

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)
Pós-Graduação em Medicina Tropical

**Anemia da Malária por *Plasmodium vivax*: Estudo Clínico
e Laboratorial em Crianças e Adolescentes**

ANA MARIA REVORÊDO DA SILVA VENTURA

RIO DE JANEIRO

2010

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)
Doutorado em Medicina Tropical

ANA MARIA REVORÊDO DA SILVA VENTURA

**Anemia da Malária por *Plasmodium vivax*: Estudo Clínico
e Laboratorial em Crianças e Adolescentes**

**Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Medicina, área de concentração: Medicina Tropical**

**ORIENTADORES: Prof. Dr. Claudio Tadeu Daniel-Ribeiro
Prof. Dr. José Maria de Souza**

RIO DE JANEIRO

2010

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)
Doutorado em Medicina Tropical

ANA MARIA REVORÊDO DA SILVA VENTURA

**Anemia da Malária por *Plasmodium vivax*: Estudo Clínico
e Laboratorial em Crianças e Adolescentes**

ORIENTADORES: Prof. Dr. Claudio Tadeu Daniel-Ribeiro
Prof. Dr. José Maria de Souza

Aprovada em : 05/03/2010

EXAMINADORES:

Prof. Dr. José Rodrigues Coura - IOC/FIOCRUZ (Presidente)
Prof^a Dra. Alda Maria da Cruz - IOC/FIOCRUZ
Prof^a Dra. Patrícia Brasil - IOC/FIOCRUZ
Prof^o Dr. José Luís do Nascimento - UFPA
Prof^a Dra. Eliete da Cunha Araújo- UFPA

BELÉM
2010

Aos meus pais, Rui da Silva Ventura e Lucinda R. da S. Ventura, in memoriam, por todas as manifestações de amor e apreço, pela transmissão dos alicerces que forjaram meu caráter e pelas oportunidades que me proporcionaram.

A toda minha família, em especial aos meus filhos Norton e Pedro, que sempre foram e serão grande fonte de motivação para que no futuro eu lhes deixe como exemplo, dentre outras coisas, que a contínua busca pelo conhecimento é um bem maior, ao qual devemos sempre almejar, pela influência positiva que tem em nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial ao Geraldo, Norton, Pedro e Rui, pela compreensão várias vezes demonstrada de que realizar uma tese de doutorado requer privação do convívio familiar de dias, semanas, meses e de anos. Esse apoio foi fundamental para que eu muitas vezes renovasse as minhas forças para cumprimento do que me propus, com o máximo possível de aproveitamento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio Tadeu Daniel-Ribeiro, inicialmente por ter aceito o desafio de coordenar o primeiro doutorado interinstitucional Fiocruz-UFPA-UEPA em Medicina Tropical e Biologia Parasitária (e que posteriormente se definiu como Doutorado Fiocruz) e, por ter aceito o convite de uma pediatra que desejava trilhar os caminhos da imunologia. Nessa sua tarefa, agradeço sobretudo o zelo e a perseverança em ler e reler meus manuscritos, em cuidadosamente corrigi-los, sugerindo novas referências e/ou novos enfoques. Nessa convivência, além do conhecimento científico adquirido, agradeço também o amadurecimento que tive, e que hoje, me faz considerá-lo como parceiro e amigo de novas pesquisas envolvendo a pediatria, a imunologia e naturalmente, a malária.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Maria de Souza, pela gentil acolhida no Programa de Ensaaios Clínicos em Malária, ainda na realização da Dissertação de Mestrado. Sua vasta experiência em malária, a qual não hesita em compartilhar, e seu amplo conhecimento da vida e da natureza humana foram fundamentais para que eu concluísse com êxito mais uma etapa de meu aperfeiçoamento profissional e pessoal.

À Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, em particular aos professores Dr. Claudio Tadeu Daniel-Ribeiro, Dr. José Rodrigues Coura, Dr. Henrique Lenzi, Dra. Ana Maria Gaspar e Dr. Ricardo Lourenço, os quais iniciaram e concretizaram a formação dessa turma de doutorado. Agradeço também ao ex-coordenador, Prof. Dr. Marcio Bóia e a atual coordenadora, Prof^a Dra. Alda Maria da Cruz pela diligência como conduziram esse doutorado.

À Universidade do Estado do Pará, em particular ao pró-reitor de Pesquisa, Prof. Dr. Sílvio Romero Buarque de Gusmão, e pela diretora de Pesquisas, Prof^a. MsC. Ana Kely Martins da Silva, pela disponibilidade e atenção a todos os alunos durante o doutorado, em sintonia com os investimentos feitos pela instituição para capacitação de seu corpo docente.

Aos meus colegas e amigos da disciplina de Pediatria II, Carina Guilhon Sequeira, Mariane Cordeiro Alves Franco, Rosa Helena Gusmão e Bruno Paes Barreto, pela compreensão e aceitação das dificuldades que estão inseridas em realizar uma tese de doutorado, sempre dispostos a alterar seus compromissos para suprir minhas eventuais ausências, para que não houvesse prejuízo na formação de nossos alunos.

Ao Instituto Evandro Chagas, onde atuo como médica e pesquisadora, na pessoa de sua diretora, Dra. Elizabeth da Conceição Santos, pelo entendimento e sobretudo, pelo apoio para que eu concluísse o doutorado.

A todos os integrantes do Laboratório de Pesquisas em Malária da Fiocruz, inclusive aos alunos de pós-graduação, pela gentil acolhida e pela disposição em sempre me auxiliar no manuseio dos equipamentos durante a realização dos testes imunológicos, fazendo-me sentir parte da equipe.

Aos funcionários do Centro de Hemoterapia do Pará responsáveis pelo recebimento e manipulação do material e pela realização dos testes laboratoriais referentes à pesquisa de causas congênitas de anemia hemolítica e ao teste de antiglobulina direto.

Ao Centro de Estudos Superiores do Pará (CESUPA) e ao Hospital Metropolitano de Urgência e Emergência (HMUE), representado pelo seu diretor, Prof. Dr. João Paulo Mendes Filho, pela compreensão, dispensando-me de minhas atividades profissionais, durante minhas missões de estudo na Fiocruz.

À Claudia Castro, secretária do Dr. Claudio Tadeu Daniel-Ribeiro, pela atenção dispensada, sempre disponível em me auxiliar durante os diversos períodos que estive na Fiocruz.

À Dra. Andrea Aparecida Moraes de Freitas, pelo auxílio no entendimento dos testes imunológicos e pela amizade desenvolvida durante sua permanência em Belém, Pará.

À Dra. Graziela Maria Zanini e a Dra. Lilian Rose Pratt Riccio pela realização dos testes imunológicos (citocinas e autoanticorpos) e também pela disponibilidade em auxiliar-me a interpretá-los.

À Dra Salma Gomes de Oliveira, pesquisadora do Laboratório de Pesquisas em Malária do Instituto Evandro Chagas, responsabilizando-se inicialmente pela separação das alíquotas do material para realização dos diversos testes e posteriormente pela realização dos testes de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos IgG e IgM anti-*P. vivax*.

Aos integrantes do Programa de Ensaio Clínicos em Malária pela contribuição decisiva para realização desta tese. Especiais agradecimentos à Miriam Mendes, à Darcy Rodrigues e ao Sr. Benedito Pontes, pelo incondicional apoio e boa vontade em auxiliar-me na coleta dos dados.

Aos funcionários do Serviço de Patologia Clínica do Instituto Evandro Chagas, em particular ao Dr. Manoel Gomes da Silva Filho, chefe do referido serviço, pela presteza na realização dos exames laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Manoel Ayres e à prof.^a Dra. Rosana Libonati Bebiani, por compartilharem de suas experiências em estatística, ao mesmo tempo em que gentilmente me auxiliaram na seleção dos testes estatísticos.

Às minhas amigas do coração, Vânia Lucia Noronha Cavalcante, Eliete da Cunha Araújo - parceiras deste doutorado interinstitucional em Medicina Tropical, à Carina Guilhon Sequeira, à Rosana Libonati Bebiani, à Maria Deise de Oliveira Ohnishi, à Mariana Cordeiro Alves Franco e à Consuelo da Silva Oliveira, pelo apoio, pelos conselhos e sobretudo pelo estímulo para continuar com galhardia e perseverança na busca do objetivo a que me propus, concluir o doutorado, com um bom aproveitamento.

A todas as crianças e adolescentes que participaram neste estudo, contribuindo anonimamente para mais um estudo científico sobre manifestações clínicas e laboratoriais da malária *vivax*.

A todas as pessoas, não mencionadas, que, de modo direto ou indireto, contribuíram para que essa tese fosse concluída.

“Quem dentre vós é sábio e entendido? Mostre pelo seu bom trato as suas obras em mansidão de sabedoria”.

(Tiago 3:13)

SUMÁRIO

| | Pág. |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS | |
| LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS | |
| RESUMO | |
| ABSTRACT | |
| 1) INTRODUÇÃO | 1 |
| 2) REVISÃO DA LITERATURA | 3 |
| 2.1. SITUAÇÃO ATUAL DA MALÁRIA | 3 |
| 2.2. CICLO EVOLUTIVO DO PLASMÓDIO | 4 |
| 2.3. O ERITRÓCITO | 7 |
| 2.4. O ERITRÓCITO E O PLASMÓDIO | 11 |
| 2.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS | 13 |
| 2.6. ANEMIA DA MALÁRIA | 14 |
| 2.6.1 Considerações gerais | 14 |
| 2.6.2. Fisiopatogenia | 21 |
| 2.6.2.1. Destruição mecânica dos eritrócitos | 21 |
| 2.6.2.2. Autoanticorpos | 21 |
| - Autoanticorpos antimembrana de eritrócitos | 22 |
| - Autoanticorpos antifosfolipídicos | 24 |
| 2.6.2.3. Participação de citocinas | 25 |
| 2.6.2.4. Alterações na medula óssea | 26 |
| 2.6.2.5. Eritropoetina | 27 |
| 3) JUSTIFICATIVA | 29 |
| 4) OBJETIVOS | 30 |
| 4.1. GERAL | 30 |
| 4.2. ESPECÍFICOS | 30 |
| 5) SUJEITOS E MÉTODOS | 31 |
| 5.1. DESENHO DO ESTUDO..... | 31 |
| 5.2. LOCAIS DO ESTUDO..... | 31 |
| 5.3. PACIENTES..... | 32 |
| 5.4. PROCEDIMENTOS..... | 33 |
| 5.5- LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXAMES LABORATORIAIS..... | 35 |
| 5.5.1.Acompanhamento parasitológico..... | 35 |
| 5.5.2. Perfil hematológico da malária..... | 35 |
| 5.5.3. Perfil imunológico da malária..... | 36 |
| 5.5.4. Investigação de causas de anemia hemolítica congênita..... | 36 |
| 5.5.5. Exame parasitológico de fezes..... | 36 |
| 5.6. BREVE DESCRIÇÃO DOS EXAMES LABORATORIAIS REALIZADOS..... | 37 |
| 5.6.1. Gota Espessa..... | 37 |
| 5.6.2. Hemograma..... | 37 |
| 5.6.3. Distendido sanguíneo (Esfregaço sanguíneo) | 38 |
| 5.6.4. Eletroforese de Hemoglobina em acetato de celulose | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 5.6.5. Teste de Brewer ou Teste de Redução da Metahemoglobina | 39 |
| 5.6.6. Eletroforese de G ₆ PD em gel de agarose a 0,9% | 40 |
| 5.6.7. Ferritina sérica | 41 |
| 5.6.8. Teste de Antiglobulina direto (Teste direto de Coombs)..... | 42 |
| 5.6.9. Pesquisa de Anticorpos contra Antígenos de Membrana de Eritrócitos normais (ELISA)..... | 42 |
| 5.6.10. Pesquisa de Anticorpos contra Cardiopina (ELISA)..... | 44 |
| 5.6.11. Detecção do Fator de Necrose Tumoral (ELISA)..... | 45 |
| 5.6.12. Detecção de Interleucina -10 (ELISA)..... | 47 |
| 5.6.13. Teste de Imunofluorescência indireta (<i>P. vivax</i>) | 48 |
| 5.6.14. Exame parasitológico de fezes..... | 49 |
| 5.7. DEFINIÇÃO DE VARIÁVEIS DO ESTUDO..... | |
| 5.7.1. Faixa etária..... | 51 |
| 5.7.2. Renda familiar..... | 51 |
| 5.7.3. Estado nutricional..... | 52 |
| 5.7.4. Anemia..... | 53 |
| 5.7.5. Palidez..... | 54 |
| 5.7.6. Recaída..... | 54 |
| 5.7.7. Reinfecção..... | 54 |
| 5.7.8. Tratamento dos casos de malária por <i>Plasmodium vivax</i> | 54 |
| 5.8. VALORES DE REFERÊNCIA..... | 55 |
| 5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 55 |
| 5.10. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..... | 57 |
| 5.11. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA..... | 57 |
| 5.12. FINANCIAMENTO..... | 58 |
| 6) RESULTADOS | 59 |
| 6.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA..... | 59 |
| 6.2. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DO <i>Plasmodium vivax</i> | 61 |
| 6.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA MALÁRIA <i>vivax</i> | 62 |
| 6.4. ANEMIA NA MALÁRIA <i>vivax</i> | 65 |
| 6.5. FATORES INDUTORES DE ANEMIA..... | 68 |
| 6.5.1. Defeitos enzimáticos dos eritrócitos, hemoglobinopatias | 68 |
| 6.5.2. Estado nutricional..... | 70 |
| 6.5.3. Parasitoses intestinais..... | 70 |
| 6.5.4. Intervalo de tempo decorrido para diagnóstico de malária | 70 |
| 6.6. PERFIL HEMATOLÓGICO NA MALÁRIA <i>vivax</i> | 72 |
| 6.6.1. Avaliação da morfologia dos eritrócitos | 72 |
| 6.6.2. Série vermelha..... | 74 |
| 6.6.3. Série branca..... | 75 |
| 6.6.4. Série plaquetária..... | 76 |
| 6.6.5. Reticulócitos..... | 78 |
| 6.6.6. Ferritina..... | 78 |
| 6.7. ACOMPANHAMENTO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM MALÁRIA <i>vivax</i> | 80 |
| 6.7.1. Série vermelha..... | 80 |
| 6.7.2. Série branca..... | 82 |
| 6.7.3. Série plaquetária..... | 83 |
| 6.8. PERFIL IMUNOLÓGICO NA MALÁRIA <i>vivax</i> | 84 |
| 6.8.1. Imunoglobulinas IgG e IgM anti- <i>P. vivax</i> | 84 |

| | |
|---|------------|
| 6.8.2. Fator de necrose tumoral e Interleucina-10 | 86 |
| 6.8.3. Autoanticorpos antimembrana de eritrócitos e anticardiolipina..... | 89 |
| 6.9. PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DURANTE O ACOMPANHAMENTO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM MALÁRIA <i>vivax</i> | 94 |
| 6.9.1. Imunoglobulinas IgG anti- <i>P. vivax</i> | 94 |
| 6.9.2. Fator de necrose tumoral e IL-10..... | 94 |
| 6.9.3. Avaliação de anticorpos anti-eritrocíticos (teste de antiglobulina direto)..... | 95 |
| 6.9.4 Autoanticorpos antimembrana de eritrócitos..... | 96 |
| 6.9.5.Autoanticorpos anticardiolipina..... | 96 |
| 6.10. EVOLUÇÃO DOS NÍVEIS DOS AUTOANTICORPOS ANTI-ERITROCÍTICOS AVALIADOS PELO TESTE DE ANTIGLOBULINA DIRETO, ANTICORPOS ANTI-ERITROCÍTICOS (ELISA) E ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINA | 98 |
| 7) DISCUSSÃO | 99 |
| 7.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS | 100 |
| 7.2. ASPECTOS PARASITOLÓGICOS | 101 |
| 7.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA MALÁRIA | 103 |
| 7.4. ANEMIA | 104 |
| 7.5. DADOS LABORATORIAIS | 108 |
| 7.6. DADOS IMUNOLÓGICOS | 113 |
| 7.6.1. Imunoglobulinas IgM e IgG anti- <i>P. vivax</i> | 113 |
| 7.6.2. Fator de necrose tumoral e Interleucina -10 | 116 |
| 7.6.3. Razão IL-10/TNF | 122 |
| 7.6.4. Autoanticorpos anti-eritrocíticos | 123 |
| 7.6.4.1. Anticorpos anti-eritrocíticos avaliados pelo DAT | 123 |
| 7.6.4.2. Anticorpos antimembrana de eritrócitos normais (ELISA) | 125 |
| 7.6.5. Anticorpos anticardiolipina | 126 |
| 8) CONCLUSÕES | 128 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 130 |
| ANEXOS | |
| ANEXO A | |
| ANEXO B | |
| ANEXO C | |
| APÊNDICES | |
| APÊNDICE A | |

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------------|---|
| ADCC | Citotoxicidade celular dependente de anticorpos |
| ADCI | Inibição celular dependente de anticorpos |
| AMA-1 | Antígeno I da Membrana Apical |
| ATP | Trifosfato de Adenosina |
| BFU-E | Fatores estimuladores da proliferação de progenitores eritroblásticos |
| Ca ⁺⁺ | Cálcio |
| CDC | Center for Diseases Control (Centro de Controle de Doenças) |
| CFU-E | Células formadoras de colônias eritróides da medula óssea |
| CHCM | Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média |
| CONEP | Comissão Nacional de Ética em Pesquisa |
| D0 | Data do diagnóstico e primeiro dia de tratamento |
| D1 | Segundo dia de tratamento |
| D2 | Terceiro dia de tratamento |
| D3 | Quarto dia de tratamento |
| D30 | Primeiro controle de cura ou trigésimo primeiro dia do início do tratamento |
| D4 | Quinto dia de tratamento |
| D5 | Sexto dia de tratamento |
| D7 | Oitavo dia a partir da data do início do tratamento |
| DARC | Receptor antigênico Duffy para quimiocinas |
| DAT | Teste de antiglobulina direto |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DP | Desvio padrão |
| 2,3 DPG | 2,3, Difosfoglicerato |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ELFA | Enzyme linked fluorescent assay |
| ELISA | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay |
| ERN | Espécie Reativa de Nitrogênio |
| EROS | Espécie Reativa de Oxigênio |
| fL | Fentolitros |
| g% | Grama por cento |
| G6PD | Glicose 6 fosfato desidrogenase |
| GSH | Glutationa |
| GSSG- | Dissulfeto de Glutationa |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| H ₂ SO ₄ | Ácido Sulfúrico |
| Hb | Hemoglobina |
| HbAA | Hemoglobina A |
| HbAS | Traço falciforme |
| HbC | Hemoglobina C |
| HbSS | Hemoglobina S (doença falciforme) |
| HCM | Hemoglobina Corpuscular Médio |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| IC 95% | Intervalo de Confiança de 95% |
| IEC | Instituto Evandro Chagas |
| IFI | Imunofluorescência indireta |

| | |
|----------------------|--|
| IFN γ | Interferon gama |
| Ig | Imunoglobulina |
| IL-4 | Interleucina 4 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| K ⁺ | Potássio |
| kg | quilograma |
| LES | Lupus Eritematoso Sistêmico |
| μ g | Micrograma |
| μ L | Microlitro |
| mL | Militro |
| mM | Milimolar |
| mm ³ | Milímetro cúbico |
| MS | Ministério da Saúde |
| MSP | Proteínas de Superfície do Merozoíto |
| MSP-1 | Proteínas de Superfície do Merozoíto-1 |
| Na ⁺ | Sódio |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| NADP | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato |
| ng/ml | nanograma/mililitro |
| nm | Nanometro |
| ° C | Graus Celsius |
| ODMS | Objetivos do Desenvolvimento do Milênio |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OPAS | Organização Pan-Americana da Saúde |
| OR | Odds ratio (razão de chances) |
| <i>P. falciparum</i> | <i>Plasmodium falciparum</i> |
| <i>P. malariae</i> | <i>Plasmodium malariae</i> |
| <i>P. ovale</i> | <i>Plasmodium ovale</i> |
| <i>P. vivax</i> | <i>Plasmodium vivax</i> |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| PBS/T20 | Solução salina fosfatada tamponada com Tween 20 |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| % | Percentual |
| pg | Picograma |
| pH | Concentração hidrogeniônica |
| PNDS | Pesquisa Nacional sobre Demografia e Saúde da Criança e da Mulher |
| PvDBP | Proteína de Ligação ao Duffy do <i>P. vivax</i> |
| PvRBP | Proteínas de Ligação ao Reticulócito do <i>P. vivax</i> |
| RDW | <i>Red width distribution</i> (variação no volume dos eritrócitos) |
| rpm | Rotação por minuto |
| TBE | Base Tris, Ácido Bórico e EDTA (solução tampão) |
| TH1 | Linfócitos T helper 1 |
| TH2 | Linfócitos T helper 2 |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| Triton X-100 | Surfactante não iônico que contém um grupo óxido polietileno hidrofílico e um grupo hidrocarbono hidrófobo ou lipofílico |

Tween 20
UNICEF

Ésteres de sorbitan etoxilados (solução tampão)
United Nations Children's Fund (Fundo das Nações Unidas para a
Infância)

V

Volts

VCM

Volume Corpuscular Médio

LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

| | Quadros | Página |
|-------------|--|---------------|
| Quadro 5.1 | Exemplo do cálculo do Índice de Massa Corporal em crianças e adolescentes | 53 |
| | Tabelas | |
| Tabela 6.1 | Distribuição de variáveis demográficas em crianças e adolescentes com malária <i>vivax</i> e do grupo controle atendidas no Instituto Evandro Chagas/Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (Belém/Pará) e no Serviço de Diagnóstico de Malária da Secretaria Municipal de Saúde de Augusto Correa (Pará), no período de outubro de 2002 a agosto de 2005. | 60 |
| Tabela 6.2 | Episódios de malária em crianças e adolescentes com diagnóstico atual de malária. | 61 |
| Tabela 6.3 | Comparação dos diferentes graus de anemia em crianças e adolescentes com malária e em indivíduos do grupo controle. | 68 |
| Tabela 6.4 | Avaliação individual da taxa de hemoglobina de crianças e adolescente com malária e sem malária com deficiência de glicose 6 fosfato desidrogenase ou com traço falciforme. | 69 |
| Tabela 6.5 | Correlação entre o intervalo de tempo para o diagnóstico com a parasitemia e da parasitemia com a taxa de hemoglobina em crianças e adolescentes com malária. | 71 |
| Tabela 6.6 | Relação entre intensidade da anemia e o intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico de malária <i>vivax</i> em crianças e adolescentes. | 72 |
| Tabela 6.7 | Valores dos componentes da série vermelha (média e desvio padrão) em crianças e adolescentes com malária e no grupo controle. | 75 |
| Tabela 6.8 | Hemograma em crianças e adolescentes com malária e no grupo controle. | 77 |
| Tabela 6.9 | Hemograma em crianças e adolescentes com malária <i>vivax</i> com primoinfecção ou com história anterior de malária. | 77 |
| Tabela 6.10 | Correlação entre parasitemia e média de hemoglobina, de leucócitos, de plaquetas e de ferritina sérica em crianças e adolescentes com malária <i>vivax</i> . | 79 |
| Tabela 6.11 | Comparação do perfil diferencial dos leucócitos em crianças e adolescentes com malária em D0, D7 e em D30 (amostras pareadas). | 83 |
| Tabela 6.12 | Relações entre o TNF e a IL-10 com a história pregressa de malária, com o intervalo de tempo para o diagnóstico, com a parasitemia, com a taxa de hemoglobina, com os leucócitos e com os anticorpos IgG e IgM anti- <i>P. vivax</i> . | 88 |
| Tabela 6.13 | Relação dos autoanticorpos com a parasitemia, com a contagem de leucócitos e com a reatividade de anticorpos IgG e IgM anti- <i>P. vivax</i> no momento do diagnóstico. | 92 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabela 6.14 | Anticorpos antieritrocíticos avaliados pelo teste de antiglobulina direto, anticorpos antimembrana de eritrócitos e anticorpos anticardiolipina em pacientes com primoinfecção e naqueles com passado de malária. | 93 |
| Tabela 6.15 | Intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico de malária e resposta aos autoanticorpos anticardiolipina, antimembrana de eritrócitos (ELISA) e antieritrocíticos avaliados pelo DAT. | 93 |
| Tabela 6.16 | Distribuição da frequência de títulos de IgG anti- <i>P. vivax</i> em pacientes com malária <i>vivax</i> , no primeiro dia de atendimento (D0), no final do tratamento (D7) e no primeiro controle de cura (D30) | 94 |

Figuras

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 6.1 | Média de formas assexuadas de <i>P. vivax</i> /mm ³ no sangue de crianças e adolescentes com malária segundo subgrupo: primoinfecção e passado de malária. | 62 |
| Figura 6.2 | Sinais e sintomas de crianças e adolescentes com malária <i>vivax</i> no primeiro dia de atendimento. | 63 |
| Figura 6.3 | Evolução dos sinais e sintomas de crianças e adolescentes com malária <i>vivax</i> do primeiro dia de atendimento até o primeiro controle de cura. | 64 |
| Figura 6.4 | Comparação da taxa média de hemoglobina no grupo com malária e no grupo controle. | 66 |
| Figura 6.5 | Distribuição da anemia (leve, moderada, grave) nos grupos com malária e no grupo controle. | 67 |
| Figura 6.6 | Frequência de glicose 6 fosfato desidrogenase e do traço falciforme no grupo com malária e no grupo controle. | 69 |
| Figura 6.7 | Distendido sanguíneo (esfregaço) em crianças e adolescentes com malária e sem malária (grupo controle). | 73 |
| Figura 6.8 | Resultado dos exames de distendido sanguíneo no primeiro dia de atendimento (D0), no final do tratamento (D7) e no primeiro controle de cura (D30) em crianças e adolescentes com malária (amostra pareada). | 74 |
| Figura 6.9 | Contagem diferencial média de leucócitos (em números absolutos) em crianças e adolescentes com malária e sem malária (grupo controle). | 76 |
| Figura 6.10 | Média de reticulócitos em pacientes e indivíduos do grupo controle. | 78 |
| Figura 6.11 | Média de hemoglobina ao primeiro dia de atendimento (D0), ao final do tratamento (D7) e ao primeiro controle de cura (D30) em crianças e adolescentes com malária (amostra pareada). | 80 |
| Figura 6.12 | Valores médios de hematócrito e do número de eritrócitos em D0, D7 e D30 em crianças e adolescentes (amostra pareada). | 81 |
| Figura 6.13 | Contagem média de reticulócitos em D0, em D7 e em D30 de crianças e adolescentes com malária (amostra pareada). | 82 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 6.14 | Anticorpos IgG e IgM anti- <i>P. vivax</i> por imunofluorescência indireta em crianças e adolescentes com malária e sem malária (grupo controle). | 84 |
| Figura 6.15 | IFI- Títulos de anticorpos IgG anti- <i>P. vivax</i> em crianças e adolescentes com malária. | 85 |
| Figura 6.16 | Teste de antiglobulina direto em crianças e adolescentes com malária e sem malária (grupo controle). | 89 |
| Figura 6.17 | Anticorpos antimembrana de eritrócitos (ELISA) em crianças e adolescentes com malária e sem malária (grupo controle). | 90 |
| Figura 6.18 | Anticorpos anticardiolipina em crianças e adolescentes com malária e sem malária (grupo controle). | 91 |
| Figura 6.19 | Teste de antiglobulina direto positivo no primeiro dia de atendimento (D0), no final do tratamento (D7), no primeiro controle de cura (D30) e durante o período de acompanhamento de crianças e adolescentes com malária. | 95 |
| Figura 6.20 | Resposta positiva de anticorpos antimembrana de eritrócitos em D0, D7, D30 e durante o período de acompanhamento de crianças e adolescentes com malária. | 96 |
| Figura 6.21 | Resultado positivo de anticorpos anticardiolipina em D0, D7, D30 e durante o período de acompanhamento de crianças e adolescentes com malária. | 97 |
| Figura 6.22 | Evolução dos níveis dos autoanticorpos anti-eritrocíticos avaliados pelo DAT, antimembrana de eritrócitos (ELISA) e anticardiolipina em crianças e adolescentes com malária <i>vivax</i> . | 98 |

RESUMO

No Brasil, a malária é endêmica na Região Amazônica, onde ocorrem mais de 99% dos registros da doença, que é determinada pelo *Plasmodium vivax* em 84,4% dos casos. Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, em 2008, quase a metade (47,8%) dos casos de malária notificados no país ocorreu em crianças e adolescentes, salientando a importância do conhecimento das particularidades clínicas, laboratoriais e imunológicas da malária nessa faixa etária, particularmente sobre a anemia, um dos sinais cardinais da doença. Assim, foram avaliadas 81 crianças e adolescentes com malária *vivax* e 40 indivíduos do grupo controle, recrutados no Programa de Ensaios Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas (Belém/Pará) e no Serviço de Diagnóstico de Malária, no município de Augusto Correa (Pará), no período de outubro de 2002 a agosto de 2005. Hemograma e outros parâmetros hematológicos, dosagem plasmática de citocinas e de anticorpos anti-*P.vivax*, anticardiolipina e antimembrana de eritrócitos (teste de antiglobulina direto e ELISA) foram realizados no primeiro dia de atendimento (D0), ao final do tratamento (D7) e no primeiro controle de cura (D30). Procedeu-se também ao rastreamento de doença falciforme e deficiência de Glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD), dosagem de ferritina sérica e exame parasitológico de fezes. A pesquisa do plasmódio em gota espessa foi realizada diariamente até que fossem obtidas duas lâminas negativas consecutivas. Autoctonia foi observada em 77,8% dos casos de malária. Houve distribuição semelhante entre os gêneros e predomínio em adolescentes. A maioria era eutrófica. Para 43,2% dos pacientes tratava-se do primeiro episódio da doença. A parasitemia média foi de 6.543 parasitas/mm³, tendo o *clearance* da parasitemia ocorrido no quarto dia de tratamento em 92,6% dos casos. Nos pacientes com primoinfecção, a parasitemia foi maior do que naqueles com passado de malária. Estes pacientes também apresentaram significativo retardo no *clearance* da parasitemia. Os pacientes apresentaram contagens menores de leucócitos, que estavam correlacionados positivamente com a parasitemia e com a presença de anticorpos IgG e IgM, no momento do diagnóstico. Houve também uma diminuição no número de plaquetas, que estiveram negativamente correlacionadas à parasitemia. Observou-se correlação, inversa, entre número de reticulócitos e taxa de hemoglobina, no início e fim do tratamento e, direta, entre os níveis de ferritina sérica (significativamente maiores nos pacientes primoinfectados) e parasitemia. De forma surpreendente e ao contrário do referido em outros estudos, foram observados níveis plasmáticos de fator de necrose tumoral (TNF) menores nos pacientes do que no grupo controle. Os níveis, baixos em D0, estavam, de forma curiosa, correlacionados positivamente com a hemoglobina e negativamente com o tempo de diagnóstico e se elevaram significativamente até D30. A Interleucina -10 (IL-10), inversamente elevada em D0, mostrou uma correlação positiva com a parasitemia e esteve associada à presença de anticorpos IgM (mas não IgG) anti-*P.vivax*, antes de diminuir e atingir valores normais em D30. Autoanticorpos antieritrocíticos avaliados por ELISA declinaram mais rapidamente do que os revelados pelo teste de antiglobulina direto e do que os anticardiolipina. Além de 2,7 vezes mais chances de apresentar anemia, os pacientes tiveram significativamente mais anemia moderada/grave. A anemia esteve associada ao retardo diagnóstico e à demora de desaparecimento da parasitemia, mas não se mostrou associada a presença de anticorpos anti-*P. vivax*, à presença de autoanticorpos antimembrana de eritrócitos e nem a fatores como deficiência de G6PD, traço falciforme, desnutrição e parasitose intestinal. A anemia também esteve associada a maiores concentrações de IL-10 e à presença de anticorpos anticardiolipina, neste caso, somente para anemia moderada/grave. A associação com o TNF foi inversa, sendo os níveis surpreendentemente menores no grupo de anêmicos, particularmente naqueles com anemia moderada/grave. À luz das variáveis estudadas, que compuseram o quadro clínico epidemiológico, imunológico e laboratorial, em particular os

eventos relacionados à anemia nestes pacientes com malária *vivax*, enfatiza-se a necessidade de pesquisas complementares na Amazônia Brasileira envolvendo maior número de crianças e adolescentes com malária, visando a confirmação dos resultados obtidos.

ABSTRACT

In Brazil, malaria is endemic in the Amazon Region, being responsible for more than 99% of the registered cases of the disease, where *P. vivax* accounts for 84.4% of the cases. According to Ministry of Health of Brazil, in 2008, almost half (47.8%) of malaria registered in the country committed children and adolescents, what emphasizes how important is the knowledge of the clinical, immunological and laboratorial characteristics of malaria in this age group, particularly related to anemia, one of the paramount signal of the disease. On this purpose, it was evaluated 81 children and adolescents with *vivax* malaria and 40 control individuals, enrolled at Program of Clinical Essays in Malaria at Evandro Chagas Institute (Belém/Pará) and at Facility Malaria Diagnosis in Augusto Correa Municipality (Pará), from October 2002 to August 2005. Hemogram and other hematological parameters, plasmatic cytokine and *P.vivax* antibody levels, anticardiolipin antibodies and anti-erythrocyte membrane antibodies (direct antiglobulin test and ELISA) levels were performed in the first day of attendance (D0), in the last day of treatment (D7) and in the first control day of cure (D30). Screening for sickle cell disease and G6PD deficiency, ferritin serum levels and parasitological fecal exam were also performed. Plasmodium thick blood film was ruled day by day until two negative consecutive blood films were obtained. Autochthony was observed in 77.8% of the malarial cases. Malaria had similar distribution among gender and a predominance of cases in adolescents. The majority of patients were eutrophic. To 43.2% patients, it was the first malarial episode. The mean parasitemia was 6.543 parasites/mm³; clearance of parasitemia occurred in the 4th day of treatment in 92.6% of cases. Primo infected patients had higher parasitemia than patients with previous malaria episodes, as well as significance delay on parasitemia clearance. Patients had low values of leukocytes which were positive correlated with parasitemia and with the presence of IgG and IgM antibodies, at the diagnosis. Also, it was observed low values of platelets, and they had a negative correlation with parasitemia. It was observed an inverse correlation between reticulocytes and hemoglobin rate, in the beginning and in the end of treatment, and a direct correlation between ferritin serum levels (significance increased in primo infected patients) and parasitemia. Unexpectedly and in the opposition of what has been referred in other studies, it was observed low plasmatic TNF levels in patients compared to control group. Curiously, TNF levels, low in D0, were positive correlated with hemoglobin and negative correlated with time to onset the diagnosis, and they had a significance increase up to D30. IL-10 levels, inversely increased in D0, had a positive correlation with parasitemia and was associated to the presence of *P. vivax* IgM antibodies (not to IgG), before decreasing to normal values in D30. Autoantierythrocytes antibodies evaluated through ELISA had a faster decline than those evaluated through direct antiglobulin test and than the anticardiolipin antibodies. Besides 2.7 more chance of anemia, patients had significance moderate/severe anemia. The anemia was associated to delay on the diagnosis and to delay on achieving the clearance of parasitemia, but it was not associated to the presence of anti-*P. vivax* antibodies, neither to the presence of anti-erythrocyte membrane autoantibodies, nor to G6PD deficiency, sickle cell trait, malnutrition and intestinal parasitosis. Also, the anemia was associated with high IL-10 levels and to the presence of anticardiolipin antibodies, in this case, only to moderate/severe anemia. The association with TNF was inverse, with low levels in the group of anemic patients, particularly those with moderate/severe anemia. Based on the studies of the variables that composed the clinical, epidemiological and laboratorial features of *vivax* malaria in these patients, particularly the events related to anemia, it is highlighted the necessity of complementary research enrolling more children and adolescents with malaria in order to consolidate these data.

1) INTRODUÇÃO:

A malária humana é provavelmente tão antiga quanto a humanidade. Ao longo da história, registros de febre periódica, caracterizadas como provável malária ou mesmo a identificação de material parasitário proveniente de estudos com sondas moleculares em ossos e/ou múmias, demonstram que a doença acometeu a civilização chinesa, egípcia e grega antes de Cristo, bem como o sudeste da Europa na época do Império Romano, com impacto na morbimortalidade da população (Sallares *et al.*, 2004; Retief & Cilliers, 2006).

Na atualidade, a malária ainda é objeto de preocupação das autoridades governamentais. Em 2006, a doença foi responsável por elevada morbidade, de cerca de 247 milhões de episódios/ano e também por elevada mortalidade, estimada em 881 mil óbitos/ano. Mais de 91% desses óbitos ocorreram na África, principalmente em crianças menores de cinco anos (World Malaria Report/WHO, 2008).

No continente africano, em consequência das infecções repetidas, o indivíduo adulto adquire um grau de imunidade suficiente para permitir que a infecção pelo plasmódio se acompanhe unicamente de sintomas discretos ou até mesmo de ausência de manifestações clínicas, embora o parasito permaneça no organismo, o que se conhece como “imunidade anti-tóxica” ou “premunição” (Baird, 1995; Hommel, 1996; Breman, 2001; Doolan *et al.*, 2009).

Nas Américas, a malária é endêmica em 21 países. O Brasil é o país com maior número de casos, 99,9% oriundos da Região Amazônica, onde a doença acomete indistintamente crianças, adolescentes e adultos. Em 2006, o Brasil notificou 548.597 casos de malária (73,4% pelo *P. vivax*). Em 2008, a diminuição foi ainda maior, com registro de 314.869 casos da doença, em que 84,4% corresponderam ao *P. vivax*, seguindo-se o *P. falciparum* com 14,6% e o restante, 1,0%, correspondendo aos casos de malária mista (*P. vivax* + *P. falciparum*), *P. malariae* e *P. ovale* (este último importado da África, pois essa espécie de plasmódio inexistente no País) (SIVEP/Malária, 2009).

A febre é o sinal cardinal na malária. Quando se acompanha de calafrio e cefaléia constitui a tríade malárica, freqüente durante a evolução clínica. Outros sinais e sintomas também costumam estar presentes tais como astenia, anorexia, artralgia, insônia, dor abdominal, diarreia, vômitos, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia. Essas manifestações clínicas, quando associadas aos dados epidemiológicos, de residência e/ou viagem para áreas endêmicas de malária permitem a suspeição da doença, confirmada pela pesquisa do plasmódio no sangue periférico, pela técnica da gota espessa.

A anemia constitui um dos parâmetros clínicos que mais despertam a atenção por estar intimamente relacionada à presença do plasmódio nos eritrócitos, onde ao se multiplicar por esquizogonia promove a lise dessas células, com subsequente invasão de novos eritrócitos (Dvorak & Miller, 1975). Entretanto, nem sempre a anemia é compatível com a densidade parasitária podendo mesmo aparecer ou até se intensificar após a negatização da parasitemia (Woodruff *et al.*, 1979), demonstrando que sua fisiopatogenia é multifatorial e complexa, envolvendo provavelmente além da lise de eritrócitos pela ação direta dos parasitos, a fagocitose de eritrócitos parasitados ou sensibilizados por complexos imunes, a formação de autoanticorpos contra os eritrócitos, a liberação de citocinas por linfócitos Th1 e Th2, que podem causar distúrbios na eritropoiese e/ou na produção da eritropoetina (Ekvall, 2003; Ghosh & Ghosh, 2007).

A anemia determinada pelo *P. vivax* é bem menos estudada do que àquela causada pelo *P. falciparum*, em parte devido a maioria (95%) dos africanos serem resistentes a essa espécie de plasmódio, por não apresentarem o antígeno Duffy (receptor utilizado pelo *P. vivax* para aderir aos eritrócitos, antes de penetrar e invadir essas células) (Langhi & Bordin, 2006) e também pela observação equivocada de que as infecções pelo *P. vivax* são sempre benignas e que não se acompanham de complicações (Mendis *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2007a).

Mesmo na ausência de complicações tais como anemia grave, síndrome de desconforto respiratório, choque, e até mesmo óbito, que são eventuais, o *P. vivax* determina um ônus econômico-social, limitando a capacidade laboral do paciente no quadro agudo e às vezes também nas recaídas (Lomar *et al.*, 2005; Price *et al.*, 2007a; Daniel-Ribeiro *et al.*, 2008; Kochar *et al.*, 2009).

Segundo as estatísticas do Serviço de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde do Brasil, em 2008, quase a metade dos casos (47,8%) notificados de malária ocorreu em crianças e adolescentes (Sivep/Malária, 2009). Entretanto, é escasso o conhecimento sobre a interação entre o *P. vivax* e o indivíduo nessa fase de pleno crescimento e desenvolvimento, particularmente no que se refere à anemia. Tal informação é, entretanto, importante para verificar se o comportamento da doença nesse grupo segue o mesmo padrão dos adultos e se determinados agravos, muito freqüentes nessa faixa etária tais como desnutrição, anemia por deficiência de ferro ou parasitose intestinal, podem contribuir para a anemia desses pacientes (Rodriguez-Morales *et al.*, 2006; Genton *et al.*, 2008; Poespoprodjo *et al.*, 2009).

2) REVISÃO DA LITERATURA:

2.1 - SITUAÇÃO ATUAL DA MALÁRIA:

Entre as doenças infecto-parasitárias que afligem o homem, a malária permanece em posição de destaque, constituindo-se em problema de Saúde Pública em muitos países da África, da Ásia e da América.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2006, foram registrados aproximadamente 246 milhões de casos de malária no mundo, com uma estimativa de 880.000 óbitos, dos quais 91% tendo ocorrido na África, particularmente em crianças menores de cinco anos. Cerca de 3,3 bilhões da população mundial encontra-se sob risco de adquirir malária, doença endêmica em 109 países e territórios, dos quais 45 estão no continente africano. Na tentativa de um controle mais efetivo da doença, diversas estratégias vem sendo implementadas, embora de modo heterogêneo, nos diversos locais onde a malária é motivo de preocupação por sua morbiletalidade: distribuição de mosquiteiros impregnados com inseticidas, combinações terapêuticas incluindo os derivados de artemisinina para os casos de malária *falciparum* (e para os casos de malária *vivax* resistentes à cloroquina), uso de inseticidas de ação residual nos domicílios, tratamento preventivo intermitente para malária na gravidez (World Malaria Report/WHO, 2008).

Em seu relatório mais recente, de 2009, a OMS está otimista quanto aos resultados alcançados para o controle mundial da malária, ao informar que um terço dos países endêmicos para malária (nove africanos e 29 não africanos) referiram redução de mais de 50% nos casos de malária em 2008, se comparados aos observados em 2000, ou ainda, pelo aumento de 17% observados em 2006 para 31% em 2008 no número de habitações africanas com pelo menos um mosquiteiro impregnado com inseticida, apesar de somente 24% das crianças abaixo dos cinco anos terem sido contempladas com tal medida preventiva nesse continente, percentual bem inferior aos 80% estabelecidos (World Malaria Report/WHO, 2009).

Os resultados dos relatórios de 2008 e de 2009 da OMS sobre o panorama mundial da malária estão em conformidade com a Declaração do Milênio, resultante da reunião entre a própria OMS e seus países membros, em 2000, onde foram definidos oito objetivos - Objetivos de Desenvolvimento do Milênio, ODMs. Nos oito objetivos propostos foram definidas metas com resultados-alvos específicos, a serem alcançados, na maior parte dos casos, em 2015, tendo como finalidade reduzir a pobreza no mundo enfrentando as situações

adversas que contribuem para mantê-la ou perpetuá-la, dentre as quais, a malária, contemplada no objetivo seis. Nos países onde a malária é endêmica, medidas vem sendo gradualmente implementadas ou incrementadas no sentido de deter sua incidência, melhorar os indicadores e taxas de prevalência e de mortalidade, tais como aumento da oferta de mosquiteiros impregnados com inseticida às crianças africanas, e distribuição de medicamentos antimaláricos (derivados de artemisinina) aos pacientes com malária *falciparum*, sobretudo àquelas menores de cinco anos, na África (World Malaria Report/WHO, 2008; 2009).

A aplicabilidade dessas metas nas Américas também é de grande importância, pois segundo a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS), 36,5% da população desse continente encontram-se sob risco de adquirir malária, sendo o Brasil o país sul americano com maior notificação de casos, dos quais 99,9% são oriundos da Região Amazônica (Organizacion Pan Americana de La Salud, 2001). Assim, segundo informa o Relatório Nacional de Acompanhamento dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio, a alta incidência da malária na Região Amazônica nos anos de 2003 a 2005, mostrou uma tendência para diminuição em 2006, embora ainda com um registro de cerca de 540 mil casos, com 87,9% desses provenientes de quatro estados da Amazônia Legal: Amazonas, Rondônia, Pará e Acre. No ano de 2008, confirmando a tendência já observada em 2006, foram notificados 314.869 casos da doença, 84,4% determinados pelo *P. vivax* (PAHO, 2005; Brasília, IPEA, 2007; Sivep_Malária, 2009).

2.2- CICLO EVOLUTIVO DO PLASMÓDIO:

O plasmódio possui um ciclo evolutivo complexo que se processa em duas etapas: fase assexuada no homem (hospedeiro intermediário) e fase sexuada no mosquito (hospedeiro definitivo).

Os esporozoítos são as formas infectantes do plasmódio para o homem. Resultam do ciclo esporogônico, com duração média de dez a dezessete dias, ocorrido no mosquito anofelino fêmea. Durante o repasto sanguíneo, essas fêmeas podem inocular os esporozoítos (alojados em suas glândulas salivares) nos capilares cutâneos do homem. Os esporozoítos, após cerca de trinta a sessenta minutos não são mais observados na corrente circulatória; dirigiram-se ao fígado, onde no interior dos hepatócitos, sofrerão um processo de multiplicação por divisão assexuada, conhecida como esquizogonia pré-eritrocítica (por preceder obrigatoriamente a fase de parasitismo intraeritrocitário) originando os esquizontes,

que por sua vez, se segmentam formando milhares de elementos filhos, os merozoítos (10.000 a 15.000 para o *P. vivax*, 40.000 para o *P. falciparum*, 2.000 para o *P. malariae* e 15.000 para o *P. ovale*) (Pessoa, 1982, Rey, 1992).

O hepatócito parasitado, distendido e alterado acaba por romper-se, liberando os merozoítos, muitos dos quais são fagocitados e destruídos pelas células de Kupffer, enquanto que outros sobrevivem, invadem os eritrócitos e iniciam o segundo ciclo de reprodução assexuada do plasmódio, o ciclo eritrocítico (Dvorak & Miller, 1975; Rey, 1992).

Alguns esporozoítos, após a penetração nos hepatócitos podem não se multiplicar por divisão esquizogônica, permanecendo quiescentes no fígado, como que adormecidos, sendo designados de hipnozoítos. Essas formas, que na malária humana são apanágio do *P. vivax* e do *P. ovale*, são responsáveis pelas recaídas. Essas podem ocorrer num intervalo relativamente curto ou após um longo período de tempo (Krotoski, 1985).

Os milhares de merozoítos, liberados na circulação pela ruptura do hepatócito, tem tropismo para os eritrócitos. Contudo, é necessário que os merozoítos reconheçam receptores específicos de superfície sobre a membrana do eritrócito para que a invasão se processe. Uma vez ocorrido o reconhecimento, há fusão do merozoíto com a membrana do eritrócito que se invagina fazendo com que o parasito se torne vacuolado dentro da célula. Nessa fase do seu ciclo, cada merozoíto no interior do eritrócito, diferencia-se na forma em anel do protozoário denominada trofozoíto. Esse, por sua vez se desenvolve, divide seu núcleo por esquizogonia e transforma-se no esquizonte eritrocítico (ou simplesmente esquizonte). O esquizonte por divisão múltipla origina, segundo a espécie, um número variável (8-32) de merozoítos. Ao conjunto de merozoítos no eritrócito, designa-se merócito ou rosácea. Num determinado momento, o eritrócito parasitado rompe-se e libera os merozoítos que parasitarão outros eritrócitos, reiniciando-se o ciclo eritrocítico (Dvorak & Miller, 1975; Rey, 1992).

Alguns merozoítos que penetraram nos eritrócitos, iniciando a fase eritrocítica do ciclo assexuado, não se diferenciam em trofozoítos, mas evoluem para as formas sexuadas do parasito: gametócitos masculinos (microgametócitos) e gametócitos femininos (macrogametócitos) (Rey, 1992).

O ciclo pré-eritrocítico do plasmódio no homem corresponde ao período de incubação da malária, que difere segundo as espécies de plasmódio: oito a doze dias para o *P. falciparum*, treze a dezessete dias para o *P. vivax* e de 28 a 30 dias para o *P. malariae*. O ciclo eritrocítico, por sua vez, determina as manifestações clínicas da doença, notadamente o paroxismo febril, caracterizado por calafrio, febre e sudorese. Na dependência da duração de cada um desses ciclos eritrocíticos, tais paroxismos podem ser observados em intervalos

regulares, de 48 em 48 horas para o *P. vivax* e para o *P. falciparum*, de 72 em 72 horas para o *P. malariae*, o que entretanto, nem sempre é possível de ser observado na prática clínica, em decorrência de tratamento precoce realizado ainda na fase de assincronismo das esquizogonias sanguíneas ou por infecções por populações distintas de plasmódio, ou ainda em infecções em primoinfectados por retardo da resposta imune específica (Pessoa, 1982; Rey, 1992; Manual de terapêutica da Malária, 2001).

O mosquito anofelino ao exercer a hematofagia ingere as formas sangüíneas do parasito. Porém somente os gametócitos são capazes de evoluir no inseto, as demais formas degeneram. No estômago do mosquito, o gametócito feminino amadurece e transforma-se no macrogameta; o gametócito masculino, por um processo de exflagelação, dá origem aos microgametas (quatro a oito). Esses, por serem dotados de flagelos movimentam-se ativamente em busca de um macrogameta. Somente um microgameta terá êxito em fecundar o macrogameta, havendo a formação do ovo ou zigoto, que na luz do estômago do mosquito modifica sua forma e recebe a designação de oocineto, que dotado de mobilidade migra até a parede do estômago onde se encista, daí a designação de oocisto. No interior do oocisto, os parasitos se multiplicam por esporogonia formando os esporozoítos, que serão liberados na cavidade geral do mosquito, em consequência da ruptura do oocisto. Então, os esporozoítos migram para as glândulas salivares e, por ocasião do repasto da fêmea do mosquito anofelino serão inoculados no homem (Pessoa, 1982).

Recentemente, o advento das técnicas moleculares trouxe contribuições que ampliaram o conhecimento sobre o ciclo evolutivo do plasmódio. Ao contrário de que se supunha de que uma vez inoculados, os esporozoítos logo penetravam na corrente circulatória para se dirigirem ao fígado, verificou-se por técnicas de PCR quantitativo, que os esporozoítos de *P. yoelii*, permaneciam por horas na derme do camundongo, antes de gradualmente entrarem em contato com os capilares desse sítio e através da corrente circulatória chegarem ao fígado. Nesse órgão, os esporozoítos ao atravessarem os sinusóides hepáticos penetram em várias células de Kupffer, antes de selecionarem uma dessas células em definitivo para formação do vacúolo parasitóforo, no qual o parasito crescerá e se multiplicará (Carrolo *et al.*, 2003; Sinnis & Coppi, 2007).

Experimentalmente, verificou-se que os merozoítos do *P. berghei* são transportados em vesículas denominadas de merossomos para a luz dos sinusóides hepáticos, não sendo, portanto livremente lançados na circulação, em consequência da ruptura dos hepatócitos, como antigamente descrito. Ademais, os merossomos por terem origem da membrana plasmática do hospedeiro, não são de pronto reconhecidos pelas células dendríticas (células

apresentadoras de antígeno) ou pelas células de Kupffer, o que facilitaria a condução desses merozoítos para a circulação, dificultando, portanto, o reconhecimento do parasito pelo sistema imune do hospedeiro (Prudêncio *et al.*, 2006; Sturm *et al.*, 2006).

