



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD
INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

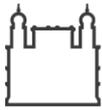
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA
INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO

LUCAS BARBOSA OLIVEIRA

APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAR A
PATOGÊNESE DA PLAQUETOPENIA NA MALÁRIA VIVAX.

Manaus - AM

2019



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD
INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA
INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO

LUCAS BARBOSA OLIVEIRA

APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAR A
PATOGÊNESE DA PLAQUETOPENIA NA MALÁRIA VIVAX.

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, área de concentração bioquímica, biologia celular e molecular de patógenos e seus vetores.

ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO AFONSO NOGUEIRA

Manaus - AM

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

O48p

Oliveira, Lucas Barbosa.

Aplicação de biomarcadores para avaliar a patogênese da plaquetopenia na malária vivax./

Lucas Barbosa Oliveira. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

84 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

Orientador: Prof^o. Dr. Paulo Afonso Nogueira.

1. Plaquetopenia 2. *Plasmodium vivax* 3. IgM I. Título

CDU 616.936 (043.3)

CDD 616.9362

22. ed.

Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos - CRB-11/ 287

LUCAS BARBOSA OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAR A
PATOGENESE DA PLAQUETOPENIA NA MALÁRIA VIVAX.**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, área de concentração bioquímica, biologia celular e molecular de patógenos e seus vetores.

Aprovado em: 22/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira - Orientador

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie - Membro externo

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda - Membro interno

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, não só por Ele ter sido o primeiro cientista a conseguir publicar os resultados sem revelar a Sua metodologia, mas também porque Ele me permitiu realizar este mestrado, segundo a sua boa, perfeita e agradável vontade. Porque d'Ele, e por Ele, e para Ele são todas as coisas

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, o meu maior Mestre, meu melhor Amigo, o meu Amado da minh'alma que sempre me guia no melhor caminho, me fortalece em todos os momentos da minha vida, se não fosse por ele jamais teria conseguido.

A minha noiva **Aline Rubens**, que eu tive a dádiva, a honra e a alegria de conhecer na pesquisa, lhe dando todo apoio em seu mestrado, eu amo muito a minha princesa, pois temos um companheirismo imensurável, nos complementamos e nos compreendemos em tudo, e sempre apoiando um ao outro em todos os momentos mais difíceis que caminhamos e crescemos juntos, e tenho a certeza que é com você que casarei meu Amor, pois nós nos amamos muito e como você disse meu Amor eu repito com a maior alegria, somos eu e você até o fim meu Amor. Eu te Amo e sempre te amarei meu Amor.

À minha família, ao meu pai **Gonçalo** (*in memoriam*), que partindo pra glória me deixou um legado e um grande exemplo, e minha mãe **Luisa**, que me mostrou com a dedicação, perseverança, e muita oração do quanto vale a pena lutar, aprender e conquistar com os valores éticos cristãos, e ter a certeza que Deus está cuidando de tudo, ao meu irmão **Lacerda** por sempre ser amigo, e estar ao meu lado. Todos sempre torceram por mim, e acreditaram nos meus sonhos, passamos por muitos momentos juntos, sofremos nos alegamos, mais o principal foi ver o quanto Deus cuida de cada um de nós, nos abençoando, guardando, fortalecendo em todas as horas, todas as circunstâncias, eu sou muito feliz pela família que tenho. Os sonhos de Deus se cumprem e se realizam em nossas vidas.

Aos companheiros de laboratório **Wellington, Yury, Fernanda, Alessandra, Tatiana, Juliane, Késsia, Natália**. Por todo o apoio pela convivência diária ao longo desses seis anos de Fiocruz, bem como pelas conversas e lutas no nosso grupo DCDIA.

Ao meu orientador **Dr. Paulo Afonso Nogueira**, meu reconhecimento pela confiança, oportunidade que me foi depositada para a realização deste trabalho, agradeço pelas sugestões, críticas fundamentais para a conclusão do nosso trabalho, pela oportunidade de participar durante esses anos do seu grupo de pesquisa, pelo aprendizado, incentivo e conselhos.

Aos professores **Dr. André Mariúba e Dra. Stefanie Lopes**, por toda a contribuição.

