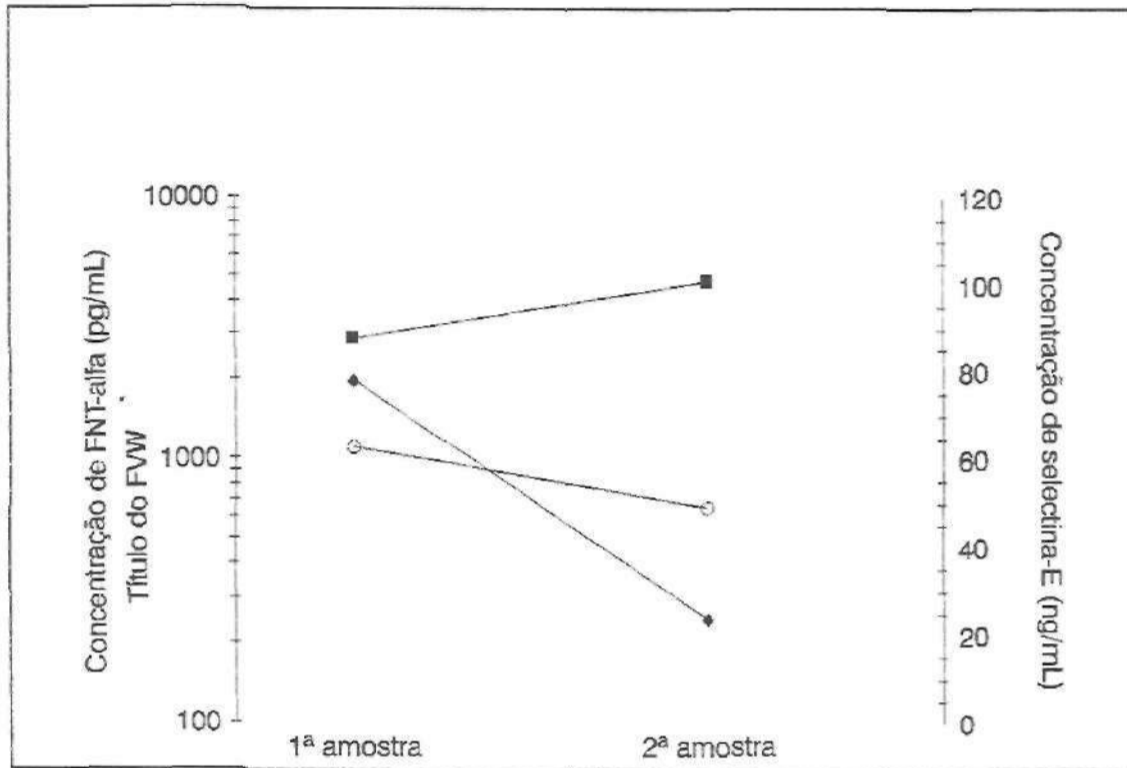


Figura 9. O paciente #3 com parasitemia inicial de 9%, evoluiu para óbito com 24 h de internação, tendo sido colhido duas amostras de sangue num intervalo de 12h. O quadrado representa a concentração plasmática de selectina-E, o losango o fator de von Willebrand (FVW) e o círculo o fator de necrose tumoral-α (FNT-α).

#### 4.8. Parasitemia dos grupos de estudo:

A frequência de hiperparasitemia, definida pela presença de parasitemia  $> 5\%$  ou  $> 250.000$  parasitos/ $\mu\text{L}$ , foi de 42,1% na forma grave e 4,3% na moderada. Esta diferença foi altamente significativa, quando a parasitemia foi expressa em termos percentuais ( $P=0,025$ )(Tabela 12). A frequência de apresentação de esquizontes no sangue periférico foi de 10,5% (2/19) na forma grave e 4,3%(1/23) na moderada, não havendo significância estatística entre esta diferença ( $P>0,05$ ).

Tabela 12. Frequência de hiperparasitemia nos pacientes com malária por *P. falciparum*

Parasitemia	Forma grave	Forma moderada	P*
$\leq 5\%$	3	7	
$> 5\%$	5	0	0,025
.....			
$\leq 250.000/\mu\text{L}$	6	15	
$> 250.000/\mu\text{L}$	3	1	0,1
.....			
Negativa	2	0	



## DISCUSSÃO

#### 4. DISCUSSÃO

A infecção aguda pelo *Plasmodium falciparum*, quando tratada precocemente, apresenta evolução benigna. Entretanto, alguns pacientes desenvolvem um quadro clínico denominado de síndrome de inflamação sistêmica que, quando está associado à disfunção de múltiplos órgãos, pode atingir uma mortalidade de até 50% dos casos<sup>125</sup>. Essa síndrome representa a via final de vários agentes etiológicos, com múltiplos fatores envolvidos na sua gênese, com destaque especial para a participação do FNT- $\alpha$  e a disfunção endotelial<sup>4,30</sup>. Na malária grave tem sido descrito aumento da produção do FNT- $\alpha$ <sup>14 21 44 48 58 62 63 83 105 109</sup>, mas a participação da disfunção do endotélio ainda não foi estabelecida<sup>127</sup>. Diferentemente de outras condições patológicas que apresentam a síndrome de inflamação sistêmica, a malária grave cursa com alterações vasculares devido ao sequestro das hemácias parasitadas na microcirculação<sup>71</sup>.

Aumento da permeabilidade capilar global tem sido detectado em indivíduos com malária grave<sup>5 27 75</sup>, o que sugere ter ocorrido disfunção endotelial nesses pacientes. Na avaliação morfológica das células endoteliais, através de microscopia eletrônica, foi constatado que a maioria das células se apresentam conservadas, mas podem ser encontrado edema ou mesmo estado avançado de degeneração celular<sup>29 71</sup>. A disfunção do endotélio foi identificada em 9 indivíduos infectados pelo *P. falciparum*, através da detecção do aumento da concentração plasmáticas de Selectina-E e molécula de aderência intercelular-1<sup>53</sup>. Contudo, todos esses pacientes apresentaram evolução benigna e sem complicações clínicas.

Até o momento, não foi possível definir se a ativação endotelial contribui para o desenvolvimento da malária grave, caracterizando um quadro de disfunção celular. Com o objetivo de estudar a disfunção do endotélio na malária grave realizamos estudo clínico envolvendo 42 pacientes infectados pelo *P. falciparum*. De acordo com a classificação adotada pela OMS<sup>130</sup>, 19 indivíduos preencheram os critérios de gravidade, enquanto os restantes

não preencheram os critérios. Não houve diferença significativa entre os dois grupos, com relação a idade, sexo e o tempo decorrido até o início do tratamento. Também não foi detectada diferença entre os grupos em relação ao número prévio de malárias e o fato da infecção atual ser prima ou reinfeção. No entanto, a hiperparasitemia, o número de óbitos e a presença de disfunção de múltiplos órgãos foram significativamente mais frequentes na forma grave do que na moderada. Alguns fatores podem ter contribuído para o agravamento da infecção pelo falciparum, como gestação (2/19), esplenectomia prévia (1/19) e miocardiopatia (1/19). Os dois primeiros fatores podem estar associados com a hiperparasitemia.

A avaliação do grau de disfunção do endotélio foi feita através da detecção, no sangue periférico, da concentração da selectina-E e do fator de von Willebrand (FVW). A análise dos resultados revelou que, durante a fase aguda da malária, ocorreu elevação da selectina-E, tanto na forma moderada quanto na grave, quando comparada com os indivíduos sem infecção ( $P < 0,05$ ). Os pacientes com malária grave apresentaram maior elevação de selectina-E ( $52,1 \pm 34,9$  ng/mL), do que aqueles com a forma moderada ( $34,6 \pm 16$  ng/mL), tendo sido esta diferença altamente significativa ( $P < 0,05$ ). O aumento do FVW nos indivíduos com malária grave ( $P = 0,02$ ) reforça a possibilidade de ocorrência de disfunção endotelial.

O aumento do FNT- $\alpha$ : foi identificado em 26,3% dos pacientes com a forma grave de malária e em nenhum da moderada ( $P = 0,001$ ). Em relação aos níveis de IL-1 $\alpha$  não houve diferença significativa entre os dois grupos. Deste modo, foi estabelecido neste estudo que a disfunção endotelial está associada com o aumento de produção do FNT- $\alpha$ : nos pacientes com malária grave e os indivíduos que apresentaram as maiores elevações de FNT- $\alpha$  e VFW evoluíram para óbito. Não houve diferença significativa entre os níveis de selectina-E e FVW, nos indivíduos que evoluíram para óbito ou sobrevida. Entretanto, este resultado pode expressar um erro do tipo  $\beta$  devido ao tamanho da amostra.

A pergunta que se faz é como a disfunção endotelial participa da fisiopatogenia da malária grave e quais são os mecanismos básicos envolvidos neste processo? A interação parasito-hospedeiro é complexa e dinâmica, o que dificulta a compreensão da relação existente entre a ativação do endotélio e o desenvolvimento da malária grave. Para efeito didático, esta discussão tratará dos principais eventos neste processo que serão subdivididos em "efeitos gerais do FNT- $\alpha$ ", "expressão das moléculas de aderência" e "apresentação da disfunção de múltiplos órgãos".

As citocinas e particularmente o FNT- $\alpha$  possuem um papel fundamental na infecção pelo *P. falciparum*, tanto no controle da doença<sup>24 116</sup>, como no desenvolvimento de suas complicações<sup>43</sup>. O FNT- $\alpha$  pode participar da gênese das manifestações clínicas da malária como a febre, hiporexia e astenia<sup>24, fA</sup>. Além do mais, esta citocina possui a capacidade de inibir o crescimento do parasito tanto *in vitro*<sup>33</sup> como *in vivo*<sup>33 116</sup>. Por outro lado, o aumento de produção do FNT-a tem sido associado com o desenvolvimento da malária grave, tanto nos modelos experimentais<sup>42</sup> como nas formas clínicas<sup>14 21 44 48 58 62 63 105 109</sup>.