Outra interessante descoberta foi a de que parte dos esporozoítos de *P. yoelii* inoculados na derme chega aos linfáticos, onde podem ou não ser destruídos, desencadeando uma resposta imune que ainda necessita ser mais bem compreendida e que pode ser útil para o desenvolvimento de vacinas antimaláricas relacionadas ao estágio pré-eritrocítico do parasito (Prudêncio *et al.*, 2006; Yamauchi *et al.*, 2007).

2.3- O ERITRÓCITO:

O eritrócito humano tem a forma de um disco bicôncavo, possuindo aproximadamente 8µm de diâmetro. É uma célula que possui 40% a mais de superfície que o necessário para o seu conteúdo citoplasmático, o que lhe confere uma redundância do continente sobre o seu conteúdo, dando-lhe grande deformabilidade, permitindo manter sua integridade ao atravessar os capilares do organismo com 2 a 3 µm de diâmetro (Hokama *et al.*, 2002).

A membrana do eritrócito é composta de uma bicamada lipídica, contendo compostos de fosfolipídios, colesterol não esterificado e glicolipídios, ancorada em um citoesqueleto. Essa membrana é responsável pela manutenção da forma, do volume, da deformabilidade, da estabilidade mecânica, além da homeostase do cálcio e das trocas iônicas do eritrócito (Hokama *et al.*, 2002).

Os fosfolipídios presentes na membrana eritrocitária são: fosfatidilcolina (30%), fosfatidiletanolamina (28%), fosfatidilserina (14%), esfingomiéline (25%). O restante, 3%, inclui fosfatidilinositol, ácido fosfático e cardiolipina. Na porção externa da dupla camada lipídica, em contato com o plasma, predominam os fosfolipídios contendo colina: fosfatidilcolina e esfingomiéline enquanto que na porção interna, junto ao citoplasma, estão os aminofosfolipídios: fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, além dos demais fosfolipídios. Acredita-se que o colesterol se distribua igualmente entre as duas camadas (Lorenzi *et al.*, 2003).

A distribuição assimétrica dos fosfolipídios é mantida à custa de enzimas, tais como as flipases que os deslocam da camada externa para a interna, as flopases, que realizam o movimento oposto e as escramblases que os movem bidirecionalmente, de modo a manter na camada interna principalmente a fosfatidilserina e o fosfatidilinositol, pois os macrófagos reconhecem e fagocitam os eritrócitos que expõem fosfatidilserina na sua camada externa,

como parece ocorrer na destruição prematura de células falciformes, células talassêmicas e em eritrócitos parasitados. Ademais, a permanência da fosfatidilserina na camada interna também inibe a adesão dessas células ao endotélio vascular, proporcionando, portanto, sua livre circulação no interior da microcirculação (Mohandas & Gallagher, 2008).

Mais de 50 proteínas transmembrana já foram identificadas e estudadas, podendo atuar como proteínas de transporte, proteínas de adesão ou como receptoras de sinais. Dentre essas, citam-se as glicoforinas (A, B, C, D, E) relacionadas aos antígenos eritrocitários e a Banda 3 (Proteína 3), que funciona como canal transportador de ânions e água para o eritrócito, além de ser importante na fixação da membrana ao citoesqueleto (Mohandas & Gallagher, 2008).

Internamente, a membrana é revestida pelo citoesqueleto, que é constituído de proteínas que se interligam umas às outras, formando à semelhança de uma malha, uma rede de sustentação para a porção lipídica. A espectrina é o principal componente protéico dessa estrutura (75%), seguindo-se as anquirinas, proteína banda 3, demantina, actina e tropomiosina (Lorenzi *et al.*, 2003).

A espectrina é formada por duas cadeias, alfa e beta, que se encontram enroladas entre si, com justaposição de duas outras proteínas, a actina e a proteína banda 4.1. Essa disposição da espectrina permite sua conexão a membrana dupla de lipídios pelos complexos proteicos formados pela espectrina-anquirina-banda 3 e pela espectrina-proteína banda 4.1- glicoforina C. Outras proteínas tais como a aducina, a tropomiosina e a demantina formam complexos juncionais, fortalecendo a ligação do citoesqueleto às proteínas transmembrana. Alterações em qualquer uma dessas proteínas podem causar instabilidade na camada lipídica, resultando em modificações na forma dos eritrócitos, que se tornam esféricos ou elípticos, com consequente diminuição na resistência ao constante traumatismo que essas células sofrem na circulação (Lorenzi *et al.*, 2003; Mohandas & Gallagher, 2008).

Cada eritrócito possui cerca de 280 milhões de moléculas de hemoglobina. Cada uma dessas moléculas é constituída de quatro cadeias de polipeptídios, denominadas alfa globina, beta globina, gama globina e delta globina, com produção controlada por genes localizados no cromossomo 16 (alfa globina) ou no cromossoma 11 (beta, gama, delta globina). As globinas se associam inicialmente em pares (dímeros) e depois em quatro cadeias, formando os tetrâmeros. Cada tetrâmero tem duas cadeias alfa e duas cadeias beta (hemoglobina A), duas cadeias alfa e duas cadeias delta (hemoglobina A2) ou duas cadeias alfa e duas cadeias gama (hemoglobina F). No indivíduo adulto, encontramos 95% a 98% de Hb A, 1,5% a 3% de Hb A2 e até 1% de Hb F, diferente da vida fetal, em que se observa 90 a 95% da hemoglobina F,

uma vez que esse tipo de hemoglobina possui maior afinidade pelo oxigênio, pelas condições relativas de hipóxia na vida uterina (Hokama *et al.*, 2002; Lorenzi *et al.*, 2003).

Em cada globina, observa-se um anel heme, responsável pela cor da hemoglobina e do sangue. O heme, por sua vez, é formado por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por um átomo de ferro, constituindo a protoporfirina. O ferro no interior da globina fica localizado numa “bolsa” hidrofóbica que protege a oxidação desse mineral, pela ação da água, do estado ferroso para o férrico, o que determinaria uma ligação irreversível entre os átomos de ferro e o oxigênio na porção heme, impedindo a liberação do oxigênio aos tecidos, principal função da hemoglobina (Hokama *et al.*, 2002; Lorenzi *et al.*, 2003).

Para que o eritrócito exerça com eficiência seu papel de transportador de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de gás carbônico, dos capilares teciduais para os pulmões faz-se necessário não somente a hemoglobina, mas também a participação ativa do metabolismo eritrocitário. Como o eritrócito não possui núcleo, nem mitocôndria no seu citoplasma, a geração de energia é suprida pela utilização de glicose, que adentra a célula por difusão facilitada. Assim, pela Via de Embden-Meyerhof, cada molécula de glicose é metabolizada em duas moléculas de lactato, sendo nesse processo gerado duas moléculas de ATP, energia que é suficiente para manter a forma e a flexibilidade da membrana, para preservar os lipídios dessa membrana e ainda manter o gradiente interno dos íons pelo funcionamento das bombas de Na⁺, K⁺ e Ca⁺⁺. Outras vias metabólicas, que direta ou indiretamente estão relacionadas à função eritrocitária, dizem respeito a Via de Luebering-Rapaport, ao Shunt da Hexosemonofosfato e a Via de Meta-hemoglobino-redutase, sendo as duas primeiras dependentes de glicose. (Lorenzi *et al.*, 2003).

A Via de Luebering-Rapaport sintetiza o 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG), cuja principal função é regular a absorção de oxigênio pelos tecidos. A ligação dessa substância à molécula da hemoglobina, reduz sua afinidade ao oxigênio, liberando-o para os tecidos (curva desviada para à direita). O oposto, ou seja, a não ligação do 2,3 DPG à hemoglobina permite que a hemoglobina expulse o gás carbônico para os pulmões e absorva o oxigênio, ligando-o ao heme, formando a oxihemoglobina. (Hokama *et al.*, 2002; Lorenzi *et al.*, 2003).

Em condições fisiológicas, uma pequena parte da hemoglobina é constantemente oxidada, formando-se a metahemoglobina, pela transformação do Fe⁺⁺ em Fe⁺⁺⁺, quando o oxigênio se desliga da hemoglobina. Para reversão desse fenômeno, o eritrócito se utiliza de sistemas redutores, sendo o principal a Via de Meta-hemoglobina-redutase (NADH-desidrogenase) e o Glutation-reduzido (GSH), que está inserido no Shunt da Hexosemonofosfato (a partir da G6PD, um carbono se oxida a dióxido de carbono. Essa

reação fornece NADPH- Nicotinamida -adenina-dinucleotídeo-fosfato para a célula, a qual mantém o GSSG- Glutation em estado reduzido, GSH) (Lorenzi *et al.*, 2003).

No eritrócito assim como em outros locais do organismo, há formação de radicais livres, cujo elétron desemparelhado está centrado num átomo de oxigênio ou de nitrogênio, sendo denominados respectivamente de Espécie Reativa de Oxigênio (EROS) e de Espécie Reativa de Nitrogênio (ERN). Essas quando produzidos dentro de limites fisiológicos estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de importantes substâncias biológicas. No entanto, se em excesso podem ser danosas. As principais **ERO** distribuem-se em dois grupos, as radicalares: hidroxila (HO), superóxido (O₂), peroxila (ROO) e alcóxila (RO); e as não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as **ERN** incluem-se o óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O₃), ácido nitroso (HNO₂), nitritos (NO₂), nitratos (NO₃) e peroxinitritos (ONOO) (Barreiros *et al.*, 2006).

A lipoperoxidação, isto é, a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, induzida por qualquer um dos radicais livres de oxigênio, pode determinar no eritrócito: a) alteração na permeabilidade da membrana com perda de potássio e desidratação; b) polimerização dos componentes da membrana e menor deformabilidade, principalmente quando os grupos sulfidríla da espectrina são lesados; c) antigenicidade da membrana levando à destruição imunomediada. (Hokama *et al.*, 2002; Barreiros *et al.*, 2006).

Os eritrócitos tem meia vida de 120 dias na circulação. Mesmo senescentes, as atividades metabólicas e enzimáticas ainda se mantêm em níveis satisfatórios nessas células não justificando sua morte programada, que é desencadeada pelas modificações sutis que ocorrem em sua membrana, incluindo a expressão de neo-antígenos, que diminuem a deformabilidade da membrana, facilitando sua fagocitose, diretamente ou por mediação de opsoninas, nos sinusóides esplênicos. Defeitos herdados (doença falciforme, deficiência de G6PD) ou adquiridos (parasitismo pelo plasmódio) dos eritrócitos aceleram ou intensificam os processos normais de envelhecimento dessas células (Arese *et al.*, 2005; Pantaleo *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo dos eritrócitos senescentes ou danificados gera produtos de degradação da hemoglobina, os hemocromos, que possuem alta afinidade para a proteína banda 3 da membrana. Os hemocromos são lesivos pela capacidade de produzir potentes radicais oxidantes hidroxila e por liberar heme livre oxidante (hemina), além de promover várias modificações na membrana: formação de poros, alteração da permeabilidade, diminuição na deformabilidade, exposição da fosfatidilserina na camada externa. Todas essas

modificações desencadeiam a formação de autoanticorpos naturais (IgG), que interagem com a proteína banda 3 da membrana, havendo então ativação do complemento (C3) e fagocitose dessas células (Arese *et al.*, 2005; Pantaleo *et al.*, 2008).

2.4. O ERITRÓCITO E O PLASMÓDIO:

O alvo do merozoíto no organismo humano são os eritrócitos, pois essas células são essenciais à sua sobrevivência, onde etapas seqüenciais e complexas necessitam ser sobrepujadas, relacionadas primeiramente à aderência e posteriormente à invasão do parasito ao eritrócito.

a) Etapa I- Adesão do merozoíto à superfície eritrocitária

Na primeira etapa da invasão o merozoíto adere à superfície eritrocitária. Esse contato inicial, reversível, pode ocorrer em qualquer parte da superfície do merozoíto e certamente envolve moléculas aí presentes, tais como MSP-1 (Proteínas de Superfície do Merozoíto-1, pertencente à família MSP (Proteínas de Superfície do Merozoíto) que parece ser essencial à aderência, invasão e sobrevivência do *P. falciparum*. Entretanto, outros ligantes (PfAMA-1, MSP-1-MSP-9, EB1-1, PfrH1, ...) tem sido implicados na aderência do *P. falciparum* a diversos receptores eritrocitários (Glicoforina A, B, C, Banda 3), enquanto que para o *P. vivax* os ligantes e receptores até o momento identificados são bem menores, em número de dois, respectivamente Proteína de Ligação ao Duffy (PvDBP) e Proteínas de Ligação ao Reticulócito (PvRBP) que se ligam ao receptor antigênico Duffy para quimiocinas (DARC) e aos receptores presentes nos reticulócitos (Gaur *et al.*, 2004).

b) Etapa 2- Reorientação apical do merozoíto

Antes que o parasito penetre no eritrócito, é necessário que haja a reorientação apical, uma vez que geralmente durante a aderência o pólo apical do parasito não está em justaposição à membrana eritrocitária. Embora esse processo ainda não esteja bem compreendido, parece haver a participação do antígeno I da Membrana Apical (AMA-1) (Gaur *et al.*, 2004; Cowman & Crabb, 2006).

c) Etapa 3- Formação da junção

Na área da membrana eritrocitária na qual o merozoíto encontra-se aderido, forma-se uma depressão (para posicionar o pólo apical do parasito). A membrana, nessa área apresenta-se espessada, havendo uma junção com a membrana plasmática do parasito. Inicia-se então um movimento da membrana na área de junção, impulsionado pelo sistema actina-miosina do parasito, no sentido do pólo apical para o posterior, que no final o circuncida. Quando a entrada do parasito se completa, o orifício da invaginação se fecha e a junção torna-se então parte do vacúolo parasitóforo, criado pelo parasito, e que o separa do citoplasma da célula hospedeira, formando assim um ambiente propício para seu desenvolvimento (Aikawa *et al.*, 1978; Gaur *et al.*, 2004; Cowman & Crabb, 2006).

O *P. vivax* invade reticulócitos, não o fazendo em eritrócitos maduros. Se a formação da junção com participação do antígeno do grupo sanguíneo Duffy é um processo irreversível que culminará com a invasão do parasito, por que essa espécie de plasmódio não invade eritrócitos maduros que apresentam esse tipo de antígeno? Parece haver uma etapa prévia envolvendo a invasão de reticulócitos, com a participação das Proteínas de Ligação aos Reticulócitos (PvRBP-1, PvRBP-2) antes da formação da junção. É provável que sendo expressas no pólo apical do merozoíto, essas proteínas estejam envolvidas na reorientação apical que precede a formação da junção e da invasão. Embora se saiba que a adesão da PvRBP é específica para os reticulócitos ainda se desconhece quais seriam os seus receptores nessas células. Ademais, essas proteínas não dependem do fenótipo Duffy, havendo inclusive casos, embora poucos, de malária *vivax* descritos na população negra da África, cujos eritrócitos não apresentam o grupo sanguíneo Duffy, sem entretanto mencionar que ligantes e/ou receptores participaram da invasão do merozoíto (Miller *et al.*, 1976; Gaur *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2006).

Diversos mecanismos são utilizados pelo plasmódio para alterar a permeabilidade da membrana celular do hospedeiro. Esses dependem de seu estágio de maturação no interior dos eritrócitos, já que o parasito necessita sobrepujar as possíveis limitações de tráfico de solutos que ocorre na membrana do eritrócito. Manter sob controle o volume e a integridade da célula evita sua destruição prematura, que comprometeria a viabilidade do parasito. Citam-se, por exemplo, o stress oxidativo que o parasito exerce sobre o eritrócito determinado alterações na permeabilidade e seletividade da membrana; comprometimento da fluidez da membrana pela diminuição na razão colesterol/fosfolípido, uma vez que o parasito não sintetiza colesterol; alteração na cinética ou introdução de defeitos estruturais na membrana pela produção e exportação de polipeptídios na própria membrana ou através dessa, que podem interagir diretamente ou competir com sistemas nativos de transporte da membrana; presença de um

sistema específico de transporte pela inserção de polipeptídios na membrana do hospedeiro para translocação de solutos do meio extracelular para o citosol do parasito, ou desse para o meio externo (Ginsberg, 1990).

O parasitismo intra-eritrocítico altera a composição fosfolipídica da membrana da célula hospedeira. Eritrócitos infectados pelo *P. falciparum* possuem maiores concentrações de fosfatidilcolina e fosfatidilinositol e menores concentrações de esfingomiéline do que eritrócitos não infectados. Também foram observadas maiores quantidades de ácido palmítico e de ácido oléico nos eritrócitos infectados, assemelhando-se mais ao perfil encontrado no vacúolo parasitóforo do que em eritrócitos não infectados. Uma vez que eritrócitos maduros apresentam síntese e metabolismo lipídico de pouca expressão, a remodelagem da membrana eritrocitária nesses casos é provavelmente induzida pelo parasito, onde se estabelece um tráfico lipídico bidirecional entre o eritrócito e o vacúolo parasitóforo, de modo a proporcionar um ambiente intracelular propício ao desenvolvimento do parasito (Hsiao *et al.*, 1991).

2.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA:

As manifestações clínicas do paludismo se iniciam após um período de incubação variável segundo a espécie de plasmódio causadora da infecção (média de 12 dias para o *P. vivax* e de 15 dias para o *P. falciparum*). Sintomas prodrômicos como mal estar, inquietação, sonolência, recusa alimentar, cefaléia e náuseas podem ocorrer antes que surja o paroxismo febril (calafrio, febre e sudorese) característico da doença (Chongsuphajaisiddhi, 1988; Rey, 1992; de Souza *et al.*, 2000).

O paroxismo febril pode ter uma periodicidade de 48 horas (febre num determinado dia, apirexia nas 24 horas seguintes) ou de 72 horas (febre num determinado dia, apirexia nas 48 horas seguintes), na dependência da espécie de plasmódio. No primeiro caso, diz-se febre terça: benigna se causada pelo *P. vivax* ou pelo *P. ovale*; maligna, se o agente etiológico é o *P. falciparum*, devido a maior possibilidade de causar complicações que predisõem ao óbito. Reserva-se o termo febre quarta para designar as infecções produzidas pelo *P. malariae* (Rey, 1992).

Na prática clínica, entretanto, o paroxismo febril pode estar ausente se houver assincronismo na maturação de uma ou mais gerações de parasitos (Kwiatkowski & Greenwood, 1989), fato importante a considerar quando se cogita no diagnóstico precoce da doença.

Outros sinais e sintomas observados na malária incluem febre, cefaléia, anorexia, mialgia, dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia, tosse, palidez, icterícia, urina escura. Embora haja hipertrofia e hiperplasia do sistema retículoendotelial, resultante da defesa do organismo na fagocitose de eritrócitos com parasito e/ou produtos tóxicos derivados do metabolismo do mesmo e fagocitose de hemácias com antígenos do parasito expressos em sua superfície (Weiss, 1991), nem sempre se detecta hepatoesplenomegalia à palpação do abdome: Moura *et al.* (1988) ao estudarem uma série de crianças internadas com malária na Pediatria da Santa Casa de Misericórdia do Estado do Pará, evidenciaram 66,6% de hepatomegalia e 88,9% de esplenomegalia. Percentuais menores (respectivamente 29%, 46%) foram observados por Ventura *et al.* (1999) em crianças com malária por *P. vivax* atendidas no Ambulatório de Malária do Instituto Evandro Chagas, em Belém/Pará.

Em crianças maiores, a sintomatologia da malária assemelha-se àquela observada em adultos. Em recém-nascidos, lactentes e pré-escolares, a expressão clínica da doença pode ser incomum, com ausência da tríade (febre, calafrio e sudorese). Nessas circunstâncias outros diagnósticos, tais como pneumonia, gastroenterite, hepatite, meningoencefalite podem ser formulados, antes da solicitação de pesquisa de plasmódio em gota espessa. (Randall & Seidel, 1985; de Souza *et al.*, 2000).

2.6. ANEMIA DA MALÁRIA:

2.6.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Segundo o que preconiza a OMS, o diagnóstico de anemia baseia-se na taxa de hemoglobina, que varia de acordo com a idade e também, na fase de adolescência, com o sexo (de Mayer, 1989; Dallman, 1996).

Em áreas endêmicas de malária, é importante diferenciar a anemia causada pela doença de outras causas potencialmente indutoras de anemia, como por exemplo, as relacionadas à deficiência de ferro, às parasitoses intestinais e à desnutrição, pois cada uma dessas entidades possui abordagem terapêutica diferenciada.

Cardoso *et al.* (1992), avaliando a prevalência de anemia em 1.068 habitantes de uma área endêmica de malária (Distrito de Candeias, localidade periurbana do Município de Porto Velho no Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira), encontraram 28% de anemia, na ausência de malária, com predomínio em crianças, sobretudo lactentes. Entretanto, encontraram uma frequência maior, 44,4% de anemia naqueles com gota espessa positiva para

doença, semelhante aos 36% de anemia observada numa população predominantemente de adultos com malária (de Freitas, 2004).

Em inquéritos epidemiológicos envolvendo somente os grupos de maior risco para anemia, crianças e/ou grávidas, essa entidade clínica é ainda mais freqüente, como evidenciado por Hedberg *et al.*(1993) que observaram 43% de anemia em crianças menores de cinco anos atendidas num Serviço de Emergência no Zaire, sendo que dessas, 22% apresentavam malária *falciparum*, ou por Shiff *et al.* (1996) que verificaram 78% de anemia em crianças também africanas menores de quatro anos. Resultado similar, 82% de anemia, foi relatado por Ventura (1997), baseando-se em casuística local, em crianças e adolescentes com malária *vivax*, procedentes de vários estados da Amazônia.

Em decorrência da coexistência de anemia e malária, Nacher (2002) sugere que fatores hematológicos do hospedeiro, tais como a redução da taxa de hemoglobina, do hematócrito e a reticulocitose poderiam ser benéficos ao parasito, no que diz respeito a sua sobrevivência, conferindo-lhes um ambiente mais propício para sua nutrição, e sua reprodução, pelo aumento do número de gametócitos. Se essa assertiva for verdadeira, os grupos com maior susceptibilidade para esse agravo, crianças e grávidas, teriam maior risco de adquirir malária. Com isso, teoricamente, as chances de aquisição das formas sexuadas do plasmódio pelo mosquito anofelino durante seu repasto sanguíneo também estariam aumentadas, facilitando a perpetuação do ciclo sexuado do parasito no vetor, como parecem demonstrar as observações provenientes do continente africano e da Amazônia de que vetores infectados teriam maior atração para as crianças e para as grávidas (Adiamah *et al.*, 1993; Quiñones *et al.*, 2000; Martinez-Espinosa *et al.*, 2004).

A anemia da malária pode sofrer a influência de vários fatores tais como retardo diagnóstico, *status* do ferro, estado nutricional do hospedeiro, parasitose intestinal e defeitos congênitos dos eritrócitos (doença falciforme e deficiência congênita de glicose 6 fosfato desidrogenase-G6PD):

- Retardo diagnóstico

O tempo decorrido entre as primeiras manifestações da doença e o diagnóstico da malária e conseqüente início do tratamento implica em repercussões clínicas ao paciente, que se reflete na limitação para o trabalho e para o lazer, pois durante esse período o parasito vive às expensas do hospedeiro. Além disso, quanto mais tempo durar a doença, maiores serão as possibilidades de agravamento: por exemplo anemia grave em conseqüência da ativação

persistente dos mecanismos imunes desencadeados pelo parasito. De fato, Ventura (1997) observou uma correlação positiva entre o retardo diagnóstico e os valores de hemoglobina de crianças e adolescentes com malária por *P. vivax* em Belém/Pará.

- Status do ferro do indivíduo

A manutenção da homeostase do ferro no organismo é essencial para a síntese de hemoglobina, para a formação da mioglobina do tecido muscular, para atuar como cofator nas reações enzimáticas do ciclo de Krebs, na síntese de purinas, carnitina, colágeno e neurotransmissores cerebrais, além de ser fundamental na regulação da função imune (Weiss, 1995; Queiroz-Torres, 2000).

A proliferação dos linfócitos T e B pode ser alterada tanto na deficiência quanto na sobrecarga de ferro. A disponibilidade de ferro intracelular influencia a proliferação de linfócitos TH1 e TH2. Na vigência de processos infecciosos, a IL-1 e o TNF alfa alteram o metabolismo do ferro por aumentar a captação e a incorporação do ferro em ferritina (forma sob a qual o ferro é armazenado) pelos macrófagos, diminuindo a quantidade de ferro disponível no sangue (hipoferremia), o que limita o crescimento de microorganismos que necessitam desse elemento. Ao mesmo tempo, o IFN gama e/ou o TNF alfa ativam os macrófagos, desencadeando uma resposta de citotoxicidade no agente agressor, com a participação do óxido nítrico. Esse, produzido como resultado da secreção do IFN gama, TNF alfa e IL-1, modula a regulação do ferro intracelular (Weiss, 1995; Queiroz-Torres, 2000).

Na malária a importância de se conhecer o *status* do ferro no organismo reside não somente na evidência de que esse mineral interfere nos linfócitos TH1 E TH2, envolvidos tanto na proteção quanto na fisiopatogenia do paludismo, como também pela relação que o plasmódio tem com o ferro. Da hemoglobina, o parasito utiliza-se do ferro ferroso para síntese de enzimas, antes que ocorra a oxidação do heme e do radical globina para a síntese de proteínas. Ademais, compete pelo ferro ofertado pelo complexo transferrina por ocasião da síntese do heme no eritrócito. A parte dessas considerações deve-se lembrar que a malária é uma doença de países subdesenvolvidos, onde também existe outro importante problema de saúde pública, a anemia ferropriva. Esse problema assume maior magnitude se levado em conta que na malária, a anemia ocorre principalmente em crianças e que essas, juntamente com as gestantes, formam o grupo de maior risco para deficiência nutricional de ferro (Nurse, 1979; Weiss, 1995).

- Estado nutricional do indivíduo

A malária pode comprometer a nutrição da criança ao restringir sua ingestão alimentar em decorrência da anorexia e dos vômitos. Por sua vez, a febre, quase que invariavelmente presente no quadro clínico da doença, pode trazer conseqüências para o estado nutricional ao induzir aumento da excreção do nitrogênio urinário, predispondo a um balanço nitrogenado negativo, trazendo repercussões negativas para a síntese de proteínas utilizadas nos mecanismos específicos e inespecíficos de defesa (Beisel, 1997; McGregor, 1988). Além do mais, a malária pelos seus efeitos imunossupressores pode aumentar a suscetibilidade a infecções de várias etiologias, contribuindo para agravar o estado nutricional pré-existente (McGregor, 1988).

Alterações nutricionais conseqüentes à malária foram evidenciadas por Shiff *et al.* (1996) na Tanzânia (África), área holoendêmica da doença, onde os autores sugerem que infecções repetidas por *P. falciparum* foram responsáveis por menor ganho ponderal em crianças (especialmente naquelas abaixo de 18 meses). Por outro lado, o inverso parece incerto, isto é, a influência que o estado nutricional exerce sobre a malária, pois os resultados obtidos no modelo animal sobre esse assunto são de difícil extrapolação para o homem cujas deficiências nutricionais são mais complexas (McGregor, 1982; 1988).

Em áreas onde coexistem malária e desnutrição proteico-calórica, poder-se-ia supor que essa última, por comprometer a imunidade celular e humoral intensificasse as manifestações patogênicas da malária, haja vista que a resposta imune ao plasmódio envolve subpopulações de linfócitos T, linfócitos B, além de macrófagos, ativação de complemento e fagocitose (McGregor, 1988). Porém, segundo McGregor (1982; 1988) há poucas evidências que demonstrem a desnutrição como fator potencializador da malária no homem. Antes, as evidências disponíveis parecem indicar mais comumente que a desnutrição exerce sobre a malária um efeito antagônico, pois Murray *et al.* (1975) observaram que no período de fome que se seguiu à seca da África Central, a realimentação com grãos exacerbava as manifestações clínicas da malária, até então latentes em adultos desnutridos, e precipitava malária cerebral grave, em lactentes com desnutrição.

- Parasitose Intestinal

Torna-se difícil estabelecer com exatidão a influência que a anemia secundária à infecção malárica possa ter sobre o hospedeiro, pois nas áreas onde ocorre a doença, a população frequentemente apresenta outras condições mórbidas, tais como parasitoses intestinais, que interferem no aproveitamento do ferro pelo organismo.

Ventura (1997) observou um percentual elevado de exames coproparasitológicos positivos (65,6%) em crianças e adolescentes com malária, provavelmente relacionado as más condições de higiene e saneamento dos locais onde viviam, já que a maioria não possuía bom nível social e econômico. Apesar disso, excetuando-se os ancilostomídeos, os demais parasitos intestinais não tiveram influência significativa sobre a anemia dos pacientes estudados. De modo similar, Cardoso *et al.* (1992) ao avaliar a prevalência de anemia em 1.068 indivíduos de todas as idades residentes em uma área endêmica de malária, no estado de Roraima, verificaram dentre os que realizaram exame parasitológico de fezes, que nem a presença e nem a ausência de parasitos intestinais esteve associada à anemia.

No estudo realizado por Stoltzfus *et al.* (2000) em crianças de 0 a 5 anos de idade residentes na ilha Pemba, em Zanzibar, na Tanzânia (África), onde a malária e as geohelmintíases (ascaridíase, tricocefalíase, ancilostomíase) apresentam elevada prevalência, a idade teve influência na associação entre anemia, malária e parasitose intestinal. Em menores de trinta meses, a anemia esteve associada à malária, e não esteve associada à ascaridíase, tricocefalíase e ancilostomíase, enquanto que naquelas maiores de 30 meses, a associação foi inversa, isto é, a anemia esteve relacionada a parasitose intestinal, especificamente à ancilostomíase.

A coexistência de diferentes parasitos, o causador da malária e os vários helmintos intestinais, requer complexas interações no sistema imune do hospedeiro, que podem lhe ser benéficas (Basavaraju & Schantz, 2006). Na década de 70, Murray *et al.* (1978) observaram que a população infantil da ilha Anjouan, no Oceano Índico, apresentava uma relativa ausência de malária devido intenso parasitismo pelo *A. lumbricoides*. Os autores então aventaram a hipótese de que essa situação estaria relacionada as alterações nutricionais, em consequência do parasitismo intestinal que levaria a supressão da malária, visando a sobrevivência do hospedeiro. Com o tratamento da helmintíase, houve, porém um aumento dramático na incidência de malária nesse grupo etário. Posteriormente outros estudos salientaram o efeito protetor das parasitoses intestinais, dependentes da carga parasitária e do poliparasitismo sobre a malária, não no sentido de suprimi-la como observado por Murray *et*

al. (1978), mas evitar complicações na malária *falciparum* (Nacher *et al.*, 2000; Nacher *et al.*, 2001), ou de induzir a tolerância do hospedeiro para as infecções mistas pelo plasmódio (Nacher *et al.*, 2001a).

Por outro lado, a interação parasito da malária- hospedeiro- parasitos intestinais pode ser prejudicial para o hospedeiro (Basavaraju & Schantz, 2006). Druilhe *et al.* (2005) salientam que o longo período (cerca de 10 anos) para que as crianças atinjam o status de semi-imunidade para malária, pode estar relacionado ao predomínio de uma resposta anti-inflamatória suscitada pela presença constante de helmintos intestinais (maior suscetibilidade das crianças às parasitoses intestinais do que os adultos) em detrimento de uma resposta inflamatória mais eficaz contra o parasito. No predomínio da resposta TH1 (inflamatória) observa-se importante atuação do mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCI), com a participação das subclasses IgG1 e IgG3, dotadas de propriedades citofílicas, isto é, a capacidade de se ligarem aos monócitos para promover a fagocitose de eritrócitos parasitados e assim exercer um controle sobre a parasitemia. Tal mecanismo estará prejudicado se houver um predomínio da resposta TH2 (antiinflamatória) durante a parasitemia, pois nesse caso, os linfócitos estimulam a produção de anticorpos não citofílicos (IgG2, IgG4, IgM). A co-infecção helmintíase-malária, segundo Nacher *et al.* (2001b), também pode agravar algumas manifestações clínicas de pacientes com malária *falciparum* complicada e não complicada, como a anemia, ao concorrer para diminuir a taxa de hemoglobina e a contagem de reticulócitos.

- Defeitos congênitos dos eritrócitos (doença falciforme, deficiência de G6PD)

Na história da longa convivência entre o plasmódio e o homem, nas áreas de alta endemicidade para a doença, o homem teve que adaptar-se a essa co-existência desenvolvendo formas leves da doença, para que assim pudesse sobreviver. Acredita-se que o polimorfismo genético dos eritrócitos, determinando as desordens hereditárias dos eritrócitos, dentre as quais, a doença falciforme e a deficiência de G6PD, seja um desses mecanismos de proteção, ao dificultar a sobrevivência do parasito no interior dos eritrócitos deficientes, não impedindo sua manifestação, mas limitando a parasitemia, certamente um dos fatores que contribuem para a gravidade da malária (Weatherall *et al.*, 2002; Mohandas & Gallagher, 2008).

A hemoglobina S é a doença hematológica hereditária mais comum no mundo. Apresenta-se sob a forma homozigótica (HbS) responsável pela doença falciforme e sob a

forma heterozigótica (Hb AS) que caracteriza o traço falciforme. A maior prevalência da doença falciforme ocorre na África tropical e entre os negros de países que participaram de tráfico de escravos, como o Brasil. Essa hemoglobina anômala resulta de uma mutação envolvendo um gene estrutural na qual o códon GAG que codifica o ácido glutâmico na posição 6 da cadeia polipeptídica é substituído pelo códon GTG que codifica a valina, alterando a estrutura primária da cadeia β da globina (Sonati & Costa, 2008).

Segundo registro de Schüler *et al.* (1982), na Região Amazônica a frequência média de heterozigotos para anemia falciforme é de 1,7% nas populações híbridas, enquanto que nos isolados negróides, estima-se uma média de 8,6% de portadores do traço ciclêmico.

Zago & Costa (1985), numa revisão sobre a incidência e a variabilidade dos distúrbios hereditários da hemoglobina no Brasil, observaram que as mais comuns eram hemoglobina S, hemoglobina SC e β talassemia, comuns tanto em indivíduos homozigóticos quanto heterozigóticos, em decorrência da miscigenação com povos oriundos do Mediterrâneo e da África. Os genes determinantes dessas duas primeiras hemoglobinopatias tem uma distribuição variável nas diversas regiões do Brasil, por conta do fluxo migratório. Por exemplo, numa população mista do sudeste com 35% de negróides, esses autores observaram uma frequência de 1,9% de heterozigotos para HbS e de 0,8% para HbC. Entre os negros, os valores foram respectivamente de 5,85% e 2,9%.

A implantação dos testes de triagem nos berçários pelas autoridades governamentais estaduais (inicialmente, para certos erros inatos do metabolismo e para o hipotireoidismo) tem permitido o rastreamento de anemias congênitas hemolíticas, possibilitando o aconselhamento familiar, além de atuar de forma preventiva em suas complicações. Em Minas Gerais, após 25 meses de implantação, esse projeto de rastreamento possibilitou detectar traço falciforme em 3,2%, traço HbC em 1,3% e 486 pacientes com doença falciforme numa população de 605.419 crianças (Sergeant, 2000).

Em decorrência da miscigenação da população indígena nativa com os colonizadores portugueses, dentre outros povos europeus, e com os negros africanos, é elevada a frequência da deficiência de G6PD no Brasil, estando situada em torno de 3,0% a 6,9% segundo estimativas da WHO (1989).

Estudos realizados por Schneider *et al.* (1987) detectaram uma frequência de aproximadamente 8% de deficiência de G6PD em comunidades de origem negróide em populações situadas às margens do rio Trombetas, no Pará. Em 1992, um percentual de 2,2% da deficiência dessa enzima foi encontrado entre doadores masculinos de sangue na área de Belém/Pará (Gonzalez, 1992). Mais recentemente, Silva (1998), avaliando casuística de

indivíduos com malária atendidos no Programa de Ensaios Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas (Belém/Pará) observou 5,5% de casos positivos para deficiência de G6PD, mediante exame de triagem pelo teste de Brewer, com confirmação pela eletroforese em gel de poliacrilamida.

2.6.2. FISIOPATOGENIA:

Os mecanismos que determinam anemia na malária tem sido bastante estudados, mas ainda não estão totalmente esclarecidos, talvez pela sua multiplicidade e complexidade: desde destruição mecânica de eritrócitos induzida pelo parasito, até resposta imune humoral e celular, intermediada por citocinas, incluindo também autoanticorpos, alterações na eritropoiese e na produção de eritropoetina (Dvorak & Miller, 1975; Woodruff *et al.*, 1979; Crane, 1991).

2.6.2.1. Destruição mecânica dos eritrócitos

A taxa de multiplicação do plasmódio é determinada pelo número de merozoítos viáveis após esquizogonia e a capacidade desses merozoítos em invadir novos eritrócitos sucessivamente. O *P. vivax* invade preferencialmente reticulócitos, o que limita a parasitemia para cerca de 2% dos eritrócitos circulantes. No caso do *P. falciparum*, a parasitemia costuma ser mais elevada, pois eritrócitos jovens, maduros e até mesmo em fase de senectude albergam essa espécie de plasmódio. Outro fator a influenciar o grau de parasitemia diz respeito a virulência da cepa infectante e, neste particular, o *P. falciparum* é mais agressivo, sendo responsável por casos graves e muitas vezes fatais. Em contraponto ao potencial lesivo do parasito, características genéticas e imunes do hospedeiro contribuem de forma decisiva para dificultar a multiplicação parasitária, embora muitas vezes, suceda o contrário, a resposta inflamatória do hospedeiro mediando o aparecimento de formas graves da doença (Chotivanich *et al.*, 2000).

2.6.2.2. Autoanticorpos:

A observação de que a anemia da malária nem sempre guardava relação com a parasitemia, suscitou o interesse dos pesquisadores para a investigação de outros possíveis

mecanismos, sobretudo imunes que a determinasse, que incluem a produção de autoanticorpos.

O *Plasmodium vivax* ao aderir aos receptores (proteína de ligação ao Duffy, proteína de ligação ao reticulócito) dos eritrócitos e posteriormente interiorizar-se, promove alterações na membrana eritrocitária, que pode torná-la imunogênica de *per se* ou por exposição de antígenos do parasito, desencadeando a formação de autoanticorpos (Maguire *et al.*, 1991). Na malária, portanto, os autoanticorpos podem ser gerados a partir de antígenos do parasito compartilhados pelo hospedeiro (mimetismo molecular), pela exposição de neo-antígenos ou cripto-antígenos na membrana do eritrócito parasitado [exposição de epítomos antigênicos conseqüentes as alterações morfológicas da membrana ou de seus componentes (proteínas, fosfolipídios)]; por material derivado do parasito (aderido aos eritrócitos infectados e não infectados) ou ainda por estímulo de células autoreativas por substâncias parasitárias dotadas de propriedades mitogênicas ou indutoras da produção de TNF; e finalmente por anticorpos anti-idiotipo, dirigidos contra anticorpos específicos para antígeno(s) do parasito ligante(s) no receptor do eritrócito (Jakobsen *et al.*, 1993; Daniel-Ribeiro, 2000; Daniel-Ribeiro & Zanini, 2000).

A existência de tais reações imunológicas mediadas por autoanticorpos podem ser avaliadas pelo teste de antiglobulina direto (teste direto de Coombs), teste de aglutinação pouco sensível, ou pela pesquisa de anticorpos antimembrana de eritrócitos ou antifosfolipídicos, por Elisa. O papel desses anticorpos não está ainda claramente estabelecido podendo tanto atuar como autoanticorpos “protetores” (como no caso de anticorpos anti-idiotipo que competem com o parasito na ligação com receptores deste em eritrócitos) quanto induzir hemólise imunomediada concorrendo para determinar anemia que pode se manifestar como uma das formas graves da doença (Jakobsen *et al.*, 1993; Daniel-Ribeiro, 2000).

-- Autoanticorpos antimembrana de eritrócitos

Na década de 60 do século passado, Zuckerman (1966) aventou a hipótese de fenômenos imunológicos induzirem anemia em pacientes com malária, ao notar que pacientes que apresentavam hemólise desproporcional ao grau de parasitemia mostravam com frequência reação antiglobulina positiva (Coombs +). Desde então, numerosos trabalhos sobre esse assunto surgiram na literatura, envolvendo indivíduos de diversas faixas etárias e etnias, além de diferentes períodos de tempo exposição e localidades, com diferentes graus de endemicidade para malária.

Rosenberg *et al.* (1973) comparando um grupo de indivíduos com malária com outro grupo constituído de indivíduos normais ou com outras patologias, evidenciaram por meio de imunofluorescência indireta, anticorpos antieritrocíticos da classe IgM somente no primeiro grupo, com valores mais elevados naqueles anêmicos. Tais pacientes também apresentavam níveis diminuídos de Complemento sérico (C3).

A participação potencial de fatores imunológicos entre as causas de anemia da malária, também foi evocada por Woodruff *et al.* (1979), que detectaram diminuição na meia vida dos eritrócitos com persistência da hemólise por quatro a cinco semanas após *clearance* da parasitemia, e a presença de imunocomplexos na superfície dessas células. Ademais, esses autores verificaram que a anemia desencadeada por esse processo foi mais intensa na fase de convalescença (em que os pacientes já estavam com parasitemia negativa) do que na fase aguda em pacientes com malária *falciparum*.

Os estudos de Facer (1979, 1980a,b) também demonstraram a participação de eritrócitos sensibilizados por complexos imunes (teste de Coombs positivo) na gênese da anemia em crianças africanas com malária por *P. falciparum*. De modo similar, Abdalla *et al.* (1983) verificaram 70% de IgG e/ou complemento aderidos à superfície dos eritrócitos em crianças africanas com teste de Coombs positivo.

Mais recentemente, Goka *et al.* (2001) obtiveram resultados semelhantes, em que evidenciaram associação entre DAT positivo e anemia em crianças com malária *falciparum* em Gana, África, área de alta endemicidade para doença.

A despeito desses resultados sugestivos da participação de autoanticorpos antieritrocíticos DAT positivos na gênese da anemia da malária, outros estudos, realizados em indivíduos com malária na África (Weatherall, 1988) e na região Amazônica (Ferreira *et al.*, 2007), não demonstraram correlação entre a presença de autoanticorpos e anemia. De fato, de Freitas (2004) encontrou resposta, similar à observada para o DAT, com autoanticorpos antieritrocíticos avaliados pela técnica de ELISA (os testes de DAT foram negativos), em 49% dos pacientes com malária (*vivax*, *falciparum* ou mista). Tais observações parecem indicar que a presença de autoanticorpos contra os eritócitos não necessariamente se relaciona à fenômenos patológicos, podendo até mesmo estar atuando como anticorpos protetores, como sugere Daniel-Ribeiro (2000).

-- Autoanticorpos antifosfolipídicos

Pela íntima relação que o parasito da malária mantém com os eritrócitos é esperado que ocorram modificações na membrana dessas células que suscitem a formação de autoanticorpos. Dentre os antígenos alvo, particularmente os componentes da dupla camada lipídica da membrana, encontram-se os fosfolipídios, presentes tanto na camada externa quanto interna (Maguire *et al.*, 1991; Hsiao *et al.*, 1991).

Os anticorpos antifosfolipídicos gerados, por exemplo, pela reatividade cruzada entre um componente do *P. falciparum* e o antígeno I da membrana eritrocitária podem beneficiar o parasito, ao facilitar sua entrada no eritrócito (Lefrançois *et al.*, 1981). Por outro lado, também podem ter um efeito protetor, como sugerem Facer & Agiostratidou (1994) que verificaram níveis elevados de anticorpos antifosfolipídicos em adultos (caucasianos, asiáticos ou negros) e em crianças (africanas) com malária *falciparum* não complicada, em contraposição a níveis significativamente baixos de IgM antifosfatidil inositol (um tipo de anticorpo fosfolipídico) associados à malária cerebral no grupo pediátrico estudado.

Essa dualidade de resposta aos autoanticorpos antifosfolipídicos, diferencia-se daquela observada no lúpus eritematoso sistêmico, protótipo das doenças auto-imunes, onde há produção de anticorpos reconhecidamente patogênicos (Tincani *et al.*, 2009). De fato, a cardiolipina está associada a um risco maior de trombose arterial e venosa em pacientes com doenças autoimunes, provavelmente pela formação de imunocomplexos entre cardiolipina e β_2 glicoproteína 1, o que não ocorre na malária (Consigny *et al.*, 2002).

Autoanticorpos podem estar presentes tanto em indivíduos com malária quanto em indivíduos com doenças autoimunes, como no lúpus eritematoso sistêmico (LES). Alguns desses autoanticorpos, em particular os anti-DNA e os antinucleares, provenientes dos pacientes com LES mostraram certa capacidade de inibir a parasitemia, ao serem colocados em culturas de *P. falciparum*. Essas observações segundo os autores, Zanini *et al.* (2009), sugerem que a resposta autoimune possa ter influência na imunidade protetora contra malária.

De Freitas (2004) ao estudar o perfil de citocinas e de autoanticorpos na anemia de indivíduos com malária (*P. vivax* e *P. falciparum*) em localidades do estado do Pará, observaram 41% de resposta positiva aos anticorpos anticardiolipina, não havendo, entretanto associação desses autoanticorpos com anemia.

2.6.2.3. Participação de citocinas

As várias citocinas produzidas em resposta à infecção podem desempenhar uma ação protetora do hospedeiro contra os estágios pré-eritrocítico, eritrocítico e sexuado do plasmódio. Elas também podem, quando há um desequilíbrio de produção, ser responsáveis por eventos fisiopatológicos da malária. Vários autores (Clark *et al.*, 1989; Grau *et al.*, 1989; Kwiatkowski *et al.*, 1990) observaram uma correlação direta entre produção excessiva de TNF e malária cerebral, inclusive com implicação no prognóstico. No que diz respeito à anemia da malária, parece haver envolvimento de várias citocinas, tais como o TNF alfa, IL-4, IL-10, IL-12, IFN gama (Menendez *et al.*, 2000; Daniel-Ribeiro & Cruz, 2000; Ghosh & Ghosh, 2007).

Na anemia da malária, supõe-se que ocorra produção crônica em baixos níveis do TNF, funcionando como estímulo para induzir alterações diseritropoéticas na medula óssea. McGuire *et al.* (1999) sugeriram essa hipótese após compararem os níveis plasmáticos dessa citocina em crianças com malária complicada por anemia grave daquele obtido para crianças com malária cerebral, observando que no primeiro grupo os níveis de TNF foram significativamente mais baixos. Entretanto, encontraram dificuldades para consubstanciar esse raciocínio pelas limitações na avaliação quantitativa dos níveis do TNF no plasma (dentre outros fatores por sua meia vida curta na circulação), além de restrições quanto à solicitação de exame histopatológico de medula óssea. Os autores então investigaram se as diferenças nas concentrações séricas dessa citocina poderiam ser explicadas geneticamente, uma vez que há alelos diferentes para baixa (alelo A -238) e alta produção de TNF (alelo A -308), associados preferencialmente à cada uma dessas formas de malária: anemia grave e malária cerebral, respectivamente.

Outra abordagem para investigação da anemia, realizada por Kurtzhals *et al.* (1998) incluiu a avaliação da influência do TNF alfa e da IL-10 em crianças de Gana, África, com malária *falciparum* não complicada e complicada (comprometimento cerebral, anemia grave-hemoglobina menor que 7g %). Naquelas com anemia grave foram observadas concentrações significativamente menores de IL-10 e diminuição nos valores obtidos para a relação TNF alfa/IL-10. Othoro *et al.* (1999) também estudaram o comportamento dessas citocinas em crianças do Quênia com malária *falciparum*, verificando que o TNF e a IL-10 estavam aumentados naquelas com anemia. Mas, ao avaliarem a intensidade da anemia, observaram que os níveis de IL-10, mas não os de TNF estavam significativamente elevados na anemia

leve, levando esses autores a concluírem que valores baixos para a relação IL-10/TNF alfa foram determinantes para os casos de anemia grave dos pacientes.

Ainda, objetivando verificar se a anemia na malária está associada com um padrão específico de resposta imune, Biemba *et al.* (1998, 2000) realizaram pesquisas, envolvendo IFN gama, avaliado pelas concentrações séricas de Neopterina (marcador de ativação de macrófagos pelo IFN gama) e IL-4. Na primeira publicação, os autores verificaram que a neopterina se encontrava elevada em todas as crianças com malária admitidas para o estudo, sendo, entretanto observados níveis mais baixos desse marcador nas crianças cujas taxas de hemoglobina estavam dentro dos valores normais no controle de cura. Essas crianças possuíam níveis mais elevados de IL-4 do que o grupo com anemia persistente. Em uma segunda publicação (2000), os autores estudaram 61 crianças com malária cerebral tendo evidenciado anemia grave em 34,4% dos casos, diretamente associada com as concentrações séricas de neopterina (aumento de até 50 vezes no risco estimado) e inversamente com os níveis séricos de IL-4.

Tais dados indicam haver na malária a participação de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF e de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, reguladas respectivamente por linfócitos TH1 e por linfócitos TH2. As primeiras reguladas principalmente por linfócitos TH1 enquanto que as anti-inflamatórias principalmente por linfócitos TH2. Se essas respostas estiverem sendo produzidas em equilíbrio, os eventos da malária se processarão de modo fisiológico para resolução da doença com o mínimo de agravo para o hospedeiro, mas, se estiverem desreguladas, essas mesmas citocinas serão responsáveis por complicações, incluindo anemia grave (Grau & Behr, 1995; Richards, 1997; HO *et al.*, 1998).

2.6.2.4. Alterações na Medula Óssea

Na fase do ataque agudo do paludismo pode haver alterações morfológicas na medula óssea, tais como hiperplasia, mais à custa de precursores de leucócitos do que de eritrócitos; hipoplasia da série vermelha e, o que se observa com mais frequência, displasia eritróide (Abdalla *et al.*, 1980).

À microscopia ótica, a medula óssea de um grupo de crianças africanas com malária *falciparum* revelou desde desde alterações pouco significativas com número normal ou reduzido de precursores eritróides com discreto aumento de linfócitos e células plasmáticas, até alterações diseritropoiéticas marcantes (nos casos de crianças com anemia grave) com

presença de eritroblastos multinucleados, cariorrexis, divisão amitótica nuclear incompleta e desproporcional e pontes citoplasmáticas (Abdalla *et al.*, 1980).

Tais alterações medulares que expressam uma displasia na série eritróide não estão relacionadas à ação direta do parasito sobre as células precursoras dos eritrócitos (Weatherall, 1988). Sua causa é desconhecida (Burchard *et al.*, 1995), todavia, parece resultar da ação do TNF, produzido em resposta à liberação de antígenos maláricos sobre os precursores eritróides, ou ser decorrente da ação citóxica do pigmento malárico, isoladamente ou sinergicamente ao TNF sobre os precursores eritróides, podendo esse efeito perdurar por semanas após o tratamento antipalúdico (Miller *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1994, Casals-Pascual *et al.*, 2006).

Por outro lado, produção deficiente de IL-12 também pode causar diseritropoiese e desse modo também estar implicada na etiopatogenia da anemia grave da malária, segundo estudos experimentais conduzidos por Mohan & Stevenson (1998) em camundongos A/J infectados por *P. chabaudi*, uma vez que a IL-12, em níveis normais, participa da eritropoiese regulando positivamente os fatores estimuladores da proliferação de progenitores eritroblásticos (BFU-E) e das células formadoras de colônias eritróides da medula óssea (CFU-E).

2.6.2.5. Eritropoetina

A eritropoietina constitui o principal fator regulador da produção de eritrócitos. Sua concentração sérica aumenta exponencialmente à medida que os níveis de hemoglobina diminuem (Burgmann *et al.*, 1996).