Ao **Programa de Pós-Graduação Biologia da interação Patógeno-Hospedeiro** pela oportunidade de realizar o mestrado, me permitindo assim a realização deste projeto, agradeço todas as secretárias da pós-graduação pela competência e suporte.

A **Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) ILM D e a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado**. Por toda a estrutura física, laboratorial, equipamentos para a realização dos experimentos muito obrigado.

Ao **Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Ferramentas para a Saúde PDTIS-FIOCRUZ** pelo uso de suas instalações.

A **CAPES**, pela bolsa concedida, e suporte financeiro fornecido no decorrer deste projeto.

EPÍGRAFE

*Não temas, porque eu sou contigo;
não te assombres, porque sou teu Deus; eu
te fortaleço, e te ajudo e te sustento com a
destra da minha justiça. Isaiás 41,10*

RESUMO

Embora a plaquetopenia seja uma manifestação hematológica bastante comum na malária ocasionada pelo *Plasmodium vivax*, e não incluída nos critérios de gravidade, seu impacto clínico é amplamente reconhecido. Esta manifestação envolve provavelmente um aumento na destruição e/ou consumo de plaquetas na periferia, porém não é comumente acompanhada por hemorragia grave. Os anticorpos anti-CD41 e Dihidroetidio marcador redox indicador para caracterizar micropartículas, agregados e plaquetas com base nos parâmetros FSC e SSC. E utilizamos o anticorpo anti-CD42 humano, o domínio externo do receptor plaquetário para o fator de von Willebrand, para estimar a contribuição da adesão plaquetária. O estresse oxidativo das plaquetas e micropartículas não foi associado à plaquetopenia em nossos pacientes. No entanto, os anticorpos antiplaquetários IgM se correlacionaram com contagens plaquetárias reduzidas, mas não foram específicos contra antígenos da malária. Os pacientes apresentaram menor número de agregados plaquetários em comparação aos controles, e a expressão de CD42 na superfície das plaquetas desses agregados foi correlacionada positivamente com o MPV. Portanto os nossos resultados indicaram que a formação de agregados contribui para a plaquetopenia associada à malária vivax. Os anticorpos antiplaquetários do tipo IgM foi negativamente correlacionado com a contagem de plaquetas, e não foi associado com exposição de malária, sugerindo que não sejam direcionados contra antígenos da malária. Os pacientes mostraram um número de agregados menor que os controles, no entanto, a expressão de CD42 nestes agregados foi correlacionado positivamente com resposta de MPV, indicando que esse fenômeno contribua mais tardiamente como causa da plaquetopenia. Portanto, estabelecemos uma ferramenta promissora para avaliar as alterações morfológicas das plaquetas, para entender e compreender o papel de fatores específicos e a dinâmica no desenvolvimento da plaquetopenia na malária vivax.

Palavras-chave: Plaquetopenia, IgM, estresse oxidativo, *Plasmodium vivax*.

ABSTRACT

Although thrombocytopenia be a common haematological manifestation in malaria caused by *Plasmodium vivax*, and not included in the severity criteria, its impact is widely recognized. This manifestation probably involves increase in the destruction and/or consumption of platelets in the periphery, but is not usually accompanied by severe hemorrhage. Anti-CD41 antibodies and redox indicator dihydroethidium were used to characterize microparticles, aggregates and platelets based on FSC and SSC parameters. Still, we used anti-human CD42 antibody, the external domain of the platelet receptor for von Willebrand factor, to estimate the contribution of platelet adhesion. The oxidative stress of platelets and microparticles was not associated with thrombocytopenia in our patients. However, IgM antiplatelet antibodies correlated with reduced platelet counts, but were not specific against malaria antigens. Patients had a lower number of platelet aggregates compared to controls, and CD42 expression on the platelet surface of these aggregates was positively correlated with MPV. Therefore our results indicated that the formation of aggregates contributes to the thrombocytopenia associated with vivax malaria. Antiplatelet antibodies of the IgM type were negatively correlated with platelet count, and were not associated with malaria exposure, suggesting that they are not targeted against malaria antigens. Patients showed a lower number of aggregates than controls, however, the expression of CD42 in these clusters was positively correlated with MPV response, indicating that this phenomenon contributes later as a cause of thrombocytopenia. Therefore, we have established a promising tool to evaluate the platelet morphological alterations to understand and understand the role of specific factors and the dynamics in the development of thrombocytopenia in vivax malaria.