O FNT- $\alpha$  pode atuar diretamente sobre as células endoteliais produzindo aumento da permeabilidade capilar<sup>30 61</sup>. Estudos *in vitro*, com monocamadas de células endoteliais mostraram que a adição de FNT-a, IL-1 e IFN-7 às culmras, mas não a IL-6, pode reduzir o efeito de barreira dessas células para macromoléculas<sup>13 49 M 101</sup>, o que corresponde ao ao processo de aumento de permeabilidade *in vivo*. Ainda não foi esclarecido como as citocinas interferem com o funcionamento das células endoteliais, mas existe a possibilidade de que esse efeito decorra da produção local de oxido nítrico<sup>93</sup> ou prostaciclina<sup>12</sup>. O FNT- $\alpha$  isoladamente ou em associação com a adrenalina, trombina, bombesina, bradicinina ou fator ativador de plaqueta gera aumento da prostaglandina E<sub>2</sub>, que interfere no funcionamento do endotélio<sup>15</sup>. Outro mecanismo para explicar a ação citotóxica do FNT-a está na sua capacidade de interferir com ofuncionamento das células endoteliais, através da inibição da sua síntese de ADN<sup>123</sup>. Existem evidências de que essa citocina possa amar sobre o transporte transjuncional, pela modulação do citoesqueleto das células endoteliais<sup>76 99 129</sup>, através da despolimerização dos microfilamentos de actina F<sup>39</sup>.

O fato de ter sido detectado níveis normais de FNT- em 73,7% dos nossos pacientes com a forma grave de malária não exclui a possibilidade da ação dessa citocina na disfunção endotelial. Fatores envolvidos na cinética e na dinâmica de ação do FNT- $\alpha$  podem influenciar a análise desses resultados. A infusão endovenosa de 50  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  de FNT- $\alpha$ , em voluntários hígidos, produziu a concentração média máxima de 4.261 pg/mL, após 5 min da injeção, seguido da redução gradual e negatificação na 2<sup>o</sup> hora<sup>121</sup>. A variabilidade que ocorre na concentração plasmática do FNT- $\alpha$  pode ser decorrente ao padrão do ciclo biológico do parasito, com aumento de produção da citocina, de forma intermitente, logo após a ruptura dos

esquizontes<sup>62</sup>. Como o FNT- $\alpha$  possui uma meia-vida de 6 min<sup>102</sup> é possível ocorrer disfunção endotelial na vigência de níveis plasmáticos normais e as manifestações da disfunção de múltiplos órgãos representem as consequências dos efeitos dessa citocina. O paciente grave #3 pode corroborar com esta hipótese, visto que a redução do FNT- $\alpha$  esteve associada ao aumento da selectina-E, que antecedeu o seu óbito num período de cerca de 12h. Outra possibilidade é que o FNT- $\alpha$  não atinja níveis periféricos detectáveis, porque a sua produção ocorra exclusivamente no local das lesões. Durante a fase aguda da malária pode ocorrer modificações diárias na concentração de FNT- $\alpha$ . De fato, Harpaz e cols<sup>47</sup> mostrou que a produção de FNT- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e iIL-6, em voluntários infectados com esporozoítos de *P. falciparum* irradiados, mostrou ampla variação diária. O FNT- $\alpha$  participa na resposta ao estímulo da exotoxina parasitária ou endotoxina bacteriana através de uma rede de citocinas. O aumento do nível do FNT- $\alpha$  antecede a elevação do IFN- $\gamma$ , mas é concomitante as modificações dos níveis de IL-4 e IL-6. Esses fatos explicam em nosso estudo porque só foi detectada correlação entre os níveis de FNT- $\alpha$  e FVW (coeficiente de Pearson  $R^2 = 0,4736$ ;  $P = 0,047$ ). De qualquer modo, a elevação do FNT- $\alpha$  parece ter um valor prognóstico, já que ocorre um risco relativo de óbito de 4,1 em indivíduos com níveis plasmáticos maiores que 500 pg/mL, enquanto que a hipoglicemia e a hiperparasitemia apresentaram riscos, respectivamente, de 3,7 e 1,6<sup>63</sup>.

Uma das possibilidades para explicar os efeitos do FNT- $\alpha$  na disfunção do endotélio seria pela sua ação citotóxica nas células endoteliais. Esta disfunção pode ser evidenciada através da detecção de substâncias normalmente sintetizadas por essas células, como por exemplo a selectina-E, MAIC-1 e o FVW. A selectina-E detectada no sangue periférico pode ser liberada durante a lesão endotelial<sup>78</sup>, mas também durante o processo de ativação endotelial<sup>78 85</sup>. Estudos *in vitro* utilizando monocamada de células endoteliais, mostraram que a adição de FNT- $\alpha$  ou IL-1 às culturas aumentou a síntese e liberação de selectina-E. O seu pico de liberação ocorreu na 4ª hora, havendo redução gradual e normalização após 48-72h<sup>78</sup>. A determinação dos níveis plasmáticos de selectina-E tem sido útil no estudo da disfunção endotelial, porque esta molécula é produzida exclusivamente pelas células endoteliais<sup>78</sup>. A selectina-E, assim como as integrinas (p.ex a molécula de adesão intercelular-1), são moléculas de natureza glicoproteicas, localizadas na membrana celular. Essas moléculas possuem um papel fundamental na interação célula-célula

ou célula-matrix extra-celular, durante a resposta imune normal ou durante a resposta inflamatória à lesão tissular<sup>8</sup>. A selectina-E normalmente não é expressa no endotélio em repouso ocorrendo normalmente síntese *de novo*\*. Essa molécula é encontrada na vênula pós-capilar e se constitui no receptor para os ligantes, de natureza glicoproteica, localizados na superfície celular dos neutrófilos, monócitos, basófilos, eosinófilos e uma subpopulação de linfócitos T de memória<sup>8</sup>. Sua função principal é orientar o tráfego transendotelial dessas células. Durante a fase aguda da malária detectamos elevação transitória dos níveis plasmáticos de selectina-E. Estas alterações foram avaliadas em 9 pacientes com infecção pelo *P. falciparum* durante um período de cerca de 7 dias. O aumento mais intenso ocorreu no grupo grave e foi pouco expressivo na forma moderada. Essa cinética foi semelhante a obtida por Hviid e cols<sup>53</sup>. Ainda não foi esclarecido se o aumento da selectina-E na malária moderada representa apenas um marcador de disfunção endotelial ou essa molécula participe da resposta anti-parasitária. Recentemente, Staunton e cols<sup>113</sup> mostraram que a molécula de aderência intercelular-1 participa do processo de opsonização das hemácias parasitadas, facilitando a fagocitose pelos macrófagos.

O FVW é sintetizado principalmente pelas células endoteliais e menor proporção pelos megacariócitos. Essa molécula é estocada em grânulos, corpúsculos de Wibel-palade, localizados no citoplasma das células endoteliais. O FVW participa do processo de aderência das plaquetas à superfície exposta da região subendotelial, assim como é responsável pela estabilização do fator VIII da coagulação. A administração endovenosa de 50 µg/m<sup>2</sup> de FNT-α, em voluntário hígidos, produziu elevação na concentração plasmática de FVW, cuja concentração plasmática alcançada foi 3,5 vezes maior do que a basal e voltou ao normal após 12-24 h da injeção<sup>122</sup>. A maior parte do FVW detectado no sangue periférico provem da liberação dos material contido nos grânulos nas células endoteliais<sup>69</sup>. Portanto, a detecção da concentração do FVW constitui um parâmetro na avaliação da disfunção endotelial e tem sido empregado na avaliação dos pacientes com sepse ou grande queimado, sendo útil na detecção do desenvolvimento das lesões pulmonares<sup>46,96</sup> ou renais<sup>46</sup>.

Nenhum paciente em nosso estudo, com a forma moderada de malária, apresentou aumento da concentração plasmática de FNT-α. No entanto, esta possibilidade pode ocorrer, como foi mostrado por Shaffer e cols<sup>105</sup> em duas crianças com malária que apresentaram

concentrações plasmáticas de 1.600 e 9.400 pg/mL, mas com uma evolução clínica benigna. Os fatores envolvidos nesses casos devem estar associado com o sistema de proteção das células endoteliais, responsável pela neutralização dos efeitos citotóxicos do FNT- $\alpha$ . Esse sistema de proteção é dependente da síntese de diversas proteínas<sup>86</sup>, em particular a superóxido dismutase (MnSOD)<sup>133</sup>. Estudo em modelo murino mostrou que a injeção prévia de FNT- $\alpha$ , antes da administração de uma dose letal de endotoxina bacteriana, produziu uma redução da mortalidade, provavelmente dependente da expressão de MnSOD intracelular<sup>3</sup>. Essa redução da resposta a endotoxina foi desenvolvida porque, tanto o FNT- $\alpha$ , quanto a IL-1, induzem aumento na concentração de ARN-mensageiro da MnSOD<sup>124</sup>. Esse aumento é dose-dependente<sup>124</sup>, rápido (< 1h)<sup>133</sup>, substancial (mais de 10 vezes o valor basal)<sup>133</sup> e persistente (até 96h após a indução)<sup>133</sup>. Como um dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade do TNF- $\alpha$  é sua capacidade de estimular a produção de anion superóxido ( $O_2^-$ )<sup>90</sup>, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )<sup>90</sup> e radical hidroxila (OH)<sup>134</sup>, a indução da expressão de MnSOD aumentaria a proteção das células endoteliais à ação destes radicais livres. Essa enzima está localizada no interior da mitocôndria, sendo responsável pela eliminação dos radicais livres de oxigênio<sup>133</sup>. Estudo *in vitro* mostrou que a sensibilidade da célula à ação do FNT- $\alpha$  está inversamente relacionada com a sua capacidade de eliminar os radicais livres<sup>138</sup>. Outra forma de proteção do endotélio consiste na neutralização da ação do FNT- $\alpha$  pelos receptores solúveis desta citocina (Rs-FNT- $\alpha$ ). A infusão endovenosa de FNT- $\alpha$  em voluntários hígidos, produziu aumento na concentração do Rs-FNT $\alpha$ <sup>68</sup>, que pode inibir, por competitividade, a ligação do FNT- $\alpha$  nos seus receptores na membrana celular<sup>102</sup>. Por outro lado, foi mostrado que o Rs-FNT- $\alpha$  pode prolongar a meia-vida do FNT- $\alpha$ , assim como manter a sua atividade biológica<sup>1</sup>. Além da neutralização causada pelo Rs-FNT- $\alpha$ , pode ser que o FNT- $\alpha$  detectado no sangue periférico, não apresente atividade biológica, apesar da realização do Imunoensaio Enzimático apresentar forte correlação com os ensaios biológicos<sup>135</sup>. No entanto, o Rs-FNT- $\alpha$  pode interferir nos resultados dessa técnica<sup>31</sup>, o que faz supor que o seu aumento no paciente com malária grave, determine a apresentação de resultados falso-negativos do nível do FNT- $\alpha$ .