Não há consenso entre os autores sobre o papel que a eritropoietina desempenha na anemia da malária. Para Burchard *et al.* (1995), há uma resposta adequada de eritropoietina nos quadros de anemia por *P. falciparum*, enquanto que para Burgmann *et al.* (1996) essa produção seria inadequada.

Mais recentemente, Chang & Stevenson (2004) estudando a produção de eritropoetina nas linhagens C57BL/6 e A/J de camundongos suscetíveis respectivamente a infecção não letal e letal por *P. chabaudi*, demonstraram que a produção desse hormônio pelos rins era adequada e apropriada aos diferentes graus de anemia desses animais. Observaram, entretanto, restrição nas funções da eritropoetina sobre a medula óssea de camundongos A/J, com supressão da proliferação, diferenciação e maturação de precursores eritróides, associado a uma inadequada reticulocitose.

Convém lembrar nas relações entre eritropetina e eritropoiese, que outros fatores como citocinas, pigmento malárico, também atuam sobre a medula óssea contribuindo para que a anemia da malária seja multicausal.

3) JUSTIFICATIVA:

A anemia é uma das facetas da malária que desperta interesse nos pesquisadores envolvidos com o estudo dessa doença, não só pela natureza complexa de sua patogênese, em que além da destruição mecânica de eritrócitos induzido pelo plasmódio, há participação de diversos mecanismos imunes, mas também, e sobretudo, porque pode se apresentar em sua forma grave como uma das complicações da malária, ceifando vidas, sobretudo de crianças menores de cinco anos de idade, no continente africano.

Do ponto de vista clínico, a anemia manifesta-se com intensidade leve, moderada ou grave dependendo de fatores relacionados com o parasito e sua virulência como também do estado imunitário do indivíduo, que por sua vez está relacionado com a idade e com o grau de exposição à infecção.

No Brasil, não são muito frequentes os estudos abordando a anemia da malária, talvez pelo fato de que anemia grave determinada pelo *P. vivax*, a espécie mais prevalente causadora de malária em nosso meio, não seja uma constante, o que em parte se justifica pelas características próprias dessa espécie de plasmódio ao invadir preferencialmente reticulócitos, o que limita a parasitemia. Desse modo, o conhecimento sobre anemia da malária provem em sua maioria da África, onde a malária pelo *P. falciparum* assume maior gravidade pela freqüência de casos complicados e maior número de óbitos, principalmente em crianças, fornecendo resultados nem sempre extrapoláveis para a realidade brasileira, particularmente para Amazônia, onde se concentra o maior número de casos da doença.

Por essas razões, julga-se pertinente estudar aspectos clínicos e laboratoriais (bioquímicos, hematológicos e imunológicos) da anemia em crianças e adolescentes com malária por *P. vivax*, procedentes de várias localidades da Região Amazônica, considerando a possível influência da coexistência das principais causas genéticas de anemia hemolítica (hemoglobinopatias, deficiência de G₆PD), de anemia por deficiência de ferro e das parasitoses intestinais.

4) OBJETIVOS:

4.1. OBJETIVO GERAL

- Estudar aspectos clínicos e laboratoriais (bioquímicos, hematológicos, imunológicos) da anemia em crianças e adolescentes com malária *vivax*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar parâmetros hematológicos que permitam a avaliação da frequência e do tipo de anemia encontrada associada à malária por *Plasmodium vivax* em crianças e adolescentes
- Avaliar a influência da densidade parasitária e do clearance da parasitemia, assim como do grau provável de imunidade anti-malárica dos pacientes, no determinismo e evolução da anemia da malária;
- Dosar os níveis do Fator de Necrose Tumoral (TNF) e da Interleucina -10 (IL-10) buscando identificar suas potenciais correlações com o determinismo e evolução da anemia da malária;
- Pesquisar a presença de autoanticorpos (anticorpos fosfolipídicos e anticorpos anti-eritrocíticos) buscando evidências de sua potencial influência no determinismo e evolução da anemia da malária;
- Verificar a influência de co-fatores (anemia ferropriva, parasitas intestinais, intervalo de tempo entre sintomatologia e diagnóstico/tratamento) na evolução clínica da anemia da malária

5) CASUÍSTICA E MÉTODOS:

5.1- DESENHO DO ESTUDO:

Trata-se de um estudo longitudinal para avaliar os parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e imunológicos de crianças e adolescentes com malária por *Plasmodium vivax* e de um grupo controle sem malária. Os pacientes também foram comparados entre si no término do tratamento e no primeiro controle de cura.

5.2- LOCAIS DO ESTUDO:

O material biológico e os dados epidemiológicos, clínicos e antropométricos foram coletados no Programa de Ensaio Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas, em Belém/Pará no período de outubro de 2002 a agosto de 2005 e no Posto de Notificação de Casos de Malária, em Augusto Correa/Pará, de junho de 2004 a janeiro de 2005.

O Instituto Evandro Chagas é um órgão do Ministério da Saúde, vinculado à Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), que atua nas áreas de pesquisas biomédicas e na prestação de serviços em saúde pública (Santos, 2007). No setor de Parasitologia, destaca-se o Programa de Ensaio Clínicos em Malária, que desde 1992 realiza o diagnóstico e tratamento de malária em indivíduos com quadro febril suspeito da doença, procedentes da capital e de várias localidades do estado do Pará e demais estados da Região Amazônica e mesmo de outros países, notadamente as Guianas.

Em 2002, no Programa de Ensaio Clínicos em Malária foram examinadas 5.082 lâminas de pacientes com suspeita de malária. O resultado foi positivo em 477 lâminas, das quais em 80,5% foi diagnosticado o *Plasmodium vivax*. O predomínio dessa espécie se manteve nos anos seguintes, 2003, 2004 e 2005, representando respectivamente, 79,4% (324/408), 86,1% (387/449) e 83,6% (391/468) (Relatório anual do Programa de Ensaio Clínicos em Malária, Instituto Evandro Chagas).

O município de Augusto Correa está situado a 256 km de Belém, numa latitude 01°01'18" sul e numa longitude 46°38'06" oeste, em uma altitude de 20 metros, com uma população estimada de 34.435 habitantes (2004), distribuída numa área de 889.279 km². Possui elevada incidência de malária, cujo diagnóstico é realizado na sede e nas demais localidades do Município, nos Postos de Notificação de Casos de Malária, que em 2004,

diagnosticou 3.955 casos da doença (em 16.888 lâminas examinadas), representando o *Plasmodium vivax*, 99,7% dessa casuística. Em 2005, dos 4.051 casos notificados (de um total de 16.716 lâminas examinadas), 98,2% foram causados pelo *Plasmodium vivax* (Sivep-Malária, MS, Brasil, 2009).

5.3- PACIENTES:

No estudo foram incluídas 81 crianças e adolescentes com malária por *P. vivax* e 62 crianças e adolescentes sem malária (grupo controle).

O número de participantes contemplou o cálculo do tamanho amostral estabelecido a partir do teste t para amostras independentes, adotando-se um poder do teste de 80%, nível alfa $\leq 5\%$, relação amostra/grupo controle 1:0,5; teste bilateral. Para realização desse teste usou-se média de hemoglobina de 9,8g/dl e desvio padrão= ± 2.078 de crianças e adolescentes com malária (Ventura, 1997). Para a média estimada da hemoglobina da população, empregou-se o valor da hemoglobina recomendado pela OMS para avaliação de anemia, hemoglobina=11,0g/dl e o desvio padrão já mencionado, tendo como resultado, para composição desse estudo, um grupo mínimo de 71 pacientes e de 35 crianças e adolescentes no grupo controle.

Para inclusão no grupo de pacientes, as crianças e adolescentes preencheram os seguintes critérios:

- Gota espessa positiva para *P. vivax*, independente da quantificação da parasitemia;
- Idade de 5 a 20 anos exclusive (pré-escolares, escolares e adolescentes), segundo o estabelecido pela OMS (1995);
- Primoinfecção ou história anterior de malária há mais de trinta dias;
- Consentimento pós-informado dos pais/responsáveis pelas crianças e adolescentes (se menores de 18 anos);
- Compromisso dos responsáveis em trazer as crianças/adolescentes diariamente para avaliação clínica, realização de exames e recebimento do tratamento antimalárico.

Como critérios de exclusão foram adotados:

- Crianças e adolescentes com malária por *P. falciparum*, *P. malariae* ou malária mista (*P. falciparum* e *P. vivax*);

- Crianças e adolescentes portadoras de doença falciforme ou ainda com evidência clínica (anamnese/exame físico) de patologias crônicas associadas, como por exemplo, cardiopatias, distúrbios respiratórios e problemas renais.

A seleção do grupo controle teve como principal critério, em ordem de prioridade, o grau de parentesco, irmãos/irmãs, primos/primas. Na impossibilidade de preenchimento desse critério, foram selecionados os vizinhos das crianças e adolescentes com malária. Em relação à idade, adotou-se preferencialmente àquela que fosse próxima ou igual (primos, vizinhos) a dos pacientes. Essas crianças e adolescentes do grupo controle, pelo grau de parentesco ou por serem vizinhas dos pacientes, possuíam condições sócio-econômicas similares ao grupo alvo.

Foi preenchido um protocolo de atendimento para os participantes (com dados de identificação, antecedentes pessoais, exame físico) do grupo controle, com obtenção do Termo de Consentimento pós- informado de seus pais/responsáveis.

Em consequência da seleção do grupo controle ter ocorrido em áreas endêmicas de malária, algumas dessas crianças e adolescentes possuíam história anterior da doença, com diferentes intervalos de tempo do último episódio. Para evitar a interferência de vieses na interpretação das variáveis, optou-se por excluir todas as crianças e adolescentes do grupo controle em que havia relato anterior de malária. Desse modo, o grupo controle, foi reduzido de 62 para 40 indivíduos.

5.4- PROCEDIMENTOS:

A pesquisa de plasmódio em gota espessa foi realizada nas crianças e adolescentes com suspeita de malária que procuraram por demanda espontânea o Programa de Ensaio Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas ou o Serviço de Diagnóstico de Malária de Augusto Correa. Aos responsáveis daquelas com lâmina positiva para *Plasmodium vivax* e que preenchiam os critérios de elegibilidade solicitou-se permissão para inclusão no estudo. Na ocasião, os objetivos da pesquisa foram explicados em linguagem clara e, os pais/responsáveis que concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Pós-Informado (anexo I), segundo o que preconiza a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP (Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, Resolução 196/96).

Após o preenchimento de um protocolo (Anexo B) contendo dados de identificação, antecedentes pessoais, tempo da doença atual, queixa principal e sinais e sintomas (exame físico), houve coleta de 10 ml de sangue das crianças e adolescentes em D0 (data do diagnóstico e primeiro dia de tratamento), D7 (8º dia a partir da data do início do tratamento) e em D30 (primeiro controle de cura, ou 31º dia do início do tratamento) para obtenção dos seguintes exames: Hemograma, variação no volume dos eritrócitos (RDW- *red width distribution*), reticulócitos, esfregaço sanguíneo, teste de antiglobulina direta, dosagem de citocinas (Fator de necrose tumoral e Interleucina-10), pesquisa de anticorpos antimembrana de eritrócitos, de anticorpos anticardiolipina e de anticorpos IgG anti-*P. vivax*. Outros exames: ferritina sérica, eletroforese de hemoglobina, pesquisa da atividade da glicose 6 fosfato desidrogenase (G₆PD) e de anticorpos IgM anti-*P. vivax* foram também realizados, porém somente em D0.

O exame parasitológico de fezes (métodos Direto e/ou de Faust e Baermann-Moraes) foi feito no decorrer da primeira semana de tratamento e entregue aos pacientes em D7 (no final do tratamento antimalárico). As crianças e adolescentes que apresentaram resultado positivo para helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Trichocephalus trichiurus*, *Ancilostomídeos*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*) e/ou protozoários reconhecidamente patogênicos (*Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*) receberam tratamento com albendazol (ou mebendazol) para as helmintíases ou secnidazol (ou metronidazol) para os protozoários, em doses pediátricas.

A pesquisa do *P. vivax* em gota espessa, com registro do número de formas assexuadas e de gametócitos por mm³, foi feita diariamente até que a leitura da lâmina tivesse resultado negativo, em dois dias consecutivos, quando então os familiares do paciente (ou ele próprio, se maior de 18 anos) receberam as doses restantes dos antimaláricos com orientação sobre a necessidade de dar continuidade ao tratamento. Com a finalidade de assegurar a cura parasitológica após tratamento clínico, no 8º dia (D7), as crianças e os adolescentes realizaram um novo exame de gota espessa, o qual foi repetido em D30, para acompanhamento do controle de cura.

A avaliação clínica ocorreu de modo simultâneo com o acompanhamento parasitológico em D0 (1º dia de tratamento) e nos dias subsequentes (D1, D2, D3,) até que a pesquisa de *P. vivax* em gota espessa se mostrasse negativa, por dois dias consecutivos, em conformidade com o protocolo de atendimento do Programa de Ensaios Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas. Os pacientes retornaram em D7 para nova consulta e, se ainda apresentassem manifestações clínicas nesta data, retornaram em D14.

No grupo controle realizou-se gota espessa para exclusão de malária. Foi preenchido o mesmo protocolo aplicado aos pacientes no que diz respeito aos dados epidemiológicos e aos antecedentes pessoais, incluindo-se história prévia e data do último episódio de malária. Realizou-se exame físico, mensurando-se peso e altura, avaliação clínica de palidez (palmar e de mucosas), ausculta cardíco-pulmonar e palpação abdominal. Coletou-se 10 ml de sangue, distribuídos em tubos com heparina, para realização dos testes imunológicos (citocinas, pesquisa de anticorpos IgG e IgM anti-*P. vivax*, pesquisa de anticorpos anticardiolipina e de anticorpos anti-membrana de eritrócitos normais), em tubos com EDTA para realização de hemograma, RDW, contagem de reticulócitos, eletroforese de hemoglobina, teste de antiglobulina direta e pesquisa de deficiência de G6PD e em tubos sem anticoagulante para dosagem da ferritina sérica. Realizou-se também esfregaço sanguíneo para avaliação da morfologia dos eritrócitos e exame de fezes para identificação de helmintos e protozoários.

5.5- LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXAMES LABORATORIAIS:

5.5.1. Acompanhamento Parasitológico

Programa de Ensaios Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas

Serviço de Diagnóstico de Malária do Município de Augusto Correa (Pará)

| | Realização de Exames | | | |
|--------------|----------------------|---------|----|-----|
| | D0 | D1-D6 * | D7 | D30 |
| Gota espessa | X | X | X | X |

* Até realização de duas lâminas negativas consecutivas

5.5.2. Perfil hematológico da malária

Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Evandro Chagas

| | Data de Realização de Exames | | |
|--------------------------------|------------------------------|----|-----|
| | D0 | D7 | D30 |
| Hemograma | X | X | X |
| RDW | X | X | X |
| Reticulócitos | X | X | X |
| Esfregaço do sangue periférico | X | X | X |

Centro de Hemoterapia do Pará (Hemopa)

| | Data de Realização de Exames | | |
|------------------|------------------------------|------|------|
| | D0 | D7 | D30 |
| Ferritina Sérica | X | ---- | ---- |

5.5.3. Perfil imunológico da malária

Laboratório de Pesquisas em Malária - Fiocruz (Rio de Janeiro)

| | Realização de Exames | | |
|--|----------------------|----|-----|
| | D0 | D7 | D30 |
| TNF (Método ELISA) | X | X | X |
| IL10 (Método ELISA) | X | X | X |
| Anticorpos anticardiolipina (Método ELISA) | X | X | X |
| Anticorpos antimembrana de hemácias normais (Método ELISA) | X | X | X |

Laboratório de Cultura e Sorologia para Malária do Instituto Evandro Chagas

| | Realização de Exames | | |
|---|----------------------|------|------|
| | D0 | D7 | D30 |
| IgG anti- <i>Plasmodium vivax</i> (IFI) | X | X | X |
| IgM anti- <i>Plasmodium vivax</i> (IFI) | X | ---- | ---- |

Centro de Hemoterapia do Pará (Hemopa)

| | Realização de Exames | | |
|--|----------------------|----|-----|
| | D0 | D7 | D30 |
| Teste de antiglobulina direta (teste direto de Coombs) | X | X | X |

5.5.4. Investigação de causas de anemia hemolítica congênita

Centro de Hemoterapia do Pará (Hemopa)

| | Realização de Exames | | |
|---|----------------------|------|------|
| | D0 | D7 | D30 |
| Eletroforese de hemoglobina | X | ---- | ---- |
| Pesquisa da atividade de glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD) | X | ---- | ---- |

5.5.5. Exame parasitológico de fezes:

Laboratório de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas

Unidade Básica de Saúde do Município de Augusto Correa (Pará)

| | Realização do Exame (primeira semana de tratamento) |
|--|--|
| | Exame parasitológico de fezes (Direto, Faust e/ou Baermann-Moraes) |

5.6. BREVE DESCRIÇÃO DOS EXAMES LABORATORIAIS REALIZADOS

5.6.1. Gota Espessa (Antuñano, 1988a,b): (Procedimento Operacional Padrão, Laboratório do Programa de Ensaaios Clínicos em Malária, Instituto Evandro Chagas)

Por punção digital, retirou-se sangue para realização da gota espessa para pesquisa de *P. vivax*, obedecendo os seguintes passos:

- 1) Realizar assepsia da face lateral do dedo com algodão embebido em álcool a 70%;
- 2) Limpar o local da punção com algodão seco, para retirada do álcool;
- 3) Fazer uma punção digital, com auxílio de uma lanceta descartável. Desprezar a primeira gota de sangue (evitando dessa maneira, que possa haver resto de álcool que possa fixar o sangue) e aproveitar a gota seguinte, estendendo-a sobre a lâmina;
- 4) Identificar a lâmina (nome completo do paciente);
- 5) Secar a lâmina;
- 6) Proceder a coloração da lâmina pela técnica de Walker, realizada em dois tempos:
 - a) Primeiro tempo: imergir a lâmina em solução de azul de metileno fosfatado para ruptura do eritrócito e liberação da hemoglobina (melhor visualização do plasmódio), lavar em seguida com uma solução tamponada para retirar o excesso;
 - b) Segundo tempo: colocar o corante de Giemsa, aguardar um intervalo de tempo de sete a dez minutos, findo os quais, proceder a imersão da lâmina em solução tamponada;
- 7) Secar a lâmina;
- 8) Realizar a leitura da lâmina em microscópio óptico com auxílio da objetiva de imersão

Na leitura da lâmina foram percorridos 100 campos microscópicos (correspondente a $0,2 \text{ mm}^3$ de sangue). Para obtenção da média de parasitos para 1 mm^3 de sangue, multiplica-se o número de parasitos encontrados nos 100 campos pela constante 5.

5.6.2. Hemograma: (Procedimento Operacional Padrão, Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Evandro Chagas)

O hemograma foi realizado em Contador Automático de Células Sanguíneas, Modelo Pentra 120 Retix – Abx Diagnostics, no Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Evandro Chagas. O sangue foi coletado em veia periférica e armazenado em frasco com EDTA. As amostras coletadas em Belém foram enviadas para realização de hemograma, em geral, imediatamente após a coleta, ou no máximo em 24 horas (sangue conservado em geladeira, 4 °C a 8°C). O mesmo procedimento foi adotado nas amostras de Augusto Correa.

No hemograma foram obtidos os seguintes parâmetros: dosagem espectrofotométrica de hemoglobina (método de cianometahemoglobina) (em grama por decilitro), contagem total de eritrócitos (em milímetro cúbico), determinação do hematócrito (em percentual), do volume corpuscular médio (VCM) (em fentolitros), da hemoglobina corpuscular média (HCM) (em picograma), da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) (em percentual), do índice de anisocitose (RDW) (em percentual), contagem total de leucócitos (em milímetro cúbico), contagem diferencial dos leucócitos, em valores absolutos (em milímetro cúbico) e em valores relativos (em percentual), contagem total de plaquetas (em milímetro cúbico) e contagem de reticulócitos (em percentual).

5.6.3. Esfregaço sanguíneo (distendido sanguíneo)

No momento da coleta de sangue para hemograma, foi realizado esfregaço sanguíneo das crianças e adolescentes com malária e do grupo controle para avaliação morfológica dos eritrócitos, mediante microscopia óptica com objetiva de 100x (imersão). Os esfregaços sanguíneos foram corados pelo método de Giemsa May-Grunwald (Sigma Chemical CO., S^t Louis, USA).

5.6.4. Eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose, pH=8,6 (Procedimento Operacional Padrão, 2002, revalidado em novembro de 2006, do Centro de Hemoterapia do Pará):

Etapas do teste:

- 1) Depositar aproximadamente 100 ml do tampão Tris-EDTA-Borato (T.E.B) na cuba fonte para eletroforese;
- 2) Embeber fitas de acetato de celulose na cuba fonte com tampão T.E.B por um tempo mínimo de vinte minutos;

3) Proceder o preparo do hemolisado das amostras a serem testadas e do controle, conforme a seguinte orientação:

- a) Em um tubo de hemólise adicionar 100 µl de hemácias da amostra a ser testada, completando-a com solução salina;
 - b) Centrifugar o tubo a 2.500 rpm por dois minutos;
 - c) Desprezar o sobrenadante com pipeta Pasteur;
 - d) Depositar no tubo de hemólise duas gotas de saponina a 1% e duas gotas de hemácias lavadas. Agitar delicadamente e então, deixar em repouso por cinco minutos;
- 4) Secar as fitas de acetato de celulose com papel de filtro;
- 5) Conectar as fitas na cuba de eletroforese com duplo papel de filtro;
- 6) Aplicar as amostras hemolisadas à 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo. Incluir sempre um controle padrão;
- 7) Ligar a cuba a 300 V por vinte a trinta minutos, ou até que se obtenha uma separação adequada das frações;
- 8) Analisar as frações, inicialmente sem coloração;
- 9) Analisar as frações com coloração, após ter embebido as fitas no corante de Ponceau por dez minutos;
- 10) Descorar as fitas com solução descorante;
- 11) Interpretar os resultados consultando o mapa de traçado eletroforético em pH alcalino.

Exemplo: hemoglobina AA (padrão normal), hemoglobina AS (traço falciforme), hemoglobina SS (doença falciforme)

5.6.5. Teste de Brewer ou Teste de redução da metahemoglobina: (Procedimento Operacional Padrão, revalidado em novembro de 2006, do Centro de Hemoterapia do Pará)

O teste de Brewer baseia-se no processo de conversão da hemoglobina a metahemoglobina na presença do nitrito de sódio (agente oxidante) e, posteriormente reconvertido por ação da G6PD na presença de azul de metileno (Brewer *et al.*, 1962). Os eritrócitos dos pacientes com deficiência enzimática (G6PD) não fazem reconversão da metahemoglobina à hemoglobina..

Etapas do teste:

- 1) Coletar sangue em um tubo com EDTA;

- 2) Identificar 3 tubos de ensaio (T, CP, CN);
- 3) Colocar 200 µl de sangue total do paciente no tubo T, CP e CN;
- 4) Adicionar 20 µl de nitrito de sódio no tubo T e CP;
- 5) Adicionar 20 µl de azul de metileno no tubo T, CN;
- 6) Homogeneizar e incubar todos os tubos (T, CP, CN) em banho Maria a 37 °C por 3 horas;
- 7) Após o período de incubação transferir 100 µl de cada amostra para tubos devidamente identificados e com 10 ml de água destilada;
- 8) Fazer a leitura comparativa com os testes controles

Interpretação dos resultados: Normal = vermelho vivo

Deficiente= castanho escuro

Observação: A presença de elevado número de reticulócitos ou episódio hemolítico pode ser causa de resultado falso positivo.

5.6.6. Eletroforese de G6PD em gel de agarose a 0,9%: realizado para confirmação de resultados alterados no teste de Brewer (Procedimento Operacional Padrão, 2002, revalidado em novembro de 2006, do Centro de Hemoterapia do Pará)

Etapas do teste:

- 1) Dissolver o gel de agarose a 0,9% em “banho maria”;
- 2) Acrescentar 50 µl de solução NADP ao gel de agarose, quando esse atingir uma temperatura de 60°C. Realizar a homogeneização dessa mistura, por rotação
- 3) Derramar a mistura numa placa previamente aquecida;
- 4) Aguardar no mínimo cinco minutos para solidificação do gel;
- 5) Levar o gel solidificado para a geladeira;
- 6) Preparar a cuba eletroforética, colocando 100 µl do tampão T.E.B em cada compartimento. Em seguida, levar para a geladeira;
- 7) Colocar cada hemolisado na fenda de um aplicador. Introduzir o aplicador a uma distância de 1,5 cm da borda inferior do gel (não deverá haver bolhas de ar entre o gel e o aplicador). Aguardar três a cinco minutos para absorção do hemolisado no gel. Retirar o aplicador, lavar cuidadosamente em água corrente e destilada, em seguida, enxugar;

Repetir o procedimento de aplicação do hemolisado na fenda do aplicador, dessa vez introduzindo-o no gel cerca de 2,5 cm acima da primeira linha de aplicação;

Registrar a seqüência de aplicação no caderno de registro de géis;

8) Levar o gel para a cuba eletroforética e realizar a migração a 300 volts durante 45 minutos (30 minutos se houver distorção visível);

9) Retirar a placa com gel da cuba eletroforética e proceder a coloração do gel; Após a solidificação da mistura de coloração, incubar em estufa a 37°C por pelo menos 10 minutos, antes de proceder à leitura;

10) Leitura dos resultados: os fenótipos são diferenciados conforme suas velocidades de migração. Os fenótipos normais são diferenciados dos fenótipos deficientes conforme a intensidade de coloração das bandas (coloração intensa azul/violeta ou coloração fraca, respectivamente para os fenótipos normais e deficientes)

Exemplo: fenótipo B, deficiente

5.6.7. Ferritina sérica: (Procedimento Operacional Padrão, 2002, Centro de Hemoterapia do Pará)

Vidas Ferritina (FER)[®] é um teste quantitativo automatizado nos aparelhos VIDAS (Bio-Mérieux S/A), que permite a determinação da ferritina humana no soro ou no plasma humano (tratado com heparinato de lítio ou com EDTA) pela técnica ELFA (Enzyme linked fluorescent assay).

Etapas do teste:

1) Retirar da geladeira os reagentes necessários à realização do teste, deixando-os 30 minutos à temperatura ambiente;

2) Utilizar um barrete FER (poços cobertos por folha de alumínio selada e etiquetada) e um cone FER (cone sensibilizado com imunoglobulinas monoclonais de rato anti-ferritina) para cada amostra, controle, ou calibrador a testar. O controle e o calibrador são também fornecidos pelo fabricante;

3) Digitar ou selecionar FER no aparelho para introduzir o código do teste;

4) Identificar cada barrete com o número da amostra;

5) Homogeneizar em vórtex o calibrador, o controle e as amostras;

6) Colocar o material a ser testado nos seus respectivos barretes e cone FER, colocando-os no aparelho;

7) Leitura do teste feita automaticamente pelo aparelho em relação à uma curva de calibração memorizada

Exemplo: Ferritina sérica (método ELISA)= 81 µg/ml

5.6.8. Teste de antiglobulina direta (Teste direto de Coombs): (Procedimento Operacional Padrão, 2002, revalidado em novembro de 2006, do Centro de Hemoterapia do Pará):

Etapas do teste (técnica centrifugação em gel):

- 1) Centrifugar a amostra a 3000 rpm por cinco minutos em centrífuga para tubos;
- 2) Colocar amostra e diluente à temperatura ambiente antes do uso;
- 3) Dispor do tubo de amostra de sangue e cartão ID-Liss/Coombs, na estação de trabalho;
- 4) Identificar cartão com o nome do paciente (ou com o número da amostra);
- 5) Preparar suspensão de eritrócitos (da amostra a ser testada):
 - a) 1 ml de ID-Diluent 2® (solução de baixa força iônica modificada utilizada em testes realizados em Gel-teste para realização de vários exames hematológicos, dentre os quais, o teste de Coombs);
 - b) 10µl do concentrado de eritrócitos;
 - c) Homogeneizar a suspensão;
- 6) Pipetar 50 µl da suspensão acima, em um microtubo do cartão já identificado;
- 7) Centrifugar (centrífuga para cartão DiaMed) por dez minutos a 70g (910 rpm);
- 8) Fazer a leitura e anotar resultado no relatório de bancada.

Interpretação dos resultados:

- a) Reação positiva: presença de aglutinação (em cruces, +/4+) observada na leitura imediata ou na leitura após cinco a dez minutos
- b) Reação negativa: ausência de aglutinação

5.6.9. Pesquisa de anticorpos contra antígenos de membrana de eritrócitos normais (ELISA) (Laboratório de Pesquisas em Malária, Fiocruz):

A) A preparação do antígeno de membrana de eritrócitos normais é realizada segundo a técnica descrita por Schetters *et al.* (1989) com pequenas modificações:

- 1) Lavar eritrócitos não parasitados com PBS por dez minutos a 1500 rpm, à temperatura ambiente;
- 2) Lisar os eritrócitos com 40 mL de tampão fosfato hipotônico (6 mM, pH=8,0) e centrifugar por 20 minutos a 1500 rpm, à temperatura ambiente;
- 3) Agitar por cinco minutos o precipitado contendo tampão de lise no vórtex (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc, Bohemia, USA). Em seguida, centrifugá-lo por vinte minutos a 2500 rpm, à temperatura ambiente;

Repetir este procedimento quantas vezes for necessário até que o sobrenadante esteja limpo;

- 4) Extrair as proteínas e fosfolipídios da membrana pela adição de 3,5 mL de PBS contendo 1% de Triton X-100;
- 5) Sonicar a mistura (Ultrasonic Clean by Branson) por cinco minutos na presença de gelo. Repetir este procedimento por três vezes;
- 6) Dosar as proteínas na mistura pelo Método de Bradford (Bio-Rad Laboratories LTDA, Philadelphia, USA);
- 7) Obter o antígeno, na concentração de 1 mg/mL;
- 8) Diluir o antígeno com PBS/Triton X-100 até o volume final de 10 mL para uso, obtendo-se uma concentração final de 0,1 mg/mL.

B) Teste de ELISA para detecção de anticorpos anti-membrana de eritrócitos normais:

- 1) Sensibilizar placas de ELISA de fundo chato (Nunc Maxisorp, eBioscience, Inc., Califórnia, USA) com 100 µL do antígeno de membrana de eritrócitos normais (obtido no item A, acima)) e incubá-las a 4° C por 14 horas;
- 2) Lavar as placas, após a incubação, por três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma Chemical CO., S^t Louis, USA) (PBS/T20);
- 3) Bloquear cada poço da placa com 200 µL de PBS contendo 0,1 % de BSA (Sigma Chemical CO., S^t Louis, USA) por duas horas a 37°C;
- 4) Lavar as placas, após a incubação, com água destilada por três vezes;

- 5) Adicionar às placas, 100 µL/poço das amostras de plasma diluídas 1:100 em PBS/T20 acrescido de BSA a 1% (PBS/T20/BSA) e incubar por uma hora a 37°C;
- 6) Lavar as placas, após a incubação, com água destilada por três vezes;
- 7) Adicionar às placas, 100µL/poço com anti-IgG humana conjugada à peroxidase (Sigma Chemical CO., S^t Louis, USA) diluída 1:1000 em PBS/T20/BSA e incubar por uma hora a 37°C;
- 8) Lavar as placas, após a incubação, com água destilada por três vezes;
- 9) Revelar a reação por adicionar 100µL/poço de orto-fenilenodiamina (Sigma Chemical CO., S^t Louis, USA) (OPD) diluído em tampão citrato (Sigma Chemical CO., S^t Louis, USA), p H=5,0 acrescido de 10 µL de H₂O₂ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a 30%;
- 10) Interromper a reação por adicionar 50µL/poço da solução de H₂SO₄ 6N (Merck KGaA, Darmstadt, Germany);
- 11) Proceder a leitura da placa, com um leitor de micro-placas (Spectra MAX 250, Molecular Devices) num comprimento de onda de 450 nm

Interpretação dos resultados: o limite de positividade (ponto de corte) para os antígenos de membrana dos eritrócitos foi estabelecido calculando-se a média das duplicatas das respostas de anticorpos dos indivíduos clinicamente saudáveis, que nunca tiveram malária, acrescido de mais dois desvios padrão

Exemplo: Pesquisa de anticorpos anti-membrana de eritrócitos normais: positivo

Pesquisa de anticorpos anti-membrana de eritrócitos normais: negativo

5.6.10. Pesquisa de anticorpos contra cardiolipina (ELISA) (Laboratório de Pesquisas em Malária, Fiocruz)

Para detecção de anticorpos contra cardiolipina, fosfolípido da membrana do eritrócito, o antígeno utilizado foi adquirido comercialmente (Sigma Chemical CO., S^t Louis, USA).

Etapas do teste:

- 1) Diluir a cardiolipina em etanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e manter a -20°C na concentração estoque de 5,2mg/mL No momento da realização do teste, diluir a cardiolipina em 12 µL de etanol

- 2) Sensibilizar placas de ELISA de fundo chato (Nunc Maxisorp, eBioscience, Inc., Califórnia, USA) com 50 µL/poço da cardiolipina. Deixar as placas descobertas para secagem pela evaporação do etanol, numa temperatura de 4° C por 14 horas;
- 3) Bloquear cada poço da placa com 200 µL de PBS contendo 2% de BSA (Sigma Chemical CO., S^t Louis, USA) e incubar por duas horas em temperatura ambiente;
- 4) Lavar as placas, após a incubação, com água destilada por três vezes;
- 5) Adicionar às placas, 100 µL/poço das amostras de plasma diluídas 1:100 em PBS/T20 acrescido de BSA a 1% (PBS/T20/BSA) e incubar por uma hora a 4°C;
- 6) Lavar as placas, após a incubação, com água destilada por três vezes;
- 7) Incubar as placas com uma anti-IgG humana conjugada à peroxidase (Sigma Chemical CO., S^t Louis, USA) por uma hora à temperatura ambiente;
- 8) Lavar as placas, após a incubação, com água destilada por três vezes;
- 9) Revelar a reação por adicionar 100µL/poço de orto-fenilenodiamina (Sigma Chemical CO., S^t Louis, USA) (OPD) diluído em tampão citrato (Sigma Chemical CO., S^t Louis, USA), p H=5,0 acrescido de 10 µL de H₂O₂ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a 30%;
- 10) Interromper a reação por adicionar 50µL/poço da solução de H₂SO₄ 6N (Merck KGaA, Darmstadt, Germany);
- 11) Proceder a leitura da placa com um leitor de micro-placas (Spectra MAX 250, Molecular Devices) num comprimento de onda de 450 nm

Interpretação dos resultados: o limite de positividade (ponto de corte) para o antígeno de cardiolipina foi estabelecido calculando-se a média das duplicatas das respostas de anticorpos dos indivíduos clinicamente saudáveis, que nunca tiveram malária, acrescido de mais dois desvios padrão

Exemplo: Pesquisa de anticorpos anti-cardiolipina: positivo

Pesquisa de anticorpos anti-cardiolipina: negativo

5.6.11. Detecção do Fator de Necrose Tumoral (ELISA) (Laboratório de Pesquisas em Malária, Fiocruz)

Os níveis do Fator de Necrose Tumoral (TNF) presentes no plasma dos pacientes e do grupo controle foram avaliados utilizando-se reagente comercial (BD

Biosciences - Pharmingen, BD OptEIA™ Set Human TNF, lot number 56627, USA) para ELISA- sanduíche, seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante.

Etapas do teste:

- 1) Sensibilizar placas de ELISA de fundo chato (Nunc Maxisorp, eBioscience, Inc., Califórnia, USA) com 100 µL/poço do anticorpo de captura diluído em solução tampão que acompanha o produto e incubar a 4° C por 14 horas;
- 2) Lavar as placas, após a incubação, por três vezes com PBS (pH=7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 3) Bloquear cada poço da placa com 200 µL de PBS contendo 10% de soro bovino fetal , pH=7,0 e incubar por uma hora em temperatura ambiente;
- 4) Lavar as placas, após a incubação, por três vezes com PBS (pH=7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 5) Preparar a diluição padrão e as diluições amostrais no diluente que acompanha o kit BD OptEIA™ Set Human TNF, seguindo indicações do fabricante de modo a obter a curva padrão;
- 6) Colocar 100 µL/poço das diluições amostrais (curva padrão), do plasma dos pacientes e do grupo controle, incubar a placa por duas horas à temperatura ambiente;
- 7) Lavar as placas, após a incubação, por cinco vezes com PBS (pH=7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 8) Adicionar 100 µL/poço do material de detecção (anticorpo monoclonal biotilado anti-TNF humano + conjugado streptavidina- horseradish, SA_v-HRP)(BD Biosciences - Pharmingen, BD OptEIA™ Set Human TNF), incubar a placa por uma hora à temperatura ambiente;
- 9) Lavar as placas, após a incubação, por sete vezes com PBS (pH=7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 10) Adicionar, para revelar a reação, 100 µL/poço do substrato (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) (BD Biosciences - Pharmingen, BD OptEIA™ Set Human TNF), incubar a placa, protegida da luz, por trinta minutos à temperatura ambiente;
- 11) Adicionar, para interromper a reação, 50 µL/poço da solução de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1 M;
- 12) Proceder a leitura da placa, com um leitor de micro-placas (Spectra MAX 250, Molecular Devices) num comprimento de onda de 450 nm

Os valores de absorvância verificados para as amostras testadas foram plotados em uma curva padrão, incluída em cada placa, para a determinação da concentração do TNF. Suas medidas foram expressas em ng/ml e convertidas em picogramas /ml, multiplicando-se os resultados por 1.000.

5.6.12. Detecção de Interleucina -10 (ELISA)

(Laboratório de pesquisas em Malária, Fiocruz)

Os níveis de interleucina-10 (IL-10) presentes no plasma dos pacientes e do grupo controle foram avaliados utilizando-se reagente comercial (BD Biosciences - Pharmingen, BD OptEIA™ Set Human IL-10, lot number MF 39369, USA) para ELISA- sanduíche, seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante.

Etapas do teste:

- 1) Sensibilizar placas de ELISA de fundo chato (Nunc Maxisorp, eBioscience, Inc., Califórnia, USA) com 100 µL/poço do anticorpo de captura diluído em solução tampão que acompanha o produto e incubar a 4° C por 14 horas;
- 2) Lavar as placas, após a incubação, por três vezes com PBS (pH=7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 3) Bloquear cada poço da placa com 200 µL de PBS contendo 10% de soro bovino fetal , pH=7,0, por uma hora em temperatura ambiente;
- 4) Lavar as placas, após a incubação, por três vezes com PBS (pH=7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 5) Preparar a diluição padrão e as diluições amostrais no diluente que acompanha o kit BD OptEIA™ Set Human IL-10, seguindo indicações do fabricante de modo a obter a curva padrão;
- 6) Colocar 100 µL/poço das diluições amostrais (curva padrão), do plasma dos pacientes e do grupo controle, incubar a placa por duas horas à temperatura ambiente;
- 7) Lavar as placas, após a incubação, por cinco vezes com PBS (pH=7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 8) Adicionar 100 µL/poço do material de detecção(anticorpo monoclonal biotilado anti-IL-10 humana + conjugado streptovindina-horseradish, SA_v-HRP)(BD

Biosciences - Pharmingen, BD OptEIA™ Set Human TNF), incubar a placa por uma hora à temperatura ambiente;

9) Lavar as placas, após a incubação, por sete vezes com PBS (pH=7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);

10) Adicionar, para revelar a reação, 100 µL/poço do substrato (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) (BD Biosciences - Pharmingen, BD OptEIA™ Set Human TNF), incubando a placa, protegida da luz, por trinta minutos à temperatura ambiente;

11) Adicionar, para interromper a reação, 50 µL/poço de ácido fosfórico (H₃P0₄) 1 M;

12) Proceder a leitura da placa, com um leitor de micro-placas (Spectra MAX 250, Molecular Devices) num comprimento de onda de 450 nm

Os valores de absorbância verificados para as amostras testadas foram plotados em uma curva padrão, incluída em cada placa, para a determinação da concentração da IL-10. Suas medidas foram expressas em ng/ml e convertidas em picogramas /ml, multiplicando-se os resultados por 1000.

5.6.13. Teste de Imunofluorescência indireta (*P. vivax*)

(Procedimento Operacional Padrão, Laboratório de Cultura e Sorologia de Malária, Instituto Evandro Chagas)

A) Obtenção do antígeno de *P. vivax*:

Pela impossibilidade de se manter em laboratório uma cultura contínua *in vitro* de *P. vivax*, os esquizontes maduros que foram utilizados para a confecção das lâminas de imunofluorescência indireta (IFI) foram obtidos diretamente de um indivíduo com malária, primo infecção, com parasitemia maior que 10.000/mm³ de sangue. Coletou-se desse paciente, cinco mililitros de sangue em tubo com heparina. Centrifugou-se a amostra, a 1500 rpm para retirada do plasma. Os eritrócitos foram lavados três vezes com PBS estéril por centrifugação a 1500 rpm, por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo colocados em cultura por 24 horas para o completo amadurecimento dos parasitos. O preparo das lâminas foi feito aplicando-se cinco microlitros da suspensão desses eritrócitos. As lâminas, então, permaneceram por 12 horas, em temperatura ambiente, para completa secagem, sendo em seguida embaladas em folha de alumínio e estocadas a -20° C, até o momento do uso.

B) Etapas do teste de IFI: Microscópio de Imunofluorescência Marca Zeiss

- 1) Retirar as lâminas MultSpot do freezer e deixá-las na estufa a 37°C;
- 2) Fixar as lâminas com acetona por dois minutos;
- 3) Colocar numa placa 10 µL de soro do paciente diluído, a partir de 1/40 em PBS;
- 4) Incubar em câmara úmida a 37°C por 30 minutos;
- 5) Lavar rapidamente em PBS para retirar excesso de soro;
- 6) Mergulhar novamente em PBS por 15 minutos;
- 7) Retirar do PBS, mergulhar rapidamente em água destilada para retirar o excesso de sais;
- 8) Secar levemente com jato de ar;
- 9) Distribuir em cada pocinho, 10 µL de conjugado (Fluoline G® - globulina anti IgG humana marcada com fluoresceína, BioLab; Fluoline G® - globulina anti IgM humana marcada com fluoresceína, BioLab) diluído 1/200 em Azul de Evans a 1%;
- 10) Incubar por 30 minutos a 37°C em câmara úmida
- 11) Lavar em PBS por 15 minutos;
- 12) Lavar em água destilada rapidamente;
- 13) Secar levemente;
- 14) Colocar glicerina tamponada (glicerina alcalina, pH=9,5) em cada pocinho e em seguida cobrir com lamínula;
- 15) Ler em microscópio de Imunofluorescência com objetiva de 40X e ocular 10X

Interpretação do teste: soro não reagente, soro reagente (em título, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 ...)

5.6.14. Exame parasitológico de fezes: (Procedimento Operacional Padrão, Serviço de Enteroparasitoses do Instituto Evandro Chagas e Laboratório da Unidade de Saúde de Augusto Correa).

Os pacientes e o grupo controle realizaram uma coleta de fezes para pesquisa qualitativa de ovos e cistos de helmintos e protozoários mediante as técnicas Direta e/ou de Faust e de Baermann-Moraes. Essas amostras foram analisadas, no mesmo dia em que foram coletadas, no Serviço de Enteroparasitoses do Instituto Evandro Chagas e no Laboratório da Unidade de Saúde de Augusto Correa.

Exame Direto a fresco:

- 1) Colocar duas a três gotas de salina a 0,85% em uma lâmina de microscopia;
- 2) Tocar com a ponta de um palito, em vários pontos das fezes, transferir uma pequena porção destas para a lâmina;
- 3) Espalhar as fezes, fazendo um esfregaço e examinar com as objetivas de 10x e/ou 40x. A espessura do esfregaço não deve impedir a passagem da luz;
- 4) Corar com lugol, para identificar cistos de protozoários e larvas de helmintos

Método de Faust (centrífugo-flutuação em sulfato de zinco):

- 1) Diluir 10g de fezes em 20 mL de água destilada e homogeneizar bem;
- 2) Filtrar através de gaze dobrada em quatro, num copo plástico, e transferir para um tubo de Wassermann (tubo de hemólise);
- 3) Centrifugar por um minuto a 2.500 rpm;
- 4) Desprezar o líquido sobrenadante e ressuspender o sedimento em água;
- 5) Repetir as operações dos itens 3 e 4 por mais duas ou três vezes, até que o líquido sobrenadante fique claro;
- 6) Desprezar a água sobrenadante e ressuspender o sedimento com uma solução de sulfato de zinco a 33%, densidade de 1,18g/mL;
- 7) Centrifugar novamente por um minuto a 2.500 rpm;
- 8) Recolher da película superficial, formada pós centrifugação, os cistos e oocistos de protozoários e os ovos leves porventura presentes, com auxílio de uma alça de platina;
- 9) Colocar a película superficial na lâmina, acrescentar uma gota de lugol e cobrir com lamínula;
- 10) Examinar o material com as objetivas de 10X e/ou 40X.

Observação: o material deve ser examinado imediatamente, pois o contato com a solução de sulfato de zinco pode deformar as formas parasitárias, especialmente os cistos de protozoários.

Método de Baermann-Moraes:

- 1) Separar 8 a 10 g de fezes;
- 2) Colocar numa gaze dobrada em quatro ou em uma peneira;
- 3) Colocar o material assim preparado sobre um funil de vidro, contendo um tubo de borracha conectado à extremidade inferior de sua haste;
- 4) Obliterar o tubo de borracha com uma pinça de Hoffmann e adicionar, ao funil, água aquecida (45°C) em quantidade suficiente para entrar em contato com as fezes;
- 5) Deixar uma hora em repouso;
- 6) Colher 5 a 7 mL da água, em um tubo de centrífuga, abrindo-se a pinça;
- 7) Centrifugar a 1.000 rpm por minuto;
- 8) Colher o sedimento, sem desprezar o líquido sobrenadante e examinar ao microscópio (10X). Caso se detecte a presença de larvas, essas deverão ser coradas com lugol e observadas com a objetiva de 40X, para identificação

5.7. DEFINIÇÃO DE VARIÁVEIS DO ESTUDO:

5.7.1. Faixa etária

Foram incluídas no estudo, crianças e adolescentes, com idade de cinco anos até dezoito anos, agrupadas nas seguintes faixas etárias (Marcondes & Setian & Carraza, 2002):

- Pré-escolares: 2 anos - 5 anos e 11 meses
- Escolares: 6 anos - 9 anos e 11 meses
- Adolescentes: 10 - 19 anos e 11 meses

5.7.2. Renda familiar

Adotou-se como base, o número de salários mínimos das pessoas que trabalhavam em cada família dos pacientes e do grupo controle, durante o período em que se realizou a coleta de dados: outubro de 2002 a agosto de 2005.

Desse modo, no Brasil, em 2002, o salário mínimo foi de R\$ 200,00. Em 2003, o governo federal determinou um salário mínimo de R\$240,00. Nos anos seguintes, 2004 e 2005, o salário mínimo nacional foi respectivamente de R\$ 260,00 e R\$300,00 (Salário Mínimo Brasileiro, 2009).

5.7.3. Estado nutricional

Para avaliação do estado nutricional, foram utilizados os parâmetros peso e estatura, aferidos no primeiro dia de atendimento das crianças e adolescentes com malária e do grupo controle. Para observar a evolução ponderal, durante o acompanhamento clínico e terapêutico da malária, aferiu-se o peso também em D7 e em D30.

A mensuração do peso foi realizada com a criança ou adolescente em roupas íntimas, os braços estendidos ao longo do corpo com os dois pés apoiados na superfície de uma balança antropométrica.

A mensuração da altura foi realizada com a criança em posição ereta, pés juntos, joelhos estendidos, braço ao longo do corpo, olhando para frente.

O peso e a altura foram aferidos numa balança antropométrica da marca Filizola devidamente calibrada.

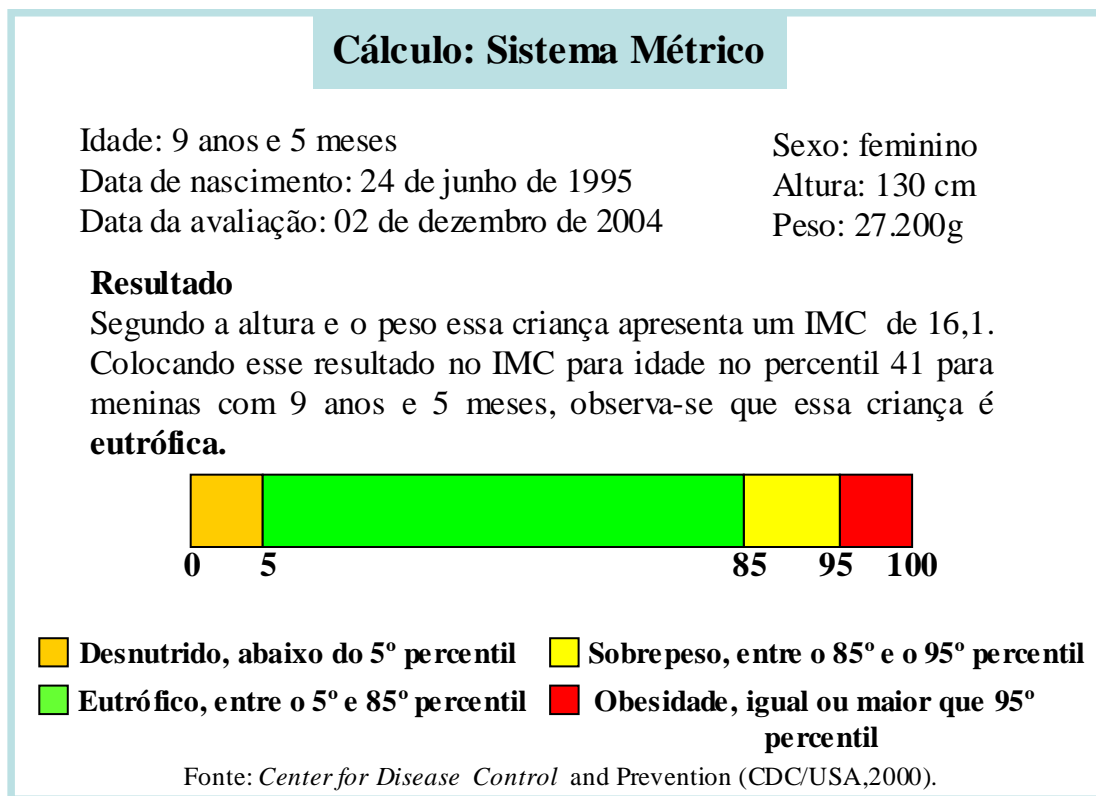
O estado nutricional foi obtido utilizando-se o Índice de Massa Corporal (peso dividido pelo quadrado da altura) para Crianças e Adolescentes do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC/USA, 2000). Trata-se de um método de rastreamento para identificação de problemas relacionados com o peso, específico para idade e sexo, com aval da Academia Americana de Pediatria, para a faixa etária de 2 aos 20 anos.

Classificação do estado nutricional utilizando-se o “IMC para o percentil para a idade” (CDC/USA, 2000):

- Desnutrição: IMC abaixo do 5º percentil
- Eutrofia: IMC situado entre o 5º percentil até o 85º percentil
- Sobrepeso (risco para obesidade): igual ou maior que o 85º percentil, porém inferior ao 95º percentil
- Obesidade: igual ou maior que o 95º percentil

No Quadro 5.1, observa-se um exemplo do cálculo do Índice de Massa Corporal, utilizando-se a Tabela do CDC/USA (2000).

Quadro 5.1- Cálculo do Índice de Massa Corporal em crianças e adolescentes.