Keywords: Thrombocytopenia, IgM, oxidative stress, *Plasmodium vivax*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo Biológico da Malária.....	20
Figura 2 – Mecanismo da Febre na Malária representada por Macrófagos e citocinas inflamatórias.....	22
Figura 3 – Formação Plaquetária.....	24
Figura 4 – Estrutura das plaquetas.....	25
Figura 5 – Função das plaquetas na hemostasia.....	27
Figura 6 – Correlação entre a queda da contagem de plaquetas e o aumento da parasitemia.....	28
Figura 7 – Índices de plaquetas em infecção humana.....	30
Figura 8 – Correlação de plaquetas e o Volume Plaquetário Médio.....	31
Figura 9 – Plaquetas Imaturas e índices plaquetários.....	32
Figura 10 – Mecanismos associados a destruição plaquetária na malária.....	36
Figura 11 – Fluxograma do estudo.....	42
Figura 12 – Análise em citometria de fluxo do plasma rico em plaquetas.....	44
Figura 13 – Determinação das subpopulações de plaquetas.....	45
Figura 14 - Avaliação de plaquetas e associação do estresse oxidativo baseado no número plaquetário.....	46
Figura 15 –Avaliação de micropartículas CD41b+ DHE+.....	47
Figura 16 – Avaliação dos níveis de anticorpos antiplaquetários IgG.....	48
Figura 17 – Avaliação dos níveis de anticorpos antiplaquetários IgM.....	49
Figura 18 – Avaliação dos níveis de anticorpos antiplaquetários IgM e IgG.....	49
Figura 19 – Avaliação da formação de trombos medidos de plaquetas ativadas com base em agregados plaquetários CD42+ CD41+.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados dos pacientes recrutados no decorrer do estudo.....	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS – Ácido Acetilsalicílico

ADP – Adenosina Difosfato

ADR – Adrenalina

ADAMS- *A Desintegrin And Metalloproteases*

ATP – Adenosina Trifosfato

CDC – Centro de Controle e prevenção de Doenças

CD41 – Marcador de Plaquetas

CD42 – Marcador para estimar a adesão plaquetária

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DHE – Dihidroetídeo

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FMT-HVD – Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado

FACS – Classificação celular Ativada por Fluorescência

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FSC – Tamanho das células na Citometria de Fluxo