Um aspecto importante da malária grave é o fenômeno de citoaderência das hemácias parasitadas. Enquanto que as hemácias normais não se ligam à superfície do endotélio, aquelas

infectadas pelas formas maduras do *P. falciparum* apresentam a capacidade de aderir as células endoteliais da vênula pós-capilar<sup>80</sup>. O seqüestro das hemácias parasitadas nos capilares e vênulas pós-capilar, assim como a formação de rosetas, agregados entre as hemácias parasitadas e não parasitadas<sup>16</sup>, dependem da interação específica dos ligantes com os seus respectivos receptores. Várias moléculas estão envolvidas no processo de citoaderência, algumas expressas na superfície da células endoteliais como as CD-36, MAIC-1 e Trombospondina<sup>106</sup>. Enquanto outras estão na superfície das hemácias parasitadas: proteínas ricas em histidina 1 e 2 e Pf 155/RESA<sup>106</sup>. Recentemente, foi identificado nas hemácias parasitadas, obtidas de pacientes com malária falciparum, a presença de ligantes para selectina-E e o VCAM-1<sup>80</sup>. O seqüestro das hemácias parasitadas parece ser órgão-específico<sup>2 71</sup> o que sugere a existência de diferentes populações de células endoteliais, mas não se pode descartar a possibilidade que hemácias parasitadas também expressem diferente densidade ou tipo de ligantes. De fato, a variação antigênica clonal do *P. falciparum* pode ocorrer numa frequência de 2,4% por geração, compreendendo antígenos relacionado com as moléculas de aderência<sup>92</sup>. O FNT- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  aumentam a citoaderência das hemácias parasitadas, através da indução da molécula de aderência-1 e CD-36 nas células endoteliais da microcirculação<sup>132</sup>. A autópsia realizada em adultos que morreram devido à malária mostrou que o percentual de seqüestro na microcirculação cerebral foi de 94% e 51% no pulmão<sup>2</sup>. A selectina-E e/ou molécula de aderência intercelular-1 foram detectadas, através de imunohistoquímica de tecido cerebral, em 77% dos casos de malária grave e em nenhum dos controles sem malária<sup>80</sup>. Através de imunohistoquímica do tecido cerebral foi mostrado a presença de moléculas de aderência na região vascular, em 92% dos pacientes com a forma grave de malária e em nenhum do controle<sup>80</sup>. Wong e cols<sup>132</sup> mostraram que o FNT- $\alpha$  produz aumento na expressão da molécula de aderência intercelular-1 nas células endoteliais de microcirculação de cérebro, a partir da 4<sup>o</sup> hora e persistiu por mais de 72h. O seu efeito máximo foi com a adição de IFN- $\gamma$ , que por sua vez estimulou a expressão do receptor de membrana do FNT- $\alpha$ <sup>117</sup>. Quando a cultura foi tratada 12h previamente com FNT- $\alpha$ : ou IL-1, a adição das hemácias parasitadas produziu aumento significativo da citoaderência<sup>119</sup>, provavelmente devido ao aumento da expressão das moléculas de aderência.

As alterações metabólicas, hidroeletrolíticas e hemodinâmicas podem contribuir para o desenvolvimento da disfunção de múltiplos órgãos na malária grave. Essas alterações podem



ser induzidas e mantidas, pelo menos em parte, através do FNT- $\alpha$  e da disfunção do endotélio. A alteração metabólica mais significativa, detectada em alguns pacientes com malária grave é a hipoglicemia, que contribui de maneira significativa na geração das lesões neurológicas. O FNT- $\alpha$  pode induzir essa alteração metabólica<sup>24 127</sup>, através da inibição da gliconeogênese, pela inibição da síntese de fosfoenolpiruvato<sup>73</sup>. Os níveis de FNT- $\alpha$ <sup>44 63</sup> e IL-1<sup>63</sup> podem ser correlacionados com a hipoglicemia das crianças com malária grave.

As manifestações neurológicas estiveram presentes em 15,8% dos nossos pacientes com a forma grave, tendo sido detectado hipoglicemia em apenas um caso. A gravidade das lesões neurológicas está diretamente relacionadas com o grau do seqüestro das hemácias parasitadas na microcirculação<sup>2</sup> e a formação das rosetas<sup>16</sup>. Esses fenômenos podem ser modulados pelo FNT- $\alpha$ , através da indução das moléculas de aderência. Por outro lado, o FNT- $\alpha$  pode interferir diretamente na função dos neurônios, através da interferência sobre os canais de cálcio<sup>112</sup> ou indiretamente pela a sua ação citotóxica sobre os oligodendrócitos<sup>104</sup>. Nos pacientes com lesão neurológica os níveis intra-raquianos de FNT- $\alpha$  podem estar elevados<sup>109</sup>, sugestivo de aumento na produção local, mas esse resultado não foi confirmado por outros<sup>44</sup>. Outra alternativa para explicar as alterações neurológicas seria pela ação do óxido nítrico<sup>23</sup>, através da sua capacidade de se difundir pelos tecidos neurais, interferindo no tráfego sináptico normal. Contudo, os resultados obtidos com a adição do FNT- $\alpha$  às culturas de células endoteliais tem sido controversos, com alguns trabalhos mostrando aumento da produção de oxido nítrico<sup>66</sup> e outros diminuição<sup>136</sup>.

O choque foi identificado em 26,3% dos nossos pacientes com a forma grave de malária, segundo a classificação da ACCP/SCCM<sup>4 \*1</sup>, Essa classificação define o choque como a pressão arterial sistólica < 90 mm de Hg, enquanto a da OMS < 70 mm de Hg<sup>130</sup>. Essa alteração hemodinâmica foi decorrente da desidratação, mas também pela intensa redução da resistência vascular periférica causada pelo FNT- $\alpha$ <sup>30</sup>. No estudo realizado por Newman e cols<sup>78</sup> em pacientes com sepse, houve aumento substancial da selectina-E plasmática apenas nos

\*<sup>1</sup> ACCP/SCCM = American College of Chest Physician/ Society of Critical Care Medicine

indivíduos com hipotensão arterial. Esse achado não corresponde aos obtidos com os nossos pacientes com a forma grave de malária, que não mostraram correlação entre a concentração de selectina-E e a pressão arterial média. Apesar de Newman e cols<sup>78</sup> não fornecerem detalhes sobre o seu grupo de estudo, uma hipótese para explicar esses resultados seria as diferentes efeitos das endotoxinas bacteriana e da exotoxinas parasitárias, embora ambas possam estimular a síntese de FNT- $\alpha$  pelos monócitos. A endotoxina é capaz de estimular diretamente as células musculares lisas dos vasos, causando redução da resistência vascular periférica<sup>114</sup>. Além disso a endotoxemia está associada com significativa redução da função sistólica em ambos os ventrículos<sup>82</sup>, o que contribui para a redução da pressão arterial.

A insuficiência renal aguda foi a disfunção orgânica mais encontrada no nosso grupo de estudo (63,2%), semelhante ao observado em outros estudos<sup>110</sup>. O choque pode induzir, agravar ou manter as lesões renais, enquanto as alterações reológicas induzidas pela redução do fluxo sanguíneo na microcirculação, contribuem para aumentar a expressão das moléculas de aderência<sup>81</sup>, ampliando assim o fenômeno de citoaderência. O FNT- $\alpha$  também é capaz de aumentar a densidade dos receptores de selectina-E e da molécula de aderência intercelular-1 na superfície das células endoteliais de glomérulo e dos vasos associados ao túbulo renal humano<sup>11</sup>. A associação da obstrução dos vasos, disfunção do endotélio e redução da perfusão renal são decisivos no desenvolvimento das lesões renais.

A insuficiência renal aguda e o aumento da produção do ácido lático concorrem para o desenvolvimento da acidose metabólica, que foi detectado em 30% dos pacientes do nosso grupo, mas este número pode ter sido maior, porque a gasometria arterial só foi realizada em 58,3% dos casos com lesão renal. A concentração de ácido lático arterial, venosa e líquórica é diretamente proporcional a gravidade da malária, e se normaliza após a recuperação clínica<sup>27 127</sup>. A acidose metabólica e o aumento da PCO<sub>2</sub> na região venular pós-capilar produzem, por mecanismos ainda não esclarecidos, incremento da aderência das hemácias parasitadas às células endoteliais<sup>26</sup>.