5.7.4. Anemia

A anemia foi definida de acordo com o critério da OMS (De Mayer, 1989, Dallman, 1996), que utiliza como parâmetro a taxa de hemoglobina, segundo idade e sexo:

| Idade | Taxa de hemoglobina |
|--|---------------------|
| 2-6 anos (ambos os sexos) | Menor do que 11 g% |
| 7-9 anos (ambos os sexos) | Menor que 12 g% |
| Igual ou maior de 10 anos (sexo feminino) | Menor que 12 g% |
| Igual ou maior de 10 anos (sexo masculino) | Menor que 13 g% |

Quanto a intensidade, a anemia foi classificada em **leve**, se a hemoglobina fosse maior que 10g%, porém abaixo do ponto de corte para sua definição segundo idade/sexo, conforme determinado pelo critério da OMS, em **moderada**, se a hemoglobina estivesse entre 7 a 10 g% e em **grave**, se a hemoglobina estivesse abaixo de 7g% (DeMayer, 1989).

A classificação morfológica da anemia, baseada nos índices hematimétricos permitiu classificá-las segundo os valores do Volume Corpuscular Médio (VCM) em normocíticas (VCM= 80-100 fL), macrocíticas (VCM acima de 100fL) ou microcíticas (VCM < 80 fL) e da

Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) em normocrômicas (HCM=27-32%), hiperocrômicas (HCM > 32%) ou hipocrômicas (HCM< 27%) (Rosenfeld, 2000).

5.7.5. Palidez

A palidez foi avaliada pela inspeção da palma da mão.

5.7.6. Recaída

Reaparecimento das manifestações clínicas de uma infecção pelo *P. vivax*, provavelmente causada por uma nova invasão dos eritrócitos por formas de origem hepática (hipnozoítos) (Manual de Terapêutica da Malária, 2001).

5.7.7. Re-infecção

Nova infecção malárica em um indivíduo que esteve por um determinado período numa área endêmica da doença. Se o indivíduo reside numa área endêmica de malária, o aparecimento de manifestações clínicas da doença acompanhadas de um diagnóstico positivo para pesquisa de plasmódio pode indicar re-infecção ou recidiva (recaída para *P. vivax*, recrudescência para *P. falciparum*), na dependência do tempo em que se deu o último episódio de malária (Manual de Terapêutica da Malária, 2001).

5.7.8. Tratamento dos casos de malária por *Plasmodium vivax*

Os casos de malária por *Plasmodium vivax* foram tratados com cloroquina associada à primaquina, segundo o que preconiza o Manual de Terapêutica de Malária do Ministério da Saúde do Brasil (2001), com o seguinte esquema posológico:

- Cloroquina - 25 mg/kg (dose total, 3 dias)

1º dia - 10 mg/kg

2º dia e 3º dia - 7,5mg/kg

Apresentação: comprimidos 150 mg

- Primaquina – 0,50 mg/kg/dia (7dias)*
Apresentação: comprimidos 5 mg e 15 mg

* Em caso de recaída, a primaquina foi prescrita na mesma dosagem, porém por 14 dias.

As doses dos antimaláricos foram calculadas por quilograma de peso com aproximação para os limites superiores, sempre que o cálculo forneceu resultados de difícil ajuste posológico. Excetuando-se os finais de semana e feriados, os medicamentos para malária foram administrados sob supervisão, pela equipe do Programa de Ensaios Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas.

5.8. VALORES DE REFERÊNCIA:

Red Width Distribution (RDW): é o índice hematimétrico que avalia quantitativamente a anisocitose, ou seja, é o coeficiente de variação do tamanho do eritrócito, cujo valor normal varia de 11,5 a 14,5% (equipamento automatizado). Valores superiores a 14,5% indicam deficiência de ferro (Garanito, 2008).

Ferritina: 30 a 300 ng/ml (Machado, 2008)

Reticulócitos: 1 a 1,5% (Lorenzi, 2003)

Leucócitos e série diferencial: (Lorenzi, 2003).

Faixa de normalidade: 5.000 a 10.000 leucócitos/mm³

Leucopenia: abaixo de 4.000 leucócitos/mm³

Plaquetas: (Garanito, 2008).

Faixa de normalidade: 150.000 – 300.000 plaquetas/mm³

Plaquetopenia: abaixo de 150.000 plaquetas/mm³

5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Na avaliação dos resultados, foram utilizados procedimentos estatísticos descritivos (média, desvio padrão) e/ou analíticos, adotando-se 5% como nível de significância.

Para seleção do teste estatístico realizou-se o teste d'Agostino para verificar se havia uma distribuição normal dos resultados. Em caso afirmativo, testes paramétricos foram utilizados. Por outro lado, testes não paramétricos foram empregados se os dados estavam dispostos de modo assimétrico.

- **Estatística analítica** (Ayres *et al.*, 2003):

- **Teste exato de Fisher:** prova não paramétrica com a finalidade de verificar se duas amostras independentes provieram da mesma população. A probabilidade exata (valor de p) é apresentada sob as formas unilateral e bilateral.
- **Teste do Qui-quadrado:** teste não paramétrico destinado a comprovar se duas amostras independentes provieram da mesma população. Os escores devem ser mensurados em nível nominal ou ordinal. Esse teste sofre a correção de continuidade- *Correção de Yates*- quando as amostras apresentam duas categorias (tabelas 2x2).
- **Teste do Qui-quadrado de partição:** trata-se de um teste de independência do Qui-quadrado, destinado para várias amostras dispostas em tabelas de contingência, para saber em qual dos conjuntos testados ocorreu a associação estatística.
- **Teste de Mann-Whitney (ou teste U):** prova não paramétrica destinada a comparar duas amostras independentes de mesmo tamanho ou de tamanho desigual, cujos escores tenham sido mensurados pelo menos em nível ordinal.
- **Teste da Mediana:** é um procedimento destinado a comprovar se duas amostras independentes, de mesmo tamanho ou tamanho desigual, provieram da mesma população com o mesmo valor médio, mais precisamente o valor da mediana. Os escores de cada amostra devem ser mensurados pelo menos em nível ordinal.
- **Teste Binomial de duas proporções:** destina-se a testar a diferença entre duas proporções amostrais independentes, procurando-se determinar se a diferença ($p_1 - p_2$) é de tal grandeza que permita rejeitar a hipótese de nulidade. O tamanho de cada amostra deve ser suficiente para a devida aproximação da distribuição binomial à curva normal, ou seja, quando atendida duas condições: $n_1 p_1 q_1 \geq 5$ e $n_2 p_2 q_2 \geq 5$.
- **Teste de Kruskal-Wallis (ou teste H):** teste de análise de variância, não paramétrico, destinado a comparar três ou mais amostras independentes do mesmo tamanho ou de tamanho desigual, cujos escores devem ser mensurados pelo menos a nível ordinal. Equivale ao teste ANOVA com um critério.
- **Teste de Friedmann:** teste de análise de variância, não paramétrico, destinado a comparar três ou mais amostras independentes do mesmo tamanho ou de tamanho desigual, cujos escores devem ser mensurados pelo menos em nível ordinal. Equivale ao teste ANOVA com dois critérios. As amostras devem ter o mesmo tamanho, a fim de permitir a comparação entre todos os indivíduos submetidos ao teste.

- **Teste t de Student:** teste paramétrico destinado a verificar se os dois grupos de escores dos mesmos indivíduos, cujas unidades foram retiradas ao acaso da população, tem por diferença média igual a zero. Os dados devem ser mensurados em escala intervalar ou de razões.
- **Correlação linear de Pearson:** proporciona verificar o grau de associação entre a variável x e a variável y , mensuradas a nível intervalar ou de razões. O coeficiente de Pearson pode variar de -1 a $+1$ e quanto mais próximo desses valores, mais forte a associação das variáveis em exame. O escore zero indica ausência de correlação.
- **Correlação linear de Spearman:** prova não paramétrica com a finalidade de determinar o grau de associação entre duas variáveis, mensuradas pelo menos em nível ordinal e dispostas em postos ordenados em duas séries: X e Y .
- **Odds Ratio (OR):** é um teste para proporções dispostas em tabelas de contingência 2×2 , ou seja, para duas amostras dicotomizadas, mensuradas em nível nominal, o qual calcula a vantagem (ou desvantagem) de um dos eventos- *sucesso*- em relação ao outro. Quando o índice é igual a unidade não há vantagem para quaisquer dos eventos. O resultado é fornecido associado ao intervalo de confiança.
- **Log-rank test:** teste de análise de sobrevivência, comparando-se duas amostras, cujas observações foram efetuadas em períodos e intervalos idênticos.
- **Correlação parcial:** teste paramétrico para verificar o grau de associação entre duas ou mais variáveis, ao mesmo tempo em que se controla o efeito de uma terceira, a variável z .
- **Regressão linear múltipla:** teste para predizer o valor de uma variável dependente (Y) a partir de duas ou mais variáveis independentes ou preditoras (X).

5.10. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seguindo o que determina a Resolução 196/96 da Comissão Nacional de Ética em pesquisa – CONEP, sobre as normas que regulamentam a pesquisa envolvendo os seres humanos, esse estudo constou de um termo de consentimento livre e esclarecido, em duas cópias, para o pesquisador e para os familiares da criança ou do adolescente (Anexo A).

5.11. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA:

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Evandro Chagas, em fevereiro de 2002 (Anexo C).

5.12. FINANCIAMENTO:

A pesquisa teve o apoio financeiro do Fundo de Tecnologia do Estado do Pará, do Programa de Qualificação Interinstitucional da CAPES, envolvendo a Universidade do Estado do Pará e Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, com repasse de verbas para aquisição de material biológico, realização de testes laboratoriais e cumprimento de missões de estudo no Rio de Janeiro. Indiretamente, teve também auxílio financeiro do Instituto Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, do Centro de Hemoterapia do Pará e da Secretaria de Saúde de Augusto Correa, na realização específica de exames laboratoriais. A tese se insere no Programa de Doutorado criado entre o Instituto Oswaldo Cruz, a Universidades Federal do Pará, a Universidade do Estado do Pará e o Instituto Evandro Chagas, beneficiando-se do auxílio financeiro específico dessas instituições.

6) RESULTADOS:

6.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA:

Realizou-se um estudo longitudinal constituído de 81 crianças e adolescentes com malária por *Plasmodium vivax* e 40 indivíduos do grupo controle, os quais foram recrutados no Programa de Ensaios Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas (Belém/Pará) e no Serviço de Diagnóstico de Malária, no município de Augusto Correa (Belém/Pará), no período de outubro de 2002 a agosto de 2005.

O grupo amostral foi analisado de duas maneiras:

- a) Comparação pareada por sexo e idade entre 40 pacientes e o grupo controle;
- b) Comparação entre 81 pacientes e o grupo controle

Por não ter havido diferença significativa na análise das variáveis estudadas nessas comparações, optou-se por apresentar os resultados considerando o grupo total de pacientes (81) e indivíduos do grupo controle (40).

A maioria dos pacientes (54,3%) adquiriu malária em Augusto Correa; 24,7% eram oriundos de outros municípios do Pará ou da Guiana Francesa e 21% da Área Metropolitana de Belém.

Do total de casos, 77,8% eram autóctones, enquanto que 22,2% adquiriram malária fora da localidade onde residiam em férias ou em atividades de lazer.

A média de idade foi similar entre os pacientes e o grupo controle, respectivamente de $11,3 \pm 3,9$ anos e de $10,9 \pm 3,0$ anos ($p=0,6896$, teste de Mann-Whitney).

A Tabela 6.1 apresenta a distribuição de dados demográficos e sócio-econômicos no grupo com malária *vivax* e no grupo controle. A distribuição foi semelhante quanto ao sexo e houve predomínio de adolescentes. A maioria era eutrófica; 68,4% das mães possuíam o primeiro grau de escolaridade. O sustento familiar era garantido por um ou menos de um salário mínimo em pouco mais da metade da casuística.

Tabela 6.1- Distribuição de variáveis demográficas em crianças e adolescentes com malária *vivax* e do grupo controle atendidas no Instituto Evandro Chagas/Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (Belém/Pará) e no Serviço de Diagnóstico de Malária da Secretaria Municipal de Saúde de Augusto Correa (Pará), no período de outubro de 2002 a agosto de 2005.

| | Pacientes | | Controle | | Valor do p |
|---------------------------------|-----------|--------|----------|--------|-------------|
| | n | (%) | n | (%) | |
| Sexo | | | | | |
| Masculino | 47 | (58) | 22 | (55) | p=0,9037 * |
| Feminino | 34 | (42) | 18 | (45) | |
| Total | 81 | (100) | 40 | (100) | |
| Faixa Etária | | | | | |
| Pré-escolares | 8 | (10) | 1 | (2,5) | p=0,3232 ** |
| Escolares | 25 | (30,8) | 12 | (30) | |
| Adolescentes | 48 | (59,2) | 27 | (67,5) | |
| Total | 81 | (100) | 40 | (100) | |
| Estado Nutricional | | | | | |
| Eutrofia | 70 | (87,6) | 25 | (83,3) | p=0,4227 ** |
| Desnutrição | 5 | (6,2) | 4 | (13,3) | |
| Sobrepeso/obesidade | 5 | (6,2) | 1 | (3,4) | |
| Total | 80 | (100) | 30 | (100) | |
| Escolaridade Materna | | | | | |
| | n | (%) | | | |
| Analfabeta | 8 | (10,1) | | | _____ |
| 1º grau incompleto | 50 | (63,3) | | | |
| 1º grau completo | 4 | (5,1) | | | |
| 2º grau incompleto | 6 | (7,6) | | | |
| 2º grau completo | 10 | (12,6) | | | |
| Superior | 1 | (1,3) | | | |
| Total | 79 | (100) | | | |
| Renda Família | | | | | |
| | n | (%) | | | |
| Menos ou um salário mínimo | 44 | (54,3) | | | _____ |
| Dois salários mínimos | 19 | (23,5) | | | |
| Três salários mínimos | 9 | (11,1) | | | |
| Quatro ou mais salários mínimos | 9 | (11,1) | | | |
| Total | 81 | (100) | | | |

* Teste do Qui-quadrado

** Teste do Qui-quadrado de partição

Nos pacientes classificou-se a doença atual como primeiro episódio de malária (primoinfecção) ou episódio com história passada da doença. Para 43,2% (35/81) tratava-se do primeiro episódio de malária (Tabela 6.2).

Tabela 6.2 - Episódios de malária em crianças e adolescentes com diagnóstico atual de malária.

| Episódio anterior de malária | n | (%) |
|------------------------------|----|-------|
| Nenhum | 35 | 43,2 |
| Um episódio | 21 | 26,0 |
| Dois ou três episódios | 16 | 19,7 |
| Quatro ou mais episódios | 9 | 11,1 |
| Total | 81 | (100) |

Comparado ao episódio atual, o último episódio de malária tinha ocorrido entre um a três meses em 37,0% (17/46), entre quatro a seis meses em 15,2% (7/46) e entre oito meses até sete anos em 30,4% (14/46) das crianças e adolescentes. Em 17,4% (8/46) não foi possível determinar o tempo decorrido desde a última malária.

6.2. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DO *Plasmodium vivax*:

Ao primeiro dia de atendimento, a parasitemia foi quantificada em 95,1% (77/81) dos pacientes, em número de parasitos (formas assexuadas) por mm³ de sangue e aferida em cruces em 4,9% (4/81) deles. A contagem média das formas assexuadas foi de 6.543 ± 9.872 parasitos/mm³, mediana= 3.000 parasitos/ mm³, sendo a menor parasitemia de 100 parasitos/mm³ de sangue e a maior parasitemia de 57.500 parasitos/mm³.

A pesquisa de plasmódio no sangue periférico se revelou negativa em D1 (segundo dia de tratamento) em 9,9% (8/81) dos pacientes, em D2, a frequência cumulativa foi de 59,2% (48/81) e em D3 de 92,6% (75/81). Dos seis pacientes restantes, cinco tiveram gota espessa negativa em D4 e um em D6, de modo que no controle pós-tratamento (D7), a parasitemia se encontrava negativa em todos os pacientes.

A Figura 6.1 mostra que o número médio de formas assexuadas de *P. vivax* foi significativamente maior no subgrupo com primoinfecção do que no subgrupo com passado de malária, respectivamente 9.311 ± 11.369 parasitos/mm³ e 4.236 ± 7.841 parasitos/mm³ de sangue (p= 0,0010; teste de Mann-Whitney).

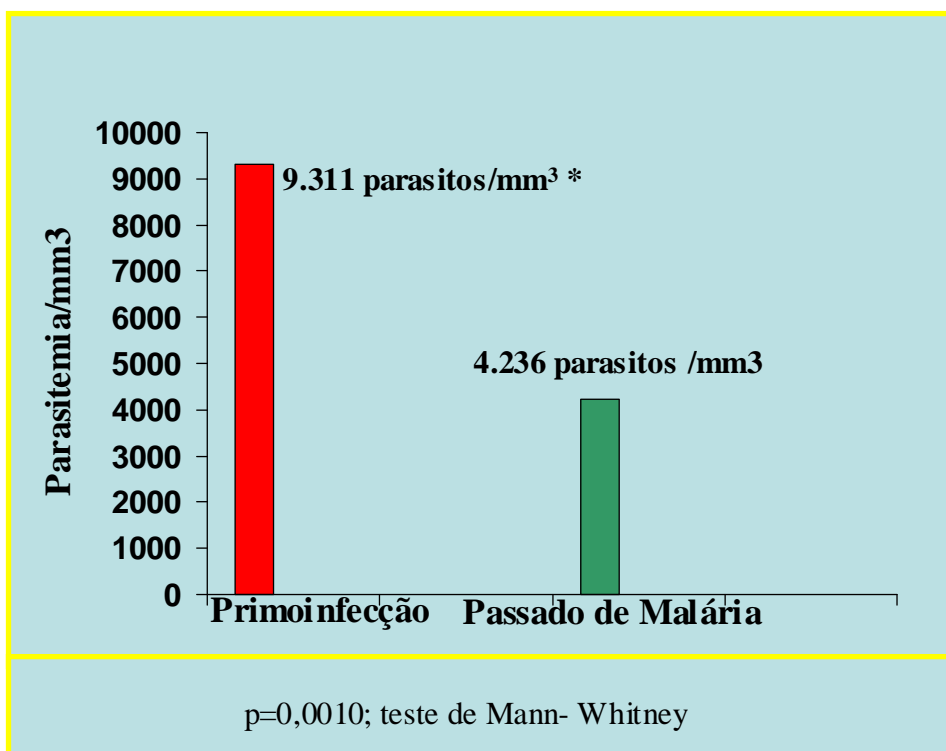


Figura 6.1- Média de formas assexuadas de *P. vivax*/mm³ no sangue de crianças e adolescentes com malária segundo subgrupo: primoinfecção e passado de malária.

Observou-se também associação entre o desaparecimento da parasitemia e a presença ou ausência de passado malárico (p=0,0001, teste do Qui-quadrado de partição). O clareamento da parasitemia ocorreu até D2 (terceiro dia de tratamento) em 75,6% e até D3 (quarto dia de tratamento) em 100% das crianças e adolescentes que já tinham tido malária. Por outro lado, naquelas com primoinfecção, menos da metade (42,4%) apresentava gota espessa negativa em D2. No dia subsequente (D3), houve um aumento para 90,1%, porém o restante teve gota espessa negativa no quinto ou no sexto dia de tratamento.

6.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA MALÁRIA *vivax*:

Os sinais e sintomas em crianças e adolescentes com malária *vivax* no primeiro dia de atendimento (D0) estão representados na Figura 2, onde se observa que os componentes da tríade malárica, febre, calafrio e cefaléia estiveram presentes respectivamente em 92,6%, 90,1% e em 77,8%.

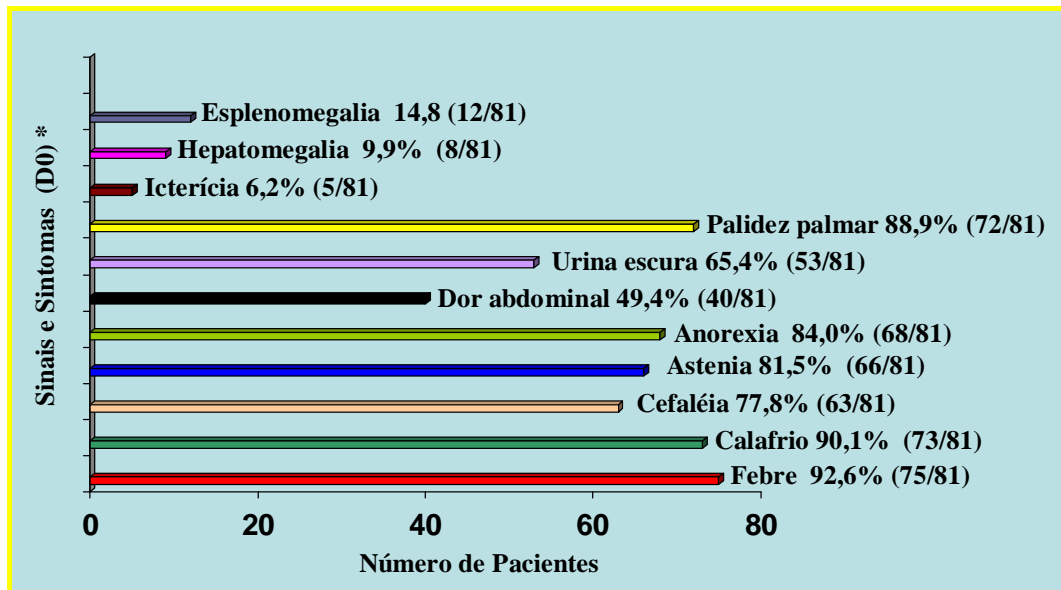


Figura 6.2 - Sinais e sintomas de crianças e adolescentes com malária *vivax* no primeiro dia de atendimento.

No grupo com malária, a palpação abdominal revelou 9,9% (8/81) de hepatomegalia (média de 1,5 cm, abaixo do rebordo costal direito) e 14,8% (12/81) de esplenomegalia (média de 2 cm, abaixo do rebordo costal esquerdo).

A frequência da tríade malária foi similar nos pacientes com primoinfecção e naquelas com passado de malária ($p=0,6125$, teste do Qui-Quadrado de partição).

A palidez foi um evento mais frequentemente observado no grupo com malária (88,9%; 72/81) do que no grupo de crianças e adolescentes controle (64,5%; 19/31).

Nos pacientes, a sensibilidade da palidez em diagnosticar anemia foi de 77,1%, enquanto que a especificidade foi de 55,5%.

A avaliação clínica de palidez pela inspeção da palma da mão mostrou-se útil como diagnóstico presuntivo de anemia ($p=0,0139$, teste de Mac Nemar).

- Evolução das manifestações clínicas:

A Figura 6.3 apresenta a evolução dos sinais e sintomas observados no dia do diagnóstico e nos dias subsequentes de acompanhamento. Em D3-D4 (respectivamente quarto e quinto dia de tratamento) verifica-se que houve um declínio acentuado da febre, do calafrio e da cefaléia. Em D7, os pacientes não se queixavam mais de febre, embora, um pequeno número ainda referisse calafrio e principalmente cefaléia, que não foram mais mencionados em D30. Sintomas tais como anorexia, astenia e dor abdominal também foram diminuindo gradativamente, entretanto, ainda foram citados no primeiro controle de cura (D30). A palidez, presente em 88,9% (72/81) em D0, persistiu com frequência elevada durante todo o seguimento, respectivamente 80% em D7 e 28,4% em D30. A icterícia foi observada em um número reduzido de pacientes, praticamente desaparecendo em D7. Em algumas crianças e adolescentes houve referência de que a urina se apresentava de coloração escura até o final do tratamento. A hepatoesplenomegalia não foi mais detectada pela palpação abdominal em D7.

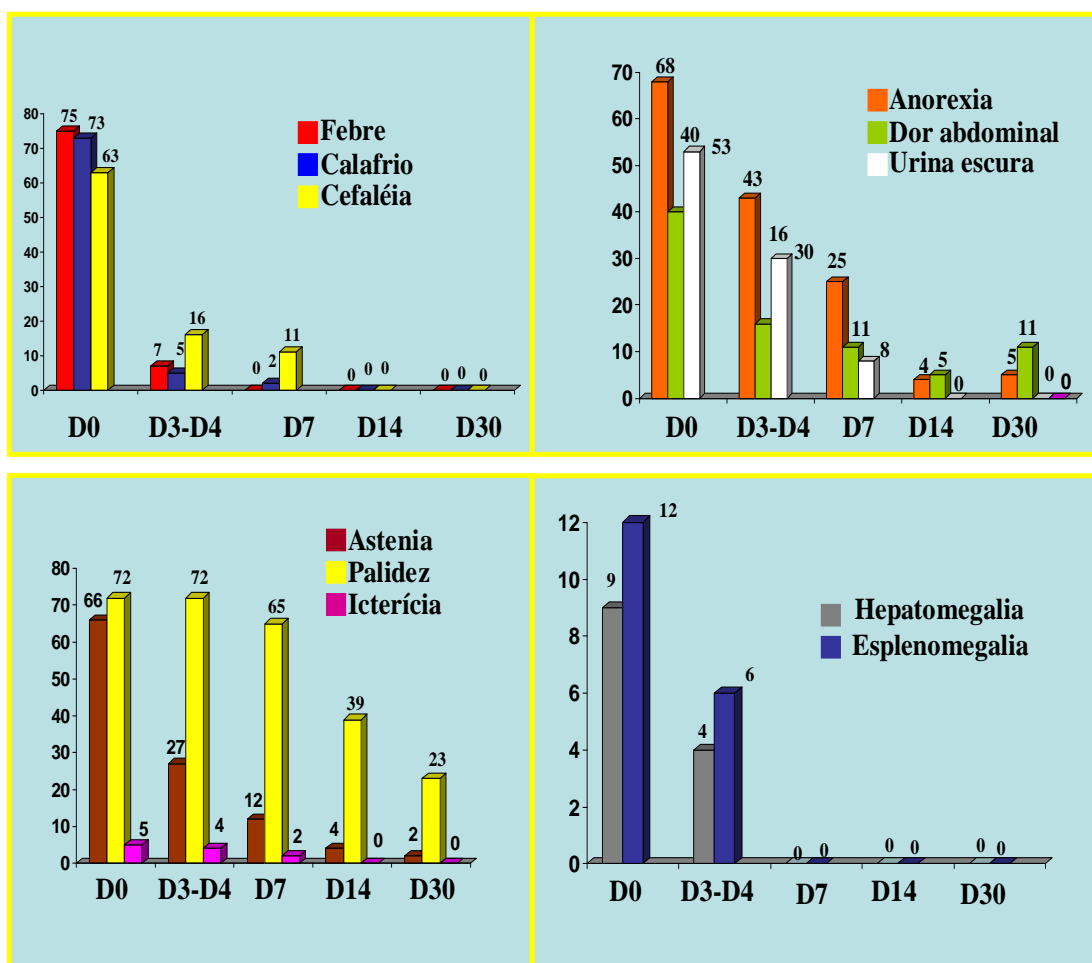


Figura 6.3- Evolução dos sinais e sintomas de crianças e adolescentes com malária *vivax* do primeiro dia de atendimento até o primeiro controle de cura.

- Evolução ponderal durante acompanhamento clínico em crianças e adolescentes com malária vivax:

No primeiro dia de atendimento (D0) foram aferidos peso e altura permitindo caracterizar o estado nutricional dos grupos estudados (Tabela 1). Durante o acompanhamento clínico, aferiu-se somente o peso em D7 e D30, sem que houvesse diferença significativa nos valores observados ($p=0,9521$, teste de Kruskal-Wallis): Em D0, a média de peso foi de $36,1 \pm 17,9$ kg, com redução para $35,6 \pm 17,8$ kg no final do tratamento (em D7) e com aumento para $36,7 \pm 18,7$ kg) no primeiro controle de cura (em D30).

6.4. ANEMIA NA MALÁRIA vivax:

Os pacientes com malária tiveram 2,7 vezes mais chance de apresentar anemia do que indivíduos do grupo controle [OR= 2,6690, $p=0,0258$, IC(95%)=1,1975 - 5,9487]. A anemia foi significativa nas crianças e adolescentes com malária ($p=0,0001$; teste de Mann-Whitney), com média de hemoglobina de $11,2 \pm 1,93g\%$ contrastando com o valor médio de $12,3 \pm 1,17g\%$ no grupo controle (Figura 6.4). Os valores mínimos encontrados para a taxa de hemoglobina foram respectivamente de 5,1g% e 10,0g% para os pacientes e indivíduos do grupo controle.

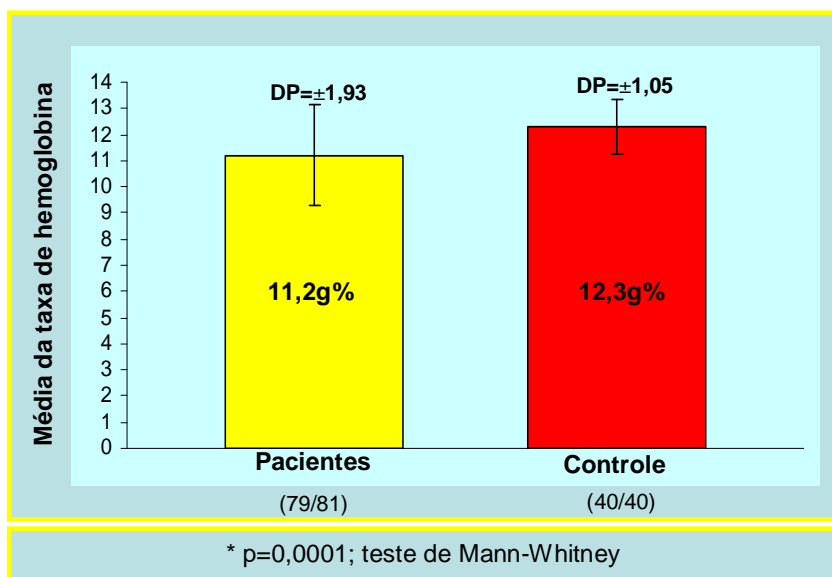


Figura 6.4 - Comparação da taxa média de hemoglobina no grupo com malária e no grupo controle.

Pacientes com primoinfecção ou com passado de malária tiveram taxas médias similares de hemoglobina, respectivamente $11,1 \pm 2,32\text{g\%}$ e $11,2 \pm 1,57\text{g\%}$ ($p=0,8629$, teste de Mann-Whitney).

A Figura 6.5 apresenta a distribuição da anemia, observada em 75% (59/79) dos pacientes e em 52,5% (21/40) dos indivíduos do grupo controle ($p=0,0258$, teste do qui-quadrado, pós correção de Yates), segundo a intensidade: leve, moderada, grave. No grupo com malária, 66,1% possuíam anemia leve, 30,5% moderada e 3,4% anemia grave. No grupo controle observou-se somente anemia leve.

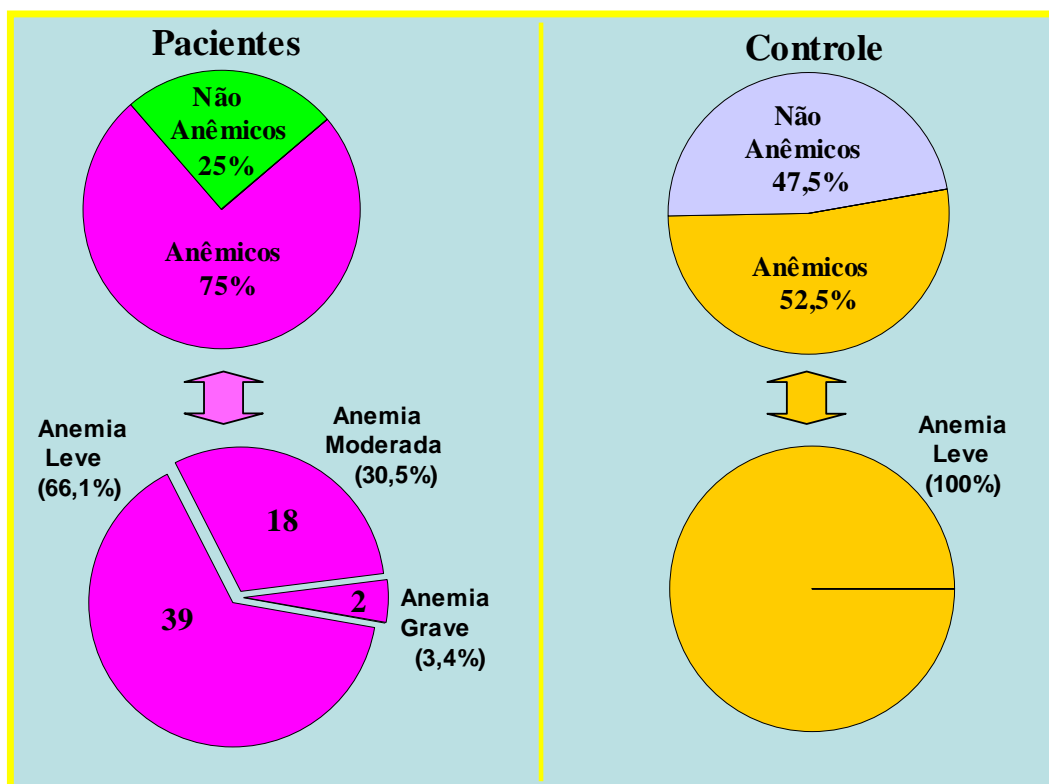


Figura 6.5- Distribuição da anemia (leve, moderada, grave) no grupo com malária e no grupo controle.

O percentual de anemia leve foi similar nos dois grupos ($p=0,2503$, qui-quadrado). Entretanto, a anemia moderada foi significativamente mais freqüente nos pacientes com malária ($p=0,0002$, teste exato de Fisher, bilateral). Ainda nesse grupo, foram observados casos de anemia grave, ausentes no grupo controle, mas esta diferença não alcançou significância estatística. Considerando-se, porém, conjuntamente anemia moderada/grave, houve significância no grupo com malária ($p=0,0001$, não anêmicos x anemia moderada/grave, $p=0,0010$, anemia leve x anemia moderada/grave, teste exato de Fisher, bilateral) (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 - Comparação dos diferentes graus de anemia em crianças e adolescentes com malária e em indivíduos do grupo controle.

| Intensidade da Anemia | Pacientes | Controles | Valor de p |
|-----------------------|-----------|-----------|---------------------------|
| Não Anêmicos | 20 | 19 | 0,2503 ^a |
| Anemia Leve | 39 | 21 | |
| Não Anêmicos | 20 | 19 | 0,0002^b |
| Anemia Moderada | 18 | 0 | |
| Não Anêmicos | 20 | 19 | 0,4902 ^b |
| Anemia Grave | 2 | 0 | |
| Não Anêmicos | 20 | 19 | 0,0001^b |
| Anemia Moderada/Grave | 20 | 0 | |
| Anemia Leve | 39 | 21 | 0,0020^b |
| Anemia Moderada | 18 | 0 | |
| Anemia Leve | 39 | 21 | 0,5447 ^b |
| Anemia Grave | 2 | 0 | |
| Anemia leve | 39 | 21 | 0,0010^b |
| Anemia Moderada/Grave | 20 | 0 | |

a) Teste do Qui-quadrado, pós correção de Yates

b) Teste exato de Fisher, bilateral

6.5. FATORES INDUTORES DE ANEMIA:

6.5.1. Defeitos enzimáticos dos eritrócitos, hemoglobinopatias

A deficiência de glicose 6 fosfato desidrogenase foi detectada em 3,8% (3/80) dos pacientes com malária e em 6,1% (2/33) dos indivíduos do grupo controle. Ao contrário do traço falciforme (Hb AS): um caso entre os pacientes (1,2%; 1/80) e um caso no grupo controle (3%; 1/34), a doença falciforme (Hb SS) não foi observada (Figura 6.6).

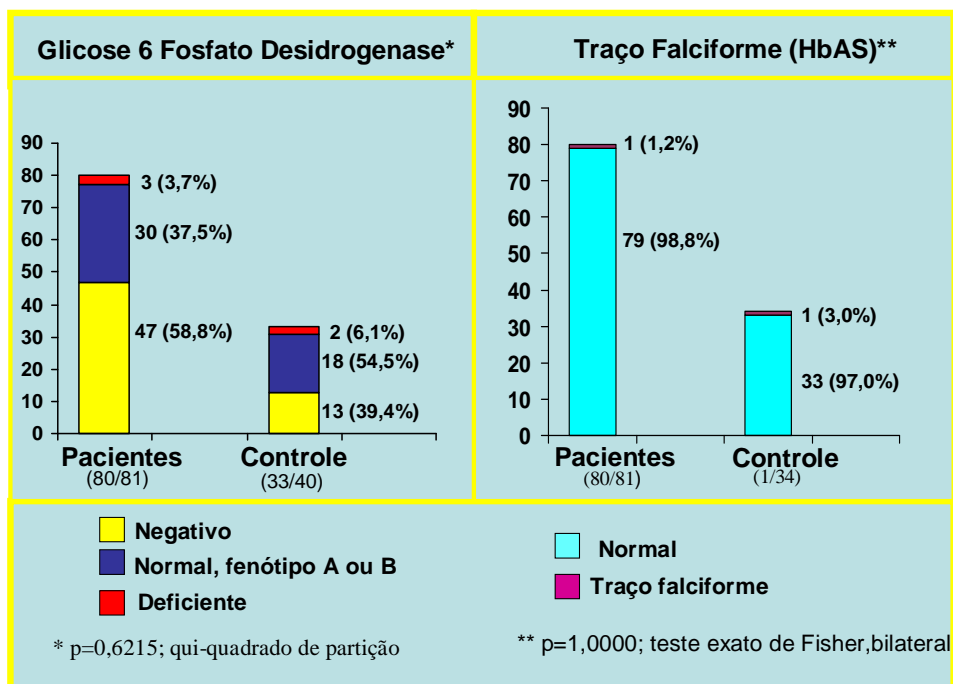


Figura 6.6 - Frequência de glicose 6 fosfato desidrogenase e do traço falciforme no grupo com malária e no grupo controle.

A Tabela 6.4 informa sobre presença ou ausência de anemia em portadoras de deficiência de glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD) ou com traço falciforme em crianças e adolescentes com malária *vivax* e naquelas pertencentes ao grupo controle.

Tabela 6.4 - Avaliação individual da taxa de hemoglobina de crianças e adolescente com malária e sem malária com deficiência de glicose 6 fosfato desidrogenase ou com traço falciforme.

| | Taxa de Hemoglobina | |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Paciente | Controle |
| Deficiência de G ₆ PD | 13,6 g% (não anêmico) | 13,5g% (não anêmico) |
| | 11,7g% (anemia leve) | 11,7 g% (anemia leve) |
| | 11,4g% (anemia leve) | |
| Traço falciforme | 11,8g% (anemia leve) | 11,7g% (anemia leve) |

Mesmo excluindo-se os indivíduos portadores de deficiência de G6PD ou com traço falciforme, os resultados observados na Figura 4 se mantiveram inalterados: presença de anemia significativa em crianças e adolescentes com malária (p=0,0001; teste de Mann-Whitney).

6.5.2. Estado Nutricional

As crianças e adolescentes com malária *vivax* e as do grupo controle eram na maioria eutróficas (Tabela1). A desnutrição, presente em 6,2% do grupo com malária e em 13,3% do grupo controle, não esteve associada à anemia ($p= 0,5891$, teste do qui-quadrado de partição).

6.5.3. Parasitoses Intestinais

Houve uma distribuição homogênea de positividade no exame de fezes para helmintos e protozoários nos grupos estudados ($p=0,5632$, teste do qui-quadrado). *Ascaris lumbricoides*, *Trichocephalus trichiurus*, *Enterobius vermicularis*, *Ancilostomídeos*, *Strongiloides stercoralis*, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica* foram observados isolados e/ou em associação, respectivamente em 78,5% (62/79) das crianças e adolescentes com malária *vivax* e em 71,4% (35/40) no grupo controle.

Dentre as crianças e adolescentes com malária, 57% albergavam somente uma espécie de parasito intestinal, 27,8% duas espécies e o restante, 14,7%, três ou mais espécies de parasitos intestinais.

Não foi observada relação entre anemia e positividade no exame parasitológico de fezes em crianças e adolescentes com ou sem malária *vivax* (respectivamente, $p=0,3389$, $p=1,0000$, testes de Fisher). Essa ausência de relação entre os dois parâmetros se manteve ao se estratificar os exames de fezes positivos para ancilostomídeos (isoladamente ou em associação) em ambos os subgrupos ($p= 0,2062$, $p=0,9995$, testes de Fisher, respectivamente para o grupo de malária *vivax* e para o grupo controle).

6.5.4. Intervalo de tempo decorrido para diagnóstico de malária

O tempo decorrido entre o início da sintomatologia e o diagnóstico de malária (gota espessa) variou de 1 a 45 dias, com média de $6,2 \pm 6,5$ dias e mediana de 4 dias.

Na Tabela 6.5 observa-se que o intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico apresentou correlação positiva com a parasitemia ($p= 0,0037$, $rs= 0,3266$, correlação linear de Spearman) e tendência para um resultado significativo para a taxa de hemoglobina.

Tabela 6.5 - Correlação entre o intervalo de tempo para o diagnóstico com a parasitemia e da parasitemia com a taxa de hemoglobina em crianças e adolescentes com malária.

| Variáveis | Teste Estatístico | Valor de p |
|--|--|-----------------|
| Intervalo de tempo para o diagnóstico x Parasitemia (77/81) | Coefficiente de Spearman (rs= 0,3266) | p=0,0037 |
| Parasitemia x Taxa de hemoglobina (75/81) | Correlação de Spearman (rs= 0,2022) | p=0,0738 |

Com a finalidade de verificar se a correlação entre intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico e parasitemia poderia sofrer influência do estado imunitário do indivíduo (avaliado indiretamente pelo passado de malária), introduziu-se uma terceira variável (variável Z): história pregressa de malária. Observou-se que quanto maior o número de episódios de malária apresentado pelo paciente, mais fraca era a correlação entre tempo de doença e parasitemia ($p=0,0011$, $r_{XY} = - 0,0377$; $p=0,0038$, $r_{X Y.Z} = - 0,3391$, correlação parcial).

A tendência observada para a correlação intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico e a taxa de hemoglobina (Tabela 6.5) pode ser confirmada pela análise de regressão múltipla. Neste teste, a taxa de hemoglobina foi influenciada pelo intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico e pelo desaparecimento da parasitemia, dentre outras variáveis analisadas (número de episódios de malária, parasitemia, ferritina) ($p=0,0030$; $p=0,0002$ para intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico e $p= 0,0259$ para o desaparecimento da parasitemia; Regressão linear múltipla).

Do mesmo modo, o intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico também esteve associado com a intensidade da anemia, moderada e moderada/grave, apresentada pelo pacientes ($p<0,05$, teste de Mann-Whitney) (Tabela 6.6).

Tabela 6.6 - Relação entre intensidade da anemia e o intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico de malária *vivax* em crianças e adolescentes.

| Intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico de malária <i>vivax</i> (Média, Desvio Padrão) | | Valor de p* |
|---|---|---------------|
| | Anemia Leve (5,1 ± 3,9 dias) | 0,3169 |
| Não Anêmicos (4,0 ± 3,1 dias) | Anemia Moderada (7,4 ± 5,9 dias) | 0,0452 |
| | Anemia Moderada/Grave (8,6 ± 6,7 dias) | 0,0167 |
| Anemia Leve (5,1 ± 3,9 dias) | Anemia Moderada (7,4 ± 5,9 dias) | 0,1778 |
| | Anemia Moderada/Grave (8,6 ± 6,7 dias) | 0,0599 |

*Teste de Mann-Whitney

6.6. PERFIL HEMATOLÓGICO NA MALÁRIA *vivax*:

6.6.1. Avaliação da morfologia dos eritrócitos

Os dados da Figura 6.7 se referem às alterações na morfologia dos eritrócitos avaliada no distendido sanguíneo (esfregaço periférico) tais como anisocitose, poiquilocitose, microcitose, anisopoiquilocitose, hipocromia (isoladas ou associadas), significativas no grupo com malária (24,3%; 18/74) (p=0,0416, teste exato de Fisher, bilateral).

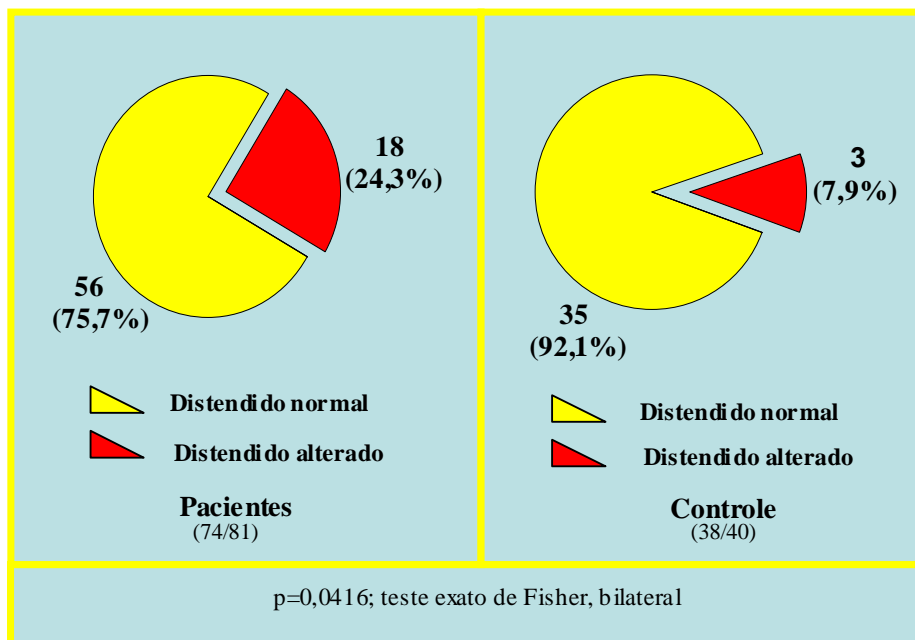


Figura 6.7- Distendido sanguíneo (esfregaço) em crianças e adolescentes com malária e sem malária (grupo controle)

Durante o acompanhamento clínico-laboratorial dos pacientes com malária observou-se uma diminuição nas alterações dos eritrócitos no distendido sanguíneo em D0, em D7 e em D30: respectivamente 22,4% (15/67), 16,4% (11/67) e 1,5% (1/67). O declínio na prevalência foi significativa entre D7 e D0 (p=0,0112, teste dos sinais, bilateral) e entre D30 e D7 (p=0,0009, teste dos sinais, bilateral) (Figura 6.8).

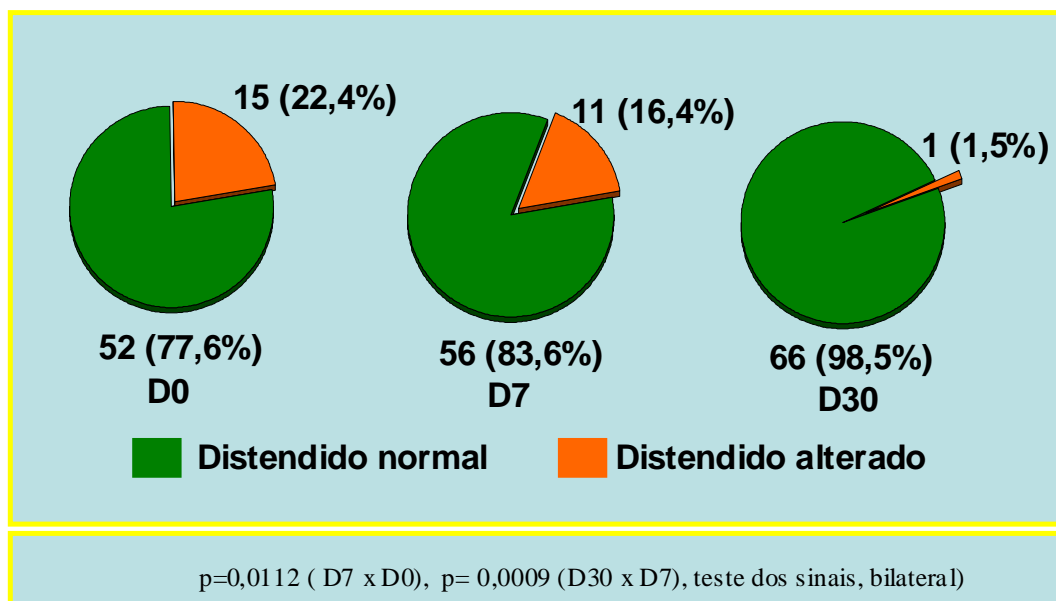


Figura 6.8 – Resultado dos exames de distendido sanguíneo no primeiro dia de atendimento (D0), no final do tratamento (D7) e no primeiro controle de cura (D30) em crianças e adolescentes com malária (amostra pareada).

6.6.2. Série Vermelha

A Tabela 6.7 apresenta os componentes da série vermelha na casuística estudada, em que se verifica que os valores médios de hemoglobina, eritrócitos e hematócrito foram significativamente menores nos pacientes do que no grupo controle ($p=0,0001$, teste de Mann-Whitney). Por outro lado, o grupo controle teve média de HCM (hemoglobina corpuscular média) e média de CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) significativamente menores do que àquelas observadas nas crianças e adolescentes com malária (respectivamente, $p=0,0465$; $p=0,0001$, teste de Mann-Whitney).

Tabela 6.7 - Valores dos componentes da série vermelha (média e desvio padrão) em crianças e adolescentes com malária e no grupo controle.

| | Pacientes | | Controle | | Valor de p* |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|
| | Média | ± DP | Média | ± DP | |
| Hemoglobina (g%) | 11,2 | ± 1,93 | 12,3 | ± 1,05 | 0,0001 |
| Eritrócitos (mm ³) | 4.094,177 | ± 704.985 | 4.699,743 | ± 484.862 | 0,0001 |
| Hematócrito (%) | 33,3 | ± 5,72 | 37,60 | ± 3,50 | 0,0001 |
| VCM (fL) | 81,73 | ± 4,92 | 80,46 | ± 6,02 | 0,3732 |
| HCM (%) | 27,28 | ± 2,04 | 26,29 | ± 2,41 | 0,0465 |
| CHCM (%) | 33,46 | ± 1,07 | 32,65 | ± 0,92 | 0,0001 |
| RDW (%) | 14,9 | ± 2,32 | 14,25 | ± 2,40 | 0,3571 |

* Teste de Mann-Whitney

A interpretação dos índices hematimétricos demonstra que nas crianças e adolescentes com malária houve um predomínio de anemia normocítica e normocrômica (55,7%; 44/79) enquanto que no grupo controle, 44,8% (17/38) apresentavam anemia do tipo microcítica e hipocrômica.

O índice de variação no volume dos eritrócitos (RDW) foi similar nos grupos estudados ($p=0,3571$, teste de Mann-Whitney), com média de $14,9 \pm 2,3\%$ nos pacientes e $14,2 \pm 2,4\%$ nas crianças e adolescentes do grupo controle.

6.6.3. Série Branca

Valores significativamente mais baixos de leucócitos foram observados no grupo com malária em relação ao grupo controle ($p=0,0001$, teste de Mann-Whitney), respectivamente 4.839 ± 2.021 leucócitos/mm³ para o primeiro grupo e de 7.137 ± 2.284 leucócitos/mm³ para o segundo. Os pacientes apresentaram um valor mínimo de 1.400 leucócitos /mm³ enquanto nos indivíduos do grupo controle este valor foi de 3.300 leucócitos/ mm³.

A maioria (64,5%; 51/79) das crianças e adolescentes com malária apresentou leucócitos na faixa de normalidade, 34,2% (27/79) tiveram leucopenia (valores abaixo de 4.000 leucócitos/mm³) e 1,3% (1/79) leucocitose.

Na Figura 6.9 observa-se a contagem diferencial dos leucócitos (em números absolutos) entre os pacientes e indivíduos do grupo controle. As crianças e adolescentes com malária apresentaram valores médios significativamente menores de eosinófilos, de segmentados e de linfócitos e significativamente maiores de bastões ($p<0,05$, testes de Mann-

Whitney). A média de basófilos e monócitos foi semelhante nos dois grupos ($p>0,05$; testes de Mann-Whitney).

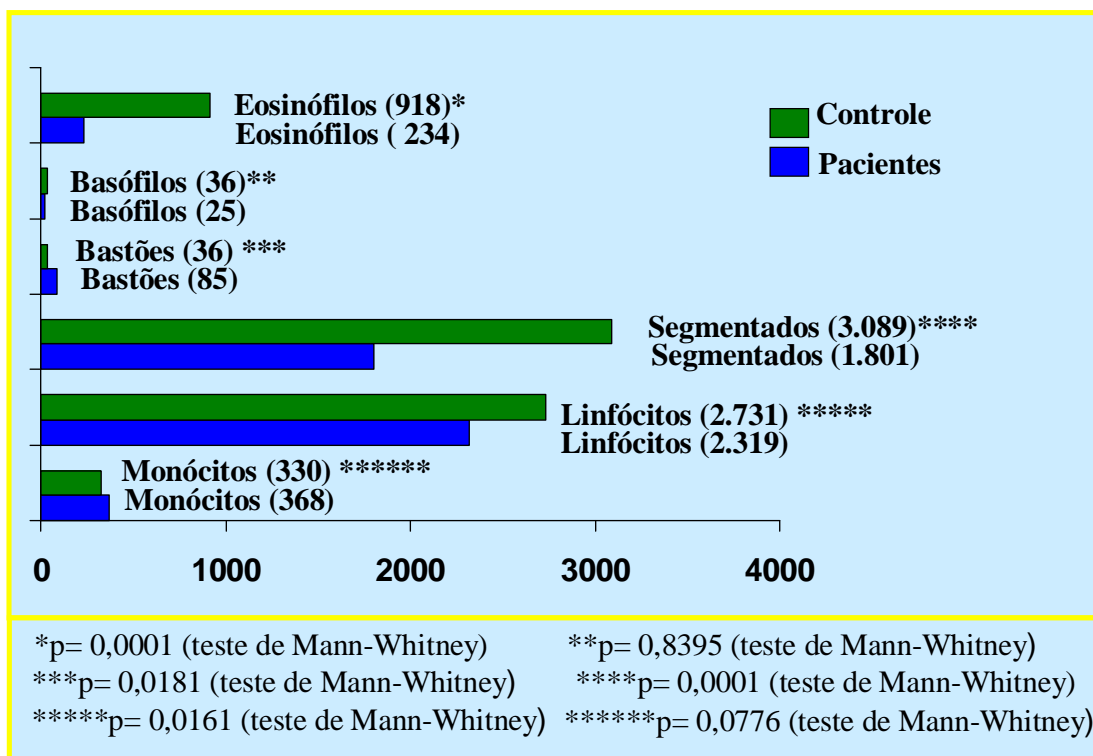


Figura 6.9 - Contagem diferencial média de leucócitos (em números absolutos) em crianças e adolescentes com malária e sem malária (grupo controle)

6.6.4. Série Plaquetária

Os pacientes apresentaram média de plaquetas ($138.405 \pm 85.375/\text{mm}^3$) significativamente menor do que nos indivíduos do grupo controle ($274.789 \pm 82.860/\text{mm}^3$) ($p=0,0001$, teste de Mann-Whitney). Plaquetopenia (valores abaixo de $150.000/\text{mm}^3$) foi observada em 67,1% (53/79) destes pacientes. Nestas crianças e adolescentes com plaquetopenia, 7,5% (4/53) apresentavam plaquetas abaixo de $50.000/\text{mm}^3$, sem evidência de sangramento.

O valor mínimo observado foi de 14.000 plaquetas/ mm^3 em crianças e adolescentes com malária e de 156.000 plaquetas/ mm^3 naquelas sem malária.

Houve uma correlação positiva, porém destituída de significância, entre a contagem de plaquetas e a taxa de hemoglobina ($p=0,5170$, $r_s=0,0740$, Correlação linear de Spearman).

A Tabela 6.8 apresenta um resumo das diferenças significativas nos valores de hemoglobina, leucócitos e plaquetas nas crianças e adolescentes com malária em relação ao grupo controle.

Tabela 6.8- Hemograma em crianças e adolescentes com malária e no grupo controle.

| Hemograma | Pacientes Média ± DP | Controle Média ± DP | Valor do p* |
|--------------------------------|-------------------------|------------------------|---------------|
| Hemoglobina (g%) | 11,2 ± 1,93 | 12,3 ± 1,17 | 0,0001 |
| Hematócrito (%) | 33,3 ± 5,72 | 37,3 ± 3,85 | 0,0001 |
| Eritrócitos (mm ³) | 4.094,177 ± 704.985 | 4.626,938 ± 496.454 | 0,0001 |
| VCM (fL) | 81,73 ± 4,92 | 81,02 ± 5,85 | 0,4838 |
| HCM (%) | 27,28 ± 2,04 | 26,67 ± 2,44 | 0,1810 |
| CHCM (%) | 33,46 ± 1,07 | 32,89 ± 1,11 | 0,0029 |
| Leucócitos (mm ³) | 4.839 ± 2.021 | 7.137 ± 2.284 | 0,0001 |
| | Média | Média | |
| Basófilos (mm ³) | 25 | 38 | 0,5816 |
| Eosinófilos (mm ³) | 234 | 1.012 | 0,0001 |
| Bastões (mm ³) | 85 | 35 | 0,0118 |
| Segmentados (mm ³) | 1.801 | 2.850 | 0,0005 |
| Linfócitos (mm ³) | 2.319 | 2.831 | 0,0019 |
| Monócitos (mm ³) | 368 | 361 | 0,6820 |
| Plaquetas (mm ³) | 138.405 ± 85.375 | 274.789 ± 82.860 | 0,0001 |

* Teste de Mann-Whitney

Na Tabela 6.9 observa-se que, à exceção das plaquetas que apresentaram valores médios significativamente menores nos primoinfectados do que naqueles com passado de malária (p=0,0001, teste de Mann-Whitney), os demais elementos do hemograma foram semelhantes em ambos os subgrupos.

Tabela 6.9 - Hemograma em crianças e adolescentes com malária *vivax* com primoinfecção ou com história anterior de malária.

| D0 | Primoinfecção (X ± DP) | História anterior de malária (X ± DP) | Valor de p * |
|-------------|--------------------------------------|--|----------------|
| Hemoglobina | 11,1 ± 2,32 g% | 11,2 ± 1,57 g% | 0,8629* |
| Eritrócitos | 4.072,571 ± 858.570 /mm ³ | 4.111,363 ± 563.917/mm ³ | 0,6749* |
| Hematócrito | 32,94 ± 6,70% | 33,57 ± 4,90% | 0,4385* |
| Leucócitos | 4.980 ± 1.922/mm ³ | 4.727 ± 2.113/mm ³ | 0,6009* |
| Plaquetas | 115.971 ± 71.630/mm ³ | 156.250 ± 91.812/mm ³ | 0,0001* |

* Teste de Mann-Whitney

6.6.5. Reticulócitos

As crianças e adolescentes com malária e as pertencentes ao grupo controle apresentaram reticulócitos dentro dos valores considerados normais (0,5 a 1,5%). Entretanto, como observado na Figura 6.10, a média de reticulócitos foi significativamente maior naquelas com malária ($p=0,0062$, teste de Mann-Whitney).

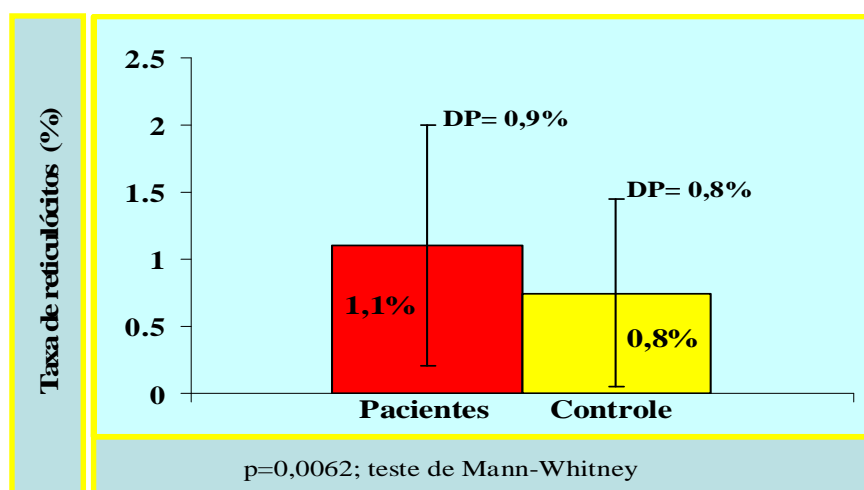


Figura 6.10- Média de reticulócitos em pacientes e indivíduos do grupo controle.

6.6.6. Ferritina

Os valores médios de ferritina, dosada em 86,5% (70/81) dos pacientes e em 77,5% (31/40) dos indivíduos do grupo controle foram respectivamente $262 \pm 173,0$ ng/ml e $51 \pm 52,9$ ng/ml, dentro dos padrões de referência (30 a 300 ng/ml). Entretanto, as crianças e adolescentes com malária tiveram valores significativamente mais elevados do que os apresentados pelo grupo controle ($p=0,0001$, teste de Mann-Whitney).

Os valores mais elevados de ferritina no grupo com malária estiveram significativamente presentes em crianças e adolescentes com primoinfecção pela malária ($315 \pm 168,4$ ng/ml) do que naquelas com passado de malária ($224 \pm 168,3$ ng/ml) ($p=0,0182$, teste de Mann-Whitney).

Os níveis de ferritina sérica foram diretamente proporcionais à taxa média de hemoglobina circulante nos pacientes, porém sem significância ($p=0,5495$, $rs=0,0727$, correlação linear de Pearson).

A correlação entre parasitemia e taxa de hemoglobina não foi significativa, o oposto do observado para os leucócitos e para a ferritina, que apresentaram uma correlação positiva e significativa. As plaquetas também tiveram uma correlação significativa, mas negativa com a parasitemia. (Tabela 6. 1)

Tabela 6.10. Correlação entre parasitemia e média de hemoglobina, de leucócitos, de plaquetas e de ferritina sérica em crianças e adolescentes com malária *vivax*.

| Variáveis | Correlação de Spearman | Valor de p |
|--|--|-------------------------------|
| Parasitemia x Hemoglobina (D0) (76/81) | Coeficiente de Spearman ($rs= 0,1513$) | $p=0,1918$ |
| Parasitemia x Leucograma (75/81) | Coeficiente de Spearman ($rs= 0,2309$) | $p= 0,0461$ |
| Parasitemia x Contagem de plaquetas (75/81) | Coeficiente de Spearman ($rs= -0,2371$) | $p= 0,0405$ |
| Parasitemia x Ferritina sérica (66/81) | Coeficiente de Spearman ($rs= 0,3138$) | $p=0,0102$ |

ACOMPANHAMENTO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM MALÁRIA *vivax*:

6.7.1. Série Vermelha

A Figura 6.11 apresenta a evolução dos níveis de hemoglobina. Observa-se que a média de hemoglobina apresentada pelos pacientes no início do tratamento ($11,2 \pm 1,91\text{g\%}$) se manteve em D7 ($11,0 \pm 1,51\text{ g\%}$), antes de se elevar significativamente em D30 ($12,4\% \pm 1,29\text{ g\%}$) ($p= 0,0001$; D30 x D0, D30 x D7, teste de Friedman). Os valores mínimos encontrados em D0 e em D7 foram compatíveis com anemia grave (respectivamente, $\text{Hb}=5,1\text{g\%}$ e $\text{Hb}=6,4\text{g\%}$) e em D30 com anemia moderada ($\text{Hb}=9,8\text{g\%}$).

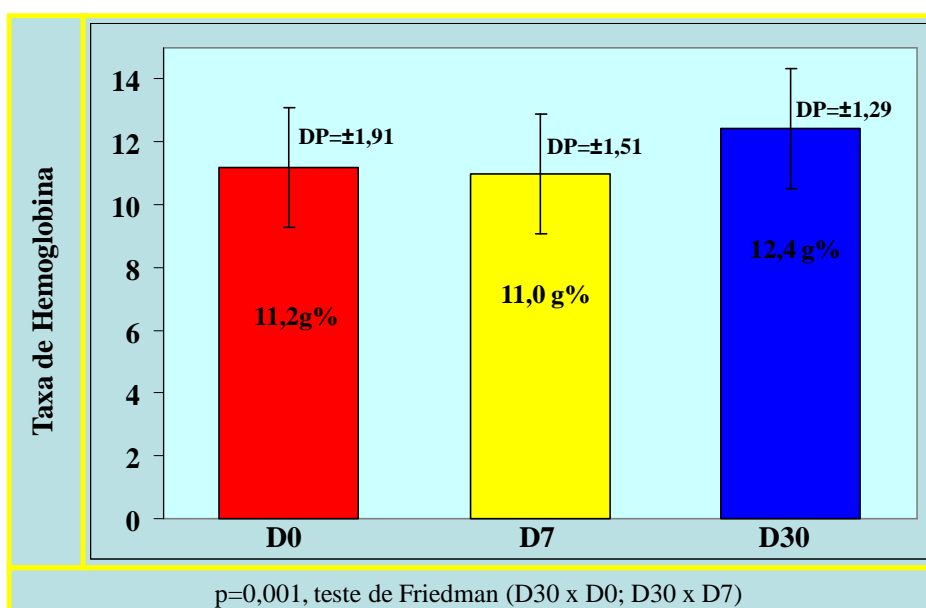


Figura 6.11- Média de Hemoglobina ao primeiro dia de atendimento (D0), ao final do tratamento (D7) e ao primeiro controle de cura (D30) em crianças e adolescentes com malária (amostra pareada).

No final do tratamento, 83%(67/81) das crianças e adolescentes apresentavam anemia. Desse total, 67,2% (45/67) tinham anemia leve, 31,3% (21/67) anemia moderada e 1,5% (1/67) anemia grave. No primeiro controle de cura, embora um pouco mais da metade não

apresentasse mais anemia, essa ainda foi observada em 45,3% (34/75) das crianças e adolescentes. Dentre àquelas com anemia, 94,1% tinham anemia leve e o restante, anemia moderada.

No primeiro controle de cura (D30) verifica-se, na Figura 6.12, que houve uma elevação significativa da média do hematócrito ($p=0,0001$, D30 x D0, D30 x D7, teste de Friedman) e dos eritrócitos ($p=0,0001$, D30 x D0, D30 x D7, teste de Friedman), em relação aos valores do início e do final do tratamento.

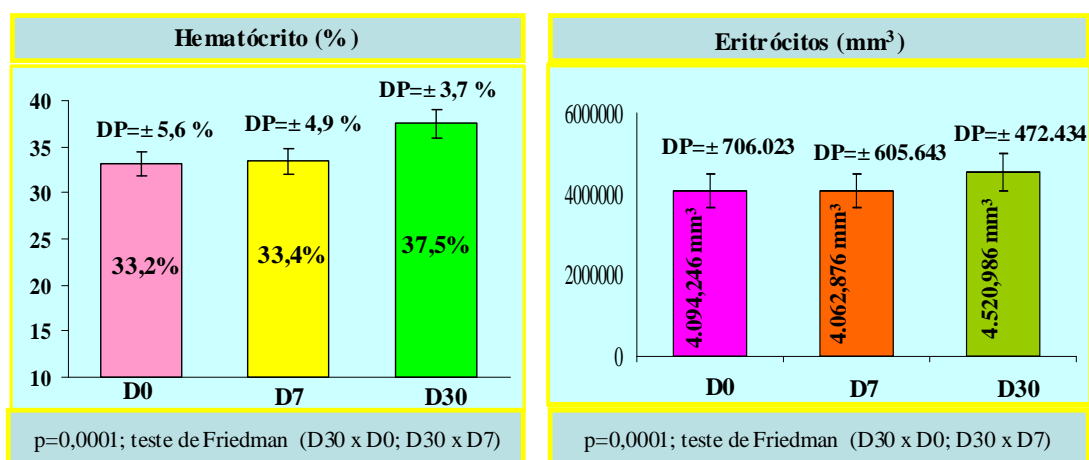


Figura 6.12- Valores médios de hematócrito e do número de eritrócitos em D0, D7 e D30 em crianças e adolescentes (amostra pareada).

O volume corpuscular médio (VCM) teve um aumento significativo durante o acompanhamento clínico de $81,6 \pm 5,0$ fL em D0 para $82,3 \pm 5,0$ fL em D7 e para $83,6 \pm 5,7$ fL em D30 ($p=0,0001$, D30 x D0; D30 x D7, teste de Friedman). A hemoglobina corpuscular média se manteve estável entre D0 (HCM= $27,2 \pm 2,1\%$) e D7 (HCM= $27,2 \pm 1,9\%$), elevando-se significativamente em D30 (HCM= $27,5 \pm 2,1\%$) ($p=0,0191$, D30 x D7, teste de Friedman). A concentração de hemoglobina corpuscular média em D30 estava significativamente diminuída (CHCM= $32,8 \pm 0,8\%$), comparada à média obtida em D7 (CHCM= $33,0 \pm 1,2\%$) e em D0 (CHCM= $33,5 \pm 1,1\%$) ($p=0,0002$, D30 x D7, D30 x D0; teste de Friedman).

Ocorreu um aumento significativo da média de reticulócitos em D7 se comparado com os resultados obtidos em D0 e em D30 ($p=0,0001$; D7 x D0; D7 x D30, teste de Friedman) (Figura 6.13).

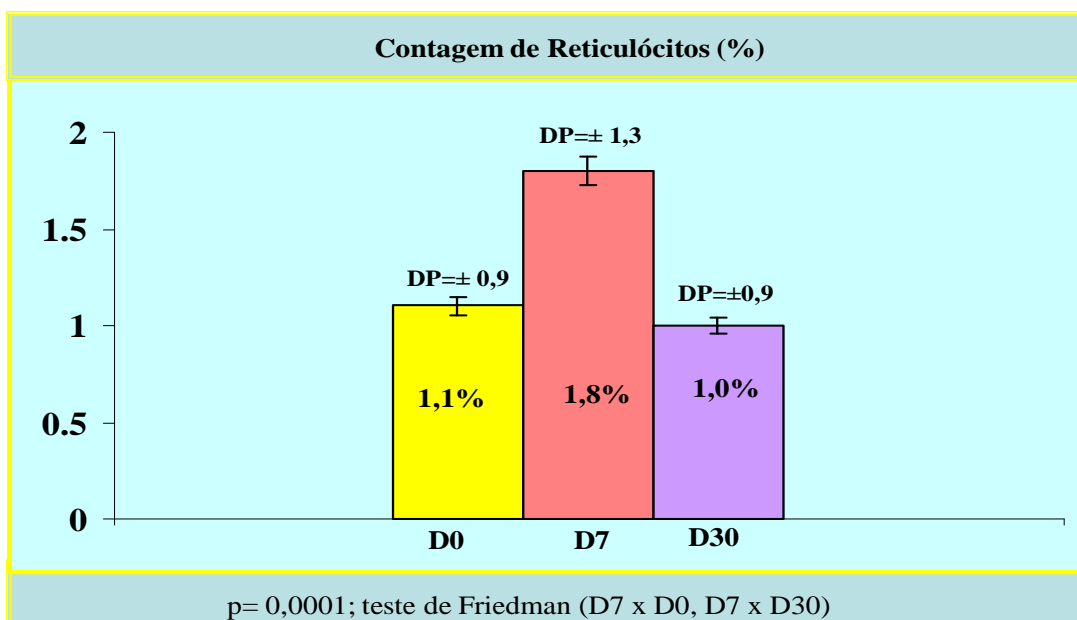


Figura 6.13- Contagem média de Reticulócitos em D0, em D7 e em D30 de crianças e adolescentes com malária (amostra pareada).

Uma relação inversamente proporcional significativa foi observada entre os reticulócitos e a taxa de hemoglobina em D0 ($p=0,0204$, $r_s= - 0,2654$, correlação de Spearman) e em D7 ($p= 0,0117$, $r_s= - 0,2822$, correlação de Spearman). Em D30, essa relação foi destituída de significância ($p= 0,1181$; $r_s=0,1858$, correlação de Spearman).

6.7.2. Série Branca

Observou-se diminuição significativa dos leucócitos em D0 (média= 4.779 ± 1.944 leucócitos/mm³) em relação aos valores médios de leucócitos de D7 e de D30, que se encontravam na faixa de normalidade ($p=0,0001$; teste de Friedman, amostra pareada).

Na Tabela 6.11 observa-se o perfil do diferencial de leucócitos na evolução clínica dos pacientes com malária: significativo aumento nos níveis dos granulócitos (segmentados e

eosinófilos, exceto os basófilos), além dos linfócitos no final do tratamento antimalárico ($p < 0,05$, testes de Friedman).

Tabela 6.11 - Comparação do perfil diferencial dos leucócitos em crianças e adolescentes com malária em D0, D7 e em D30 (amostras pareadas).

| <i>Leucograma (mm³)</i> | <i>D0</i> (<i>X ± DP</i>)* | <i>D7</i> (<i>X ± DP</i>)* | <i>D30</i> (<i>X ± DP</i>)* | <i>Valor do p**</i> |
|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---|
| Leucócitos (mm ³) | 4.779 ± 1.944 | 7.329 ± 3.573 | 7.231 ± 2.222 | 0,0001 (D0 x D7; D0 x D30) |
| Basófilos (mm ³) | 26 ± 48,5 | 43,2 ± 55,6 | 38,1 ± 74,8 | 0,4381 0,0001 (D0 x D7; D0 x D30; D7 x D30) |
| Eosinófilos (mm ³) | 210 ± 197,2 | 638 ± 515 | 1.189 ± 801 | 0,0010 (D0 x D30; D7 x D30) |
| Bastões (mm ³) | 80,3 ± 135,5 | 50,5 ± 94,4 | 17,0 ± 75,6 | 0,0001 (D0 x D7; D0 x D30) |
| Segmentados (mm ³) | 1.754 ± 1.249 | 3.104 ± 1.879 | 2.941 ± 1.493 | 0,0001 (D0 x D7; D0 x D30) |
| Linfócitos (mm ³) | 2.328 ± 1.041 | 3.051 ± 2.310 | 2.706 ± 981 | 0,0001 (D0 x D7; D0 x D30) |
| Monócitos (mm ³) | 364 ± 204 | 437 ± 276 | 308 ± 194 | 0,0268 (D7 x D30) |

* (X, DP)= média, desvio padrão

** Teste de Friedman

6.7.3. Série Plaquetária:

A contagem média de plaquetas em D0 (141.328 ± 87.404 plaquetas/mm³) foi significativamente menor do que aquela observada em D7 (295.328 ± 116.527 plaquetas/mm³) e em D30 (252.356 ± 59.822 plaquetas/mm³) ($p=0,0001$, teste de Friedman, D0 x D7; D0 x D30). Plaquetopenia esteve presente em 67,1% (53/79) no momento do diagnóstico, em 8,6% (7/81) no final do tratamento e em 6,6% (5/75) no primeiro controle de cura.

6.8. PERFIL IMUNOLÓGICO NA MALÁRIA *vivax*:

6.8.1. Imunoglobulinas IgG e IgM anti-*P. vivax*

A pesquisa de IgG e IgM anti-*P. vivax* por imunofluorescência indireta foi realizada em 95,1% (77/81) das crianças e adolescentes com malária e em 77,5% das do grupo controle (31/40). Como esperado, a proporção de testes reagentes para IgG (títulos iguais ou maiores que 40) foi significativamente maior no grupo de pacientes (90,9%; 70/77) do que no grupo controle (9,7%; 3/31) ($p=0,0001$; teste exato de Fisher). Anticorpos IgM foram observados somente no grupo de pacientes (63,6%; 49/77), com títulos que variaram entre 40 a 640 (Figura 6.14).

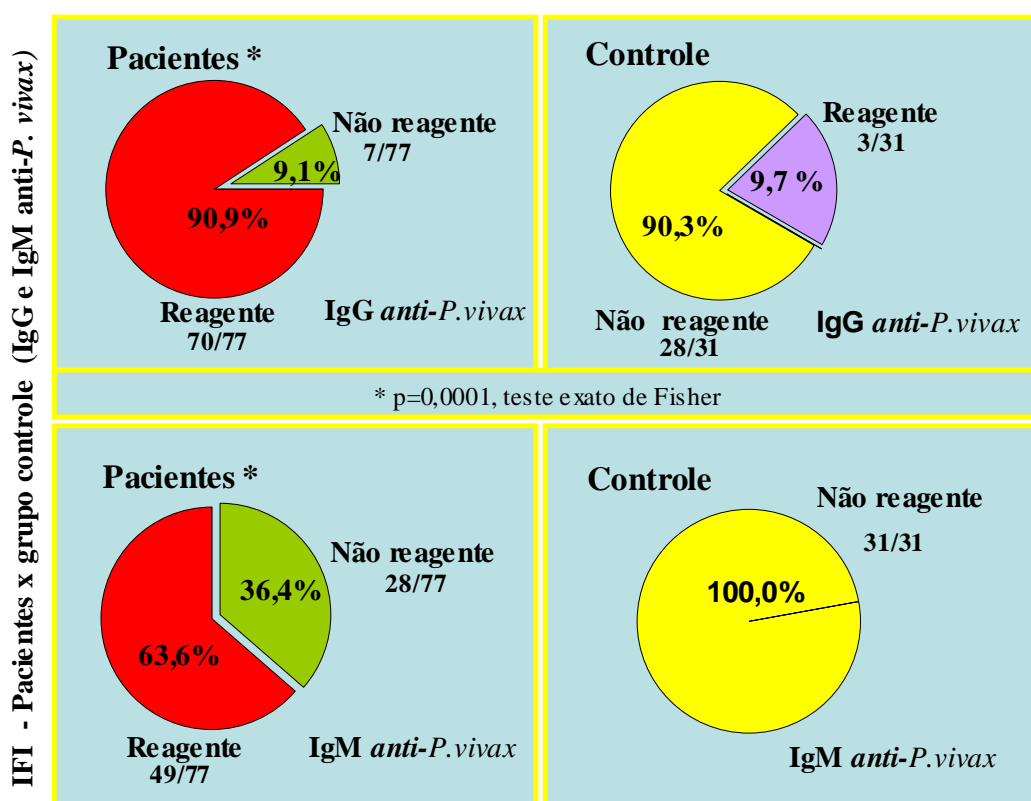


Figura 6.14 - Anticorpos IgG e IgM anti-*P. vivax* por imunofluorescência indireta em crianças e adolescentes com malária e sem malária (grupo controle).

Nos pacientes, os títulos para os anticorpos da classe IgG anti-*P. vivax* variaram entre 40 a igual ou maior que 10.240. Na Figura 6.15, observa-se a distribuição destes títulos em que 51,3% dos pacientes apresentaram títulos elevados, entre 5.120 a igual ou maior que 10.240.

Nos três indivíduos do grupo controle, reagentes para IgG anti-*P.vivax*, os títulos foram iguais a 80.

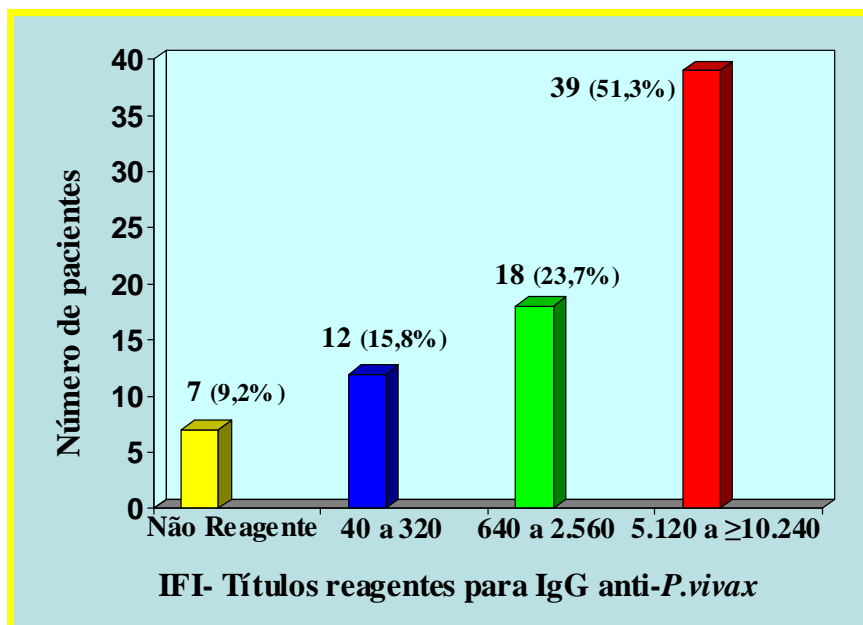


Figura 6.15- IFI- Títulos de anticorpos IgG anti-*P. vivax* em crianças e adolescentes com malária.

Houve uma relação inversamente proporcional entre parasitemia e títulos de anticorpos IgG anti-*P.vivax*, porém não significativa ($p=0,2216$, $r_s = -0,1448$, correlação linear de Spearman).

Os títulos de IgG anti-*P. vivax* não estiveram relacionados com a anemia em crianças e adolescentes com malária ($p=0,1546$, teste do qui-quadrado de partição).

Por outro lado, houve associação entre leucócitos no momento do diagnóstico e a resposta de IgG anti-*P. vivax*: a média de leucócitos foi significativamente superior ($4.878,60 \pm 2.069$ leucócitos/ mm^3) nas crianças e adolescentes com resposta IgG positiva do que naquelas não reagentes (3.328 ± 1.155 leucócitos/ mm^3) ($p=0,0382$, teste de Mann-Whitney).

Semelhante resposta também foi observada para os níveis médios de leucócitos entre os pacientes com IgM reagente e os não reagentes. Os primeiros apresentaram contagem média de leucócitos significativamente maior quando comparados aos pacientes não reagentes, respectivamente 5.463 ± 1.959 leucócitos/ mm^3 e 4.406 ± 1.980 leucócitos/ mm^3 ($p=0,0276$, teste de Mann-Whitney).

O passado de malária não esteve associado aos títulos de IgM anti-*P. vivax*, ($p=0,3740$, teste do qui-quadrado), mas teve influência significativa sobre os títulos de IgG anti-*P. vivax*: títulos entre 5.120 até igual ou maior que 10.240 estiveram associados às crianças e adolescentes com história prévia de malária ($p=0,0218$, teste do qui-quadrado de partição).

6.8.2. Fator de Necrose Tumoral e Interleucina-10

- Fator de Necrose Tumoral

No grupo com malária, 99,1% (77/81) realizaram dosagem plasmática de TNF. O valor médio foi de $16 \pm 58,3$ pg/ml, significativamente menor do que no grupo controle (85%, 34/40), em que o valor médio foi de $25,5 \pm 46,4$ pg/ml ($p=0,0014$, teste de Mann-Whitney). Em ambos os grupos, houve ampla variação nos valores observados: não detectável a 490 pg/ml para os pacientes e de 2 a 258 pg/ml para os indivíduos controle.

No grupo com malária *vivax* e anemia foram observados valores médios de TNF significativamente menores do que no grupo controle com anemia, respectivamente $7,3 \pm 9,6$ pg/ml e $23,5 \pm 24,4$ pg/ml ($p=0,0014$, teste de Mann-Whitney). Também as crianças e adolescentes com malária *vivax* e anemia moderada/grave tiveram valores médios dessa citocina ($4,6 \pm 8,5$ pg/ml) significativamente menores do que as que apresentavam anemia leve ($8,6 \pm 10,0$ pg/ml ($p=0,0178$, teste de Mann-Whitney).

Duas correlações significativas surpreendentes foram evidenciadas: a primeira positiva entre o TNF e a hemoglobina ($p=0,0127$, $rs=0,2845$, coeficiente de Spearman), e outra, desta feita, negativa, entre o TNF e o intervalo de tempo decorrido pra o diagnóstico ($p=0,0066$, $rs=-0,3071$, Correlação linear de Spearman).

Não foi observada associação entre o TNF e a resposta imune IgG para *P. vivax* ($p=0,3709$, teste de Mann-Whitney). Entretanto, observou-se tendência de associação entre essa citocina e os anticorpos IgM anti-*P. vivax* ($p=0,0892$, teste de Mann-Whitney).

- Interleucina-10

No grupo com malária a média de IL-10 foi de $199,7 \pm 362,4$ pg/ml versus $43,2 \pm 94,8$ pg/ml no grupo controle, com tendência para significância para os pacientes ($p=0,0830$, teste de Mann-Whitney). Ampla variação nos valores dessa citocina foi observada tanto no grupo com malária (1,0 pg/ml a 1.288 pg/ml) quanto no grupo sem malária (2,0 pg/ml a 570 pg/ml).

No grupo com malária e anemia ($191,7 \pm 366,7$ pg/ml), os níveis de IL-10 foram significativamente maiores do que no grupo controle com anemia ($59,3 \pm 132,2$ pg/ml) ($p=0,0226$, teste de Mann-Whitney). Contudo, não houve diferença entre os valores de IL-10 entre os diferentes graus de anemia em crianças e adolescentes com malária ($p=0,6416$, teste de Mann-Whitney).

Observou-se correlação positiva significativa entre IL-10 e a parasitemia ($p= 0,0151$, $rs= 0,2834$, Correlação linear de Spearman). Correlação positiva não significativa ocorreu entre IL-10 e a taxa de hemoglobina ($p=0, 2465$, $rs= 0,1345$, Correlação linear de Spearman). Também não houve significância na correlação negativa entre IL-10 e o intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico ($p=0,9887$, $rs= - 0, 0016$, Correlação linear de Spearman) e nem na correlação negativa entre IL-10 e leucócitos ($p=0,7398$, $rs= - 0,0387$, Correlação linear de Spearman).

A IL-10 esteve associada à presença de anticorpos IgM anti-*P. vivax* nas crianças e adolescentes com malária ($p=0,0546$, teste de Mann-Whitney), mas não apresentou associação com os anticorpos IgG ($p=0,2248$, teste de Mann-Whitney).

Os níveis plasmáticos de TNF e de IL-10 foram similares nas crianças e adolescentes que apresentavam malária pela primeira vez e naquelas com história progressa de malária (respectivamente, $p=0,2679$, $p=0,3694$, testes de Mann-Whitney).

Os níveis plasmáticos de TNF não tiveram correlação com os níveis plasmáticos de IL-10 no grupo com malária ($p=0,2643$, $rs=0,1288$, correlação de Spearman).

Na Tabela 6.12 encontram-se agrupadas as associações entre o TNF e a IL-10 com as variáveis estudadas: intervalo de tempo para o diagnóstico, história progressa de malária, parasitemia, taxa de hemoglobina, leucócitos e anticorpos IgG e IgM anti-*P. vivax*.

Tabela 6.12- Relações entre o TNF e a IL-10 com a história progressa de malária, com o intervalo de tempo para o diagnóstico, com a parasitemia, com a taxa de hemoglobina, com os leucócitos e com os anticorpos IgG e IgM anti-*P. vivax*.

| Variáveis | TNF | IL-10 |
|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| História progressa de malária | p=0,2679 | p=0,3694 |
| Intervalo de tempo para o diagnóstico | p=0,0066 (rs= - 0,3071)* | P=0,9887 (rs= - 0,0016)* |
| Parasitemia | p=0,4388 (rs= - 0,0920) * | p= 0,0151 (rs= 0,2834)* |
| Taxa de hemoglobina | p=0,0127 (rs= 0,2845)* | p=0,2465 (rs= 0,1345)* |
| Leucócitos | p=0,3761 (rs= 0,1030)* | p=0,7398 (rs= - 0,0387)* |
| Anticorpos IgG anti- <i>P. vivax</i> | p=0,3709 ** | p=0,2248 ** |
| Anticorpos IgM anti- <i>P. vivax</i> | p=0,0892 ** | p=0,0546 ** |

* Correlação linear de Spearman

** Teste de Mann-Whitney

- Razão IL-10/TNF

Após ter obtido individualmente de cada participante do estudo a razão IL-10 /TNF, obteve-se a média desses resultados, que para 79% (64/81) dos pacientes, foi de $65,07 \pm 141,08$ pg/ml e de $3,97 \pm 4,63$ pg/ml para 85% do grupo controle. Apesar da grande diferença entre as médias, a razão IL-10/TNF apresentou resultados estatisticamente semelhantes entre as crianças e adolescentes com malária e àquelas pertencentes ao grupo controle (p= 0,2792, teste de Mann-Whitney).

Nos pacientes com malária a média da razão IL-10/TNF foi também semelhante entre as que apresentavam anemia e àquelas com ausência de anemia ($p=0,2325$, teste de Mann-Whitney).

A primoinfecção ou passado de malária também não influenciou na razão IL-10/TNF dos pacientes ($p=0,2652$, teste de Mann-Whitney).

6.8.3. Autoanticorpos antimembrana de eritrócitos e anticardiolipina

- Anticorpos anti-eritrócíticos avaliados pelo teste de antiglobulina direto

Houve evidência de hemólise auto-imune, determinada pelo teste de antiglobulina direto positivo (teste de Coombs direto) em 26,7% (20/75) das crianças e adolescentes com malária e em 9,1% (3/33) daquelas pertencentes ao grupo controle. Observou-se significância desse resultado no grupo com malária ($p=0,0265$, Teste exato de Fisher, bilateral) (Figura 6.16).

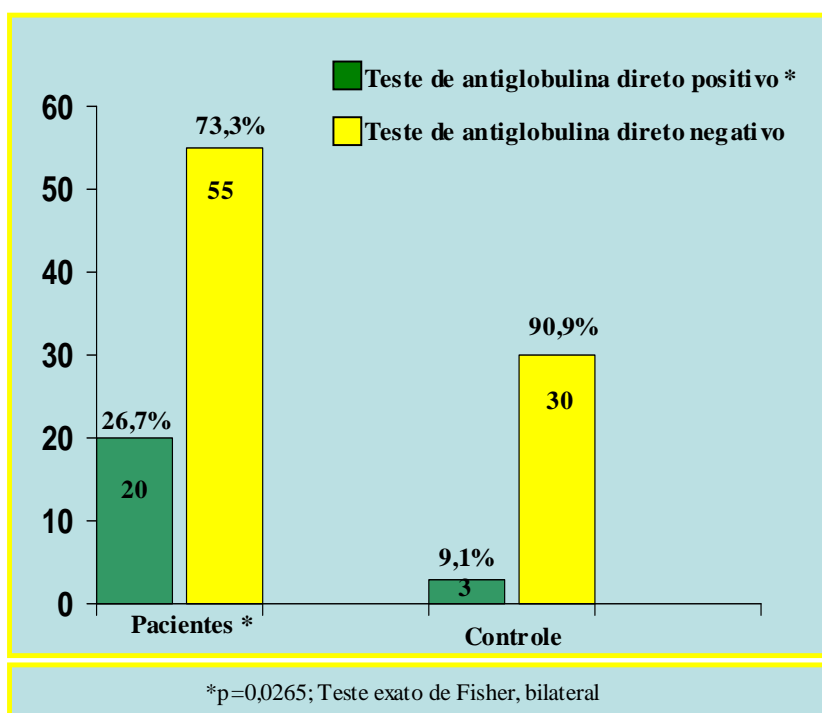


Figura 6.16- Teste de antiglobulina direto (DAT) em crianças e adolescentes com malária e sem malária (grupo controle).

A positividade do DAT foi similar nos pacientes anêmicos e não anêmicos ($p=0,7636$, teste exato de Fisher). Dos que tinham DAT positivo, 45% (9/20) tinham anemia leve, 35% (7/20) anemia moderada/grave e 20% (4/20) não apresentavam anemia.

- Anticorpos antimembrana de eritrócitos

Na Figura 6.17 observa-se que a proporção de autoanticorpos antimembrana de eritrócitos foi significativamente maior nos pacientes com malária ($p=0,0001$, teste binomial de duas proporções) em relação ao grupo controle.

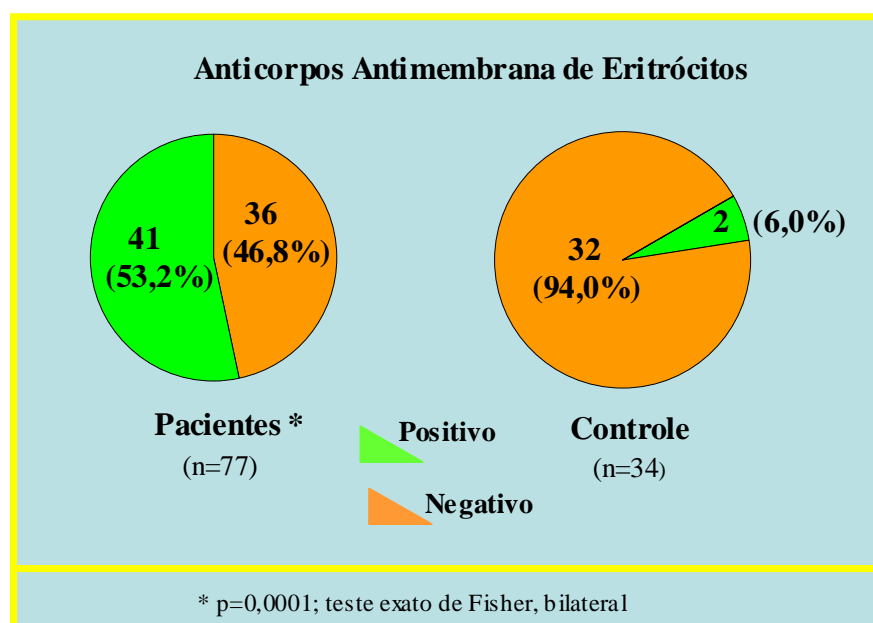


Figura 6.17- Anticorpos antimembrana de eritrócitos (ELISA) em crianças e adolescentes com malária e sem malária (grupo controle).

Os anticorpos antimembrana de eritrócitos não estiveram associados à anemia moderada/grave nas crianças e adolescentes com malária ($p=0,5065$, teste do qui-quadrado)

- Anticorpos anticardiolipina

A proporção de autoanticorpos anticardiolipina foi significativamente maior nos pacientes com malária do que no grupo controle ($p=0,0030$, teste binomial de duas proporções) (Figura 6.18) e estiveram associados à anemia moderada/grave nas crianças e adolescentes com malária ($p=0,0489$, teste exato de Fisher).

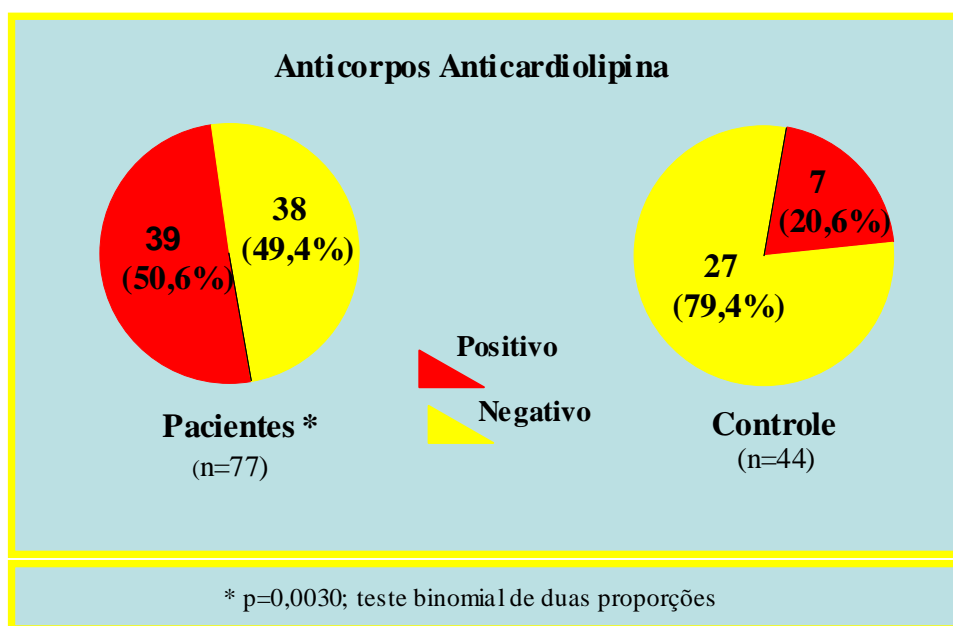


Figura 6.18- Anticorpos anticardiolipina em crianças e adolescentes com malária e sem malária (grupo controle).

Na Tabela 6.13 verifica-se que exceto para a tendência de uma associação entre anticorpos antimembrana de eritrócitos e contagem de leucócitos no momento do diagnóstico, esses autoanticorpos e os demais estudados não apresentaram associação com a parasitemia, com a contagem de leucócitos e com a reatividade de anticorpos IgG e IgM anti-*P. vivax*.

Tabela 6.13 – Relação dos autoanticorpos com a parasitemia, com a contagem de leucócitos e com a reatividade de anticorpos IgG e IgM anti-*P. vivax* no momento do diagnóstico.

| Variáveis | Parasitemia | Leucócitos (D0) | Anticorpos IgG anti- <i>P. vivax</i> (D0) | Anticorpos IgM anti- <i>P. vivax</i> (D0) |
|---|------------------------------|--------------------|---|---|
| Anticorpos antieritrocíticos avaliados pelo DAT | p=0,5422 (rs= - 0,0735)* | p=0,1408** | p=0,1787*** | p=0,7726**** |
| Anticorpos antimembrana de eritrócitos | p=0,9607 (rs= - 0,0059)* | p=0,0739** | p=1,0000*** | p=0,7790 **** |
| Anticorpos anticardiolipina | p=0,7757 (rs= - 0, 0339)* | p=0,9008 ** | p=0,2626 *** | p=0,8802 **** |

*Correlação linear de Spearman; ** Teste de Mann-Whitney

Teste exato de Fisher; * Teste do Qui-quadrado

Na Tabela 6.14 observam-se resultados similares para os anticorpos antimembrana avaliados pelo teste de antiglobulina direto, anticorpos antimembrana e anticorpos anticardiolipina nos subgrupos de pacientes com primoinfecção e com passado de malária ($p > 0,05$, teste de Mann-Whitney, teste binomial de duas proporções).

Tabela 6.14- Anticorpos antieritrocíticos avaliados pelo teste de antiglobulina direto, anticorpos antimembrana de eritrócitos e anticorpos anticardiolipina em pacientes com primoinfecção e naqueles com passado de malária.

| | Primoinfecção (X, DP)* | Passado de Malária (X, DP)* | Valor do p |
|---|--|--|-----------------|
| Teste de antiglobulina direto | 18,8% (6 positivos) 81,22% | 32,5% (14 positivos) 67,5% | 0,2015 ** |
| Anticorpos antimembrana de eritrócitos | (26 negativos) 35,3% (12 positivos) 64,7% | (29 negativos) 55,8% (24 positivos) 44,2% | 0,0731** |
| Anticorpos anticardiolipina | (22 negativos) 41,2% (14 positivos) (58,8%) (20 negativos) | (19 negativos) 58,1% (25 positivos) 41,9% (18 negativos) | 0,1393 ** |

* (X, DP) = média, desvio padrão

** Teste binomial de duas proporções

O intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico não foi fator determinante para a presença de autoanticorpos anticardiolipina, antimembrana de eritrócitos e a positividade ao teste de antiglobulina direto nas crianças e adolescentes com malária *vivax* (respectivamente, $p=0,3114$, $p=0,1981$, $p=0,7854$, testes do qui-quadrado de partição), como se verifica na Tabela 6.15.

Tabela 6.15- Intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico de malária e resposta aos autoanticorpos anticardiolipina, antimembrana de eritrócitos (ELISA) e antieritrocíticos avaliados pelo DAT.

| Tempo de doença | Ac anticardiolipina* | | Ac antimembrana de Eritrócitos* * | | Ac anti membrana de eritrócitos (DAT)*** | |
|---------------------------|----------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|--|----------------|
| | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| 0-3dias | 17 (43,6%) | 16 (42,1%) | 15 (41,7%) | 18 (43,9%) | 10 (47,6%) | 23 (42,6%) |
| 4-7 dias | 10 (25,7%) | 15 (39,5%) | 9 (25,0) | 16 (39,0%) | 6 (28,6%) | 20 (37,0%) |
| Igual ou maior que 8 dias | 12 (30,7%) | 7 (18,4%) | 12 (33,3) | 7 (17,1%) | 5 (23,8%) | 11 (20,4%) |
| Total | 39 (100,0%) | 38 (100,0%) | 36 (100,0%) | 41 (100,0%) | 21 (100,0%) | 54 (100,0%) |

* $p=0,3114$, teste do qui-quadrado de partição; ** $p=0,1981$, teste do qui-quadrado de partição; *** $p=0,7854$, teste do qui-quadrado de partição

6.9. PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS (IMUNOGLOBULINAS, CITOCINAS E AUTOANTICORPOS) DURANTE O ACOMPANHAMENTO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM MALÁRIA *vivax*:

6.9.1. Imunoglobulinas IgG anti-*P. vivax*

A análise conjunta de IgG anti-*P. vivax* avaliados por imunofluorescência indireta no soro de 70 pacientes revelou testes reagentes em D0, D7 e D30, respectivamente em 91,4%, 95,7% e 92,9%. Títulos positivos até a diluição de 2.560 predominaram em D30 (70%; 49/70). Diluições de 5.120 a ≥ 10.240 foram observadas em metade dos pacientes durante seu tratamento e em 22,9% no primeiro controle de cura (Tabela 6.16).

Tabela 6.16 - Distribuição da frequência de títulos de IgG anti-*P. vivax* em pacientes com malária *vivax*, no primeiro dia de atendimento (D0), no final do tratamento (D7) e no primeiro controle de cura (D30)

| Títulos de IgG anti <i>P. vivax</i> (IFI) | D0 | | D7 | | D30 | |
|---|----|---------|----|---------|-----|---------|
| | n | % | n | % | n | % |
| Não reagente | 6 | (8,6) | 3 | (4,3) | 5 | (7,1) |
| 40 a 320 | 11 | (15,7) | 10 | (14,3) | 20 | (28,6) |
| 640 a 2.560 | 18 | (25,7) | 21 | (30,0) | 29 | (41,4) |
| 5.120 a ≥ 10.240 | 35 | (50,0) | 36 | (51,4) | 16 | (22,9) |
| TOTAL | 70 | (100,0) | 70 | (100,0) | 70 | (100,0) |

6.9.2. Fator de Necrose Tumoral e IL-10

Houve uma elevação crescente e significativa do fator de necrose tumoral, $23,3 \pm 16,6$ pg/ml, no final do tratamento (D7) e no primeiro controle de cura (D30), $49,3 \pm 79,7$ pg/ml em relação ao observado em D0, $17,0 \pm 61,0$ pg/ml ($p=0,0001$, amostra pareada, teste de Friedman, D0 x D7; D0 x D30). Situação inversa ocorreu com a interleucina-10: valores significativamente mais elevados em D0, $190,8 \pm 350,6$ pg/ml quando comparados aos de D7 e de D30, respectivamente $64,9 \pm 21,2$ pg/ml e $35,3 \pm 51,1$ pg/ml ($p=0,0446$, amostra pareada, teste de Friedman, D0 x D7).

6.9.3. Avaliação de anticorpos anti-eritrocíticos (teste de antiglobulina direto)

A Figura 6.19 apresenta o percentual de pacientes com teste de antiglobulina direto positivo em D0, D7 e em D30, respectivamente 26,7% (20/75), 38,5% (30/78) e 25,6% (17/66), bem como aqueles que permaneceram com teste positivo durante algum período do acompanhamento.