A lesão pulmonar ocorreu em 26,3% dos nosso grupo de estudo, semelhante ao que é descrito em outros estudos<sup>9</sup>. Apesar da intensa controversia sobre os mecanismos envolvidos na gênese do edema pulmonar, Charoenpan e cols<sup>19</sup> mostrou que a lesão é decorrente de edema pulmonar não cardiogênico, apesar da hiperhidratação e a hipoalbuminemia podem agravar o quadro. No nosso estudo a insuficiência renal aguda (12/19) e a insuficiência cardíaca congestiva (paciente #10), foram fatores que contribuíram para o desenvolvimento das manifestações pulmonares. Existem evidências de que o FNT- $\alpha$  possa desenvolver lesões na unidade alvéolo-capilar<sup>61</sup>, através do ativação dos fagócitos ou pela disfunção das células endoteliais<sup>97</sup>.

Os fenômenos hemorrágicos podem estar presentes na forma grave de malária, mas só foi detectado num único indivíduo no nosso estudo (paciente #16), que apresentou hemorragia digestiva. Dois outros pacientes tiveram redução do tempo de atividade de pró-trombina, mas nenhum outro teste foi realizado no restante do grupo para avaliar a coagulação ou a fibrinólise. Na malária grave tem sido descrito que o aumento do FNT- $\alpha$  está associado com a diminuição da atividade da proteína C e do inibidor-1 da proteína C, ao mesmo tempo que os níveis plasmático do complexo trombina-antitrombina III estão elevados<sup>48</sup>. As alterações de homeostasia apresentaram forte correlação com a gravidade da doença, e foram totalmente revertidas após a eliminação dos parasitos. Esses resultados apontam para uma tendência pró-coagulante durante a infecção de malária, podendo estar associada a ação do FNT- $\alpha$  sobre o endotélio<sup>77</sup>. A trombina formada no intravascular, possui efeito sinérgico com o FNT- $\alpha$  na disfunção das células endoteliais, através da estimulação da produção do fator ativador de plaquetas<sup>88</sup>.

A presença de endotoxemia tem sido descrita nos pacientes com malária grave<sup>32,65,120</sup>, contudo o teste empregado na sua detecção, lisado do amebócito do *Limulus*, não permite a diferenciação entre a endotoxina bacteriana e as exotoxinas parasitária<sup>115</sup>. As hemácias parasitadas<sup>62</sup> e antígenos do parasito Pf155/RESA<sup>84</sup> ou MSP-1 e RAP-1<sup>54</sup> estimulam o monócito, semelhante a endotoxina bacteriana, aumentando significativamente a produção de FNT- $\alpha$ . No entanto, ainda não foi esclarecido se as exotoxinas parasitária possuem as mesmas propriedades da endotoxina<sup>86,115,123</sup>, com relação à ação citotóxica sobre o endotélio.

O nosso estudo mostrou, pela primeira vez, que durante a infecção pelo *P. falciparum*, os pacientes com a forma grave de malária apresentam disfunção endotelial e aumento da produção do FNT- $\alpha$ . Esses dois fatores associados contribuem para o desenvolvimento da síndrome de inflamação sistêmica. Na Figura 11, estão resumidos os principais eventos que ocorrem na microcirculação do paciente com a forma grave. O FNT- $\alpha$  atua de forma direta, através da ação citotóxica sobre as células endoteliais, e de forma indireta por indução das moléculas de aderência. O aumento dessas moléculas facilita o fenômeno de citoaderência, que por sua vez aumenta a disfunção endotelial pela obstrução vascular e anóxia tissular. Por outro lado, alterações hemodinâmicas, hemostáticas e metabólicas podem ampliar os efeitos do FNT- $\alpha$  e a disfunção do endotélio. Esses fatores associados determinam o desenvolvimento da disfunção de múltiplos órgãos do paciente com malária grave. Esta abordagem da fisiopatogenia da malária grave permite especular sobre a possibilidade de se utilizar novas abordagens terapêuticas e profiláticas na malária<sup>118</sup>.

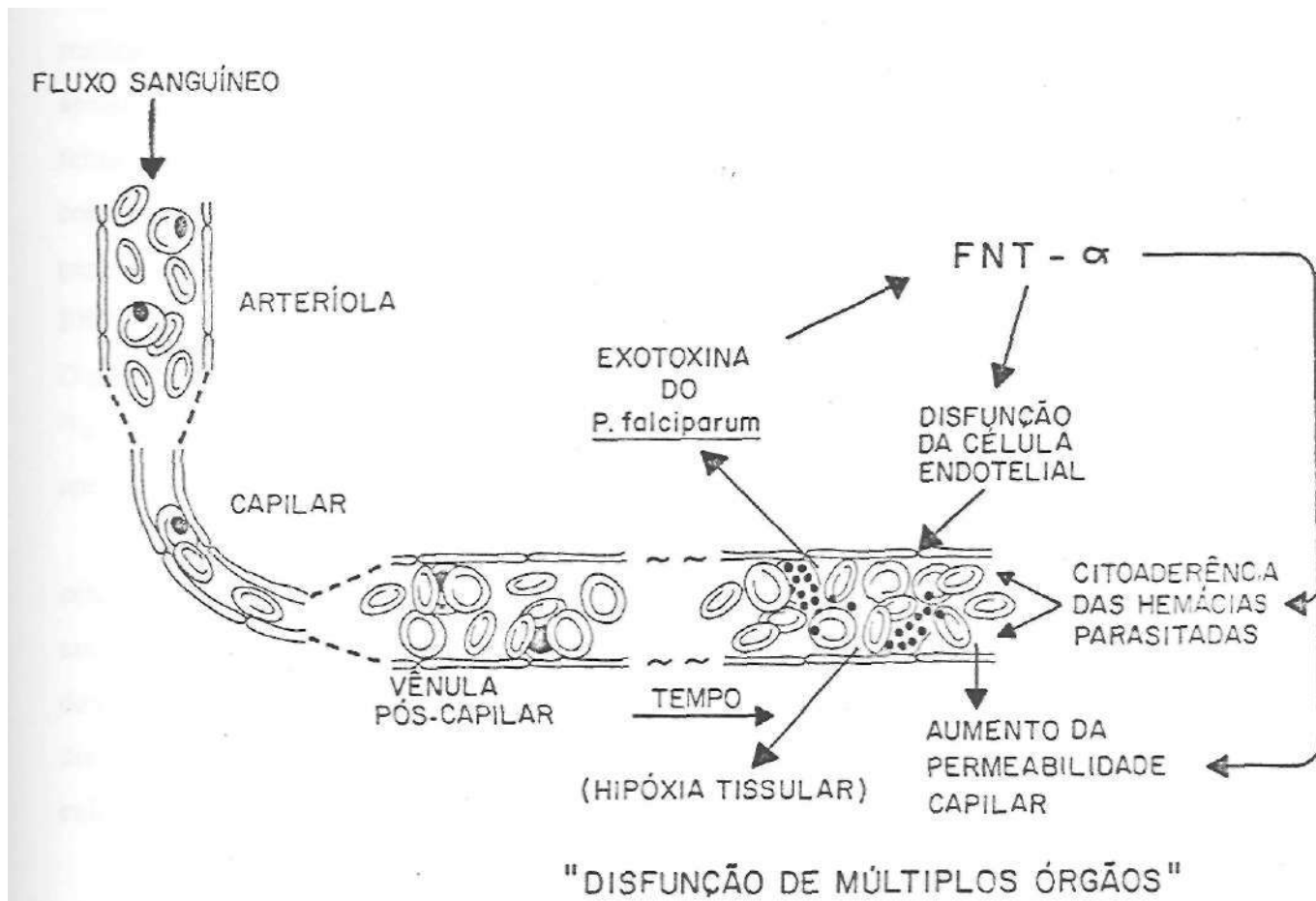


Figura 11. Hemácias parasitadas estão circulando na microcirculação. Exotoxina do *p. falciparum* estimula a produção de Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ), que aumenta a expressão de diversos tipos de molécula de aderência na superfície do endotélio. Essa modulação nas células endoteliais induz o aumento da citoaderência das hemácias na região venular pós-capilar. As alterações reológicas associadas com o efeito citotóxico direto do FNT- $\alpha$  determinam uma disfunção da células endoteliais e, conseqüentemente, aumento da permeabilidade capilar com hipóxia tissular. Esses eventos culminam com a disfunção de múltiplos órgãos(Adaptado de Carlson<sup>16</sup>)

A perspectiva é que se possa modular os efeitos do FNT- $\alpha$  e para tal, recentemente foi empregado anticorpo anti-FNT- $\alpha$ . Este reduz a citotoxicidade das células endoteliais *in vitro* à ação do FNT- $\alpha$ <sup>38</sup>, mas o seu emprego clínico ainda é limitado. No único estudo clínico aberto, realizado em crianças com malária, a sua administração não reduziu a mortalidade, mas apresentou redução significativa, de maneira dose-dependente, da concentração do FNT- $\alpha$  e da febre<sup>64</sup>. Outra abordagem no tratamento adjuvante da malária, seria o emprego de substâncias com propriedade imunomoduladora, associado com o aumento de proteção do endotélio. A pentoxifilina é um fármaco que possui esse perfil, já que é capaz de bloquear a transcrição do FNT- $\alpha$ <sup>28</sup>, assim como aumentar a proteção da células endoteliais à ação citotóxica do FNT- $\alpha$ <sup>137</sup>. O uso da pentoxifilina nos modelos de malária experimental, produziu redução da mortalidade<sup>59</sup><sup>98</sup> e menor desenvolvimento das formas cerebrais<sup>59</sup>. O seu emprego clínico ainda não foi definido, apesar de relatos de casos sugerirem algum benefício no seu uso<sup>40</sup><sup>67</sup>.

Fatores nutricionais, também, podem interferir na interação do FNT- $\alpha$  com as células endoteliais. A lesão citotóxica produzida pelo FNT- $\alpha$  nas células endoteliais está associado com a diminuição intracelular de zinco<sup>33</sup>. Como na infecção pelo *P. falciparum* foi detectado redução plasmática desse íon<sup>49</sup> é possível que a sua correção possa interferir na disfunção do endotélio na malária grave. Recentemente, foi mostrado que a adição de zinco à cultura de células endoteliais pode prevenir a disfunção causada pelo FNT- $\alpha$ <sup>49</sup>.

Finalmente, o desenvolvimento de uma vacina anti-malárica eficaz deve levar em consideração a perspectiva de que alguns antígenos do parasito possam estimular a produção de FNT- $\alpha$  e assim levar à disfunção endotelial, causando alterações capazes de concorrer para o desenvolvimento da síndrome de inflamação sistêmica na malária.

## CONCLUSÕES

## 5. CONCLUSÕES

Os nossos resultados permitiram concluir que:

1. Os pacientes com a forma moderada de malária por *P. falciparum* e *P. vivax* tiveram elevação da concentração de selectina-E, quando comparados com o grupo controle normal. No entanto, somente o grupo grave apresentou aumento significativo dessa molécula.

2. Este trabalho mostrou, pela primeira vez, a presença de disfunção endotelial nos pacientes com malária grave. Essa disfunção foi identificada através da detecção de selectina-E e do fator de von Willebrand (FVW). A concentração plasmática da selectina-E na forma grave foi de  $52,1 \pm 34,9$ , enquanto na forma moderada foi  $34,6 \pm 16,0$  ng/mL, sendo essa diferença altamente significativa. Da mesma forma o aumento do FVW foi significativamente maior no grupo grave.

3. Dados obtidos de 9 pacientes com malária por falciparum fazem supor que o processo de disfunção endotelial seja temporário. Após 7 dias da negatização da parasitemia, houve redução dos níveis de selectina-E, mas ainda assim não tinha alcançado os níveis obtidos nos padrões normais.



4. A disfunção endotelial nos pacientes com a forma grave de malária foi associado com o aumento da concentração do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ). Os níveis dessa citocina apresentaram correlação com os níveis do FVW ( $R^2=0,476, P=0,047$ ).

5. Não foi identificado aumento de produção da interleucina- $1\alpha$  nos pacientes com malária grave. Os pacientes com a forma moderada apresentaram elevação dos níveis dessa citocina, mas o aumento não foi significativo.

6. A mortalidade por malária foi maior no grupo com a forma grave do que na forma moderada. Contudo, não houve diferença significativa entre a concentração de selectina-E, FVW ou FNT- $\alpha$  nos que sobreviveram ou foram a óbito. Este resultado, provavelmente, não é conclusivo devido ao tamanho da amostra ser reduzido.

7. A hiperparasitemia foi maior no grupo grave de malária. No estudo de regressão linear múltipla não houve correlação entre a concentração de selectina-E e os níveis de glicemia, creatininemia, pressão arterial média e o número de episódios prévios de malária.

8. Os resultados obtidos neste estudo possibilitarão compreender melhor os os fatores que atuam na microcirculação, durante o desenvolvimento da malária grave. Particularmente, a relação que parece existir entre os fenômenos de aderência associado às hemácias parasitadas na gênese da disfunção de múltiplos órgãos.

## **RESUMO**

—

## RESUMO

A malária representa atualmente um importante problema de saúde pública. A evolução clínica da infecção pelo *P. falciparum* é geralmente benigna, mas a mortalidade pode atingir até 50% dos casos. Citocinas como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ) e o fenômeno de aderência associado as hemácias parasitadas são os principais mecanismos envolvidos na fisiopatogenia da forma grave de malária. Contudo, ainda existem muitos pontos na patogenia desta infecção, particularmente a contribuição da disfunção endotelial no desenvolvimento da síndrome de inflamação sistêmica da forma grave da malária.

Com o objetivo de contribuir para o entendimento da disfunção do endotélio na malária grave foi realizado um estudo envolvendo 42 pacientes infectados pelo *Plasmodium falciparum*, 6 infectados por *P. vivax* e 13 indivíduos hígidos. A função endotelial foi avaliada,

através da detecção da concentração plasmática da selectina-E e do fator de von Willebrand (FVW). Um total de 19 pacientes foram caracterizados como apresentando a forma grave e 23 a forma moderada, de acordo os critérios da OMS. Nos pacientes com malária houve aumento da concentração de selectina-E e do FVW, quando comparado com o grupo controle normal ( $P < 0,05$ ). No entanto, os pacientes com a forma grave apresentaram uma maior ativação endotelial do que os indivíduos do grupo moderado, respectivamente  $52,1 \pm 34,9$  e  $34,6 \pm 16$  ng/mL de selectina-E ( $P < 0,05$ ). Também os títulos do FVW estavam mais elevados na forma grave ( $P < 0,05$ ).

Além da disfunção do endotélio, os pacientes com malária grave apresentaram maior elevação do nível do FNT- $\alpha$ , do que na forma Moderada ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, a concentração de interleucina- $1\alpha$  não apresentou diferença entre os grupos grave, moderado e controle ( $P > 0,05$ ).

A mortalidade da malária foi maior no grupo grave (4/19) do que no moderado (0/23) ( $P < 0,05$ ), e está associada com a maior elevação do FNT- $\alpha$  e maior disfunção endotelial. Contudo, não houve diferença nos níveis de selectina-E e FVW entre os indivíduos que foram a óbito e os que sobreviveram. A correlação entre o FNT- $\alpha$  e o FVW foi de 0,4736 ( $P = 0,047$ ), o que sugere que a disfunção endotelial possa estar associada ao aumento dos níveis plasmáticos do FNT- $\alpha$ .

Os resultados do presente trabalho mostram, pela primeira vez, o envolvimento do endotélio na malária grave e sua relação com a elevação dos níveis do FNT- $\alpha$ . Tais dados permitem prever o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos e profiláticos, através do aumento da proteção do endotélio, modulação na expressão das moléculas de aderência, ou na controle dos efeitos citotóxicos do FNT- $\alpha$ .

**ABSTRACT**

## ABSTRACT

Malaria remains a major public health problem throughout the world. Although the clinical manifestations of malaria are not usually severe, the mortality associated to *Plasmodium falciparum* infection can reach 50% according with the care disposable. Cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and the phenomena of adherence associated to parasited erythrocytes are considered to play important role in the pathophysiology of severe malaria. However several important questions about the pathology of malaria remain unsolved. This included the contribution of endothelial dysfunction of systemic inflammatory response syndrome associated to severe malaria.

Aiming at contributing to the understanding of endothelial dysfunction in severe malaria we studied 42 individuals *P. falciparum*. The endothelial function was evaluated through the detection of plasma levels of E-selectin and von Willbrand Factor (VWF). Nineteen individuals were characterized as presenting severe malaria while in 23 individuals presented moderate manifestations according to WHO. An increase in plasma concentrations of E-Selectin and the titers of vWF was detected in individuals with *P. falciparum* infection, when compared to those infected with *P. vivax* and normal controls ( $P < 0,05$ ). However, the cases of severe malaria showed a more intense involvement of endothelial cells than those without malaria, as measured by the plasma levels of E-Selectin, respectively  $52,1 \pm 34,9$  and  $34,6 \pm 16$  ng/mL. Comparable results were obtained with vWF.

Plasma levels of TNF- $\alpha$  were higher in individuals with severe malaria as compared with the moderate cases. On the other hand, plasma interleukin- $1\alpha$  showed comparable levels in all the studied groups.

Mortality was higher in the severe group (4/19) and was associated to higher increases of plasma TNF- $\alpha$  and endothelial dysfunction. However, no difference was found in the levels of E-selectin and vWF among those individuals who survived and who died. The correlation between TNF- $\alpha$  and vWF was 0,4736 ( $P=0.047$ ) suggesting that the endothelial dysfunction could be associated to the increased levels of TNF- $\alpha$ .

Our results show for the first time the involvement of endothelium in severe malaria and its relation with the increased plasma levels of TNF- $\alpha$ . These data open new avenues for the development of novel methods of prophylaxis and therapy by means of modulation of expression of adherence molecules, the control of cytotoxic effects of TNF- $\alpha$  and the increasing the protection of the endothelial cells.

## **BIBLIOGRAFIA**



### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of Tumor Necrosis Factor by its soluble receptors. *The Journal of Experimental Medicine* 1992;175:323-329.
2. Aikawa M, Pongponratan E, Tegoshi T, Nakamura K-I, e cols. A study on the pathogenesis of human cerebral malaria and cerebral babesiosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1992;(Suppl III)87:297-301.
3. Alexander HR, Doherty GM, Block MI, Kragel PJ e cols. Single-dose tumor necrosis factor protection against endotoxin-induced shock and tissue injury in rats. *Infection and Immunity* 1991;59:3889-3894.
4. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis *Chest*. 1992;101:1644-1655.
5. Areekul S. Transcapillary escape rate and capillary permeability to albumin in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1988;82:135-140.
6. Atkinson CT, Aikawa M. Ultrastructure of malaria-infected erythrocytes. *Blood cells* 1990;16:351-368.
7. Berendt AR, Ferguson DJP, Newbold C. Sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: sick cells and sticky problems. *Parasitology Today* 1990;6:247-254.

8. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *Journal of Clinical Investigation* 1993;91:379-387.
9. Boulos M, Costa JM, Tosta CE. Comprometimento pulmonar na malária (Revisão). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1993;35:93-102.
10. Brewster DR, Kwiatkowski D, White NJ. Neurological sequelae of cerebral malaria in children. *The Lancet* 1990;336:1039-1043.
11. Briscoe DM, Cotran RS. Role of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules in renal inflammation: *In vitro* and *In vivo* studies. *Kidney International* 1993; 44 (suppl 42): S27-S34.
12. Burke-Gaffney A, Keenan AK. Does TNF- $\alpha$  directly increase endothelial cell monolayer permeability? *Agents and Action* 1993; 38:C83-C85.
13. Burke-Gaffney A, Keenan AK. Modulation of human endothelial cell permeability by combination of cytokines interleukin- $\alpha/\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  and interferon- $\gamma$ . *Immunopharmacology* 1993; 25:1-9.
14. Butcher GA, Garland T, Ajdukiewicz, Clark IA. Serum tumor necrosis factor associated with malaria in patients in the Solomon islands. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1990;84:658-661
15. Burch RM, Tiffany CW. Tumor necrosis factor causes amplification of arachidonic acid metabolism in response to interleukin 1, bradykinin, and other agonists. *Journal of Cellular Physiology* 1989;141:85-89.
16. Carlson J. Erythrocyte rosetting in *Plasmodium falciparum* Malaria-with special reference to the pathogenesis of cerebral malaria. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 1993; 86(Suppl):1-79.
17. Carme B, Bouquety JC, Plassart H. Mortality and sequelae due to cerebral malaria in african children in Brazzaville, Congo. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1993;48:216-221.
18. Chan-Ling T, Neill AL, Hunt NH. Early microvascular changes in murine cerebral malaria detected in retinal wholemounts. *American Journal of Pathology* 1982;140:1121-1130.
19. Charoenpan P, Indraprasit S, Kiatboonsri S, Suvachittanont, Tanomsup S. Pulmonary edema in severe falciparum malaria. *Chest* 1990;97:1190-97.

20. Clark IA. Cell-mediated immunity in protection and pathology of malaria. *Parasitology Today* 1987;3:300-305.
21. Clark IA, Cowden WB, Chaudhri G. The pleiotropic effects of tumour necrosis factor in Malaria. Em: Bonavida B, Grager G (Editors). *Tumor necrosis factor: structure, mechanism of action, role in disease and therapy*. Karger, Basel, Switzerland. 1990;156-161.
22. Clark IA, MacMiccking JD, Gray KM, Rockett KA, Cowden WB. Malaria mimicry with tumor necrosis factor. Contrasts between species of murine malaria and *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Pathology* 1992;140:325-336.
23. Clark IA, Rockett KA, Cowden WB. Possible central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral malaria. *Lancet* 1992; 340:894-896.
24. Clark IA, Rockett KA, Cowden WB. TNF in Malaria. Em: Beutler B (Editor). *Tumor Necrosis Factor: the molecules and their emerging role in Medicine*. Raven Press, Ltd. New York, USA. 1992;20:303-328.
25. Corbett CEP, Duarte MIS, Lancellotti CLP, Silva MALG, Andrada Jr HF. Cytoadherence in human falciparum malaria as a cause of respiratory distress. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1989;92:112-120.
26. Crandall I, Smith H, Sherman IW. *Plasmodium falciparum*: the effect of pH and  $Ca^{24}$  concentration on the *in vitro* cytoadherence of infected erythrocytes to amelanotic melanoma cells. *Experimental Parasitology* 1991;73:362-368.
27. Davis TME, Suputtamongkol, Spencer JL, Ford S e cols. Measures of capillary permeability in acute falciparum malaria: relation to severity of infection and treatment. *Clinical Infectious Diseases* 1992; 15:256-66.
28. Doherty GM, Jensen JC, Alexander HR, Buresh HR, Norton JA. Pentoxifylline supression of Tumor Necrosis Factor gene transcription. *Surgery* 1991;110:192-198.
29. Duarte MIS, Corbet CEP, Boulos M, Amato-Neto V. Ultrastructure of the lung in falciparum malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1985;34:31-35
30. Edwards MJ, Heniford BT, Miller FN. Tumor necrosis factor mediates disseminated intravascular inflammation (DDI) in the genesis of multiple organ edema. *Journal of Surgical Research*. 1993; 54:140-144.

31. Engelberts I, Stephens S, Fracot JM, Van der Linden, Buurman WA. Evidence of different effects of soluble TNF-receptors on various TNF measurements in human biological fluids. *Lancet* 1991;338:515-516.
32. Enk C, Bygbjerg IC, Baek L. Transient hypozincemia and endotoxemia in human malaria. *Trace Elements in Medicine*. 1990;7:131-133.
33. Ferrante A, Kumaratilake L, Rzepczyk CM, Dayer J-M. Killing of *Plasmodium falciparum* by cytokine effector cells (neutrophils and macrophages). *Immunology letters* 1990;25:179-188.
34. Fisher MA, Malik AB. Interaction between neutrophils and endothelial cells mediate lung vascular injury. *Applied Cardiovascular Pathophysiology* 1991;4:175-189.
35. Friedland JS, Ho M, Remick TJ, Dunnag D e cols. Interleukin-8 and *Plasmodium falciparum* in Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1993;87:54-55.
36. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasil- Sistema integrado de séries históricas. Mortalidade por malária, Síntese-AIH, Brasília, 1983-1987.
37. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasil- Sistema integrado de séries históricas. Notificação dos casos de malária, Síntese-AIH, Brasília, 1984-1992.
38. Galloway CJ, Madanat S, Mitra G. Monoclonal anti-Tumor Necrosis Factor (TNF) antibodies protect mouse and human cells from TNF cytotoxicity. *Journal of Immunology Methods*. 1991; 140:37-43.
39. Goldbium SE, Ding X, Campbell-Washington J. TNF- $\alpha$   $\beta$  induces endothelial cell-F actin depolymerization, new actin synthesis, and barrier dysfunction *Cell Physiology*. 1993;264:C894-C905.
40. Graninger W, Thalhammer F, Locker G. Pentoxifylline in cerebral Malaria. *The Journal of Infectious Diseases* 1991; 164:829.
41. Grau GE, Fajardo LF, Piguet P-F, Allet B e cols. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 1987;237:1210-1212
42. Grau GE, Piguet P-F, Vassali P, Lambert P-H. Tumor Necrosis factor and other cytokines in cerebral Malaria: experimental and clinical data. *Immunological Reviews* 1989; 112: 49-70.
43. Grau GE, Piguet P-F, Lambert P-H. Immunopathology of malaria: role of cytokine production and adhesion molecules. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1992; 87:95-100.

44. Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Virima JJ e cols. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *The New England Journal of Medicine*. 1989; 320:1586-1591.
45. Greenwood BM, Bradley AK, Greenwood AM, Byass P e cols. Mortality and morbidity from malaria among children in rural area of the Gambia, West Africa. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1987;81:478-486.
46. Grosso MA, Vidars DE, Brown JM, Mulvijn DW e cols. Local skin burn causes sytemic (lung and kidney) endothelial cell injury reflected by increased circulating and decreased tissue factor VIII-related antigen. *Surgery* 1989;106:310-317.
47. Harpaz R, Edelman R, Wasserman SS, Levine MM e cols. Serum cytokine profiles in experimental human Malaria. Relationship to protection and disease course after challenger. *Journal of Clinical Investigation*. 1992; 90:515-523.
48. Hemmer CJ, Kern P, Holst FGE, Radtke KP e cols. Activation of the host response in human *Plasmodium falciparum* malaria: relation of parasitemia to tumor necrosis factor/cachectin, thrombin-antithrombin III, and protein C levels. *The American Journal of Medicine* 1991; 91:37-44.
49. Hennig B, Wang Y, Ramasamy S, McClain CJ. Zinc protects against tumor necrosis factor-induced disruption of porcine endothelial cell monolayer integrity. *Journal of Nutrition*. 1993;123:1003-1009.
50. Hoffman SL, Rustama D, Punjabi NH, Surampaet B e cols. High-dose dexamethasone in quinine-treated patients with cerebral malaria: a double-blind, placebo controlled trial. *Journal of Infectious Diseases* 1988;158:325-331.
51. Horstmann RD, Dietrich M, Bienzle U, Rasche H. Malaria induced thrombocytopenia. **Blut** 1981;157-164.
52. Howard RJ, Gilladoga AD. Molecular studies related to the pathogenesis of cerebral malaria. *Blood* 1989;74:2603-2618.
53. Hviid L, Theander TG, Elhassan IM, Jensen JB. Increased plasma levels of soluble levels of soluble ICAM-1 and ELAM-1 (E-Selectin) during acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunology Letters*. 1993; 36:51-58.
54. Jakobsen PH, Baek L, Jepsen S. Demonstration of soluble *Plasmodium falciparum* antigens reactive with *Limulus* amoebocyte lysate and polymixin B. *Parasite Immunology* 1988;10:593-606.

55. Jakobsen PH, Moon R, Ridley RG, Bate CAW e cols. Tumour necrosis factor and interleukin-6 production induced by components associated with merozoite proteins of *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunology* 1993;15:229-237.
56. Karunawerra N, Grau G, Gamage P, Carter R, Mendis K. Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. *Proceedings of National Academy of Science, USA* 1992;89:3200-3203.
57. Kaul DK, Roth EF, Nagel RL, Howard RJ, Handunnetti SM. Rosetting of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells with uninfected red blood cells enhances microvascular obstruction under flow conditions. *Blood* 1991;78:812-819.
58. Kern P, Hemmer CJ, Damme JV, Gruss H-J, Dietrich M. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *The American Journal of Medicine* 1989;87:139-143.
59. Kremsner PG, Grundmann H, Neifer S, Sliwa K e cols. Pentoxifylline prevents murine cerebral Malaria. *The Journal of Infectious Diseases* 1991;164:605-608.
60. Kremsner PG, Nüssler A, Neifer S, Chaves MF e cols. Malaria antigen and cytokine-induced production of reactive nitrogen intermediates by murine macrophages: no relevance to the development of experimental cerebral malaria. *Immunology* 1993;78:286-290.
61. Kuei JH, Taskin DP, Figling RA. Pulmonary toxicity of recombinant human tumor necrosis factor. *Chest* 1989;96:334-338.
62. Kwiatkowski D, Cannon JG, Manogue KR, Cerami A e cols. Tumour necrosis factor production in falciparum malaria and its association with schizont rupture. *The Clinical Experimental Immunology* 1989;77:361-366.
63. Kwiatkowski D, Hill AVS, Sambou I, Twumasi P e cols. TNF concentration in fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *The Lancet* 1990;336:1201-1204.
64. Kwiatkowski D, Molyneux ME, Stephens S, Curtis N e cols. Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. *Quarterly Journal of Medicine* 1993;86:91-98.
65. Kyaw-Zaw A, Maung-K, Thwe M. Endotoxaemia in complicated falciparum malaria. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988;82:513-514.
66. Lamas S, Michel T, Brenner BM, Marsden PA. Nitric Oxide synthesis in endothelial cells: evidence for a pathway inducible by TNF- $\alpha$ . *American Journal of Physiology* 1991;261:C634-C641.