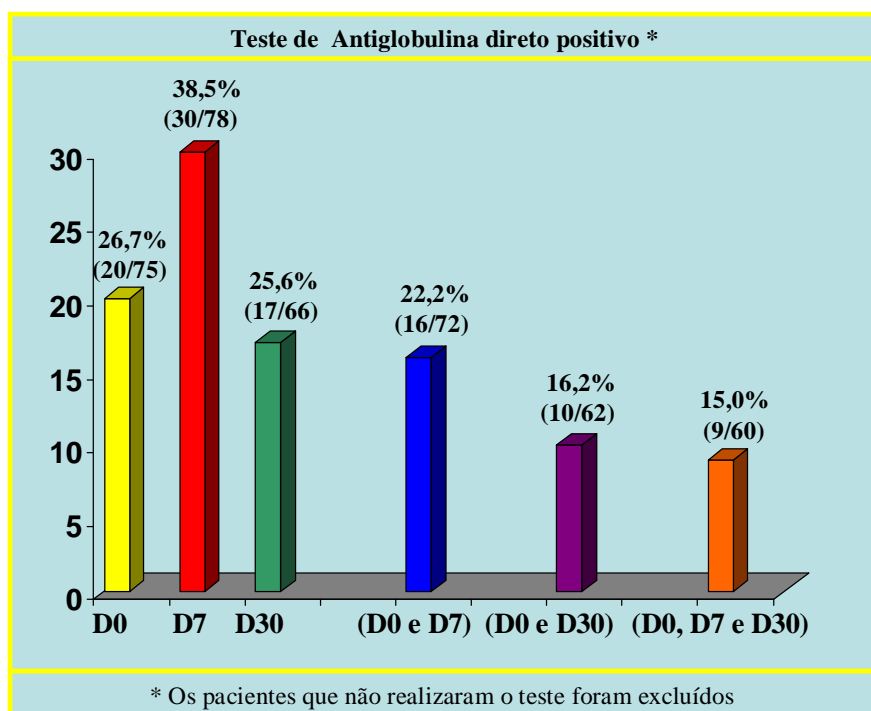


Figura 6.19 - Teste de antiglobulina direto positivo no primeiro dia de atendimento (D0), no final do tratamento (D7), no primeiro controle de cura (D30) e durante o período de acompanhamento de crianças e adolescentes com malária.

Das crianças e adolescentes que tiveram teste de antiglobulina direto positivo em D0 (26,7%; 20/75), 45% (9/20) tinham anemia leve e 35% (7/20) anemia moderada/grave. No final do tratamento (D7), verificou-se que dentre àquelas com teste positivo (38,5%; 30/78), 56,7% (17/30) tinham anemia leve e 23,3% (7/30) anemia moderada. Dos testes positivos (26,1%; 17/65) no primeiro controle de cura (D30), 17,6% (3/17) tinham anemia leve. Apesar desses resultados, não foram observadas diferenças entre o percentual de testes positivos e negativos entre os pacientes anêmicos e não anêmicos (Em D0, $p=0,7636$; em D7, $p=0,5477$; em D30, $p=0,1667$, testes exatos de Fisher, bilateral).

Persistência de testes positivos de antiglobulina direto em todo o período de acompanhamento do estudo (D0, D7 e D30) foi observada em 15% (9/60) dos pacientes (Figura 6.19).

6.9.4 Autoanticorpos antimembrana de eritrócitos (ELISA)

A Figura 6.20 apresenta a resposta aos autoanticorpos antimembrana de eritrócitos durante o período de acompanhamento dos pacientes, onde se observa 46,8% (36/77) de testes positivos em D0, 25,6% (20/78) em D7 e 22,5% (16/71) em D30. Em apenas um paciente (1,4%) os anticorpos antimembrana de eritrócitos persistiram por todo o período do estudo.

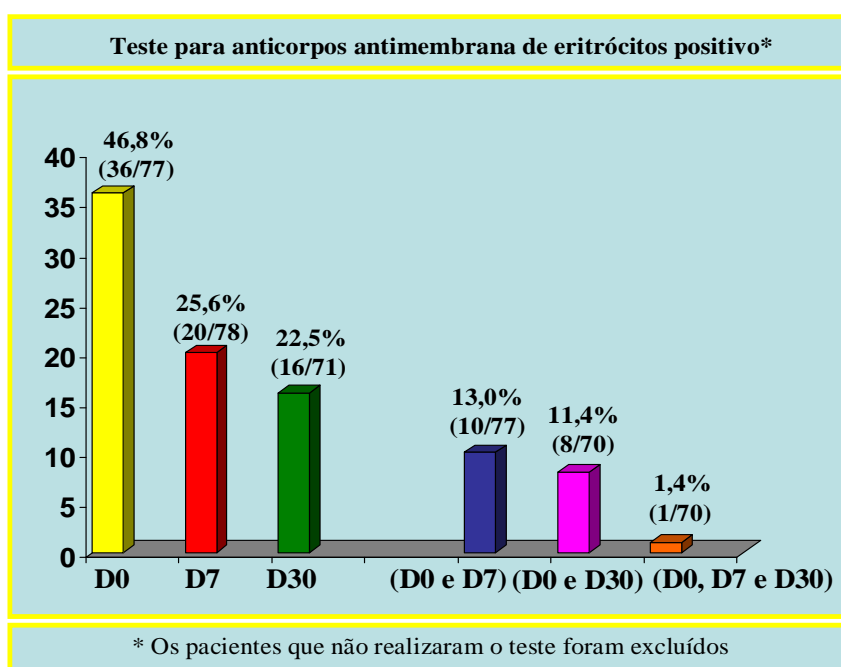


Figura 6.20 - Resposta positiva de anticorpos antimembrana de eritrócitos em D0, D7, D30 e durante o período de acompanhamento de crianças e adolescentes com malária.

6.9.5. Autoanticorpos anticardiolipina

Na Figura 6.21 observa-se a resposta dos anticorpos anticardiolipina, os quais foram positivos em cerca da metade da amostra (50,6%; 39/77) no primeiro dia de atendimento. Em D7 houve um discreto aumento, para 62,8% (49/78), seguido de um declínio, 19,7% (14/71)

no primeiro controle de cura (D30), além da persistência desses resultados em 13% (9/70) dos pacientes durante o seguimento clínico-laboratorial.

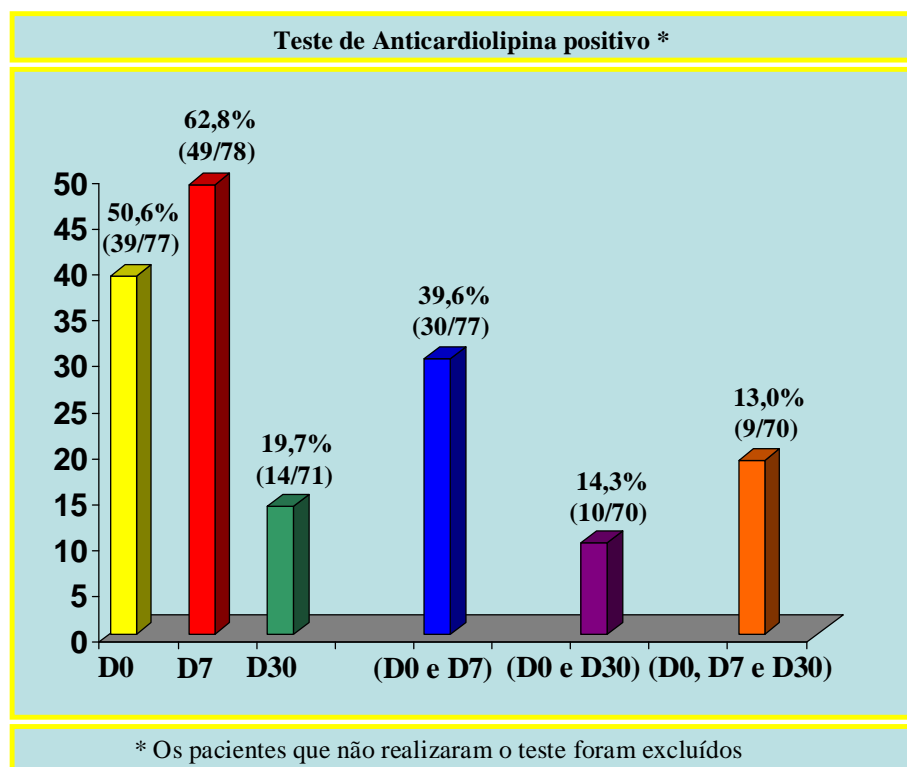


Figura 6.21 - Resultado positivo de anticorpos anticardiolipina em D0, D7, D30 e durante o período de acompanhamento de crianças e adolescentes com malária

Houve associação entre anemia moderada/grave e presença de anticorpos anticardiolipina ($p=0,0489$, teste exato de Fisher) em D0. No final do tratamento (D7), a anemia foi observada em proporções semelhantes de crianças e adolescentes com anticorpos anticardiolipina positivo ou negativo, respectivamente 81,6% (40/49) e 86,2% (25/29) ($p=0,7571$, teste exato de Fisher, bilateral). Do mesmo modo, em D30 não se evidenciou associação entre anemia e presença de anticorpos anticardiolipina ($p=0,3761$, teste exato de Fisher, bilateral).

6.10. EVOLUÇÃO DOS NÍVEIS DOS AUTOANTICORPOS: ANTI-ERITROCÍTICOS AVALIADOS PELO TESTE DE ANTIGLOBULINA DIRETO, ANTIMEMBRANA DE ERITRÓCITOS (ELISA) E ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINA:

Na Figura 6.22, observa-se a evolução dos níveis dos autoanticorpos: anti-eritrocíticos avaliados pelo DAT, anticorpos antimembrana de eritrócitos (ELISA) e anticorpos anticardiolipina no período de 30 dias, a partir do primeiro dia de tratamento (D0) em uma amostra pareada envolvendo 58 pacientes. Os anticorpos antimembrana de eritrócitos tiveram um declínio significativo em relação aos anticorpos anticardiolipina ($p=0,0057$, Log-rank test) e aos anticorpos antieritrocíticos avaliados pelo DAT ($p=0,0012$, Log-rank test).

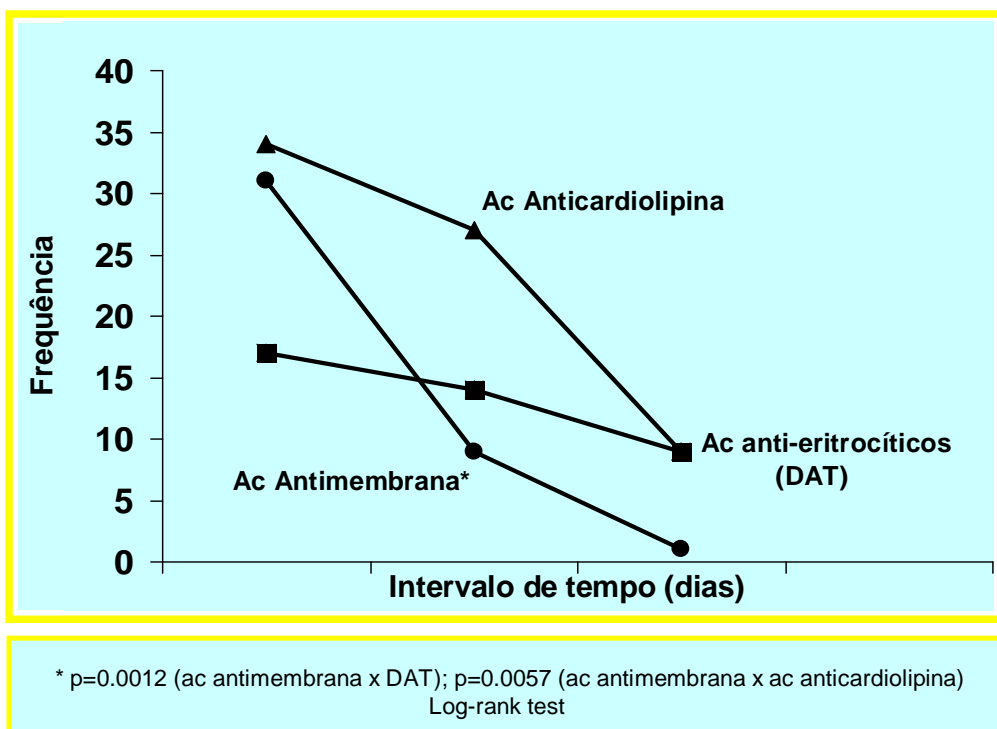


Figura 6.22 - Evolução dos níveis dos autoanticorpos anti-eritrocíticos avaliados pelo DAT, antimembrana de eritrócitos (ELISA) e anticardiolipina em crianças e adolescentes com malária *vivax*.

7) DISCUSSÃO:

O estudo avaliou os parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e imunológicos de crianças e adolescentes com malária por *Plasmodium vivax* atendidas em regime ambulatorial, em postos de atendimento nas cidades de Belém e Augusto Correa. Os resultados obtidos foram comparados a um grupo de quarenta crianças e adolescentes sem malária, parentes ou vizinhos dos casos-índices. Os indivíduos com malária foram também comparados entre si, em relação às coletas realizadas no dia do diagnóstico, ao término do tratamento (D7) e no primeiro controle de cura (D30).

Além da anemia associada à malária, outras causas de anemia frequentes na faixa etária pediátrica e que poderiam interferir nos resultados como variáveis confundidoras ou modificadoras de efeito, tais como carência de ferro, desnutrição e parasitose intestinal, deficiência de G6PD e doença falciforme, também foram avaliadas.

Dos exames laboratoriais, além da dosagem da hemoglobina, utilizada para estimar a anemia como preconiza a OMS, avaliou-se a série eritrocitária, os índices hematimétricos, o número de reticulócitos, de leucócitos e de plaquetas. Mediante a análise do distendido sanguíneo foi também possível detectar alterações morfológicas dos eritrócitos. A ferritina sérica foi o parâmetro utilizado para o diagnóstico de deficiência de ferro, não tendo sido possível a utilização de outros marcadores para detecção de ferropenia, por serem exames de alto custo e/ou de difícil realização em laboratórios de rotina. Os helmintos e protozoários intestinais foram pesquisados em exames coproparasitológicos nos pacientes e nos indivíduos do grupo controle.

Os parâmetros imunológicos estudados, relacionados à anemia foram os anticorpos IgG e IgM anti-*P. vivax*, os anticorpos anti-eritrocíticos avaliados pelo teste de antiglobulina direto (DAT), também conhecido como teste de Coombs, os anticorpos antimembrana de eritrócitos avaliados pela técnica de ELISA, os anticorpos anticardiolipina e as citocinas - TNF e IL-10. Realizaram-se exames diários para a pesquisa de plasmódio em gota espessa (até a obtenção de duas lâminas consecutivas com resultado negativo) para acompanhamento da resposta ao tratamento antimalárico e foram feitas comparações de dados clínicos, laboratoriais e imunológicos entre os pacientes que estavam apresentando o primeiro episódio de malária e aqueles com episódios anteriores da doença.

7.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS:

Segundo as estatísticas do Ministério da Saúde do Brasil, no período da coleta de dados do estudo (2002 a 2005), 45,1% do total de casos notificados de malária no país ocorreram na faixa de zero a 19 anos, sendo que em 2008, houve um aumento desse percentual passando as crianças e adolescentes a representar 47,8% dos 314.869 casos da doença (Sivep_Malária/MS, 2009). Tal panorama demonstra a importância da abordagem dos aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos da malária nessa parcela da população.

As crianças e adolescentes adquiriram malária na área Metropolitana de Belém, em municípios do interior do Pará e na Guiana Francesa. Predominaram os casos autóctones de malária (77,8%), ou seja, adquiridos no próprio habitat do paciente. Excetuando os 1,2% de casos adquiridos na Guiana Francesa, as regiões estudadas estão localizadas na Amazônia brasileira, que concentra 99,9 dos casos registrados de malária do País (Sivep_Malária/MS, 2009).

Os pacientes deste estudo foram susceptíveis de adquirir malária, independentes do sexo, masculino ou feminino. A associação entre malária e sexo na faixa etária pediátrica não é habitual (Ventura *et al.*, 1999; Noronha *et al.*, 2000, Pinto *et al.* 2001), diferente da população adulta, em que os casos de malária predominam no sexo masculino, já que os homens, mais do que as mulheres, exercem atividades ocupacionais consideradas de risco para aquisição da doença, tais como garimpagem, extração de madeira, extração de palmito e pesca de subsistência (Cardoso *et al.*, 1992; de Freitas, 2004).

No grupo com malária houve um predomínio de adolescentes (59,2%) sobre os pré-escolares e escolares, sem que esse fato, tivesse influência sobre os parâmetros clínicos, laboratoriais e imunológicos estudados, uma vez que o grau de imunidade para a doença, indiretamente avaliada pela história passada de malária, não foi diferente entre essas diversas faixas etárias. Tal resultado pode ser atribuído à transmissão instável de malária na Amazônia brasileira, onde os indivíduos são vulneráveis à aquisição da malária, não importa a idade que apresentem, em contraposição ao que se observa em áreas de transmissão estável e/ou perene de malária, como na África, em que as crianças menores de cinco anos pagam maior tributo à doença, apresentando as maiores taxas de morbi-mortalidade (Baird, 1995; Marsh & Snow, 1997; OPAS, 2001, Duarte *et al.*, 2004)

Na avaliação do estado de saúde é fundamental considerar as desigualdades sociais e econômicas da população das diversas regiões brasileiras, como fatores determinantes de

agravos (Brito, 2008). Em nossa casuística 10,1% das mães eram analfabetas e 68,4% possuíam o 1º grau. Um pouco mais da metade (54,3%) referiu renda igual ou inferior a um salário mínimo. Essa realidade já foi apontada por Carrasquilla (2001) ao concluir que os mais acometidos por malária são justamente os de menor renda e escolaridade que, em geral, residem próximo aos criadouros de anofelinos existentes na periferia dos centros urbanos ou no interior dos Estados da Amazônia e da Colômbia.

A despeito da baixa renda familiar da população estudada, predominaram crianças e adolescentes eutróficos (87,6%). Em uma pesquisa nacional sobre Demografia e Saúde da Criança e da Mulher realizada pelo Ministério da Saúde, a frequência de desnutrição observada foi de 1,7% para crianças abaixo de cinco anos e de 2,2% para meninas na faixa etária de 15 a 19 anos, dentro do percentual esperado para populações saudáveis e bem nutridas (PNDS-2006, relatório final, 2008). Ademais, a UNICEF (2008) igualmente atesta que houve diminuição da desnutrição ao afirmar que “A proporção de crianças com baixo peso para a idade no Brasil, entre 2000 e 2006, caiu de 12,7% para 3,5%, representando uma redução de 72,4%”. Nossos resultados podem refletir alguma melhoria dos indicadores nutricionais das crianças brasileiras e faz sentido pensar que isso possa ter ocorrido em consequência do aumento indireto da renda, pela implementação e execução de programas destinados às famílias carentes pelo governo federal (Domene, 2003).

Em nossa casuística, foram estudadas somente crianças e adolescentes com malária por *Plasmodium vivax*, a espécie responsável por 84,4% dos casos de malária notificados em 2008 no país (Sivep_Malária/MS, 2009). Tal situação difere radicalmente daquela observada no continente africano, onde a malária é determinada principalmente pelo *Plasmodium falciparum* (Snow *et al.*, 2003).

Os pacientes diferiram quanto ao número de episódios anteriores de malária: para 43,2% deles era o primeiro episódio e para 56,8%, outros episódios haviam ocorrido. Em áreas endêmicas brasileiras, é freqüente que pacientes relatem história pregressa da doença, como nos estudos realizados em Mato Grosso por Duarte *et al.* (2004) e no Pará, por Fernandes *et al.* (2008) que observaram respectivamente 76,1% e 75% de indivíduos com malária com pelo menos um episódio anterior da doença.

7.2. ASPECTOS PARASITOLÓGICOS:

Os pacientes possuíam parasitemia média ($6.543,50 \pm 9.872$ formas assexuadas/mm³) semelhante à de outros dois estudos conduzidos no Pará, em pacientes infectados pelo *P.*

vivax: o primeiro na faixa etária de zero a quinze anos (5.343 ± 6.572 formas assexuadas/mm³) (Ventura, 1997) e o segundo em indivíduos de todas as idades, com predominância de adultos (4.308 ± 6.521 formas assexuadas/mm³) (Fernandes *et al.*, 2008).

Com a instituição do tratamento antimalárico, 59,2% e 92,6% dos pacientes estavam negativos para a presença de parasitos no sangue circulante, respectivamente no terceiro (D2) e quarto (D3) dias de tratamento. Em D7 todas as crianças e adolescentes eram negativas para a pesquisa de plasmódio em gota espessa. Dinâmicas semelhantes de declínio e negativação da parasitemia foram observadas em estudo anterior por Ventura (1997) e também por Pinto *et al.* (2001) em crianças e adolescentes com malária *vivax* na Região Amazônica.

No subgrupo de pacientes com passado de malária, os níveis de parasitemia foram inferiores aos observados naqueles que não relataram episódio prévio da doença. Da mesma forma, o desaparecimento da parasitemia foi mais precoce nas crianças e adolescentes com passado de malária. Assim até D2, 75,6% dessas crianças e adolescentes já estavam com gota espessa negativa para a presença de plasmódio, contra 42,4% daquelas sem história pregressa da doença. No mesmo sentido dessas observações constatou-se que 100% dos pacientes com passado de malária e 90% daqueles sem esta história estavam negativos no exame da gota espessa em D3. Tais resultados são coerentes com a noção de que uma re-exposição aos antígenos do plasmódio é capaz de limitar a parasitemia, ao desencadear uma resposta imune direcionada às diversas fases do ciclo assexuado do parasito (King *et al.*, 2008).

Observou-se então uma correlação entre parasitemia e história pregressa de malária e também entre esta e o desaparecimento da parasitemia, ambas sobre influência do longo intervalo de tempo ($6,2 \pm 6,5$ dias) para que a doença fosse diagnosticada e tratada. Esta situação é semelhante aos estudos realizados por Ventura *et al* (1999) e do Amaral *et al.* (2003) que respectivamente referiram 12,5 e 13,5 dias de prazo para que o diagnóstico de malária fosse estabelecido em crianças e adolescentes com malária, na região Amazônica. A demora no diagnóstico e consequente retardo para iniciar o tratamento suscita preocupações quanto à formação dos profissionais de saúde e sua capacidade de evocar o diagnóstico de malária dentre as principais hipóteses diante de uma doença febril aguda em áreas onde a doença tem caráter endêmico. Dados do Serviço de Vigilância Epidemiológica de Malária do Ministério da Saúde (SIVEP/Malária, 2009) mostram que 55,78% dos casos de malária da área urbana e rural da Amazônia brasileira foram diagnosticados nas primeiras 48 h do início dos sintomas, entretanto um percentual ainda considerável de 35,63% o foram após 49 horas.

7.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA MALÁRIA:

Nos pacientes, os sintomas componentes da tríade da malária (febre, calafrio e cefaléia) estiveram presentes em respectivamente 92,6%, 90,1% e 77,8% dos pacientes, sem que se observasse influência do passado de malária sobre tais manifestações clínicas. Esses percentuais foram similares àqueles encontrados em estudo anterior realizado na mesma região (respectivamente 97%, 91% e 85%; Ventura *et al.*, 1996), mas superiores aos relatados por Rodriguez-Morales *et al.* (2006) em setenta e oito crianças internadas com malária *vivax* na Venezuela no que se refere à frequência do calafrio (41,03%) e cefaléia (14,1%).

Hepatomegalia e esplenomegalia foram observadas respectivamente em 9,9% e 14,8% dos pacientes refletindo o comprometimento do sistema retículo-endotelial, que integra o repertório de respostas geradas pelo hospedeiro frente à infecção plasmodial (Engwerda *et al.*, 2004; Buffet *et al.*, 2009). O percentual de pacientes com hepatomegalia registrado nesse estudo foi inferior aos 29% e aos 43,3% de hepatomegalia observados respectivamente por Ventura *et al.* (1999) e por do Amaral *et al.* (2003) em populações da faixa etária pediátrica. O percentual de esplenomegalia foi também inferior aos encontrados por Ventura *et al.*, 1999 (46%) e Amaral *et al.*, 2003 (50%); mas foi superior aos 10% observados por Echeverri *et al.* (2003) em uma população da Amazônia colombiana em que cerca de 1/3 dos indivíduos estudados eram crianças.

Em D3/D4 os sinais e sintomas presentes no momento do diagnóstico já se encontravam em franco declínio, coincidindo com o desaparecimento da parasitemia em 92,6% dos pacientes em D3 e praticamente a totalidade deles em D4, o que denota uma boa resposta clínica e parasitária à terapêutica. Na literatura pesquisada, os dados clínicos sobre malária *vivax* em pediatria são escassos. A comparação dos dados obtidos neste estudo com aqueles observados em crianças e adolescentes que adquiriram malária em condições epidemiológicas semelhantes às do estudo atual (Ventura, 1997) mostram uma relativa sobreposição de resultados, no que tange o desaparecimento da tríade e da maioria dos sinais e sintomas, paralelamente ao declínio e negatificação da parasitemia.

Na fase aguda da doença, isto é, no período pré-tratamento, houve uma discreta redução da média ponderal, provavelmente à custa de manifestações clínicas tais como febre, astenia e anorexia que podem ter contribuído para uma menor ingestão alimentar. Todavia, ao retornarem para o primeiro controle de cura, as crianças e adolescentes apresentaram um ganho ponderal médio de 600-1.100g. Tal aumento ponderal é de fato comum após a resolução de um quadro infeccioso. Os estudos sobre o impacto da malária *vivax* sobre tais

parâmetros na faixa etária pediátrica são escassos, mas acredita-se que o *P. vivax* possa influenciar o estado nutricional à semelhança do que ocorre em áreas holoendêmicas de malária *falciparum*, em que o parasito é capaz de causar alterações significativas no ganho de peso de lactentes e pré-escolares (Shiff *et al.*, 1996, Williams *et al.*, 1997).

7.4. ANEMIA:

A taxa média de hemoglobina no grupo com malária ($11,2 \pm 1,93$ g%) foi significativamente inferior àquela registrada no grupo controle ($12,3 \pm 1,17$ g%), embora superiores às observadas por Ventura *et al.* (1999) e Rodriguez-Morales *et al.* (2005) em amostras de crianças e adolescentes com malária *vivax* (respectivamente $9,9 \pm 2,1$ g% e $8,9 \pm 2,65$ g%). Entretanto, a média dessa casuística foi inferior àquela ($13,4 \pm 2,0$ g%) encontrada por de Freitas (2004) em uma amostra constituída predominantemente por adultos, o que parece refletir a sabidamente maior susceptibilidade da população infanto-juvenil para o desenvolvimento de anemia e de formas mais graves de malária.

Como esperado, a chance de aparecimento de anemia (OR=2,6690, p=0,0258, IC(95%)=1,1975-5,9487) foi 2,7 vezes maior no grupo com malária do que no grupo controle, o que só se explica parcialmente, pelo parasitismo intraeritrocítico e a resultante lise mecânica dos eritrócitos promovida pelo plasmódio durante a esquizogonia (Rey, 1992). De fato, como a anemia não costuma ter uma relação direta com a parasitemia, podendo persistir ou até mesmo aparecer na ausência desta, outros mecanismos de natureza imune e hormonal podem ser desencadeados e atuar sobre os eritrócitos ou sobre a medula óssea. Na realidade, a anemia da malária possui etiologia complexa e multifatorial, transformando em desafio sua elucidação fisiopatológica (Menendez *et al.*, 2000; Ekvall, 2003; Chang & Stevenson, 2004).

Setenta e cinco por cento das crianças e adolescentes com malária estavam anêmicas no momento do diagnóstico (contra 52,5% do grupo controle), sendo 66,1% com anemia leve, 30,5% anemia moderada e 3,5% com anemia grave. Percentuais superiores de anemia grave foram encontrados na Venezuela (10,26%) e na Indonésia (32%) em crianças também com malária *vivax*, mas com idade inferior àquela por nós estudada (Rodriguez-Morales *et al.* 2006; Poespoprodjo *et al.*, 2009). Por outro lado, Fernandes *et al.* (2008) encontraram somente um caso (1,4%) de anemia grave (Hb=6,3 g%) em uma população mista de adolescentes e adultos com malária *vivax* na Amazônia brasileira. Ainda que guardadas as reservas necessárias decorrentes de diferenças na exposição das populações estudadas, esses dados

parecem confirmar a noção geralmente aceita de que a prevalência de anemia grave é maior na criança, sobretudo na de tenra idade, decrescendo nos adolescentes e por fim nos adultos.

Neste estudo, a prevalência de anemia leve nas crianças e adolescentes com malária não diferiu significativamente daquela apresentada pelos indivíduos controle (sem malária). A diferença entre pacientes e controle foi significativa para a prevalência de anemia moderada e de anemia moderada/grave, consideradas conjuntamente (já que apesar da ausência de anemia grave no grupo controle, a presença de anemia grave em 3,5% dos pacientes não foi significativa). Não obstante nossos achados demonstrarem variabilidade de apresentação da anemia na infecção pelo *P. vivax*, o encontro de anemia moderada/grave nestes pacientes deve servir de alerta para os profissionais de saúde, indicando que esta espécie de plasmódio, predominante no Brasil, pode, a exemplo do *P. falciparum*, determinar manifestações graves. De fato, cada vez mais a literatura vem chamando atenção para as complicações decorrentes da malária *vivax*, inclusive com desfecho fatal, o que vem modificando o panorama da doença, anteriormente considerada essencialmente benigna (Ohnishi *et al.*, 2008; de Lacerda *et al.*, 2007; Tosta, 2007; Santos-Ciminera *et al.*, 2007; Price *et al.*, 2007).

As crianças e adolescentes que apresentavam malária pela primeira vez tiveram significativamente mais anemia moderada/grave do que leve, em comparação com aquelas com passado de malária. Ademais, as crianças e adolescentes com malária pela primeira vez tiveram parasitemia significativamente maior e demoraram mais para obter o clareamento da parasitemia, o que parece coerente com a ausência de uma resposta imune prévia específica e efetiva contra o parasito (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003).

A palidez foi um parâmetro útil para o diagnóstico presuntivo de anemia com sensibilidade de 77,1%, desempenho semelhante às observações de Luby *et al.* (1995) que verificaram sensibilidade de 66% para diagnóstico de anemia moderada e de 93% para diagnóstico de anemia grave, ao utilizar sinais clínicos (dentre os quais a palidez palmar) para o diagnóstico de anemia em crianças em área endêmica de malária, em Malawi, África.

No início do tratamento, a palidez foi observada em 88,9% e a anemia em 75% dos pacientes, sendo essa a terceira manifestação clínica mais freqüente. Ela se mostrou capaz de diagnosticar àquelas crianças e adolescentes com anemia moderada/grave. Em D7, palidez e anemia permaneceram elevadas, respectivamente 80% e 83%, sendo ainda observados alguns casos de anemia moderada e anemia grave. No primeiro controle de cura (D30), 28,4% das crianças e adolescentes ainda estavam pálidas e 45,3% ainda com anemia, de grau leve, com exceção de dois indivíduos que apresentavam anemia moderada. A melhora gradual na anemia destes pacientes, com parasitemia negativa e resposta hematopoiética progressiva da

medula óssea, esteve em conformidade com o comportamento evolutivo da malária *falciparum* e da malária *vivax* em crianças e adolescentes africanas ou amazônidas, que ainda se apresentavam anêmicas no oitavo dia e/ou no trigésimo dia de acompanhamento clínico (Ventura, 1997; Biemba *et al.*, 1998, Nussenblatt *et al.*, 2001).

Nas crianças e adolescentes com malária deste estudo foram encontrados 78,5% de exame coproparasitológico positivo: 57% para uma espécie, 27,8% para duas e 14,7% para três ou mais espécies de parasitos intestinais. Apesar dessa elevada frequência, os helmintos e protozoários não tiveram influência sobre a anemia dos pacientes. Do mesmo modo, os ancilostomídeos, helmintos que classicamente possuem papel de destaque como indutores de anemia ferropriva na infância, também não estiveram implicados na anemia desses pacientes. Tais resultados são similares aos observados por Akhwale *et al.* (2004) em uma amostra com 1.314 indivíduos de várias faixas etárias no Quênia, onde houve associação significativa entre anemia e infecção malárica (*P. falciparum*), mas não com a infestação por ancilostomídeos. Por outro lado, diferem dos resultados de Achidi *et al.* (2008) em escolares africanos residentes de áreas co-endêmicas de malária e helmintíases em Camarões, que demonstraram influência dos helmintos no determinismo da anemia associada à malária por *P. falciparum*.

Na realidade a relação causal entre anemia e parasitose intestinal nem sempre é facilmente estabelecida, porque a anemia resulta de uma complexa interação entre meio ambiente, idade, hábitos alimentares, status sócio-econômico, poliparasitismo, grau de infestação parasitária e da genética do hospedeiro e do parasito. Ignorar esses fatos e/ou considerá-los isoladamente pode levar a conclusões errôneas sobre a frequência e a causa da anemia (Brito *et al.*, 2006). Se um terceiro fator potencialmente indutor de anemia, como a infecção malárica estiver atuando nessa relação, o desafio de entender o papel que cada um desses agentes desempenha na anemia de crianças e adolescentes é ainda maior (Druilhe *et al.*, 2005; Brooker *et al.*, 2006, Pullan & Brooker, 2008).

Outras causas potencialmente determinantes de anemia na faixa etária pediátrica são a desnutrição protéico-calórica e a deficiência específica de ferro (Queiroz & Torres, 2000; Borelli *et al.*, 2004). Em nossa casuística encontramos 6,2% de desnutrição, sem que esta estivesse associada à anemia. No Quênia, a desnutrição esteve presente em 15,4% de crianças hospitalizadas com malária *falciparum*, mas sem relação com a anemia quando os dados foram submetidos à análise multivariada (Ong'echa *et al.*, 2006). De forma semelhante, às considerações feitas sobre o impacto da co-existência de parasitose intestinal e malária e o impacto sobre a morbidade da malária, em especial da anemia em crianças e adolescentes, há

controvérsia sobre a relação entre estado nutricional, malária e anemia, especulando-se se a desnutrição atuaria como um fator de proteção ou de agravo para malária (Mc Gregor, 1982; Ghosh *et al.*, 1995; Genton *et al.*, 1998; Friedman *et al.*, 2005; Ehrhardt *et al.*, 2006).

Nestes pacientes a deficiência de G6PD e a Doença Falciforme foram investigadas como possíveis causas de anemia. Evidenciou-se 3,7% de deficiência de G6PD, percentual similar aos 3% encontrados por Santana *et al.* (2009) em área endêmica de malária, em Manaus, porém inferior aos 7,9% obtidos por Castro *et al.* (2006), em um estudo transversal realizado no sul do Brasil. Não foram observados casos de doença falciforme, mas tão somente o traço falciforme em 1,2 % dos pacientes, compatível com a frequência de 2 a 8% referida para a população brasileira (Zago, 2001).

Nos locais onde a malária tem alta prevalência, a deficiência de G6PD e a doença falciforme podem ser um fator de proteção ao limitar a parasitemia e a expressão das manifestações clínicas associadas à malária (Williams *et al.*, 2005; Tripathy & Reddy, 2007; Tosta, 2007). Devido o baixo percentual destas alterações hemolíticas congênitas em nossos pacientes, não foi possível determinar essa proteção. Contudo, a deficiência de G6PD e o traço falciforme não influenciaram na média de hemoglobina apresentada pelos pacientes.

O intervalo de tempo decorrido entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico de malária não parece relacionado à anemia leve, mas pode ter contribuído de modo significativo para anemia moderada e para as anemias moderada/grave nos pacientes com malária. É possível que tais resultados demonstrem um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro exacerbado pelo aumento do tempo de interação entre ambos, que como pretendem Tosta (2007) e Price *et al.* (2007) facilitaria ao plasmódio expressar o seu potencial patogênico, dificultando a atuação do sistema imune em limitar a parasitemia e diminuir a morbidade e o risco de complicações inerentes à doença.

Do ponto de vista epidemiológico, em área de transmissão de malária, o atraso no diagnóstico e conseqüentemente na instituição do tratamento anti-malárico, aumentam as chances de aquisição de gametócitos (presentes no sangue periférico desde o estágio inicial da infecção) pelos anofelinos por ocasião do repasto sanguíneo e de transmissão pelo vetor infectado para o indivíduo suscetível. Por outro lado, novas infecções, aumentam as chances de recaída, pela inoculação de novas gerações de esporozoítos que podem permanecer quiescentes no fígado, como resultado igualmente do atraso na administração da terapêutica, que inclui a primaquina, droga de ação hipnozoítica e gametocitocida. Também sob esse aspecto, hemólises (de eritrócitos parasitados e não parasitados) recorrentes e a diseritropoiese

induzidas por essas recaídas podem exacerbar a anemia multifatorial da malária (Collins *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2007).

7.5. DADOS LABORATORIAIS:

7.5.1. Ferritina

A ferritina, um dos marcadores séricos utilizados para avaliar a carência de ferro, se encontra diminuída nos três estágios de carência desse mineral: a) depleção dos estoques de ferro tecidual, sem alteração no hematócrito ou no ferro sérico; b) deficiência na eritropoiese em consequência do esgotamento dos estoques de ferro do sistema retículo-endotelial, com diminuição dos níveis de ferro sérico, aumento da capacidade de ligação da transferrina e do nível sérico de transferrina, diminuição da concentração de hemoglobina nos reticulócitos, sem alterações no hematócrito ou no esfregaço sanguíneo; c) anemia ferropriva em que a hemoglobina e o hematócrito se encontram diminuídos, alterações no distendido sanguíneo, além de achados laboratoriais que caracterizam as fases precedentes. Entretanto, a ferritina nos processos infecciosos atua como uma proteína inflamatória, elevando-se na fase aguda da doença, de modo a limitar a utilização do ferro circulante pelos microorganismos que dele dependem (Walter *et al.* 1997; Paiva *et al.*, 2000, Machado, 2008). O ferro não é um elemento importante para a sobrevivência do plasmódio, pois o parasito promove a degradação da hemoglobina, utilizando-se da globina para suas atividades metabólicas e liberando o radical heme (composto por ferro), que é estocado como hemozoína (pigmento malárico). Por outro lado, o ferro proveniente da lise do eritrócito é reutilizado para a síntese de hemoglobina. Porém, se a oferta desse mineral se sobrepõe às necessidades do organismo, níveis aumentados de ferro podem ser encontrados em indivíduos com malária (Francis *et al.*, 1997).

Nas crianças e adolescentes com malária deste estudo, o valor médio da ferritina sérica ($262 \pm 173,0$ ng/ml) foi significativamente superior ao encontrado no grupo controle ($51 \pm 52,9$ ng/ml), embora ainda estivesse no padrão de normalidade. Níveis séricos de ferritina mais elevados em pacientes com malária foram também observados em crianças ou em adultos com malária sintomática ou assintomática por Das *et al.* (1997), Stoltzfus *et al.* (1997), Odunukwe *et al.* (2000) e Assobayire *et al.* (2001). Esses autores salientam a dificuldade de se estimar a real carência de ferro ou de anemia ferropriva em áreas hiper/holendêmicas de malária, utilizando-se apenas a ferritina sérica e enfatizam a necessidade de combinar outros marcadores, tais como saturação da transferrina, protoporfirina eritrocitária e receptor de transferrina, para aumentar a sensibilidade dos

métodos de avaliação da causa da anemia em áreas malarígenas. Entretanto, tais marcadores não são exequíveis para utilização de rotina em saúde pública, por requererem laboratórios com equipamentos especializados e serem de alto custo (Paiva *et al.*, 2000; Machado, 2008).

Não se observou correlação significativa entre a ferritina sérica e a taxa de hemoglobina nas crianças e adolescentes com malária, o que indiretamente sugere que a anemia destes pacientes foi determinada pela diminuição da hemoglobina à custa de hemólise e não de deficiência de ferro. Esta ausência de correlação foi também observada por Das *et al.* (1997) ao verificar a influência da malária em marcadores do status de ferro em crianças na Índia, por Geissler *et al.* (1998) ao estudar o status de ferro, anemia e hábitos de geofagia em crianças escolares no Quênia; e por Stoltzfus *et al.* (2000) ao avaliar a relação da anemia e do status de ferro em relação à malária, ancilostomíase e febre recente em crianças, de zero a cinco anos de idade, na Tanzânia.

Houve, por outro lado, uma correlação significativa entre a ferritina sérica e a parasitemia, reforçando o papel dessa proteína como marcador inespecífico de resposta inflamatória aguda, diante de um parasito que mantém uma estreita relação com a hemoglobina, em conformidade com outros estudos realizados em áreas endêmicas de malária da África (Geissler *et al.*, 1998; Odunukwe *et al.*, 2000; Assobayire *et al.*, 2001).

Os pacientes com primoinfecção apresentaram concentração média de ferritina sérica ($315 \pm 168,4$ ng/ml) significativamente maior do que aqueles com história pregressa de malária ($224 \pm 168,3$ ng/ml). É possível que os pacientes que adquiriram malária pela primeira vez e que apresentavam uma parasitemia também significativamente maior tenham tido uma resposta inflamatória mais exacerbada, justificando os níveis mais elevados de ferritina.

7.5.2. Morfologia dos eritrócitos no distendido sanguíneo

Alterações morfológicas dos eritrócitos tais como anisocitose, poiquilocitose, anisopoiquilocitose, microcitose, hipocromia foram mais frequentes nos pacientes do que nos indivíduos do grupo controle. Os eritrócitos podem modificar sua forma (de discóides para esféricos) devido à presença do plasmódio ou em virtude de alterações provocadas pelo parasito ao se utilizar de componentes dessas células em sua nutrição (Ginsberg, 1990; Francis *et al.*, 1997). As alterações no distendido sanguíneo tiveram uma evolução bastante favorável com o declínio e negatização da parasitemia, pós-instituição da terapêutica antimalárica: de 22,4% em D0, para 16,4% em D7, e somente 1,5% no primeiro controle de cura.

7.5.3. Indicadores hematimétricos

Neste estudo, o índice de variação no volume dos eritrócitos (RDW- *Red Cells Distribution Width*) se encontrava nos padrões de normalidade, confirmando que a anemia observada nas crianças e adolescentes foi induzida pelo *Plasmodium vivax* e não decorreu de uma carência de ferro, já que, como salientam Melo *et al.* (2002), o RDW é um bom marcador para diagnosticar anemia ferropriva e, ao contrário da ferritina sérica, não se eleva na vigência de processos inflamatórios agudos (Walter *et al.* 1997; Das *et al.*, 1997) .

Além do RDW, outros indicadores hematimétricos, VCM, HCM e CHCM podem ser úteis para auxiliar no diagnóstico das anemias carenciais. Desses, o VCM é o mais confiável, encontrando-se baixo na anemia ferropriva, pois o HCM que representa o peso da hemoglobina na média dos eritrócitos e o CHCM, concentração de hemoglobina na média dos eritrócitos, são passíveis de sofrer interferência de vários fatores, dentre os quais, a hemólise. O HCM e o CHCM dos pacientes desta casuística foram significativamente mais elevados do que aqueles do grupo de crianças e adolescentes sem malária, provavelmente em consequência da lise dos eritrócitos por fenômenos mecânicos e imunológicos desencadeados pelo plasmódio (Menendez *et al.*, 2000; Ekval, 2003; Garanito, 2008).

Nos pacientes houve predomínio de anemia normocítica e normocrômica (55,7%), semelhante ao observado por inúmeros outros autores tanto em países africanos quanto no Brasil (Stein & Gelfand, 1985; de Freitas, 2004; Jain & Kaur, 2005).

7.5.4. Eritrócitos e Hematócrito

Paralelamente à taxa de hemoglobina que foi significativamente menor nas crianças e adolescentes com malária do que nas do grupo controle, os eritrócitos e o hematócrito também estavam significativamente diminuídos nos pacientes. Tais alterações foram transitórias, com elevação e normalização no final do tratamento e/ou no primeiro controle de cura e sugerem uma resposta hematopoiética da medula óssea, favorecida pela negatização da parasitemia em decorrência da administração dos antimaláricos, não havendo, via de regra, necessidade de outros procedimentos terapêuticos, tais como administração de ferro ou transfusão sanguínea (Selvam & Baskaram, 1996).

7.5.5. Reticulócitos

A despeito das crianças e adolescentes com malária apresentarem reticulócitos dentro dos valores considerados normais, a média ($1,1 \pm 0,9 \%$) foi significativamente maior do que àquela dos indivíduos do grupo controle ($0,8 \pm 0,8 \%$). No final do tratamento, houve um aumento significativo da contagem de reticulócitos, o que demonstra de modo indireto que houve resposta da medula óssea à anemia (Wickramasinghe & Abdalla, 2000; Chang & Stevenson, 2004).

7.5.6. Série Branca

Na malária é comum o encontro de leucócitos com valores normais ou diminuídos, embora também possa haver leucocitose. Em 64,5% dos pacientes os leucócitos estavam em número normal. Este percentual foi inferior aos 77,2% observados em coreanos adultos com malária *vivax* (Oh *et al.*, 2001), mas superiores aos 43% encontrados em indivíduos amazônidas com malária por *P. vivax* e/ou *P. falciparum* (de Freitas, 2004).

Leucopenia (leucócitos inferiores a $4.000/\text{mm}^3$) foi encontrada em 34,2% das crianças e adolescentes, num percentual superior (19,9%) ao registrado por Oh *et al.* (2001), contudo inferior (57%) ao observado por de Freitas (2004). A leucopenia, como postulam McKenzie *et al.* (2005), pode ser consequência do deslocamento dos leucócitos da circulação periférica para o baço e outros órgãos hematopoiéticos, ao invés de estase ou depleção.

Houve uma correlação positiva e significativa entre leucócitos e parasitemia, semelhante ao observado no estudo conduzido por McKenzie *et al.* (2005) em 4.697 indivíduos com malária (*P. vivax*, *P. falciparum*) na Tailândia e no Peru. Em nossa casuística, a observação dessa correlação positiva pode a primeira vista parecer incongruente, considerando-se o predomínio de leucócitos em níveis normais e somente 1,3% de leucocitose no momento do diagnóstico. Entretanto se lembrarmos que nestes pacientes, houve uma correlação significativa positiva entre tempo de doença e parasitemia e portanto, maiores níveis de parasitemia antes do diagnóstico, pode-se especular que nos sítios inflamatórios, os leucócitos estivessem aumentados para limitar e/ou coibir a infecção desencadeada pelos parasitos (corroborada pela tendência de associação entre o tempo de doença e a contagem de leucócitos).

Com o desaparecimento da parasitemia e a resolução da infecção, os leucócitos, particularmente os eosinófilos, os segmentados e os linfócitos, que estavam diminuídos no início do tratamento, se elevaram e retornaram aos seus níveis de normalidade no final do tratamento e no primeiro controle de cura, de forma semelhante ao evidenciado no *follow-up*

de indivíduos com malária em Papua, Nova Guiné (Taylor *et al.*, 2008), em Bangkok, na Tailândia (Tangpukdee *et al.*, 2008), na Índia (Kumaresan & Selvam, 1991) e na Venezuela (Rodriguez-Morales *et al.*, 2005).

7.5.7. Série Plaquetária

A plaquetopenia (contagem de plaquetas abaixo de $150.000/\text{mm}^3$) foi observada em 67,1% de nossos pacientes, frequência similar à da literatura (Patel *et al.*, 2004; Kumar & Shashirekha, 2006, Araujo *et al.*, 2008). Apesar de comumente observada, a diminuição de plaquetas no sangue circulante de indivíduos com malária raramente se acompanha de distúrbios hemorrágicos, fato por nós observado, mesmo naqueles (7,5%) que apresentavam plaquetas abaixo de $50.000/\text{mm}^3$, nível considerado crítico pelos hematologistas para o aparecimento de sangramento (Rothschild & Carneiro, 2003). Infelizmente, a despeito da endemicidade da doença na Região Amazônica, é comum vermos pacientes com malária recebendo concentrado de plaquetas, na ausência de hemorragia, denotando a falta de familiaridade dos profissionais de saúde com a doença e com seu manejo clínico.

Ao se acompanhar a evolução da contagem de plaquetas durante o seguimento clínico-laboratorial das crianças e adolescentes com malária, verificou-se que as plaquetas, que estavam baixas (141.328 ± 87.404 plaquetas/ mm^3) no início do tratamento, também se elevaram e se normalizaram no término do tratamento e no primeiro controle de cura, respectivamente 295.328 ± 116.527 e 252.356 ± 59.8 plaquetas/ mm^3 . Estes resultados confirmam que a plaquetopenia da malária é um fenômeno transitório, normalizando-se no sangue circulante com a instituição do tratamento anti-malárico (Adepapo *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2008).

Observou-se em nossa casuística uma correlação negativa significativa entre a parasitemia e a contagem de plaquetas. Correlação dessa natureza é controversa na literatura, estando presente (Ladhani *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2008) ou ausente (Adepapo *et al.*, 2007).

Recentemente McMorran *et al.* (2009), em experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* em camundongos, sugeriram que as plaquetas poderiam contribuir para a destruição do plasmódio. Embora o presente estudo não tenha sido conduzido para abordar esse aspecto da fisiopatogenia da malária, esse é um assunto interessante, haja vista termos observado associação negativa entre plaquetas e parasitemia. A diminuição das plaquetas no sangue circulante no início do tratamento com normalização após o uso de antimaláricos poderia

significar que essas células estariam comprometidas de alguma forma com o controle da parasitemia, por exemplo estando aderidas aos eritrócitos parasitados.

O hemograma das crianças e adolescentes com primoinfecção e daquelas com passado de malária foi similar no que diz respeito à série vermelha (hemoglobina, eritrócitos, hematócrito) e aos leucócitos. A contagem de plaquetas, entretanto, foi significativamente mais baixa naquelas com primoinfecção, que também apresentaram parasitemia média significativamente maior. Estes achados diferem do observado por Taylor *et al.* (2008) que não evidenciaram diferenças nos valores de plaquetas em populações com graus variados de exposição ao plasmódio.

7.6. DADOS IMUNOLÓGICOS NA MALÁRIA VIVAX:

7.6.1. Imunoglobulinas Ig M e IgG anti-*P. vivax*

Anticorpos IgM anti-*P. vivax* foram evidenciados em 63,6% das crianças e adolescentes com malária. Este percentual foi superior aos 19% de resposta para anticorpos IgM anti-*P.vivax* encontrados por de Freitas (2004) em indivíduos (predominantemente adultos) com malária na Região Amazônica. Do mesmo modo, os títulos de anticorpos IgM, que em nossos pacientes variaram entre 40 a 640, foram superiores àqueles (entre 40 a 320) observados por de Freitas (2004). Tal diferença poderia ser atribuída ao fato de que crianças parecem expressar com mais frequência anticorpos anti-plasmodiais da classe IgM do que adultos (Bouharoun-Tayoun & Druilhe, 1992) ou pela dificuldade de se detectar anticorpos de classe IgM por usualmente serem de baixa afinidade e por terem meia vida curta (Spiegelberg, 1974). Apesar dessas considerações e mesmo que essa diferença fosse significativa, não se poderia afirmar que as crianças e adolescentes com malária *vivax* apresentaram uma resposta imune mais efetiva do que àquela evidenciada por de Freitas (2004), pois cabe lembrar que na malária, a proteção conferida por alguns anticorpos não se correlaciona necessariamente com sua quantidade (frequência, títulos), mas com a qualidade da resposta imune, dada pelo predomínio de anticorpos citofílicos (IgG1, IgG3) sobre aqueles não citofílicos (IgG2, IgM) (Druilhe & Kusmith, 1987; Marsh *et al.*, 1989, Bouharoun-Tayoun & Druilhe, 1992).