67. Landau Z, Attali M. Use of pentoxifylline in the treatment of cerebral Malária. *Clinical Infectious Diseases* 1993;17:137-138.
68. Lantz M, Malik S, Slevin M, Olsson I. Infusion of Tumor Necrosis Factor (TNF) causes an increase in circulating TNF-binding protein in humans. *Cytokines* 1990;2:402-406.
69. Levine JD, Harlan JM, Harker LA, Joseph ML, Counts RB. Thrombin-mediated release of factor VIII antigen from human umbilical vein endothelial cells in culture. *Blood* 1982;60:531-534.
70. Looareesuwan S, Warrell DA, White NJ, Sutharasamai P e cols. Do patients with cerebral malaria have cerebral oedema? A computed tomography study. *The Lancet* 1983;i:434-437.
71. MacPherson GG, Warrel MJ, White NJ, Looreesuwan S, Warrel DA. Human malaria cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration *The American Journal of Pathology* 1985; 119: 385-401.
72. Mallick AJ, Ishizaka A, Stephens KE, Hatherill JR e cols. Multiple organ damaged caused by tumor necrosis factor and prevented by prior neutrophil depletion. *Chest* 1989;95:1114-1120.
73. McCallum R, Hill M, Sith R. Inhibited steroid induction of PEPCK in hepatoma cells treated with hurIL-1 and hurTNF. Em: Oppeheim JJ, Kluger MJ, Dinarello CA (Eds.). *Monokines and other non-lymphocytic cytokines*. Alan R Liss, New York, USA. 1988;267-272.
74. Mendis KN. Contrasting clinical disease in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria, and the association of both cytokines. *Bulletin et Institute Pasteur* 1992;90:3-9.
75. Migasena P, Areekul S. Capillary permeability function in malaria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1987; 81:549-60.
76. Molony L, Armstrong L. Cytoskeletal reorganizations in human umbilical vein endothelial cells as a result of cytokine exposure. *Experimental Cell Research* 1991; 196:40-48.
77. Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by Tumor Necrosis Factor. *The Journal of Experimental Medicine* 1986; 163:740- 745.
78. Newman W, Beall LD, Carson CW, Hunder GG e cols. Soluble E-selectin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in the serum of patients with septic shock. *The Journal of Immunology* 1993;150:644-654.

79. Newton CRJN, Kirkham FJ, Wmstanley PA, Pasvol G e cols. Intercranial pressure in african children with cerebral malaria. *The Lancet* 1991;337:573-576
80. Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C e cols. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *The Journal of Experimental Medicine* 1992;176:1183-1189.
81. Ohtsuka A, Ando J, Korenaga R, Kamiya A-e cols. The effect of flow on the expression of vascular adhesion molecule-1 by cultured mouse endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993;193:303-310.
82. Parillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *The New England Journal of Medicine* 1993;328:1471-1477.
83. Peyron F, Vuillez JP, Barbe G, Boudin C e cols. Plasma levels of tumor necrosis factor during a longitudinal surveying an endemic area of malaria. *Acta Tropica* 1990;47:47-51
84. Picot S, Peyron F, Deloron P, Boudin C e cols. Ring-infected erythrocyte surface antigen (Pf/155RESA) induces tumour necrosis factor-alpha production. *Clinical Experimental Immunology* 1993;93:184-188.
85. Pigott R, Hemingway IH, Gearing AJH. Soluble forms of E-Selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992; 187:584-589.
86. Pohlman TH, Harlan JM. Human Endothelial cell response to lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor is regulated by protein synthesis. *Cellular Immunology* 1989; 119: 41-52.
87. Pober JS, Slowik MR, De Luca LG, Ritchie AJ. Elevated cyclic AMP inhibits endothelial cell synthesis and expression of TNF-induced Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1, and Vascular Cell Adhesion Molecule-1, but not Intercellular Adhesion Molecule-1. *The Journal of Immunology* 1993;150:5114-5123.
88. Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Human endothelial cells in culture produced platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin. *The Proceedings of National Academy of Science, USA* 1984;81:3534-3538
89. Pukrittayakamee S, White NJ, Clemens R, Chittamas S e cols. Activation of the coagulation cascade in falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1989;83:762-766.



90. Radeke HH, Meier B, Topley N, Fioege J e cols. Interleukin 1- $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  induce oxygen radical production in mesangial cells. *Kidney International* 1990;37:767-775.
91. Ringwald P, Peyron F, Vuillez JP, Touze JE e cols. Levels of cytokines in plasma during *Plasmodium falciparum* malaria attacks. *Journal of Clinical Microbiology* 1991;29:2076-2078.
92. Roberts DJ, Craig AG, Berendt AR, Pinches P. Rapid switching to multiple antigens and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* 1992;357:689-692.
93. Rockett KA, Awburn MM, Aggarwal BB, Cowden WB, Clark IA. *In vivo* induction of nitrite and nitrate by lymphotoxin, and interleukin-1: possible roles in Malária. *Infection and Immunity* 1992;60:3725-3730.
94. Royall JA, Berkkow RL, Beckman JS, Cunningham MK e cols. Tumor necrosis factor and interleukin 1 $\alpha$  increase endothelial permeability. *American Journal of Physiology* 1989;257:L399-L410.
95. Ruangjirachuporn W, Afzelius BA, Paulie S, Wahlgren M e cols. Cytoadherence of knobby and knobless *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Parasitology* 1991;102:325-334.
96. Rubin DB, Wiener-Kronish PW, Murray JF, Green DR e cols. Elevated von Willebrand factor antigen is an early plasma predictor of acute lung injury in nonpulmonary sepsis syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* 1990; 86:474-480.
97. Santos-Neto LL, Freitas-Santos C, Tosta CE. Citocinas e endotélio: da homeostasia à lesão pulmonar. Em: Tavares P, Editor. *Atualização em fisiologia. Respiração*. Editora Cultura Médica Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil 1991; 132-144.
98. Santos-Neto L, Muniz-Junqueira I, Brandi MC, Tosta CE. Has pentoxifylline has a place in the therapy of Malaria? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1992;25(Supl. II):66-67.
99. Sato N, Goto T, Haranaka K, Satomi N e cols. Actions of Tumor Necrosis Factor on cultures of vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *Journal of National Cancer Institute* 1986;76:1113-1121.
100. Scheibel LW, Ashton SH, Trager W. *Plasmodium falciparum*: microaerophilic requirements in human red blood cells. *Experimental Parasitology* 1979;47:410-418.

101. Schuger L, Varani J, Marks RM, Kunkel SL e cols. Cytotoxicity of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : for human umbilical vein endothelial cells. *Laboratory Investigation* 1989;61:62-68.
102. Seckinger P, Isaaz S, Dayer JM. Purification and biological characterization of specific tumor necrosis factor  $\alpha$  : inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 1989;264:11966-11973
103. Sein KK, Maeno Y, Thuc HV, Anh TK, Aikawa M. Differential sequestration of parasitized erythrocytes in cerebrum and cerebellum in human cerebral malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1993;48:504-511.
104. Selmaj K, Raine CS, Farooq M, Norton WT, Brosnan CF. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *The Journal of Immunology* 1991;147:1522-1529.
105. Shaffer N, Grau GE, Hedberg K, Davachi F e cols. Tumor necrosis factor and severe malaria. *The Journal of Infectious Diseases* 1991;163:96-101.
106. Sherman IW, Crandall I, Smith H. Membrane proteins involved in the adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to the endothelium. *Biology Cell* 1992;74:161-178.
107. Silamut K, White NJ. Relation of the stage of parasite development in the peripheral blood to prognosis in falciparum Malaria. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1993;87:436-443.
108. Silva AMT, Kauibach HC, Chuidian FS, Lambert DR e cols. Shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of *Salmonella* endotoxin. *The New England Journal of Medicine* 1993;328:1457-1460.
109. Silva HJ, Hoang P, Dalton H, Silva DR e cols. Immune activation during cerebelar dysfunction following *Plasmodium falciparum*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1992;86:129-131.
110. Sitprija V. Nephropaty in falciparum malaria. *Kidney international* 1988;34:867-877.
111. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods*. Seventh Edition. The Iowa State University Press, Iowa, USA. 1980.
112. Soliven B, Albert J. Tumor necrosis factor modulates  $Ca^{2+}$  currents in cultured sympathetic neurons. *The Journal of Neuroscience* 1992;12:2665-2671.