Anticorpos IgG anti-*P. vivax* estavam presentes em 90,9% das crianças e adolescentes com malária e em 9,7% daquelas sem malária (grupo controle) possivelmente por terem tido malária no passado, não referida pelos seus familiares. Entretanto, nas crianças e adolescentes

do grupo controle, a pesquisa de plasmódio em gota espessa e a pesquisa de anticorpos de classe IgM (mais frequentemente associados à infecção aguda) anti-*P. vivax* foram negativas. Ademais, é provável que não tenham apresentado febre ou outros sintomas sugestivos de malária nos dias subsequentes de acompanhamento clínico do caso-índice que justificasse a procura para atendimento clínico e repetição da pesquisa de plasmódio no sangue periférico.

O elevado percentual de resposta IgG observada em nossos pacientes (90,9%) e os 100% registrados por Pinto *et al.* (2001) em uma população infanto-juvenil com malária *vivax* foram superiores aos 62% encontrado por de Freitas (2004) também em indivíduos com malária *vivax*, na maioria adultos.

Não somente a freqüência, mas também os títulos de anticorpos anti-*P. vivax* estiveram elevados. Eles foram assim distribuídos: 9,2% não reagentes, 15,8% títulos baixos (40 a 640), 23,7% títulos moderados (640 a 2.560) e 51,3% títulos elevados (5.120 a maior ou igual a 10.240). Apesar dessa “exuberante” resposta imune, por não termos avaliado as subclasses desses anticorpos, não nos foi possível obter conclusões mais aprofundadas sobre seu papel anti-plasmodial. Por outro lado, Pinto *et al.* (2001) que encontraram maior freqüência de anticorpos citofílicos sobre não citofílicos em pacientes semi-imunes ou não imunes e Whalgren *et al.* (1983; 1986) que evidenciaram níveis elevados de IgG2 (não citofílica) em indivíduos primoinfectados concluíram pela influência de diferentes graus de exposição ao *P. falciparum* na geração dessa resposta.

Títulos moderados ou elevados de anticorpos IgG foram mais frequentes em pacientes anêmicos (79%) do que não anêmicos (61%), não atingindo contudo níveis de significância a ponto de serem associados à anemia.

Imunoglobulinas na superfície de eritrócitos infectados podem desempenhar um papel importante na gênese da anemia da malária, ou mesmo surgir em consequência da destruição dos eritrócitos. Por exemplo, Scholander *et al.* (1998) não evidenciaram diferenças na ligação das imunoglobulinas (IgG e IgM) em eritrócitos de crianças anêmicas e não anêmicas com malária *falciparum*, apesar de terem observado maior ligação desses anticorpos na superfície dos eritrócitos das crianças com anemia moderada, concluindo ser um evento que merece novos estudos no contexto da interação parasito- hospedeiro.

Em D0, os títulos de IgG mostraram correlação negativa, não significativa, com a parasitemia. Se tal observação indica uma real tendência, que, de fato, teria sido registrada com uma amostragem maior, é possível que essa correlação tenha sido influenciada pelo intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico de malária, que por sua vez teve correlação positiva com a parasitemia (associada à história pregressa de malária). De fato, considerando

que tais pacientes não apresentavam alta parasitemia, pode-se cogitar que no momento do diagnóstico esses anticorpos já estavam presentes na circulação há algum tempo, tentando limitar a parasitemia, em cooperação com a resposta imune celular.

Por outro lado, se a falta de significância estatística aponta para uma real ausência de correlação entre resposta IgG e parasitemia, cabe lembrar os resultados de Pinto *et al.* (2001) em crianças e adolescentes amazônidas com malária *vivax*, no primeiro dia de tratamento. Esses autores salientaram a dificuldade de correlacionar os títulos de anticorpos IgG encontrados em seus pacientes com a parasitemia assexuada, pela variabilidade de tempo entre o número de dias decorridos entre o início da doença e a mensuração dos anticorpos.

Os anticorpos IgG e IgM anti-*P. vivax* das crianças e adolescentes com malária apresentaram correlação com os leucócitos, demonstrando resposta humoral efetiva contra o parasito, provavelmente auxiliando a limitar a infecção, uma vez que os anticorpos IgG (citofílicos), em cooperação com os monócitos, podem atuar na opsonização e na fagocitose de eritrócitos, via receptores FcyRI, FcyRII e FcyRIII, promovendo a inibição celular dependente de anticorpos-ADCI (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990; Jafarshad *et al.*, 2007). Parece também que os anticorpos IgM possam exercer um efeito protetor, como evidenciado pela correlação inversa entre os títulos de tais anticorpos e a parasitemia, em crianças e adolescentes africanas com malária *falciparum* (Boudin *et al.*, 1993).

Títulos significativamente maiores de IgG (entre 5.120 e igual ou maior que 10.240) foram observados entre as crianças e adolescentes com passado de malária, sugerindo que o contato prévio com antígenos plasmodiais foi capaz de desencadear resposta de linfócitos B de memória nestes pacientes. Parece razoável supor que esta resposta, ao ser mobilizada, tenha sido efetiva, pois tais pacientes apresentaram menor parasitemia, clareamento mais precoce desta parasitemia e menos anemia moderada/grave do que aqueles com primoinfecção, em conformidade com o papel esperado em termos de evolução clínica e parasitológica da malária (Gray & Skarvall, 1988; Struik & Riley, 2004; Jangpatarapongsa *et al.*, 2006).

Títulos de IgG compatíveis com uma resposta imune de células B de memória nos pacientes com passado de malária pode ter ocorrido tanto naqueles que referiram o último episódio há menos de 180 dias (52,2%) como também naqueles que relataram o último episódio da doença entre oito meses a sete anos do episódio atual (30,4%), em conformidade com Migot *et al.* (1995) que observaram longa duração da resposta imune de células B de memória, até oito anos após a aquisição de malária, em alguns indivíduos residentes em Madagascar.

Anticorpos reagentes anti-*P. vivax* foram observados não somente no primeiro dia de atendimento (D0), como no final de tratamento (D7) e no primeiro controle de cura (D30), respectivamente em 91,4%, 95,7% e 92,9% dos pacientes (amostra pareada). Metade destes pacientes possuía títulos elevados em D0 e D7, enquanto que no controle de cura predominaram títulos mais baixos (28,6%, para títulos entre 40 a 320 e 41,4% para títulos entre 640 a 2.560). Essa persistência de anticorpos, inclusive com títulos elevados, no curso da infecção malárica parece ser compatível com ativação policlonal de linfócitos B em resposta a antígenos específicos, semelhante às observações de Banic *et al.* (1991) em pacientes com malária *falciparum*.

Ademais, convém salientar que esses anticorpos podem estar presentes na circulação sanguínea por meses ou anos, em títulos decrescentes, constituindo-se numa ferramenta útil para inquéritos epidemiológicos em área de transmissão de malária, expressando infecção plasmodial progressa, embora não sejam utilizáveis como parâmetros indicativos de resposta clínica ou parasitológica (Braga *et al.*, 1998; Bruschi & Castagna, 2004).

7.6.2. Fator de Necrose Tumoral e Interleucina -10

O TNF das crianças e adolescentes com malária variou entre valores não detectáveis até 490 pg/ml. Ampla variação dessa citocina foi também observada em outros estudos: TNF plasmático entre 11 a 728 pg/ml em adolescentes e adultos com malária *vivax* nas ilhas Salomão, no Pacífico (Butcher *et al.*, 1990) e TNF plasmático entre 0 a 9.400 pg/ml em crianças com malária *falciparum*, no Zaire (Shaffer *et al.*, 1991).

Entretanto, e de forma surpreendente, o TNF foi significativamente menor nas crianças e adolescentes com malária ($16 \pm 58,3$ pg/ml) do que no grupo controle ($25,5 \pm 46,4$ pg/ml), em desacordo com a literatura onde se costuma observar níveis elevados dessa citocina associados à malária, pela sua característica atividade pró-inflamatória (Clark *et al.*, 1989; Shaffer *et al.*, 1991; Mendis *et al.*, 1992). Os baixos níveis de TNF de nossos pacientes não parecem ser resultado de falhas na condução do experimento, do modo de coleta e de armazenamento do material (Dugué *et al.*, 1996) e/ou da execução dos testes de ELISA, os quais foram realizados seguindo-se as orientações do fabricante. Ademais, as alíquotas de plasma de D0, D7, D30 e do grupo controle para essa citocina (e para a interleucina-10) foram testadas aleatoriamente.

Também surpreendente foi o fato dos pacientes anêmicos terem apresentado TNF significativamente menor do que o grupo controle com anemia. Essa resposta do TNF parece

paradoxal, se comparada com os níveis significativamente elevados dessa citocina em crianças anêmicas com malária *falciparum* residentes em área holoendêmica da África para a doença (Kurtzhals et al., 1998; Othoro et al., 1999; Nussenblatt et al., 2001). Na região Amazônica, Fernandes et al. (2008) também encontraram níveis elevados de TNF em pacientes com malária *vivax* ou com malária *falciparum* e, embora não tivessem verificado diferença nas concentrações dessa citocina entre anêmicos e não anêmicos na infecção por *P. vivax*, encontraram em indivíduos com malária *falciparum* não complicada, níveis menores de TNF nos anêmicos do que nos não anêmicos.

Dentre os pacientes anêmicos, os níveis de TNF também foram significativamente mais baixos naqueles com anemia moderada/grave em relação aos que tinham anemia leve. Como justificar este resultado, se níveis elevados de TNF parecem estar relacionados às complicações da malária (Grau et al., 1989; Shaffer et al., 1991; Kurtzhals et al., 1998)? Pode-se considerar a existência de uma “inibição transitória” do TNF, secundária a dois mecanismos, não excludentes: a) desequilíbrio na resposta imunológica TH1/TH2, com predomínio da resposta TH2, em consequência da elevada frequência de parasitose intestinal e/ou do tempo prolongado de doença; b) elevação dos níveis de cortisol em decorrência do stress determinado pelo parasito.

De fato, na busca pelo entendimento dos complexos mecanismos que regem a interação entre plasmódio e o homem, recentemente, vem se dando importância a um possível papel dos parasitos intestinais sobre a modulação da resposta imune do organismo diante da infecção plasmodial, haja vista ser comum elevada prevalência de malária e de parasitose intestinal numa mesma população, ambas com potencial para causar anemia (Druilhe et al., 2005; Brooker et al., 2006).

Na inter-relação entre helmintos e o hospedeiro, frequentemente observada em ambientes com baixas condições de higiene e saneamento, há um predomínio da resposta TH2, com a finalidade de controlar os parasitos intestinais e reparar os danos teciduais por eles causados (Basavaraju & Schantz, 2006; Diaz & Allen, 2007; Hewitson et al., 2009) Se considerarmos que 78,5% das crianças e adolescentes com malária apresentavam parasitose intestinal, poderíamos supor que a resposta TH2 predominou sobre a resposta TH1, de modo que a produção de TNF, TH-1 induzida, não pode ser expressa em toda sua magnitude?

No momento do diagnóstico, observou-se uma correlação negativa significativa entre o TNF e tempo de doença, ou seja, o tempo decorrido sem tratamento contribuiu para que as crianças e adolescentes com malária apresentassem níveis significativamente mais baixos de TNF (inclusive àquelas com anemia moderada/grave) do que as crianças e adolescentes sem

malária. Salienta-se também que o tempo de doença teve uma relação indireta com a taxa de hemoglobina, inclusive após a análise multivariada para observar de fato que fatores estariam influenciando a anemia dos pacientes.

O tempo de doença também esteve positivamente associado com a parasitemia. É possível que o tempo decorrido entre o início dos sintomas e o momento do diagnóstico tenha contribuído para que o organismo simultaneamente desencadeasse outros mecanismos, além do TNF, sabidamente capazes de inibir o crescimento plasmodial e assim limitar a parasitemia, como por exemplo, liberação de IL-4, que caracteriza uma resposta do tipo TH2 com anticorpos. Winkler *et al.* (1998) estudando por meio de citometria de fluxo, o fenótipo e a frequência com que as células T induziam a produção de citocinas TH1 e TH2, no curso da infecção por *P. falciparum* em indivíduos africanos com idade entre 4 a 35 anos, observaram uma resposta desviada para TH2 antes do tratamento antimalárico e que decresceu com a resolução da parasitemia, sendo substituída por uma resposta direcionada para TH1 em células T periféricas, com maior produção de IFN- γ sobre IL-4.

Por outro lado, é possível que os níveis baixos de TNF estivessem relacionados ao cortisol plasmático, que possui ação anti-inflamatória e imunossupressora, expressando a inter-relação entre os sistemas imune e neuro-endócrino. Na vigência de uma infecção, o organismo vivencia uma situação de stress, o que leva à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, com liberação de hormônios, dentre os quais o cortisol, que além de suas funções endócrinas, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimula os linfócitos TH2 à produção de IL-4, IL-10 e IL-13 (Imura *et al.*, 1991; Elenkov, 2004). Libonati *et al.* (2006) verificaram em pacientes da Região Amazônica com malária *falciparum* que o cortisol, no momento do diagnóstico, se encontrava elevado, estando seu declínio associado à diminuição da parasitemia.

Neste estudo, também se observou uma correlação positiva entre TNF e taxa de hemoglobina, que divergiu do comumente descrito na literatura, onde se nota ausência ou correlação indireta entre TNF e taxa de hemoglobina (anemia) (Shaffer *et al.*, 1991; Kurtzhals *et al.*, 1998; Nussenblatt *et al.*, 2001). No entanto, de Freitas (2004), em indivíduos predominantemente adultos com malária da região Amazônica, também observou uma correlação positiva entre TNF e taxa de hemoglobina, tendo sugerido que essa correlação poderia estar exercendo um efeito “protetor” agindo predominantemente na eliminação dos parasitos durante a fase aguda da infecção, uma vez que a maioria dos indivíduos apresentava anemia leve. Se essa hipótese estiver correta, o TNF poderia ter apresentado um papel duplo: induzido anemia, em 66,1% de grau leve e conjuntamente com outros fatores ter corroborado

para os casos de anemia moderada/grave, estando transitoriamente “inibido” no momento do diagnóstico.

Nos pacientes, os níveis plasmáticos de TNF foram aumentando na medida em que a parasitemia decrescia e a taxa de hemoglobina gradualmente se elevava, em consequência do tratamento antimalárico. Observou-se também uma correlação negativa, embora não significativa, entre o TNF e a parasitemia. Parece pouco provável que os antígenos do parasito não tivessem sido capazes de estimular os macrófagos na produção de TNF, sendo, portanto, mais plausível supor que sua presença no plasma estivesse “inibida”. O desaparecimento da parasitemia associou-se significativamente com o aumento da taxa de hemoglobina (inclusive na análise multivariada) que ocorreu, junto com o incremento dos níveis de TNF, após o tratamento até o controle de cura, de forma semelhante à evolução clínica da malária *vivax* ou da malária *falciparum*, respectivamente em populações infanto-juvenis amazônica e africana (Ventura, 1997; Biemba *et al.*, 1998, Nussenblatt *et al.*, 2001).

Salienta-se ainda que os níveis significativamente baixos de TNF encontrados no momento do diagnóstico nas crianças e adolescentes com malária desse estudo podem estar subestimados, à custa de um fator inibidor presente em eritrócitos, conforme evidenciado por Sheikh *et al.* (1996) em experimentos realizados inicialmente em camundongos infectados pelo *P. yoelii* (cepa 17 X) e repetidos em camundongos infectados por *P. berghei* ANKA e por *P. chabaudi* (cepa AS). Embora esses autores não tivessem identificado a natureza bioquímica desse inibidor, relacionaram sua presença aos eritrócitos infectados, estabeleceram ser específico para malária (afastando a contaminação por lipopolissacarídeos) e excluíram outros potenciais fatores que pudessem interferir na mensuração de citocinas, e que pudessem estar presentes no soro destes camundongos, tais como receptores solúveis do TNF, anticorpos heterófilos, fator reumatóide, complemento e α 2- macroglobulina.

A elevação significativa dos níveis do TNF ($23,3 \pm 16,6$ pg/ml) ao término do tratamento, após a administração dos antimaláricos supõe “normalização” dos níveis dessa citocina num patamar semelhante ao do grupo controle ($25,5 \pm 46,4$ pg/ml). Em D30, no controle de cura, os níveis do TNF ($49,3 \pm 79,7$) dos pacientes apresentaram valores significativamente mais elevados do que no início do tratamento, onde além dos antimaláricos, os indivíduos também tinham recebido tratamento para as parasitoses intestinais. Infelizmente, não houve o seguimento do grupo controle para que pudessemos mensurar os níveis do TNF pós-tratamento dos helmintos e protozoários neste grupo sem malária e assim, comparar com os resultados obtidos nas crianças e adolescentes com malária em seu primeiro controle de cura.

Em resumo, as concentrações plasmáticas de TNF destas crianças e adolescentes com malária apresentaram um perfil totalmente diferente do que se observa comumente na malária, julgando-se que estivessem “transitoriamente” inibidas. Apesar das especulações sobre algumas das causas dessa provável “inibição”, permanece a questão porque esse fenômeno não foi ainda evidenciado em outros indivíduos com malária em diversas situações de endemidade em países da África, da Ásia ou das Américas. Portanto, outros estudos envolvendo crianças e adolescentes com malária na Amazônia necessitam ser conduzidos direcionados especificamente para o comportamento evolutivo do TNF, a fim de verificar se os níveis baixos de TNF, no momento do diagnóstico (e que depois se elevaram, atingindo valores próximos ao do grupo controle) estiveram realmente associados à anemia moderada/grave ou se representaram uma associação espúria.

A produção de IL-10, secretada por células TH2 inibe a função de células TH1, envolvidas na produção de TNF, IFN- γ , IL-1 e IL-6, citocinas que desempenham importante papel na fisiopatologia da malária (Mosmann & Moore, 1991; Peyron *et al.*, 1994). Em nosso estudo, os níveis plasmáticos de IL-10 foram significativamente maiores nos pacientes do que nos indivíduos do grupo controle, respectivamente de $199,7 \pm 362,4$ pg/ml e de $43,2 \pm 94,8$ pg/ml, com ampla variação nos valores mínimo e máximo observados, semelhante aos detectados para o TNF. Fernandes *et al.* (2008) também observaram altas concentrações de IL-10 em pacientes da Amazônia brasileira com malária *vivax*.

As concentrações plasmáticas de IL-10 tiveram correlação positiva e significativa com a parasitemia, justificando os níveis elevados dessa citocina no momento do diagnóstico, onde se acredita que estivesse sendo liberada exercendo atividade anti-inflamatória ou imunorreguladora, desviando a resposta imune para TH2 (Mosmann & Moore, 1991). Esse resultado esteve em conformidade com o observado por Jason *et al.* (2001) ao estudar o comportamento de várias citocinas, entre as quais, a IL-10 em indivíduos com malária, correlacionando-as com a parasitemia; com o encontrado por Luty *et al.* (1998) ao verificarem a participação ativa da IL-10 de *per se* ou estimulando os linfócitos B a produzirem anticorpos para que houvesse o declínio da parasitemia; e com o evidenciado por de Freitas (2004) que encontraram níveis elevados de IL-10 associados à parasitemia em indivíduos da Amazônia, provavelmente regulando a produção excessiva de citocinas TH1, especialmente o TNF.

A IL-10 também esteve mais elevada no grupo anêmico com malária do que naqueles anêmicos sem malária. Contudo, não houve diferença entre os valores dessa citocina para os diferentes graus de anemia (leve, moderada/grave) nos pacientes, divergindo portanto, dos

achados de Kurtzhals *et al.* (1998) em que as crianças e adolescentes de Gana com anemia grave apresentavam níveis plasmáticos de IL-10 significativamente menores que àquelas com malária cerebral ou com malária *falciparum* não complicada.

Se nestes pacientes a IL-10 estiver de algum modo neutralizando o efeito deletério do TNF em determinar anemia grave, é possível que sua associação significativa com anemia, esteja relacionada à anemia de grau leve, justificando a correlação positiva (não significativa) entre IL-10 e taxa de hemoglobina, em uma doença que por excelência predispõe à anemia, por mecanismos diversos e interrelacionados. Neste sentido, a IL-10 pode ter tido um comportamento similar àquele observado por de Freitas (2004) em indivíduos com malária, que apresentavam anemia predominantemente de grau leve e concentrações elevadas de IL-10, sugerindo que estivessem induzindo maior proliferação e diferenciação de linfócitos B para produção de anticorpos, visando aumentar a efetividade da resposta fagocitária aos eritrócitos infectados ou controlando a atividade inflamatória do TNF.

A IL-10 esteve associada à presença de anticorpos IgM anti-*P. vivax*. É possível que tal resultado no momento do diagnóstico possa refletir a liberação dessa citocina na fase aguda da infecção, em relação direta com a associação observada entre leucócitos e IgM, tendo contribuído para o declínio da parasitemia (correlação positiva significativa) semelhante ao evidenciado por de Freitas (2004) que também encontrou concentrações mais elevadas de IL-10 em pacientes amazônidas com malária *vivax* IgM reagentes. Ademais, Siddiqui *et al.* (2008) igualmente evidenciaram uma resposta imune humoral associada a uma resposta imune celular tipo TH2, ao estudar um antígeno (Pv TRAg40) expresso nas formas em anéis, trofozoítos e esquizontes do *P. vivax*, capaz de suscitar além de uma elevada resposta imune humoral (90,7% de soropositividade), uma resposta linfoproliferativa com grandes quantidades de IL-12, IL-4 e IL-10 com provável efeito protetor, em comparação com as quantidades de IFN- γ e TNF.

No acompanhamento clínico e parasitológico das crianças e adolescentes com malária, o comportamento evolutivo da IL-10 foi o oposto daquele do TNF nos pacientes com malária (amostra pareada): decréscimo significativo nos níveis plasmáticos da IL-10: $64,9 \pm 21,2$ pg/ml e $35,3 \pm 51,1$ pg/ml, em D7 e em D30, se comparado com aqueles observados no primeiro dia de atendimento, de $190,8 \pm 350,6$ pg/ml. O declínio gradual da IL-10 pode ser entendido como uma consequência natural de interrupção do estímulo que motivou a resposta TH2 nestes pacientes: a infecção malárica e provavelmente a parasitose intestinal, ambos tratados conforme preconizado. Mosmann & Moore (1991) salientam o papel da IL-10 na regulação do sistema imune para que atinja um estado de equilíbrio, após uma intensa

resposta TH1 ou TH2, atuando na liberação de subclasses de anticorpos ou pela meia vida curta das células produtoras de altos níveis de citocinas ao entrarem em apoptose ou modificando seu fenótipo pós remoção do estímulo antigênico.

Diversos estudos conduzidos em crianças e adultos apontam para a correlação entre os níveis de TNF e IL-10 na patologia da malária, particularmente nas complicações, tais como malária cerebral e anemia (Kurtzhals *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 1998; Nussenblatt *et al.*, 2001). Em nossos pacientes, os níveis plasmáticos de TNF e de IL-10 mostraram uma correlação direta, porém não significativa, provavelmente pelas diversas funções que essas citocinas podem desempenhar na fisiopatogenia da malária (Malaguarnera & Musumeci, 2002). Concentrações plasmáticas elevadas de IL-10 não correlacionada com os níveis de TNF também foram relatadas por Peyron *et al.* (1994) em crianças e adultos com malária *falciparum* complicada, em que essa citocina teria um papel benéfico, ao reduzir a resposta inflamatória TNF-induzida pelo parasito, ou um papel maléfico, ao diminuir a resposta imune celular.

7.6.3. Razão IL-10/TNF

O padrão predominante de resposta das citocinas TH1 (TNF, IFN γ , IL-2) e das citocinas TH2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10) pode ser decisivo para o aparecimento de manifestações graves nos indivíduos com malária, a qual pode ser avaliada pela razão IL-10/TNF (Kurtzhals *et al.*, 1998; Nussenblatt *et al.*, 2001). Em nossa casuística não foram observadas diferenças na razão IL-10/TNF entre as crianças e adolescentes com malária e àquelas do grupo controle, o oposto do relatado por Othoro *et al.* (1999) que evidenciaram razão IL-10/TNF significativamente menor em crianças e adolescentes africanas com malária *falciparum* e anemia grave em relação àquelas com malária *falciparum* não complicada, particularmente às custas de elevação do TNF.

Diante dessas considerações sobre o TNF e a IL-10 em crianças e adolescentes com malária *vivax*, relacionando-as sobretudo com a anemia moderada-grave, é oportuno ter em mente que as citocinas possuem atividade pleotrópica, que suas atividades biológicas, protetoras ou deletérias, dizem respeito mais aos locais onde estão atuando do que sua presença detectada de forma quantitativa no plasma. Portanto, o desfecho das relações parasito-hospedeiro dependem da natureza, da cinética, da quantidade e dos locais de

produção de citocinas, direta ou indiretamente induzidas pelo parasito.(Grau & Behr, 1995; Malaguarnera & Musumeci, 2002).

7.6.4. Autoanticorpos anti-eritrocíticos

7.6.4.1. Anticorpos anti-eritrocíticos avaliados pelo DAT

Autoanticorpos não são patognomônicos de doenças autoimunes. Ocorrem em indivíduos saudáveis e vem sendo documentados em doenças infecciosas tais como sífilis, hanseníase, HIV/AIDS e em associação com a malária em pacientes de várias idades e de diferentes etnias (para revisão ver Daniel-Ribeiro & Zanini, 2000). No caso do plasmódio, admite-se que o fenômeno autoimune possa ter um papel benéfico (aquisição de uma imunidade anti-tóxica ou anti-parasitária natural) ou deletério, sendo formados em consequência de: a) apresentação de antígenos do parasito que mimetizam moléculas do hospedeiro; b) exposição de neo-antígenos ou cripto-antígenos na membrana do eritrócito parasitado; c) material derivado do parasito (aderido aos eritrócitos infectados e não infectados) ou contra ligantes do parasito no eritrócito dotados de propriedades mitógenas ou indutores da produção de TNF; d) exposição de epítomos antigênicos consequentes as alterações morfológicas da membrana ou de seus componentes (proteínas, fosfolipídios) e e) por anticorpos anti-idiotipo (contra anticorpo específico para um ligante do parasito no receptor do eritrócito) (Daniel-Ribeiro, 2000; Daniel-Ribeiro & Zanini, 2000).

Nessa casuística os anticorpos antieritrocíticos foram avaliados pelo teste de antiglobulina direto (DAT, que detecta eritrócitos sensibilizados por imunoglobulinas em sua membrana) e pelo ensaio imunoenzimático (ELISA, que detecta anticorpos dirigidos contra eritrócitos normais no soro dos pacientes). Foram encontrados pelos dois métodos em percentuais significativamente superiores em crianças e adolescentes com malária do que naquelas do grupo controle.

DAT positivo foi observado em 26,7% dos pacientes. Resultados superiores aos nossos, respectivamente 50 e 70% foram encontrados em crianças africanas com malária *falciparum* em Gâmbia (Facer, 1979) e em Quênia (Abdalla *et al.*, 1983) e inferiores, 13,3%, e 0,5% em adultos amazônidas com malária *vivax* e/ou malária *falciparum* (de Freitas, 2004; Ferreira *et al.*, 2007).

A parasitemia não influenciou na resposta ao DAT de nossos pacientes, de forma similar ao evidenciado por Helegbe *et al.* (2007) em crianças com malária grave

(*P. falciparum*) em Gana (África), porém divergente dos estudos também em crianças africanas, conduzidos por Facer (1979,1980a) onde tais anticorpos estiveram associados à parasitemia. Tais resultados discrepantes podem estar relacionados à intensidade do fenômeno de sensibilização que pode concernir somente aos eritrócitos parasitados ou tanto aos parasitados quanto os não parasitados, como observado nos estudos experimentais conduzidos por Helegbe *et al.* (2009) em camundongos infectados por *P. berghei* e nas crianças africanas estudadas por Facer *et al.* (1979), em que autoanticorpos antieritrocíticos poderiam estar envolvidos na lise ou retirada da circulação de eritrócitos não infectados

A anemia das crianças e adolescentes com malária não esteve relacionada aos anticorpos DAT positivo, embora todas as crianças com anemia grave e 35% das que apresentaram anemia moderada tivessem resposta positiva para esses autoanticorpos. De fato, ao se especular sobre o papel de imunoglobulinas sensibilizando eritrócitos no desencadeamento da anemia, convém considerar que a anemia em crianças africanas com malária *falciparum* pode cursar tanto com DAT positivo (Facer, 1980b, Goka *et al.*, 2001; Helegbe *et al.*, 2007) quanto com DAT negativo (Greenwood *et al.*, 1978). Casuísticas da Região Amazônica, envolvendo pacientes adultos com malária *vivax*, malária *falciparum* ou malária mista (*Pv* + *Pf*), também não evidenciaram associação do DAT com anemia (de Freitas, 2004; Ferreira *et al.*, 2007).

Não houve influência do intervalo de tempo para que o diagnóstico de malária fosse estabelecido em nossos pacientes e positividade no DAT. Essa resposta foi coerente com ausência de associação entre anticorpos DAT positivo e anemia nestes pacientes, se considerarmos que o intervalo de tempo para o diagnóstico esteve associado à anemia moderada e anemia moderada/grave, determinadas provavelmente por causas não relacionadas aos anticorpos detectáveis pelo DAT (Ekval, 2003).

Do mesmo modo, não foram encontradas diferenças na resposta positiva para os anticorpos DAT em crianças e adolescentes com primoinfecção e naquelas com passado de malária, semelhante ao observado por Facer *et al.* (1980b) que observaram resposta fortemente positiva ao teste de antiglobulina direto em crianças africanas com diferentes graus de exposição (e de imunidade) ao *P. falciparum*, ao estudarem a expressão de subclasses de IgG relacionadas à positividade desses autoanticorpos, porém diferente dos achados de Penalba *et al.* (1984) que encontraram maior percentual de anticorpos autoimunes anti-eritrocitários em africanos previamente expostos à malária.

Autoanticorpos antieritrocíticos DAT positivos foram evidenciados em percentual mais elevado (38,5%) no final do tratamento (pacientes com parasitemia negativa) do que

aqueles observados no início do tratamento (26,7%), provavelmente relacionados à liberação de antígenos específicos indutores dessa resposta no curso evolutivo da doença (Faceret *et al.*, 1979; Daniel-Ribeiro & Zanini, 2000). De fato, 15% destas crianças e adolescentes com malária mantiveram-se positivas até o primeiro controle de cura, comportamento semelhante àquele relatado por Facer *et al.* (1979) em crianças africanas.

Dentre os pacientes com anticorpos antieritrocíticos DAT positivos, 80% tinham anemia leve ou moderada no final do tratamento, enquanto que 17,6% tinham anemia leve no primeiro controle de cura. A despeito desses percentuais, tais autoanticorpos não estiveram associados à anemia, a qual pode ter sido causada por outro tipo de autoanticorpo (Ritter *et al.*, 1993).

7.6.4.2. Anticorpos antimembrana de eritrócitos normais (ELISA)

O comportamento dos anticorpos antimembrana de eritrócitos nas crianças e adolescentes com malária foi semelhante ao identificado para os anticorpos antieritrocíticos avaliados pelo DAT (ELISA), expressando como o próprio nome indica, anticorpos que foram produzidos contra componentes de eritrócitos normais e que se encontravam livres na corrente circulatória. Tais anticorpos estiveram significativamente presentes em 53,2% das crianças e adolescentes com malária, se comparados a 6,0% no grupo controle, similar aos 56% observado por de Freitas (2004) e inferior aos 84% relatados por Zanini (2001), ambos em soro de indivíduos amazônidas com malária.

Os eritrócitos durante sua meia vida sofrem insultos oxidativos que modificam sua membrana e que induzem a formação dos hemocromos (produtos de degradação da hemoglobina). Esses se fixam na proteína banda 3 (principal proteína da membrana eritrocitária) levando a oxidação dessas células e formação de *clusters*. Os *clusters* da proteína banda 3 se ligam aos autoanticorpos naturais (alta afinidade para essas células), o complemento é ativado ocorrendo então a fagocitose desses eritrócitos senescentes. O plasmódio, de forma semelhante ao processo fisiológico para a destruição dos eritrócitos senescentes, também promove alterações oxidativas na membrana dessas células, expondo sítios antigênicos, que são reconhecidos por autoanticorpos, direcionados principalmente para a proteína banda 3, os quais se fixam nessa membrana, ativam o complemento induzindo a fagocitose desses eritrócitos parasitados (Turrini *et al.*, 2003, Arese *et al.*, 2005; Pantaleo *et al.*, 2008). Esse mecanismo parece indicar um papel protetor para esses autoanticorpos durante a infecção malárica, como sugeriu Greenwood, em 1968, ao observar que doenças

autoimunes, tais como o lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatóide, de cunho comprovadamente autoimune, são quatro a seis vezes menos frequentes em africanos (que estão permanentemente expostos à malária) do que nos europeus; e mais recentemente, Daniel-Ribeiro & Zanini (2000) ao fazerem uma extensa revisão sobre o assunto.

Os autoanticorpos antimembrana de eritrócitos de nossos pacientes não se correlacionaram com a história pregressa de malária, com o intervalo de tempo para o diagnóstico de malária e nem com a parasitemia, variáveis que tiveram influência sobre a frequência e/ou intensidade da anemia, podendo significar que a despeito de sua presença, não estiveram envolvidos num desfecho desfavorável, semelhante ao relatado por Zanini (2001) e por de Freitas (2004). A tendência para uma associação entre esses autoanticorpos e os leucócitos, no momento do diagnóstico reforça essa hipótese de proteção, considerando a importância que tem os glóbulos brancos como geradores de resposta imune humoral e celular para coibir e/ou erradicar o parasito.

7.6.5. Anticorpos anticardiolipina:

Anticorpos anticardiolipina foram encontrados significativamente em 50,6% dos pacientes deste estudo, diferente dos demais autoanticorpos que também foram pesquisados estiveram associados à anemia moderada/grave. Se considerarmos que tal manifestação expressou uma forma grave da doença, este resultado concorda com aquele obtido por Jakobsen *et al.* (1993) que demonstraram associação entre gravidade da malária (comprometimento cerebral) e anticorpos anti-fosfolipídicos em um grupo de crianças na Gâmbia, África, e diverge do papel protetor que esses e demais autoanticorpos possam ter na malária (Facer & Agiostratidou, 1994; Daniel-Ribeiro, 2000; Daniel-Ribeiro & Zanini, 2000).

Exceto por esta significativa associação entre estes autoanticorpos e anemia moderada/grave, tais autoanticorpos, à semelhança dos anticorpos antieritrocíticos avaliados pelo DAT e anticorpos antimembrana, não estiveram relacionados com outras variáveis estudadas tais como a parasitemia, o intervalo de tempo decorrido para diagnóstico, o passado de malária, os leucócitos, à reatividade aos anticorpos IgG e IgM anti-*P. vivax*. Por que somente então estes autoanticorpos, e não os demais, estiveram associados com anemia moderada/grave nestas crianças e adolescentes com malária?

É provável que a “especificidade” desses autoanticorpos direcionados para a cardiolipina tenha sido responsável por esse achado. A cardiolipina é um dos componentes da

dupla camada lipídica dos eritrócitos, embora não esteja presente em grande quantidade (cerca de 3%, em conjunto com o fosfatidil inositol, ácido fosfatídico, dentre outros). Em consequência do desenvolvimento do parasito no interior dos eritrócitos, o plasmódio induz substanciais modificações nas propriedades estruturais e funcionais na membrana dessas células (Ginsberg, 1990; Maguire *et al.*, 1991; Hsiao *et al.*, 1991), que podem favorecer o reconhecimento de antígenos compartilhados pelo parasito e pelo hospedeiro (mimetismo molecular), já que o plasmódio não apenas apresenta fosfolipídios integrando sua membrana celular como também sintetiza fosfolipídios (Vial & Ancelin, 1998).

O aumento de anticorpos anticardiolipina de 62,8% no final do tratamento em relação ao percentual de 50,6% no início do tratamento foi semelhante aos achados relatados por Jakobsen *et al.* (1993) na maioria de pacientes Sudaneses com malária *falciparum*, cujos anticorpos anticardiolipina retornaram aos níveis de pré-infecção no trigésimo dia após o início do tratamento antimalárico.

Nestas crianças e adolescentes com malária, o declínio dos autoanticorpos anti-eritrocíticos foi significativamente mais rápido do que os demais autoanticorpos estudados no final do tratamento e no primeiro controle de cura, provavelmente em consequência do gradual processo oxidativo decorrente do parasitismo intraeritrocitário, semelhante ao que se observa com eritrócitos normais senescentes ou com eritrócitos patológicos, por distúrbios enzimáticos ou genéticos (Arese *et al.*, 2005; Pantaleo *et al.*, 2008).

8) CONCLUSÕES:

- A chance das crianças e adolescentes terem anemia foi 2,7 vezes maior no grupo com malária *vivax*. A anemia, presente em 75% das crianças e adolescentes com malária, não esteve relacionada à desnutrição, à parasitose intestinal, à deficiência de G6PD ou ao traço falciforme;
- Anemia leve foi observada em 66,1%, anemia moderada em 30,5% e anemia grave em 3,4% das crianças e adolescentes com malária. Os casos de anemia moderada/grave, significativos no grupo com malária, foram mais frequentes quando houve retardo diagnóstico e predominaram em pacientes com primoinfecção;
- A anemia persistiu durante todo o acompanhamento clínico das crianças e adolescentes com malária, passando de 75% no momento do diagnóstico para 83% no final do tratamento, ainda com alguns casos de anemia moderada e anemia grave, e declinando no primeiro controle de cura para 45,3%, com apenas um caso de anemia moderada e ausência de anemia grave;
- O RDW (Red Width Distribution) e os índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), diferentes da ferritina, mostraram-se úteis para exclusão de deficiência de ferro em crianças e adolescentes com malária;
- Uma resposta imune humoral foi evidenciada pela presença de anticorpos antiplasmodiais da classe IgG e IgM, predominando os títulos de IgG com valores elevados (iguais ou superiores a 10.240), sendo mais frequentemente observados nos pacientes com passado de malária. Os anticorpos IgG anti-*P. vivax* se mantiveram elevados até o controle de cura (D30);
- Títulos moderados ou elevados de anticorpos IgG anti-*P. vivax* foram proporcionalmente mais frequentes em pacientes anêmicos, sem contudo atingirem níveis de significância;
- O nível de TNF das crianças e adolescentes com malária foi mais baixo do que o registrado no grupo de crianças e adolescentes sem malária, e esteve positivamente associado à presença de anemia moderada/grave e ao intervalo de tempo decorrido para o diagnóstico;
- Níveis elevados de IL-10 no momento do diagnóstico das crianças e adolescentes com malária estiveram associados à anemia, sem mostrar, contudo, diferença de frequência quando se estratificou os casos em anemia leve e moderadas/graves, sendo as concentrações plasmáticas maiores nos pacientes que apresentaram resposta IgM anti-*P. vivax*;
- A razão IL-10/TNF não foi diferente entre as crianças e adolescentes com malária, na presença ou ausência de anemia, ou na comparação entre os diferentes graus de anemia;

- Enquanto os níveis plasmáticos de TNF apresentaram elevação significativa no final do tratamento e no primeiro controle de cura, os níveis plasmáticos de IL-10 apresentaram nesse mesmo período, um declínio significativo, tendendo os níveis das duas citocinas à normalidade;
- Autoanticorpos antieritrocíticos avaliados pelo teste de antiglobulina direto (DAT), anticorpos antimembrana de eritrócitos (ELISA) e anticorpos anticardiopina foram mais frequentes nas crianças e adolescentes com malária em relação ao grupo controle, e persistiram, embora em frequência menor, até o primeiro controle de cura. Esses anticorpos não estiveram associados à presença de IgG e IgM anti-*P. vivax*;
- Autoanticorpos antieritrocíticos avaliados pelo DAT e anticorpos anticardiopina (mas não os antimembrana de eritrócitos) foram observados com maior frequência no final do tratamento do que no momento do diagnóstico. Somente os anticorpos anticardiopina estiveram associados à anemia moderada/grave nas crianças e adolescentes com malária;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA S, WEATHERALL DJ, WICKRAMASINGHE SN, HUGHES M. The anaemia of *P. falciparum* malaria. **Br J Haematol.** 1980; 46 (2):171-183.
- ABDALLA SH, KASILI FG, WEATHERALL DJ. The Coombs direct antiglobulin test in Kenyans. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1983; 77 (1): 99 -102.
- ACHIDI EA, APINJOH TO, MBUNWE E, BESINGI R, YAFI C, WENJIGHE AWAH N, AJUA A, ANCHANG JK. Febrile status, malarial parasitaemia and gastro-intestinal helminthiases in schoolchildren resident at different altitudes, in south-western Cameroon. **Ann Trop Med Parasitol.** 2008 Mar; 102 (2):103-118.
- ADEPAPO AD, FALADE CO, KOTILA RT, ADEMOWO GO. Age as a risk factor for thrombocytopenia and anaemia in children treated for acute and uncomplicated falciparum malaria. **J Vector Borne Dis.** 2007; 44:266-271.
- ADIAMAH JH, KORAM KA, THOMSON MC, LINDSAY SW, TODD J, GREENWOOD BM. Entomological risk factors for severe malaria in a peri-urban area of the Gambia. **Ann Trop Med Parasitol.** 1993 Oct; 87(5):491-500.
- AIKAWA M, MILLER LH, JOHNSON J, RABBEGE J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. **J Cell Biol.** 1978; 77: 72-82.
- AKHWALE WS, LUM JK, KANEKO A, ETO H, OBONYO C, BJÖRKMAN A, KOBAYAKAWA T. Anemia and malaria at different altitudes in the western highlands of Kenya. **Acta Trop.** 2004 Jul;91(2):167-175.
- ANTUÑANO FJL. Diagnostico microscopico de los parasitos de la malaria en la sangre. **In:** ANTUÑANO FJL, SCHUMUNIS G. **Diagnostico de Malaria.** Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1988a, p. 39-50.
- ANTUÑANO FJL. Diagnostico microscopico en la sangre - preparacion de muestras en gota gruesa. **In:** ANTUÑANO FJL, SCHUMUNIS G. **Diagnostico de Malaria.** Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1988b, p. 78-86b.
- ARAUJO A, LACERDA MVG, ABDALLA DSP, LIMA ES. The role of platelets and plasma markers of anti-oxidants status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with *vivax* malaria. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2008 Sept; 103 (6):517-521.
- ARESE P, TURRINI F, SCHWARZER E. Band 3/Complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. **Cell Physiol Biochem.** 2005;16: 133-146.
- ARTAVANIS-TSAKONAS K, TONGREN JE, RILEY EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clin Exp Immunol.** 2003 Aug;133(2):145-152.

ASSOBAYIRE FS, ADOU P, DAVIDSSON L, COOK JD, HURRELL RF. Prevalence of iron deficiency with and without concurrent anemia in population groups with high prevalences of malaria and other infections: a study in Côte d'Ivoire. **Am J Clin Nutr.** 2001; 74: 776-782.

AYRES M, AYRES Jr M, AYRES DL, DOS SANTOS AS. In: _____ **BioEstat 3.0. Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas.** Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília, CNPq, 2003. p.291.

BAIRD JK. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. **Parasitol Today.** 1995; 11 (3):105-111.

BANIC DM, VIANA-MARTINS FS, DE SOUZA JM, PEIXOTO TD, DANIEL-RIBEIRO C. Polyclonal B-lymphocytes stimulation in human malaria and its association with ongoing parasitemia. **Am J Trop Med Hyg.** 1991 May; 44 (5): 571-577.

BARREIROS ALBS, DAVID JM, DAVID JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova.** 2006; 29 (1): 113-123.

BASAVARAJU SV; SCHANTZ P. Soil-transmitted helminths and *Plasmodium falciparum* malaria: Epidemiology, clinical manifestations, and the role of nitric oxide in malaria and geohelminth co-infection. Do worms have a protective role in *P. falciparum* infection? **Mt Sinai J Med.** 2006;73(8):1098-1105.

BEISEL WR. Magnitude of the host nutritional responses to infection. **Am J Clin Nutr.** 1997; 30 (8):1236-1247.

BIEMBA G, GORDEUK VR, THUMA PE, MABEZA GF, WEISS G. Prolonged macrophage activation and persistent anemia in children with complicated malaria. **Trop Med Int Health.** 1998 Jan; 3:60-65.

BIEMBA G, GORDEUK VR, THUMA P, WEISS G. Markers of inflammation in children with severe malarial anemia. **Trop Med Int Health.** 2000; 5: 4256-4262.

BORELLI P, BLATT S, ROGERO M, RICARDO AF. Haematological alterations in protein malnutrition. Review. **Rev Bras Hematol Hemoter.** 2004;26(1):49-56.

BOUDIN C, CHUMPITAZI B, DZIEGIEL M, PEYRON F, PICOT S, HÖGH B, AMBROISE-THOMAS P. Possible role of specific immunoglobulin M antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens in immunoprotection of human living in a hyperendemic area, Burkina Faso. **J Clin Microbiol.** 1993 March; 31, (3): 636-641.

BOUHAROUN-TAYOUN H, DRUILHE P. Antibodies in *falciparum* malaria: what matters most, quantity or quality? **Mem Inst Oswaldo Cruz,** 1992; 87 (Supp III):229-234.

BOUHAROUN-TAYOUN H, ATTANATH P, SABCHAREON A, CHONGSUPHAJAISIDDHI T, DRUILHE P. Antibodies that Protect Humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion In vitro, but act in cooperation with monocytes. **J Exp Med.** 1990 Dec; (172):1633-1641.

BRAGA EM, FONTES CJ, KRETYLI AU. Persistence of humoral response against sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to *Plasmodium vivax*. **J Infect Dis.** 1998; 177(4):1132-1135.

BRASÍLIA, IPEA- Objetivos de Desenvolvimento do Milênio- Relatório Nacional de Acompanhamento. Supervisão- Grupo Técnico para o acompanhamento dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (Decreto de 31 de outubro de 2003). **Coordenação do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea) e Secretaria de Planejamento e Investimentos Estratégicos (SPI/MP).** Brasília. 2007; 147p.

BREMAN JG. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria. **Am J Trop Med Hyg.** 2001 Jan-Feb; 64 (1-2Suppl):S1–11.

BRITO F. Transição demográfica e desigualdades sociais no Brasil. **Rev Bras Estud Popul.** 2008; 25 (1):5-26.

BRITO LL, BARRETO ML, SILVA R de C, ASSIS AM, REIS MG, PARRAGA IM, BLANTON RE. Moderate-and-low intensity co-infections by intestinal helminths and *Schistosoma mansoni*, dietary iron intake and anemia in Brazilian children. **Am J Trop Med Hyg.** 2006 Nov;75(5):939-44.

BROOKER S, CLEMENTS ACA, HOTEZ P, HAY SL, TATEM AJ, BUDDY DAP, SNOW RW. The co-distribution of *Plasmodium falciparum* and hookworm among African schoolchildren. **Malaria Journal.** 2006; 5(99)doi:10.1186/1475-2875-5-99. [acesso em 12 de setembro de 2009]. Disponível em <http://www.malariajournal.com>

BROOKER S, AKHWALE W, PULLAN R, ESTAMBALE B, CLARKE SE, SNOW RW, HOTEZ P. Epidemiology of Plasmodium-Helminth co-infection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control. **Am J Trop Med Hyg.** 2007;77 (6 Suppl): 88–98.

BRUSCHI F, CASTAGNA B. The serodiagnosis of parasitic infections. **Parassitologia.** 2004 Jun;46(1-2):141-144.

BURCHARD GD, RADLOFF P, PHILIPPS J, NKEYI M, KNOBLOCH J, KREMSNER PG. Increased erythropoietin production in children with severe malarial anemia. **Am J Trop Med Hyg.** 1995; 55 (5): 547-551.

BURGMANN H, LOOAREESUWAN S, KAPIOTIS C, VIRAVAN C, VANIJANONTA S, HOLLENSTEIN U, WEISINGER E, PRESTERL E, WINKLER S, GRANINGER W. Serum levels of erythropoietin in acute *Plasmodium falciparum* malaria. **Am J Trop Med Hyg.** 1996; 54 (3): 280-283.

BUFFET PA, SAFEUKUI I, MILON G, MERCEREAU-PUJALON O, DAVID PH. Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. **Curr Opin Hematol.** 2009 May;16(3):157-164.

BUTCHER GA, GARLAND T, AJDUK IEWICZ AB, CLARK IA. Serum tumor necrosis factor associated with malaria in patients in the Solomon Islands. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1990 Sep-Oct; 84(5):658-61.

CARDOSO MA, FERREIRA MU, CAMARGO LMA., SZARFARE SC. Anemia em população de área endêmica de malária, Rondônia (Brasil). **Rev Saúde Pública.** 1992; 3 (26):161-166.

CARROLO M, GIORDANO S, CABRITA-SANTOS L, CORSO S, VIGARIO AM, SILVA S, LEIRIÃO P, CARAPAU D, ARMAS-PORTELA R, COMOGLIO PM, RODRIGUEZ A, MOTA MM. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. **Nat Med.** 2003 Nov 9 (11):1363–1369.

CARRASQUILLA G. An ecosystem approach to malaria control in an urban setting. **Cad. Saúde Pública.** 2001;17 (Suppl): S171-179.

CASALS-PASCUAL C, KAI O, CHEUNG JOP, WILLIAMS S, LOWE B, NYANOTI M, WILLIAMS TN, MAITLAND K, MOLYNEUX M, NEWTON CRJC, PESHU N, WATT SM, ROBERTS DJ. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. **Blood.** 2006;108: 2569-2577.

CASTRO S, WEBER R, DADALT V, TAVARES V, GIUGLIANI Ri. Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil. **J Med Screen** 2006;13:85–86

CDC/ CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. HEALTH & SAFETY TOPICS. Body Mass index. Children and Teen BMI Calculator, 2000. [acesso em 15 de junho de 2009]. Disponível em <http://www.cdc.gov/healthyliving>.

CHANG K-H, STEVENSON MM. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. **Int J Parasitol.** 2004; 34: 1501-1516.

CHONGSUPHAJAISIDDHI T. Malaria in paediatric practice. *In*: WERNSDORFER WH, MCGREGOR I. Sir. **Malaria Principles and Practice of Malariology.** London: Churchill Livingstone; 1988. v.1,p. 889 - 902.

CHOTIVANICH K, UDOMSANGPETCH R, SIMPSON J, PUKRITTAYAKAMEE S, NEWTON P, LOOAREESUWAN S, WHITE JN. Parasite multiplication potential and the severity of *falciparum* malaria. **J Infect Dis.** 2000; 181: 1206-1209

CLARK IA, CHAUDRI G, COWDEN WB. Roles of tumour necrosis factor in the illness and pathology of malaria. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1989; 83(4), 436-440.

COLLINS WE, JEFFERY GM, ROBERTS JM. A retrospective examination of anemia during infection of humans with *Plasmodium vivax*. **Am J Trop Med Hyg.** 2003; 68: 410–412.

CONSIGNY PH, CAUQUELIN B, AGNAMEY P, COMBY E, BRASSEUR P, BALLETT JJ, ROUSSILLHON C. High prevalence of co-factor independent anticardiolipin antibodies in malaria exposed individuals. **Clin Exp Immunol.** 2002; 127:158-164.

COWMAN AF, CRABB BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**. 2006 Feb; 124: 755-766.

CRANE GG. Malária e anemia. **Rev Soc Bras Med Trop**. 1991; 24 (3):131-136.

DALLMAN PR. Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro no lactente e na criança pequena. **Anais Nestlé**. 1996;52:1-10.

DANIEL-RIBEIRO CT, LACERDA MV, OLIVEIRA-FERREIRA J. *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: some aspects of its epidemiology, clinical spectrum and naturally induced immune responses. **Bull Soc Pathol Exot**. 2008 Jun; 101(3):243-248.