113. Staunton D, Ockenhouse C, Springer T. Soluble intercellular adhesion molecule 1 - immunoglobulin G1 immunoadhesin mediates phagocytosis of malaria-infected erythrocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1992;176:1471-1476.
114. Stoclet J-C, Fleming I, Gray G, Julou-Schaeffer GJ e cols. Nitric oxide and endotoxemia. *Circulation* 1993;87(Suppl V):V77-V80.
115. Taveme J, Bate CAW, Kwiatkowski D, Jacobsen PH, Playfair JHL. Two soluble antigens of *Plasmodium falciparum* induce tumor necrosis factor releases from macrophages. *Infection and Immunity* 1990; 58:2923-2928.
116. Taverne J, Tavernier J, Fiers W, Playfair JHL. Recombinant tumour necrosis factor inhibits malaria parasites *in vivo* but not *in vitro*. *Clinical Experimental Immunology* 1987; 67:1-4.
117. Tsujimoto M, Yip YK, Vilcek J. Interferon- $\gamma$  enhances expression of cellular receptor for tumour necrosis factor. *Journal of Immunology* 1986;136:2441-2444.
118. Tosta CE, Santos-Neto L. Citocinas, Integrinas e patogenia da malária [Editorial]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1989;22:167-170.
119. Udeinya IJ, Akogyeram CO. Induction of adhesiveness in human endothelial cells by *Plasmodium falciparum* -infected erythrocytes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1993;48:488-495.
120. Usawattanakul W, Tharavanij S, Warrel S, Looreesuwan S e cols. Factor contributing to the development of cerebral Malaria II. Endotoxin. *Clinical Experimental Immunology* 1985;61:562-568.
121. Van der Poli T, Van Deventer SJH, Hack CE, Wolbink GJ e cols. Effects on leukocytes after injection of tumor necrosis factor into healthy human. *Blood* 1992; 79:693-698.
122. Van der Poli T, Van Deventer SJH, Pasterkamp G, Mourik JAV e cols. Tumor necrosis factor induces von Willebrand factor release in healthy humans. *Thrombosis and Haemostasis* 1992; 67:623-626.
123. Van der Wiel PA, Pieters RHH, Van der Pijl A, Bloksma N. Synergic action between tumor necrosis factor and endotoxins or poly(A.U) on cultured bovine endothelial cells. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 1989;29:23-28.
124. Visner GA, Chesrown SE, Monier J, Ryan US, Nick HS. Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992;1:453-46

Warrell DA. Pathophysiology of severe falciparum malaria in man. *Parasitology* 1987; 94:S53-S76.

Warrel DA, Looreesuwan S, Warrel MJ, Kasemsarn P e cols. Dexamethasone proves deleterious in cerebral malaria. A double-blind trial in 100 comatose patients. *The New England Journal of Medicine* 1992;306:313-319.

White NJ, Ho M. The pathophysiology of malaria. *Advances in Parasitology* 1992;31:83-173.

Wick TM, Johnson KJ, Swerlick RA, Grady K, Millet P. Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitised red blood cells (PRBC) to human microvascular endothelial cell (MEC) CD36 and ICAM-1 strain-specific and regulatable FASEB 1992; 6; A1892.

World Health Organization. Severe and complicated malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1986; 80(suppl):1-50.

World Health Organization. Severe and complicated malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1990; 84(suppl 2): 1-65.

World malaria situation in 1989. *Epidemiological Records* 1990;22:157-170.

Wong D, Dorovini-Zís K. Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmunology* 1992;39:11-22.

Wong GHW, Kamb A, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV. MnSOD induction by TNF and its protective role. In: *Tumor necrosis factor: the molecules and their emerging role in medicine*. Beutler B (Ed.), Raven Press, Ltd., New York 1992;29:473-484.

Yamauchi N, Kuriyama H, Watanabe N, Neda H e cols. Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells *in vitro*. *Cancer Research* 1989;49:1671-1675.

Yamasaki S, Onishi E, Enani K, Natori K e cols. Proposal of standardized methods and reference for assaying recombinant human Tumor Necrosis Factor. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 1986;39:105-118.

Yoshizumi M, Perrela MA, Burnett JC, Lee M-E. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial Nitric Oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circulation Research* 1993; 73:205-209.

Zheng H, Crowley JJ, Chan JC, Hoffman H e cols. Attenuation of Tumor Necrosis Factor-induced endothelial cytotoxicity and neutrophil chemoluminescence. *American Review of Respiratory Disease* 1990;142:1073-1078.

Zimmerman RJ, Chan A, Leadon SA. Oxidative damage in murine tumor cells treated *in vitro* by recombinant human Tumor Necrosis Factor. *Cancer Research* 1989;49:1644-1648.

ANEXOS

### 3.1. ANEXO I. Ficha utilizada na coleta dos dados:

SOBRENOME :		HOSPITAL		Nº DO PRONTUÁRIO			
NOME:		SEXO (M/F)	PROFISSÃO	NATURALIDADE			
DATA DE NASCIMENTO:		PROCEDENCIA					
ENDEREÇO				TELEFONE			
Nº DE MALARIAS:	ÚLTIMO EPISÓDIO	DURAÇÃO DO EPISÓDIO ATUAL (dias):	INÍCIO	DURAÇÃO DA INTERNAÇÃO	EVOLUÇÃO (bita ou óbito):		
<b>Parâmetros (Preencher os dados mais significativos das primeiras 24 h da internação)</b>							
Temperatura retal (°C)	Temperatura axilar (°C)	Pressão Arterial (mm de Hg)	X	Frequência Cardíaca	bat	Frequência Respiratória	irpm
<b>Gasometria Arterial</b> (Todos os dados resultantes da gasometria arterial (pH, PaO <sub>2</sub> , PaCO <sub>2</sub> e HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) devem ser obtidos da mesma amostra)							
PaO <sub>2</sub>	Fração inspirada de O <sub>2</sub> (F <sub>i</sub> O <sub>2</sub> ):	Em caso de utilização de CATETER NASAL assinalar o FLUXO (L/min):					
	Fração inspirada de O <sub>2</sub> (F <sub>i</sub> O <sub>2</sub> ):	Em caso de uso de MÁSCARA assinalar: Reservatório (SIM/NÃO): TIPO= FLUXO (L/min)=					
pH	PaCO <sub>2</sub>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Em caso de uso de PEEP assinalar a pressão de admissão (cm de H <sub>2</sub> O) =				
SÓDIO SÉRICO (mEq/L):	POTÁSSIO SÉRICO (mEq/L):	HEMATÓCRITO (%):	leucocitose	BILIRUBINA TOTAL (mg/dL):			
Insuficiência renal aguda (SIM OU NÃO) (DEFINIÇÃO DE IRI: CREATININA > 1,4 mg/dL)		EM CASO DE IRI ASSINALAR: - A ELEVACÃO DA CREATININA FOI EVIDENCIADA NAS ÚLTIMAS 24h (SIM OU NÃO): - A ELEVACÃO DA CREATININA ESTA ASSOCIADA A OLIGURIA (defeito urinário < 150 mL durante um período consecutivo de 8 h) (SIM OU NÃO):					
CREATININA SÉRICA (mg/dL)=							
<b>ESCALA DE GLASGOW (ASSINALE)</b>							
<b>Abertura dos olhos</b>		<b>Resposta motora (MOVIMENTO DOS MEMBROS)</b>		<b>Resposta verbal</b>			
- ESPONTÂNEA	(4)	- OBEDIÊNCIA AO COMANDO VERBAL	(6)	- ORIENTADO e COMPREENSIVO	(5)		
- COMANDO VERBAL	(3)	<b>resposta aos estímulos dolorosos</b>		- VITAL mas DESORIENTADO	(4)		
- A VOZ	(2)	- LOCALIZA A DOR	(5)	- PALAVRAS INAPROPRIADAS	(3)		
- PERMANCECE FECHADO PARA QUALQUER ESTÍMULO	(1)	- RETORNO a FLEXÃO	(4)	- SOMS INCOMPREENSÍVEIS	(2)		
		- FLEXÃO e RIGIDEZ DE DECONTORNAÇÃO	(3)	- NENHUMA RESPOSTA	(1)		
		- EXTENSÃO e RIGIDEZ DE DECONTORNAÇÃO	(2)				
		- NENHUMA RESPOSTA	(1)				
Observação: para os pacientes que estiverem entubados a resposta verbal será avaliada da seguinte maneira:							
		- PACIENTE INRESPONSIVO	(1)				
		- O PACIENTE ESTA INRESPONSIVO, mas a SUA CAPACIDADE DE COMUNICAÇÃO É QUESTIONÁVEL	(3)				
		- O PACIENTE PARECE ORIENTADO e É CAPAZ DE SE COMUNICAR	(5)				
Rx DE TORAX:							
TERAPIA ENREGADA							
NA MALARIA: FARMACOS				DOSE (mg/24 h):			
				DURAÇÃO DA TERAPIA (HORAS):			
PLASMEFERESE (SIM OU NÃO):		OUTROS FARMACOS					

8. 2. **ANEXO:** Dados Clínicos e Epidemiológicos dos pacientes com malária

Tabela 12. Achados Eoidemiológicos dos pacientes com malária grave

Paciente NI	Idade (Anos)	Sexo	N!CPM	Ultimo Episódio (meses)	Início do quadro atual (dias)	Local da Infecçãc	Profissão	Etnia	Evolução
#1	40	M	0	2	4	MT	Garimpeiro	-	<b>S</b>
#2	23	M	2	24	15	RR	Garimpeiro	-	<b>S</b>
#3	23	M	1	3	6	MT	?		0
#4	15	F	?	?	?	MT		índio	S
#5	52	M	0	?	5	RO	Comerciante	-	S
#6	57	M	5/9	36	6	RO		-	S
#7	20	M	2	13	4	MT	Lavrador	índio	S
#8	24	M	0	-	2	GO	?		S
#9	27	M	8	3	1	GO	Garimpeiro	-	S
#10	61	M	?	?	>7	GO	?		0
#11	32	M	0	5	11	MT	Comerciante	-	0
#12	54	F	1	?	8	TO	Do lar		S
#13	17	M	0	-	8	PA	Funcionário Público	-	S
#14	24	M	1/4	?	6	RO	Médico		S
#15	44	M	1/4	12	7	RO	Funcionário Público		S
#16	23	F	0	-	11	MA	Do lar		0
#17	20	M	1/4	2	3	RO	Motorista		S
#18	25	M	0	-	5	RO	Comerciante	-	<b>S</b>
#19	32	F	?	?	5	MT		índio	<b>S</b>

Abreviatura: N° CPM= Número de casos prévio de malária; MF= Masculino ou Feminino; Estados da Federação: MT=Mato Grosso, RR=Rorâima, RO=Rondônia, GO=Goiás, TOTocantins, PA=Pará, MA=Maranhão; S/0= Sobrevida/Óbito