DANIEL-RIBEIRO CT. Is there a role for autoimmunity in immune protection against malaria? **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2000; 95 (2): 199-207.

DANIEL-RIBEIRO CT, FERREIRA-CRUZ MF. The new and the old in malaria immunopathology. **Ciênc Cult. (São Paulo)**. 2000 July-October; 52 (4/5):269-281.

DANIEL-RIBEIRO CT, ZANINI G. Autoimmunity and malaria: what are they doing together ? **Acta Tropica**. 2000;76: 205-221.

DAS BS, THURNHAM DI, DAS DB. Influence of malaria on markers of iron status in children: implications for interpreting iron status in malaria- endemic communities **Br J Nutr**. 1997 Nov;78(5): 751-760.

DE FREITAS AAMF. **Estudo do perfil de citocinas e de auto-anticorpos na anemia de indivíduos com infecção aguda por *Plasmodium vivax* e/ou por *Plasmodium falciparum* em duas localidades do Estado do Pará.** [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2004.

DE LACERDA MV, DE OLIVEIRA SL, ALECRIM MG. Splenic hematoma in a patient with *Plasmodium vivax* malária. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2007 Jan-Feb; 40 (1):96-97.

DE MAEYER EM, DALLMAN P, GURNEY JM, HALLBERG L, SOOD SK, SRIKANTIA SG. **Preventing and controlling iron deficiency anemia, through primary health care.** Geneva.World Health Organization.1989; p.1-57.

DE SOUZA JM, CALVOSA VSP, VENTURA AMRS, PINTO AYN, SILVA RSU, LIBONATI RMF. Malária. *In*: TONELLI E & FREIRE LMS. **Doenças Infeciosas na Infância e Adolescência.** Rio de Janeiro: Medsi; 2000, v. 2, p. 1271-1296.

DIAZ A, ALLEN JE. Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. **Eur J Immunol**. 2007 Dec;37(12):3319-3326.

DO AMARAL CN, DE ALBUQUERQUE YD, PINTO AYN, DE SOUZA, JM. A importância do perfil clínico-laboratorial no diagnóstico diferencial entre malária e hepatite aguda viral. **J Pediatr**. 2003; 79(5):429-434.

DOMENE SMA. Indicadores nutricionais e políticas públicas. **Estud Av**. 2003; 17 (48): 131-135.

DOOLAN DL, DOBAÑO C, BAIRD JK. Acquired immunity to malaria. **Clin Microbiol Rev.** 2009 Jan; 22(1):13-36.

DRUILHE P & KHUSMITH S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria-immune status. **Infect Immun.** 1987 April; 55 (4): 888-891.

DRUILHE P, TALL A, SOKHNA C. Worms can worsen malaria: towards a new means to roll back malaria? **Trends in Parasitol.** 2005 Aug; 8: 359-362.

DUARTE EC, GYORKOS TW, PANG L, ABRAHAMOWICZ M. Epidemiology of malaria in a hypoendemic brazilian amazon migrant population: a cohort study. **Am J Trop Med Hyg.** 2004, 70, (3), 229–237.

DUGUÉ B, LEPPÄNEEN E, GRÄSBECK R. Preanalytical factors and the measurements of cytokines in human subjects. **Int J Clin Lab Res.** 1996; 26: 99-105.

DVORAK JA, MILLER LH. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. **Science.** 1975;137:748-750.

ECHEVERRI M, TOBÓN A, ALVAREZ G, CARMONA J, BLAIR S. Clinical and laboratory findings of *Plasmodium vivax* malaria in Colombia, 2001. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2003 Jan-Feb; 45(1):29-34.

EHRHARDT S, BURCHARD GD, MANTEL C, CRAMER JP, KAISER S, KUBO M, OTCHWEMAH RN, BIENZLE U, MOCKENHAUP FP. Malaria, anemia, and malnutrition in African children-defining intervention priorities. **J Infect Dis.** 2006 July;194(1): 108-114.

EKVALL H. Malaria and anemia. **Curr Opin Hematol.** 2003; 10: 108-114.

ELENKOV IJ. Glucocorticoids and the TH1/TH2 balance. **Ann N Y Acad Sci.** 2004 Jun; 1024:138-146.

ENGWERDA CR, BEATTIE L, AMANTE FH. The importance of the spleen in malaria. **Trends Parasitol.** 2005 Feb;21 (2): 75-80.

FACER CA, BRAY RS, BROWN J. Direct Coombs Antiglobulin Reactions in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. I - Incidence and Class Specificity. **Clin Exp Immunol.** 1979; 35:119-127.

FACER CA. Direct Coombs Antiglobulin Reactions in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. II. Specificity of erythrocytes – bound IgG. **Clin Exp Immunol.** 1980a;39:279-288.

FACER CA. Direct Antiglobulin Reactions in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. III. Expression of IgG subclass Determinants and Genetic Markers and Association with Anemia. **Clin Exp Immunol.** 1980b;41:81-90.

FACER CA & AGIOSTRATIDOU G. High levels of anti-phospholipids antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* and in *P. vivax* malaria. **Clin Exp Immunol.** 1994; 95: 304-309.

FERNANDES AAM, DE MOURA CARVALHO LJ, ZANINI GM, VENTURA, AMRS, DE SOUZA JM, COTIAS PM, SILVA-FILHO IL, DANIEL-RIBEIRO, CT. Similar cytokines response and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon Region. **Clin Vaccine Immunol.** 15(4), 2008 April; 650-658.

FERREIRA CM, ALECRIM MGC, FERREIRA WA, VASQUES FG, FRAIJI NA. Anticorpos anti-eritrocitários em pacientes com Coombs direto positivo infectados com malária por *P. vivax* e *P. falciparum*. **Rev Bras Anal Clín.** 2007; 39(4): 311-314.

FRANCIS SE, JR SULLIVAN DJ, GOLDBERG DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Annu Rev Microbiol.** 1997; 51:97-123.

FRIEDMAN JF, KWENA AM, MIREL LB, KARIUKI SK, TERLOUW DJ, PHILLIPS-HOWARD PA, HAWLEY WA, NAHLEN BL, SHI YP, TER KUILE FO. Malaria and nutritional status among pre-school children: results from cross-sectional surveys in western Kenya. **Am J Trop Med Hyg.** 2005 Oct;73(4):698-704.

GARANITO MP. Interpretação do hemograma na criança. *In*: Carneiro JDA. **Hematologia Pediátrica.** 1ª Ed. Cidade Editora Manole LTDA. 2008. p.16-28.

GAUR D, MAYER DCG, MILLER LH. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **Int J Parasitol.** 2004; 34: 1413-1429.

GEISSLER PW, MWANIKI DL, THIONG'O F, MICHAELSEN KF, FRIISH. Geopahagy, iron status and anaemia among primary school children in Western Kenya. **Trop Med Int Health.** 1998 Jul; 3(7): 529-534.

GENTON B, D'ACREMONT V, RARE L, BAEA K, REEDER JC, ALPERS MP, MULLER I. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. **Plos Medecine.** 2008 June; 5 (6): e127.

GENTON B, AL-YAMAN F, GINNY M, TARAICA J, ALPERS MP. Relation of anthropometry to malaria morbidity and immunity in Papua New Guinean children. **Am J Clin Nutr.** 1998 Sep; 68(3):734-741.

GHOSH SK, YADAV RS, DAS BS, SHARMA VP. Influence of nutritional and haemoglobin status on malaria infection in children. **Indian J Pediatr.** 1995 May-Jun; 62(3):321-326.

GHOSH K, GHOSH K. Pathogenesis of anemia in malaria: a concise review. **Parasitol Res.** 2007; 101:1463-1469.

GINSBERG H. Alterations caused by the intraerythrocytic malaria parasite in the permeability of its host cell membrane. **Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.** 1990; 95 (1):31-39.

GONZALES MMM. **Deficiência de G6PD. Revisão bibliográfica e detecção em doadores de sangue do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará** [Trabalho de Conclusão de Curso], Belém: Universidade Federal do Pará,1992.

GOKA BQ, KWARKO H, KURTZHALS JA, GYAN B, OFORI-ADJEI E, OHENE SA, HVIID L, AKANMORI BD, NEEQUAVE J. Complement binding to erythrocytes is associated with macrophage activation and reduced haemoglobin in *Plasmodium falciparum* malaria. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2001 Sep-Oct; 95(5): 545-549.

GRAU GE, BEHR C. Cytokines and malaria: for better or for worse. *In*: AGGARWAL BB, PURI RK. **Human Cytokines: their role in disease and therapy.** 1.ed. U.S.A: Blackweell Science Inc.; 1995. p. 459-476.

GRAU GE, TAYLOR TE, MOLYNEUX ME, WIRIMA JJ, VASSALLI P, HOMMEL M, LAMBERT PH. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. **N Engl J Med.** 1989; 320(24):1586-1591.

GRAY D, SKARVALL H. B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. **Nature.** 1988 Nov; 336:70-73.

GREENWOOD BM, STRATTON D, WILLIAMSON WAB, MOHAMMED I. A study of the role of immunological factors in the pathogenesis of anaemia of acute malaria. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1978; 72 (4): 378-385.

GREENWOOD BM. Autoimmune disease and parasitic infections in Nigerians. **Lancet.** 1968; 2 (7564): 380-382.

HEDBERG K, SHAFFER N, DAVACHI F, HIGHTOWER A, LYAMBA B, PALUKU KM, NGUYEN-DINH P, BREMAN JG. *Plasmodium falciparum* - associated anaemia in children at a large urban hospital in Zaire. **Am J Trop Med Hyg.** 1993;48 (3):365-371.

HELEGBE GK, GOKA BQ, KURTZHALS JA, ADDAE MM, OLLAGA E, TETTEH JK, DODOO D, OFORI MF, OBENG-ADJEI G, HIRAYAMA K, AWANDARE GA, AKANMORI BD. Complement activation in Ghanaian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Malar J.** [publicado on line] 2007 Dec17; 6:165.

HELEGBE GK, HUY NT, YANAGI T, SHUAIBU MN, YAMAZAKI A, KIKUCHI M, YASUNAMI M, HIRAYAMA K. Rate of red blood cell destruction varies in different strains of mice infected with *Plasmodium berghei*-ANKA after chronic exposure. **Malar J.** [publicado on line] 2009 May; 5(8):91.

HEWITSON JP, GRAINGER JR, MAIZELS RM. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host Immunity. **Mol Biochem Parasitol.** 2009 Sep; 167(1):1-11

HO M, SCHOLLAARDT T, SNAPE S, LOOAREESUWAN S, SUNTHARASAMAI P, WHITE NJ. Endogenous interleukin-10 modulates proinflammatory response in *Plasmodium falciparum* malaria. **J Infect Dis.** 1998;178:520-525.

HOKAMA NK, HOKAMA PON, MACHADO PEA, MATSUBARA LS. Interferência da malária na fisiologia e na fisiopatologia do eritrócito. Parte I- Eritrócito normal e vetor. **J Bras Med.** 2002;83 (1):77-86.

HOMMEL M. Physiopathology of symptoms of malaria. Role of cytokine, cytoadherence and premonition. **Presse Med.** 1996 Jan; 25(2):70-76.

HSIAO LL, HOWARD RJ, AIKAWA M, TARASCHI TF. Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Biochem J.** 1991: 121-132.

IMURA H, FUKATA J-I, MORI T. Cytokines and endocrine function: an interaction between the immune and neuroendocrine systems. **Clin Endocrinol.** 1991; 35: 107-115.

JAIN M, KAUR M. Comparative study of microscopic detection methods and haematological changes in malaria. **Indian J Pathol Microbiol.** 2005 Oct; 48(4):464-7.

JANGPATARAPONGSA K, SIRICHAISINTHOP J, SATTABONGKOT J, CUI L, MONTGOMERY SM, LOOAREESUWAN S, TROYE-BLOMBERG M, UDOMSANGPETCH R. Memory T cells protect against *Plasmodium vivax*. **Microbes Infect.** 2006 Mar; 8(3):680-6.

JAKOBSEN PH, MORRIS-JONES SD, HVIID L, THEANDER TG, HØJER-MADSEN M, BAYOUMI RA, GREENWOOD BM. Anti-phospholipid antibodies in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. **Immunol.** 1993 August; 79 (4): 653-657.

JAFARSHAD A, DZIEGIEL MH, LUNDQUIST R, NIELSEN LK, SINGH S, DRUILHE PL. A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes Fcγ₂ and Fcγ₃. **J Immunol.** 2007 Mar;178(5):3099-3106.

JASON J, ARCHIBALD LK, NWANYANWU OC, BELL M, BUCHANAN I, LARNED J, KAZEMBE PN, DOBBIE H, PAREKH B, BYRD MG, EICK A, HAN A, JARVIS WR. Cytokines and malaria parasitemia. **Clin Immunol.** 2001 Aug; 100(2):208-218.

KING CL, MICHON P, SHAKRI AR, MARCOTTY A, STANISIC D, ZIMMERMAN PA, COLE-TOBIAN JL, MUELLER I, CHITNIS CE. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection: **Proc Natl Acad Sci USA.** 2008 Jun; 105(24):8363-8368.

KOCHAR DK, DAS A, KOCHAR SK, SAXENA V, SIROHI P, GARG S, KOCHAR A, KHATRI MP, GUPTA V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. **Am J Trop Med Hyg.** 2009 Feb; 80(2):194-198.

KROTOSKI WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1985;79 (1):1-11.

KUMARESAN PR, SELVAM R. The haematology of *Plasmodium vivax* before and after chloroquine and primaquine treatment in north Madras area. **Indian J Malariol.** 1991 Jun;28(2):115-20.

KUMAR A, SHASHIREKHA. Thrombocytopenia - an indicator of acute *vivax* malaria. **Indian J Pathology Microbiol.** 2006 Oct; 49(4):505-508.

KURTZHALS JAL, ADABAYERI V, GOKA BQ, AKANMORI BD, OLIVER-CONMEY J O, NKRUMAH FK, BEHR C, HVIID L. Low plasma concentrations of interleukin-10 in severe malarial anemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. **Lancet.** 1998; (351): 1768-1772.

KWIATKWOSKI D, GREENWOOD BM. Why is malaria fever periodic? A hypothesis. **Parasitol Today.** 1989; 5 (8): 264-267.

KWIATKWOSKI D, HILL AVS, SAMBOU I, TWUMASI P, CASTRACANE J, MANOGUE KR, CERAMI A, BREWSTER DR, GREENWOOD BM. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Lancet.** 1990; 336 (8725): 1201-1204.

LADHANI S, LOWE N, COLE AO, KOWOUONDO K, NEWTON CR. Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome. **Br J of Haematol.** 2002 Dec;119(3): 839-847.

LANGHI DM JR, BORDIN JO. Duffy blood group and malaria. **Hematology.** 2006 Oct;11(5):389-398.

LEFRANÇOIS G, LE BRAS J, SIMMONEAU M, VROKLANS M, BOUVET E, VACHON F. Anti-erythrocyte autoimmunization during chronic *falciparum* malaria. **Lancet.** 1981 Sept; 661-664.

LIBONATI RMF, DE MENDONÇA BB, MAUÉS JA, QUARESMA JAS, DE SOUZA JM. Some aspects of the behavior of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in patients with uncomplicated falciparum malaria: cortisol and dehydroepiandrosterone levels. **Acta Trop.** 2006; 98: 270-276.

LOMAR AV, VIDAL JE, LOMAR FP, BARBAS CV, DE MATOS GJ, BOULOS M. Acute respiratory distress syndrome due to *vivax* malaria: case report and literature review. **Braz J Infect Dis.** 2005 Oct; 9(5): 425-30.

LORENZI TF. Fisiologia das células do sangue e hemostasia. *In*: LORENZI TF, D'AMICO E, DANIEL MM, SILVEIRA PAA, BUCCHERI.V. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica.** 3ª Ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2003.p.45-192.

LUBY SP, KAZEMBE PN, REDD SC, ZIBA C, NWANYANWU OC, HIGHTOWER AW, FRANCO C, CHITSULO L, WIRIMA JJ, OLIVAR MA. Using clinical signs to diagnose anaemia in African children. **Bull World Health Organ.** 1995; 73(4): 477- 482.

LUTY AJ, LELL B, SCHMIDT-OTT R, LEHMAN LG, LUCKNER D, GREVE B, MATOUSEK P, HERBICH K, SCHMID D, ULBERT S, MIGOT-NABIAS F, DUBOIS B, DELORON P, KREMSNER PG. Parasite antigen-specific interleukin-10 and antibody responses predict accelerated parasite clearance in *Plasmodium falciparum* malaria. **Eur Cytokine Netw.** 1998 Dec; 9(4):639-646.

MACHADO RR. Anemias Carenciais. *In*: Carneiro JDA. **Hematologia Pediátrica**. 1ª Ed. São Paulo: Editora Manole LTDA; 2008.p. 40-63.

MAGUIRE PA, PRUDHOMME J, SHERMAN IW. Alterations in erythrocyte membrane phospholipid organization due to the intracellular growth of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **Parasitol**. 1991 Apr; 102 Pt 2:179-86.

MALAGUARNERA L, MUSUMECI S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. **Lancet**. 2002 Aug; 472-478.

MANUAL DE TERAPÊUTICA DA MALÁRIA/Colaboração de Agostinho Cruz Marques [*et al*], Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Gerência Técnica de Malária, 6ª. ed., 2001. 104 p.

MARCONDES E, SETIAN N, CARRAZA F. Desenvolvimento físico (crescimento) e funcional da criança.*IN*: MARCONDES E, VAZ FAC, RAMOS JLA, OKAY Y. **Pediatria Básica-Tomo I Pediatria Geral e Neonatal**. São Paulo:Sarvier, 9ª. ed., 2002. v.1, 23-35.

MARSH K, SNOW R. Host parasite interaction and morbidity in malaria in endemic areas. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 1997; 352: 1385-1394.

MARSH K, OTOO L, CARSON RJ, GREENWOOD BM. Antibodies to blood stage antigens of *P. falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 1989; 83: 293-303.

MARTINEZ-ESPINOSA FE, DANIEL-RIBEIRO CT, ALECRIM WD. Malaria during pregnancy in a reference centre from the Brazilian Amazon: unexpected increase in the frequency of *Plasmodium falciparum* infections. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2004 Feb; 99(1):19-21.

McGREGOR IA. Malaria and nutrition. *In*: WERNSDORFER, W.H., McGREGOR, I. Sir. **Malaria Principles and Practice of Malariology**, London: Churchill Livingstone, 1988. v. 1, 754-767.

McGREGOR IA. Nutritional implications. **Rev Infect Dis**. 1982 July-Aug; 4:798-804.

McGUIRE W, KNIGHT JC, HILL AV, ALLSOPP CE, GREENWOOD BM, KWIATKOWSKI D. Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. **J Infect Dis**. 1999 Jan;179(1):287-90.

McKENZIE FE, PRUDHOMME WA, MAGILLI AJ, FORNEY JR, PERMPANICH B, LUCAS C, GASSER RA JR, WONGSRICHANALAI C. White blood cell counts and malaria. **J Infect Dis**. 2005 Jul 15;192(2):323-30.

MCMORRAN BJ, MARSHALL VM, DE GRAAF C, DRYSDALE KE, SHABBAR M, SMYTH GK, CORBIN JE, ALEXANDER WS, FOOTE SJ. Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection. **Science**. 2009 Feb; 323 (6):797-800.

- MELO MR, PURINI MC, CANÇADO RD, KOORO F, CHIATTONE CS. Uso de índices hematimétricos no diagnóstico diferencial de anemia: uma abordagem a ser adotada? **Rev Assoc Med Bras.** 2002; 48(3): 2-4
- MENDIS K, SINA BJ, MARCHESINI P, CARTER R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **Am J Trop Med Hyg.** 2001 Jan-Feb; 64(1-2 Suppl): S97-101.
- MENDIS KN, CARTER R. The role of cytokines in *Plasmodium vivax* malaria. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1992; 87 (3 Suppl):S51-55.
- MENENDEZ C FLEMING AF, ALONSO PL. Malaria related-anemia. **Parasitol Today.** 2000 Nov;16(11):469-476.
- MIGOT F, CHOUGNET C, HENZEL D, DUBOIS B, JAMBOU R, FIEVET N, DELORON P. Anti-malaria antibody-producing B cell frequencies in adults after a *Plasmodium falciparum* outbreak in Madagascar. **Clin Exp Immunol.** 1995 Dec;102(3):529-534.
- MILLER LH, MASON SJ, CLYDE DF, MCGINISS MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks - The Duffy - blood group genotype FyFy. **N Engl J Med.** 1976; 295 (6):302-304.
- MILLER LH, GOOD MF, MILON G. Malaria pathogenesis. **Science.** 1994 June; 264: 1878-1883.
- MILLER KL, SILVERMAN PH, KULLGREN B, MAHLMANN LJ. Tumour necrosis factor α and the anemia associated with murine malaria. **Infect Immun.** 1989 May; 57 (5):1542-1546.
- MOHAN K, STEVENSON MM. Dyserythropoiesis and severe anemia associated with malaria correlate with deficient interleukin-12 production. **Br J of Hematol.** 1998; 103:942-949.
- MOHANDAS N, GALLAGHER PG. Red cell membrane: past, present, and future. **Blood.** 2008 November; 112: 3939-3948.
- MOURA EFA, SILVA JUNIOR JPT, REIS AM. Malária na infância - estudo de nove casos. **Clin Ped.** 1988; 12 (4): 34-38.
- MOSMANN TR, MOORE KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. **Immunol Today.** 1991 Mar; 12(3): A49-53
- MURRAY J, MURRAY A, MURRAY M, MURRAY C. The biological suppression of malaria: an ecological and nutritional interrelationship of a host and two parasites. **Am J Clin Nutr.** 1978 Aug; 8:1363-6.
- MURRAY MJ, MURRAY AB, MURRAY NJ, MURRAY MB. Refeeding - malaria and hyperferræmia. **Lancet.** 1975;1 (7908): 653-654.
- NACHER M. Malarial anaemia: a crossroad? **Med Hypotheses.** 2002; 59(3):363-365.

NACHER M, GAY F, SINGHASIVANON P, KRUDSOOD S, TREEPRASERTSUK S, MAZIER D, VOULDOUKIS I, LOOAREESUWAN S. *Ascaris lumbricoides* infection is associated with protection from cerebral malaria. **Parasite Immunol.** 2000 Mar;22 (3):107-13.

NACHER M, SINGHASIVANON P, SILACHAMROON U, TREEPRASERTSUK S, VANNAPHAN S, TRAORE B, GAY F, LOOAREESUWAN S. Helminth infections are associated with protection from malaria-related acute renal failure and jaundice in Thailand. **Am J Trop Med Hyg.** 2001 Dec; 65(6):834-836.

NACHER M, SINGHASIVANON P, GAY F, SILACHOMROON U, PHUMRATANAPRAPIN W, LOOAREESUWAN S. Contemporaneous and successive mixed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections are associated with *Ascaris lumbricoides*: an immunomodulating effect? **J Parasitol.** 2001a Aug; 87 (4):912-915.

NACHER M, SINGHASIVANON P, GAY F, PHUMRATANAPRAPIN W, SILACHAMROON U, LOOAREESUWAN S. Association of helminth infection with decreased reticulocyte counts and hemoglobin concentration in Thai *falciparum*. **Am J Trop Med Hyg.** 2001b Oct; 65(4):335-337.

NORONHA E, ALECRIM MGC, ROMERO GAS, MACEDO V. Estudo clínico da malária *falciparum* em crianças em Manaus, AM, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2000 Mar-Abr; 33(2):185-190.

NURSE GT. Iron, the thalassaemias, and malaria. **Lancet.** 1979; 2 (8149): 938-940.

NUSSENBLATT V, MUKASA G, METZGER A, NDEEZI G, GARRETT E, SEMBA RD. Anemia and interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels among children with acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Clin Diagn Lab Immunol.** 2001 Nov;8(6):1164-1170.

ODUNUKWE NN, SALAKO LA, OKANY C, IBRAHIM MM. Serum ferritin and other haematological measurements in apparently healthy adults with malaria parasitemia in Lagos, Nigeria. **Trop Med Int Health.** 2000; 5, (8): 582-586.

OHNISHI MD, VENTURA AMRS, LIBONATI RMF, MENDES MMF, APOLINÁRIO JHD, DE SOUZA JM. O pulmão na malária *vivax*- relato de caso. In: 44º Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, 2008, Porto Alegre. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2008; 41:215.

OH M-D, SHIN H, SHIN D, KIM U, LEE S, KIM N, CHOI M-H, CHAI J-Y, CHOE K. Clinical features of *vivax* malaria. **Am J Trop Med Hyg.** 2001; 65(2):143-146.

ONG'ECHA JM, KELLER CC, WERE T, OUMA C, OTIENO RO, LANDIS-LEWIS Z, OCHIEL D, SLINGLUFF JL, MOGERE S, OGONJI GA, ORAGO AS, VULULE JM, KAPLAN SS, DAY RD, PERKINS DJ. Parasitemia, anemia and malarial anemia in infants and young children in a rural holoendemic *Plasmodium falciparum* transmission area. **Am J Trop Med Hyg.** 2006; 74(3): 376-385.

OPAS - ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD - **Situacion de los programas de malaria en las Americas.** 2001 Mazo; 22(1):10-14.

OTHORO C, LAL AA, NAHLEN B, KOECH D, ORAGO ASS, UDHAYAKUMAR V. A low interleukin-10 tumor necrosis factor is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in Western Kenya. **J Infect Dis.** 1999; 179: 279-282.

PAHO-PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Malaria and the Millennium Development Goals. Washington, D.C; Pan American Health Organization; 2005. p:1-18.

PAIVA A, RONDÓ PHC, GUERRA-SHINOHARA EM. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. **Rev Saude Pública.** 2000; 34(4):421-426.

PANTALEO A, GIRIBILDI G, MANNU F, ARESE P, TURRINI F. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cells removal under physiological and pathological conditions. **Autoimmun Rev.** 2008 Jun; 7 (6): 457-462.

PATEL U, GANDHO G, FRIEDMAN S, NIRANIAN S. Thrombocytopenia in malaria. **J Natl Med Assoc.** 2004 Sep; 96(9):1212-1214.

PENALBA C, SIMONNEAU M, AUTRAN B, BOUVET KOSKAS E, VROCLANS M, VACHON F, COULAUD JP, SAIMOT AG. Anti-I anti-erythrocyte auto-immunization in malaria. **Bull Soc Pathol Exot Filiales.** 1984 Jul-Aug; 77(4):469-480.

PESSOA SB, MARTINS AV. Gênero *Plasmodium* - Parasitas da malária. In :_____ **Parasitologia Médica.** 11^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982. p.280-291.

PEYRON F, BURDIN N, RINGWALD P, VUILLEZ JP, ROUSSET F, BANCHEREAU J. High levels of circulating IL-10 in human malaria. **Clin Exp Immunol.** 1994 Feb; 95(2):300-303.

PINTO AYN, VENTURA AMRS, SOUZA, JM. Resposta de anticorpos IgG anti-*Plasmodium vivax* em crianças expostas à malária, antes e após tratamento específico. **J Pediatr.** 2001 Jul-Aug; 77(4): 299-306.

PNDS. Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher-PNDS/2006-Relatório Final. Centro Brasileiro de Análise e Planejamento. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Brasília. 2008. p.252-262. [acesso em 10 de setembro de 2009]. Disponível em <http://www.saude.gov.br/pnds>.

POESPOPRODJO JR, FOBIA W, KENANGALEM E, LAMPANH DA, HASANUDDIN A, WARIKAR N, SUGIARTO P, TJITRA E, ANSTEY NM, PRICE RN. *Vivax* malaria: a major cause of morbidity in early infancy. **Clin Infect Dis.** 2009 Jun 15; 48(12):1704-1712.

PRICE RN, TJITRA E, GUERRA CA, YEUNG S, WHITE NJ, ANSTEY NM. *Vivax* malaria: neglected and not benign. **Am J Trop Med Hyg.** 2007 Dec;77 (6 Suppl):S79-87.

PRICE L, PLANCHE T, RAYNER C, KRISHNA S. Acute respiratory distress syndrome in *Plasmodium vivax* malaria: case report and review of the literature. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2007a Jul;101(7):655-659.

PRUDÊNCIO M, RODRIGUEZ A, MOTA MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. **Nat Rev Microbiol.** 2006 Nov; 4: 849-856.

PULLAN R, BROOKER S. The health impact of polyparasitism in humans: are we underestimating the burden of parasitic diseases? **Parasitol.** 2008 June;135(7): 783–794.

QUEIROZ SS, TORRES MAA. Anemia ferropriva na infância **J Pediatr.** 2000; 76 (3 Suppl): S298-304.

QUIÑONES ML, DRAKELEY CJ, MULLER O, LINES JD, HAYWOOD M, GREENWOOD BM. Diversion of *Anopheles gambiae* from children to other hosts following exposure to permethrin-treated bednets. **Med Vet Entomol.** 2000 Dec; 14(4): 369-375.

RANDALL G, SEIDEL JS. Malaria. In: **Clínicas Pediátricas da América do Norte.** (Simpósio sobre infestações parasitárias). Rio de Janeiro: Interamericana; 1985, (4). p.927-938.

RETIEF F, CILLIERS L. Periodic pyrexia and malaria in Antiquity. **S Afr Med J.** 2006 Aug; 96(8): 684, 586-688.

RICHARDS AL. Tumour necrosis factor and associated cytokines in the host's response to malaria. **Int J Parasitol.** 1997 Oct; 27(10):1251-1263.

RITTER K, KUHLENCORD A, THOMSEN R, BOMMER W. Prolonged haemolytic anemia in malaria and autoantibodies against triosephosphate isomerase. **Lancet,** 1993; 342:1333-1334.

RODRIGUEZ-MORALES AJ, SÁNCHEZ E, ARIA M, VARGAS M, PICCOLO C, COLINA R, FRANCO-PAREDES C. White blood cell counts in *Plasmodium vivax* malaria. **J Infect Dis.** 2005; 192:1675-1676.

RODRIGUEZ-MORALES AJ, SÁNCHEZ E, VARGAS M, PICCOLO C, COLINA R, ARIA M. Anemia and thrombocytopenia in children with *Plasmodium vivax* malaria. **J Trop Pediatr.** 2006 Feb;52(1):49-51.

ROSENBERG EB, STRICKLAND GT, YANG SL, WHALEN GE. IgM antibodies to red cells and autoimmune anaemia in patients with malaria. **Am J Trop Med Hyg.** 1973, 22 (2): 146-151.

ROSENFELD R. Alterações eritrocitárias. IN: CARRAZA FR & ANDRIOLO A. **Diagnóstico Laboratorial em Pediatria.** São Paulo: Sarvier; 2000. p.26-38.

ROTHSCHILD C, CARNEIRO JDA. Púrpuras plaquetárias e vasculares. IN: MARCONDES E, VAZ FAC, RAMOS JLA, OKAY Y. **Pediatria Básica. Tomo II. Pediatria Clínica Geral.** São Paulo: Sarvier; 2003. p.729-733.

RYAN JR, STOUTE JA, AMON J, DUNTON RF, MTALIB R, KOROS J, OWOUR B, LUCKHART S, WIRTZ RA, BARNWELL JW, ROSENBERG R. Evidence for

transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in Western Kenya. **Am J Trop Med Hyg.** 2006; 75(4): 575-581.

SALÁRIO MÍNIMO BRASILEIRO [Acesso em 15 de junho de 2009]. Disponível em <http://www.portalbrasil.net/salariominimo.htm>.

SALLARES R, BOUWMAN A, ANDERUNG C. The spread of malaria to Southern Europe in antiquity: new approaches to old problems. **Medical History.** 2004; 48: 311-328.

SANTANA MS, de LACERDA MVG, BARBOSA MG, ALECRIM WD, ALECRIM MGC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in an endemic area for malaria in Manaus: a cross-sectional survey in the Brazilian Amazon. **PLoS One.** 2009; 4(4):e5259.

SANTOS-CIMINERA PD, ROBERTS DR, ALECRIM MGC, COSTA MRF, QUINNAN JR GV. Diagnosis and hospitalization trends, Brazil. **Emerg Infect Dis.** 2007 Oct; 13(10):1597-1600.

SCHOLANDER C, CARLSON J, KREMSNER P, WAHLGREN M. Extensive immunoglobulin binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in a group of children with moderate anemia. **Infect Immun.** 1998 Jan; 66: 361-363.

SCHETTERS TPM, VAN-RUN-VAN BREDA JHJ, HERMSEN C, CURFS J, ELING WW. Protective and pathological activity in serum of mice developing resistance to *Plasmodium berghei* infection. **Parasite Immunol** 1989;11 (4):413-423.

SCHNEIDER H, GUERREIRO JF, SANTOS SEB, WEIMER TA, SCHNEIDER MPC, SALZANO FM: Isolate breakdown in Amazonia - The blacks of the Trombetas river. **Rev Bras Genet** 1987;10:565-574.

SELVAM R, BASKARAN G. Hematological impairments in recurrent *Plasmodium vivax* infected patients. **Jpn J Med Sci Biol.** 1996 Aug; 49(4):151-165.

SCHÜLER L, SALZANO FM, FRANCO MHL, FREITAS MJM, MESTRINER MA, SIMÕES AL. Demographic and blood genetics characteristics in an Amazon population. **J Hum Evol.** 1982; (11):549-558.

SERGEANT GR. Screening for sickle cells disease in Brazil. **Lancet.** 2000 July; 356 (9224):168-169.

SHAFFER N, GRAU GE, HEDBERG K, DAVACHI F, LYAMBA B, HIGHTOWER AW, BREMAN JG, NGUYEN-DINH P. Tumor necrosis factor and severe malaria. **J Infect Dis.** 1991; 163: 96-101.

SHEIKH NA, CARO HN, TAVERNE J, PLAYFAIR JHL, RADEMACHER TW. Malaria: a tumour necrosis factor inhibitor from parasitized erythrocytes. **Immunol.** 1996; 87: 461-466.

SHIFF C, CHECKLEY W, WINCH P, PREMJI Z, MINJAS J, LUBEGA P. Changes in weight gain and anaemia attributable to malaria in Tanzanian children living under holoendemic condition. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1996;90: 262-265.

SIDDIQUI AA, BORA HB, SINGH N, DASH AP, SHARMAI YD. Expression, purification, and characterization of the immunological response to a 40-Kilodalton *Plasmodium vivax* tryptophan-rich antigen. **Infect and Immun.** 2008 June; 76: 2576-2586.

SILVA MCM. **A deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e sua relação com a infecção malárica.**[Dissertação de Mestrado]. Belém. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará & Museu Paraense Emílio Goeldi & Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária; 1998.

SINNIS P, COPPI A. A Long and Winding Road: The Plasmodium sporozoite's journey in the mammalian host. **Parasitol Int.** 2007 Sept; 56(3): 171-178.

SIVEP/MALARIA. **Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica – Notificação de Casos de Malária.** Relatórios. Resumo epidemiológico, Região Malária. Ministério da Saúde. DATASUS. [acesso em 20 de setembro de 2009]. Disponível em: http://www.saude.gov.br/sivep_malaria.

SNOW RW, CRAIG MH, NEWTON CRJC, STEKETEE RW. The public health burden of *Plasmodium falciparum* malaria in Africa: Deriving the numbers. **Working Paper No. 11, Disease Control Priorities Project. Bethesda, Maryland: Fogarty International Center, National Institutes of Health.** 2003 August; p. 81. [acesso em 15 de setembro de 2009]. Disponível em <http://www.cdc.gov/malaria>.

SONATI MF, COSTA FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **J Pediatr.** 2008; 4(4) (Suppl): S40-51.

SPIEGELBERG HL. Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. **Adv Immunol.** 1974; 19: 259-274.

STEIN CM, GELFAND M. The clinical features and laboratory findings in acute *Plasmodium falciparum* malaria in Harare, Zimbabwe. **Cent Afr J Med.** 1985 Sep; 31(9):166-70

STOLTZFUS RJ, CHWAYA HM, ALBONICO M, SCHULZE KJ, SAVIOLI L, TIELSCH JM. Serum ferritin, erythrocyte protoporphyrin and hemoglobin are valid indicators of iron status of school children in a malaria –holoendemic population. **J Nutr.** 1997; 127: 293-298.

STOLTZFUS RJ, CHWAYA HM, MONTRESOR A, ALBONICO M, SAVIOLI L, TIELSCH JM. Malaria, hookworms and recent fever are related to anemia and iron status indicators in 0- to 5-y old Zanzibari children and these relationships change with age. **J Nutr.** 2000 Jul; 130 (7): 1724-1733.

STRUIK SS, RILEY EM. Does malaria suffer from lack of memory? **Immunol Rev.** 2004 Oct; 201:268-290.

STURM A, AMINO R, VAN DE SAND C, REGEN T, RETZLAFF S, RENNENBERG A, KRUEGER A, POLLOK JM, MENARD R, HEUSSLER VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science.** 2006 Sept; 313 (5791): 1287-1290.

TANGPUKDEE N, YEW HS, KRUDSOOD S, PUNYIAPRADIT N, SOMWONG W, LOOAREESUWAN S, KANO S, WILAIRATANA P. Dynamic changes in white blood cell counts in uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **Parasitol Int.** 2008 Dec; 57(4):490-494.

TAYLOR WRJ, WIDJAJA H, BASRI H, OHRT C, TAUFIK T, TJITRA, E, BASO S, FRYAUFF D, HOFFMAN S, RICHIE TL. Changes in the total leukocyte and platelet counts in Papuan and non Papuan adults from northeast Papua infected with acute *Plasmodium vivax* or uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Malaria J.** [publicado on line] 2008 Dec; 7:259.

TINCANI A, ANDREOLI L, CHIGHIZOLA C, MERONI PL. The interplay between the antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity.** 2009 May; 42(4):257-259.

TRIPATHY V, REDDY BM. Present status of understanding on the G6PD deficiency and natural selection. **J Postgrad Med.** 2007 Jul-Sep;53(3):193-202.

TOSTA CE. Coadaptation and malaria control. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2007 Jun; 102(3):385-404.

TURRINI F, GIRIBALDI G, CARTA F, MANNU F, ARESE P. Mechanisms of band 3 oxidation and clustering in the phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Redox Rep.** 2003; 8(5):300-303.

UNICEF- **Situação Mundial da Infância 2008 - Caderno Brasil.** Coordenação Geral: Carvalho M. UNICEF-Fundo das Nações Unidas para a Infância. Brasília- Distrito Federal, 2008; p.20-21.

VENTURA, AMRS. **Malária por *Plasmodium vivax* em crianças e adolescentes – aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais**[Dissertação de Mestrado]. Belém, Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará & Instituto Evandro Chagas, 1997.

VENTURA AMRS, PINTO AYN, SILVA RSU, CALVOSAVSP, FILHO MGS, SOUZA JM. Malária por *Plasmodium vivax* em crianças e adolescentes- aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **J Pediatr.** 1999; 75, (3):187-193.

VIAL HJ, ANCELIN ML. Malarial lipids. In: SHERMAN IW. **Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection.** Washington, USA: American Society for Microbiology; 1998. p. 160-176.

WEATHERALL DJ, MILLER LH, BARUCH DL, MRASH K, DOUMBO OK, CASALS-PASCUAL C, ROBERTS D. Malaria and the red cell. **Hematology.** 2002: 35-57.

WEATHERALL DJ. The anaemia of malaria. In: WERNESDORFER WH, MCGREGOR I. Sir. **Malaria Principles and Practice of Malariology.** London: Churchill Livingstone; 1988. v. 1. p. 735-751.

WEISS L. Barrier cells in the spleen. **Immunol Today.** 1991; 12 (1): 24-29.

- WEISS G, WACHTER H, FUCHS D. Linkage of cell mediated immunity to iron metabolism. **Immunol Today**. 1995; 16 (10): 495-500.
- WHALGREN M, BERZINS K, PERLMANN P, PERSSON M. Characterization of the humoral immune responses in *Plasmodium falciparum* malaria. II. IgG subclass levels of anti-*P. falciparum* antibodies in different sera. **Clin Exp Immunol**. 1983; 54:135-142.
- WHALGREN M, PERLMANN H, BERZINS K, BJORKMAN A, LARSSON A, LJUNGSTROM I, PATARROYO I, PERLMANN P. Characterization of the humoral immune responses in *Plasmodium falciparum* malaria. III. Factors influencing the co-expression of antibodies isotypes (Ig M and IgG1 to 4). **Clin Exp Immunol**. 1986; 63: 343-353.
- WALTER T, OLIVARES M, PIZARRO F, MUÑOZ C. Iron, anemia and infection. **Nutr Rev**. 1997 April; 55(4):111-124.
- World Malaria Report 2008/WHO- World Health Organization**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. World Malaria Report 2008. World Health Organization, 215 p. ISBN 978 92 4 156390 7 (NLM classification: WC 765). [Acesso eletrônico em 30 de setembro de 2009], disponível em [http:// www.who.int](http://www.who.int).
- World Malaria Report 2009/WHO- World Health Organization**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. World Malaria Report 2009. World Health Organization, 78 p. ISBN 978 92 4 156390 1 (NLM classification: WC 765). [Acesso eletrônico em 30 de setembro de 2009], disponível em <http://www.who.int>
- WHO. Glucose -6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Bull World Health Organ**. 1989; 6: 601-611.
- WICKRAMASINGHE SN, ABDALLA SH. Blood and bone marrow changes in malaria. **Baillieres Best Pract Res Clin Haematol**. 2000 Jun;13(2):277-99.
- WILLIAMS TN, MAITLAND K, PHELPS L, BENNETT S, PETO TE, VIJI J, TIMOTHY R, CLEGG JB, WEATHERALL DJ, BOWDEN DK. *Plasmodium vivax*: a cause of malnutrition in young children. **Q J Med**. 1997 Dec; 90 (12):751-757.
- WILLIAMS TN, MWANGI TW, WAMBUA S, ALEXANDER ND, KORTOK M, SNOW RW, MARSH K. Sickle cell trait and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and other childhood diseases. **J Infect Dis**. 2005 Jul 1;192(1):178-86.
- WINKLER S, WILLHEIM M, BAIER K, SCHIMD D, AICHELBURG A, GRANINGER W, KREMSNER PG. Reciprocal regulation of Th1- and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in *Plasmodium falciparum* malaria. **Infect Immun**. 1998 Dec; 66(12): 6040-6044.
- WOODRUFF AW, ANSDELL VE, PETTIT LE. Cause of anaemia in malaria. **Lancet**, 1979 May;1 (38125): 1055-1057.
- YAMAUCHI LM, COPPI A, SNOUNOU G, SINNIS P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. **Cell Microbiol**. 2007; 9 (5):1215–1222.

ZAGO MA, COSTA FF. Hereditary hemoglobin disorders in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1985; 79 (3): 385-388.

ZAGO MA. Anemia falciforme e doença falciforme. *In: Ministério da Saúde. Manual de doenças mais importantes, por razões étnicas, na população afro-descendente.* Brasília: Secretaria de Políticas de Saúde; 2001.

ZANINI GM. **Estudo da reatividade de auto-anticorpos com antígenos plasmodiais e evidências da participação da resposta auto-imune na proteção imunológica contra a malária.** [Dissertação de Doutorado em Biologia Parasitária]. Rio de Janeiro. Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz, 2001.

ZANINI GM, De MOURA CARVALHO LJ, BRAHIMI K, De SOUZA-OASSOS LF, GUIMARÃES SJ, Da SILVA MACHADO E, BIANCO-JUNIOR C, RICCIO EKP, DE SOUSA MA, ALECRIM, MGC, LEITE N, DRUILHE P, DANIEL-RIBEIRO CT. Sera of patients with systemic lupus erythematosus react with plasmodial antigens and can inhibit the *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum*. **Autoimmunity.** 2009 Sep;42 (6): 545- 552.

ZUCKERMANN A. Recent studies on factors involved in malarial anemia. **Mil Med.** 1966 Sep; 131(9) (Supp): S1201-1216.

ANEXO A

Termo de Consentimento Pós-Informado

1. Instituto Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365- Manguinhos. Rio de Janeiro. Fone (0xx21) 3280-1486.
2. Instituto Evandro Chagas – Programa de Malária . Av. Almirante Barroso, 492. Fone – 3214-2190.

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – resolução nº 196 de 10.10.1996 – CNS)

I –DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME (Paciente).....

RESPONSÁVEL LEGAL

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº

ENDEREÇO COMPLETO CEP

CIDADE ESTADO..... FONE.....

II – DADOS SOBRE O ESTUDO

1.Título: Anemia da Malária por *Plasmodium vivax*: Estudo Clínico e Laboratorial em Crianças e Adolescentes.

2. Pesquisadores Principais: Dr. José Maria de Souza (Coordenador do Programa de Malária /IEC), Dr. Cláudio Ribeiro (Pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz), Dra. Dalma Banic (Pesquisadora do Instituto Oswaldo Cruz), Dra. Ana Maria Ventura (Programa de Malária /IEC, UEPA), Dra. Andréa Aparecida Fernandes (doutoranda do Instituto Oswaldo Cruz)

3. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (IEC) - 27/02/2002.

III. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. A malária é uma doença muito frequente na Amazônia.

2. A anemia costuma estar presente em crianças com malária e tem múltiplas causas. Esta pesquisa pretende avaliar algumas destas causas, mediante o preenchimento de um protocolo

e coleta de sangue. Será também realizado exame de fezes para o diagnóstico de parasitas intestinais que possam estar contribuindo para a anemia.

3. A coleta de sangue (10 ml) para realização dos exames (hemograma, esfregaço do sangue periférico, reticulócitos, teste de Coombs, eletroforese de hemoglobina, deficiência de G₆PD, ferritina sérica, dosagem de citocinas, sorologia) será feita com material esterilizado e descartável sem risco algum para as crianças.

4. O responsável legal pela criança será informado dos resultados dos exames que possam vir a influenciar no tratamento da malária, incluindo-se o exame parasitológico de fezes.

5. Para verificar como se comporta a anemia na criança com malária, durante os 7 dias de tratamento com drogas anti-maláricas, a criança será vista pelo pediatra da equipe, coletando sangue para comparação dos resultados em D7 (8º dia de tratamento) e D30 (controle de cura). Exame parasitológico de fezes será coletado na primeira semana de tratamento

6. É assegurado o tratamento de todas as crianças com malária, independente de participarem do estudo. A qualquer momento, pode haver a retirada das crianças e adolescentes do estudo.

7. Para obtenção de quaisquer informações e esclarecimento o paciente poderá entrar em contato com a Dra. Ana Maria R. da S. Ventura, no Instituto Evandro Chagas, situado à Av. Almirante Barroso, 492 – Bairro: Marco. Telefone para contacto (91) 3214-2190, 8146-7723.

8. Todas as informações coletadas serão mantidas em sigilo.

IV. AFIRMAÇÕES DO PACIENTE OU DE SEU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Fui esclarecido sobre os objetivos da pesquisa, os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos?

SIM NÃO

2. Fui esclarecido sobre a liberdade de tirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do tratamento do menor do qual sou responsável?

SIM NÃO

3. Fui esclarecido de que não haverá remuneração financeira além do previsto para as despesas do estudo?

SIM NÃO

4. Fui esclarecido de que não haverá indenização além das previstas pela lei, em reparação a dano imediato ou tardio, causado pela pesquisa em questão?

SIM **NÃO**

5. Fui esclarecido sobre a segurança de que a identidade do menor do qual sou responsável será preservada, mantendo-se as informações em caráter confidencial ?

SIM **NÃO**

V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo, conforme acima definido, consinto em autorizar a participação do menor do qual sou responsável, na qualidade de paciente, no Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

Belém, de..... de.....

.....

Assinatura do Responsável Legal

ANEXO B

PROTOCOLO

Registro _____ Data _____

Nome do paciente _____

Nome do responsável _____

Endereço _____

Bairro _____ Fone _____

Naturalidade _____

Procedência _____

Sexo masculino () feminino ()

Cor branca () parda () negra () amarela ()

Data de nascimento: _____

Idade (em anos e meses) _____

Antecedentes pessoais

História anterior de malária ? sim () Tipo de malária ? _____
1 vez (), 2-3 vezes (), 4-9 vezes (), mais de 9 vezes ()
não ()
Tratamento completo ? sim ()
não ()

História anterior de anemia ? sim () comprovação laboratorial ? sim () não ()
Tratamento com ferro ? sim () não ()
Quanto tempo (dias/meses) ? _____
não ()

Doenças concomitantes ? sim () Quais ? (especificar) _____
não ()

Doença anteriores ? sim () Quais ? (especificar) _____
não ()

Condições de moradia (local de residência):
() cidade () periferia () floresta () coleção d'agua () outros

Renda familiar () 1 salário mínimo () mais de 1 até 3 salários mínimos
() mais de 3 até 5 salários mínimos () mais de 5 salários mínimos

Escolaridade materna () analfabeta () 1º grau completo () 1º grau
incompleto () 2º grau completo () 2º grau incompleto () Superior

Sabe como a malária é transmitida?

() sim () não () foi informado () foi informado, mas não acredita

Uso de medidas profiláticas:

() mosquiteiro () inseticida () antimaláricos () outras () nenhuma

Tempo de doença (malária) (dias) _____

Queixa principal _____

SINAIS E SINTOMAS

| | D0 | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D15 | D30 |
|-------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| Febre | | | | | | | | | | |
| Calafrio | | | | | | | | | | |
| Cefaléia | | | | | | | | | | |
| Astenia | | | | | | | | | | |
| Anorexia | | | | | | | | | | |
| Dor abdominal | | | | | | | | | | |
| Epigástrico | | | | | | | | | | |
| Mesogástrico | | | | | | | | | | |
| Hipogástrico | | | | | | | | | | |
| Hipocôndrio D | | | | | | | | | | |
| Hipocôndrio E | | | | | | | | | | |
| Flanco D | | | | | | | | | | |
| Flanco E | | | | | | | | | | |
| Fossa ilíaca D | | | | | | | | | | |
| Fossa ilíaca E | | | | | | | | | | |
| Difusa | | | | | | | | | | |
| Colúria | | | | | | | | | | |
| Palidez palmar | | | | | | | | | | |
| Palidez da conjuntiva | | | | | | | | | | |
| Icterícia | | | | | | | | | | |
| Hepatomegalia | | | | | | | | | | |
| Esplenomegalia | | | | | | | | | | |
| Temperatura axilar (consulta) | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|--------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Gota espessa | D0 | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 |
| Parasitemia | | | | | | | | |

Grau de hidratação: Hidratado () Desidratado () Tipo de desidratação _____

Estado nutricional:

Peso:

Altura

Tratamento:

Material coletado: () gota espessa () distensão sangüínea () sangue () fezes

Resultado dos exames solicitados:

OBS:

ANEXO C

Protocolo nº008/2001/CEP/IEC- Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas (27 de fevereiro de 2002).



APÊNDICE A

VENTURA AMRS, SEQUEIRA CG, OHNISHI MD, LIBONATI RMF, SILVA FILHO MG, MENDES MMF, DANIEL-RIBEIRO CT, SOUZA JM. Anemia moderada/grave e grupo sanguíneo ABO em crianças e adolescentes com malária *vivax*. In: XLV Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, 2009, Recife. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**. Minas Gerais: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2009; 42:228.

VENTURA AMRS, OHNISHI MD, LIBONATI RMF, SILVA FILHO MG, MENDES MMF, ZANINI GM, SOUZA JM, DANIEL-RIBEIRO CT. Anticorpos anticardiolipina e antimembrana de hemácias e anemia em crianças e adolescentes com malária *vivax*. In: 44º Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, 2008, Porto Alegre. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**. Minas Gerais: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2008;41:179.

Perfil de auto-anticorpos na anemia de crianças e adolescentes com malária *vivax*. Artigo sob avaliação dos orientadores, Dr. Claudio Tadeu Daniel-Ribeiro e Dr. José Maria de Souza, para ser publicado.