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

ILMD – Instituto Leônidas e Maria Deane

IFN – Interferon

IL1 β – Interleucina 1 Beta

IL 6 – Interleucina 6

IL10 – Interleucina 10

MPV – Volume Plaquetário Médio

MIF - Média da Intensidade de Fluorescência

ML – Mililitro

mM - Milimolar

MP – Micropartícula

Nº – Número

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-americana de saúde

ON – Óxido Nítrico

PDW – Amplitude de variação do tamanho das plaquetas

PLT – Plaquetas

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

PGE1 – Prostaglandina E1

PSG – Papes Salina Glucose

RNA – Ácido Ribonucleico

SSC – Granulosidade das células na Citometria de Fluxo

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UL – Microlitro

VWF – Fator de Von Willebrand

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Epidemiologia.....	18
2.2 Aspectos do ciclo biológico.....	18
2.3 Mecanismo de febre na malária.....	20
2.4 Plaquetas.....	23
2.4.1 Formação e estrutura.....	23
2.4.2 Interação das plaquetas na homeostasia.....	25
2.5 Plaquetopenia na malária.....	27
2.5.1 Morfologia plaquetária associada a plaquetopenia.....	29
2.5.2 Agregação plaquetária.....	32
2.5.3 Mecanismo de destruição plaquetária.....	33
3. JUSTIFICATIVA.....	37
4. OBJETIVOS.....	38
4.1 OBJETIVO GERAL.....	38
4.2 OBJETIVO ESPECIFICO.....	38
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5.1 Recrutamento de pacientes.....	39
5.1.1 Critérios de inclusão e exclusão para os pacientes.....	39
5.1.2 Critérios de inclusão e exclusão para os voluntários sadios.....	39
5.2 Coleta do sangue e obtenção do plasma e plaquetas	40
5.3 Avaliação da resposta de plaquetas frente a estímulos.....	40
5.4 Leitura e análise das amostras.....	41
5.5 Detecção de co-infecção.....	41
5.6 Análise estatística.....	41
6. RESULTADOS.....	42
6.1 Avaliação do plasma rico em plaquetas.....	43
6.2 Associação do estresse oxidativo com a plaquetopenia.....	45
6.3 Avaliação do estresse oxidativo após ativação plaquetária com Adrenalina e formação de micropartículas (MP).....	46
6.4 Anticorpos antiplaquetários na patogênese da plaquetopenia na malária vivax.....	47

6.5 Biomarcador para estimar a ativação plaquetária por trombos de formação medidos pelo número de agregados.....	50
7. DISCUSSÃO.....	53
8. CONCLUSÃO.....	58
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
10. ANEXOS.....	74

1. INTRODUÇÃO

O *Plasmodium vivax* é o agente causador de malária mais amplamente distribuído em regiões da Ásia e América Latina (NAING *et al.*, 2014; HOWES *et al.*, 2016). O dogma sobre o qual a malária vivax seja considerada uma doença benigna vem sendo contestado por vários estudos que relataram complicações graves, desde a anemia e até mesmo morte (GETHING *et al.*, 2016; ANTINORI *et al.*, 2016).

A anemia é manifestada por uma destruição hemolítica e desieritropoiese, é muito frequente em casos de recorrência de malária em áreas hiperendêmicas no sudoeste asiático (CLARK *et al.*, 2007; KENANGALEM *et al.*, 2016; WASSMER; GRAU, 2017). A anemia quando associada com baixas contagens de plaquetas aumenta o risco de complicações na evolução da doença (MAINA *et al.*, 2010; LEAL *et al.*, 2013).

A plaquetopenia é outra manifestação hematológica bastante comum na malária vivax, porém quando manifestada isoladamente não caracteriza por si só uma malária complicada ou grave (BARBER *et al.*, 2013; LAMPAH *et al.*, 2014). A redução do número de plaquetas desenvolve-se no início da malária, antes do aparecimento dos sintomas (De MAST *et al.*, 2007). Embora alguns mecanismos envolvidos na plaquetopenia na malária já tenham sido descritos, eles ainda permanecem incompreendidos (SARAVU *et al.*, 2011; LACERDA *et al.*, 2011; LACERDA *et al.*, 2012; LEAL-SANTOS *et al.*, 2013; COELHO *et al.*, 2013; ANGCHAI SUKSIRI, 2013; LAMPAH *et al.*, 2015; NAING, WHITTAKER, 2018). Sabe-se que a vida útil das plaquetas é fortemente reduzida nos pacientes infectados e as plaquetas periféricas são removidas por causa da malária (SKUDOWITZ *et al.*, 1973; YAMAGUCHI *et al.*, 1997; COX; MCCONKEY, 2010; LACERDA *et al.*, 2011). Ademais, estudos em voluntários humanos infectados por *Plasmodium falciparum* foram bem esclarecedores em demonstrar que a plaquetopenia acontece antes dos sintomas de febre de uma maneira gradativa (DE MAST *et al.*, 2010; CLAUSHUIS *et al.*, 2016). Com a evolução da parasitemia a redução da contagem de plaquetas ocorre concomitantemente. Especula-se que os mecanismos associados às destruições periféricas apontem para uma tríade, que combina a fagocitose de plaquetas, apoptose e ativação-adesão de agregados plaquetários (PIGUET *et al.*, 2002; DE MAST *et al.*, 2009).

Por outro lado, a plaquetopenia pode não estar relacionada apenas a um efeito direto do parasita, pois estudos evidenciaram que a produção de plaquetas defeituosas pela medula óssea também funciona como mecanismo efetor da baixa contagem de plaquetas (LACERDA *et al.*, 2011).

Achados suportam a ação da resposta medular ao longo da fase aguda para compensar a baixa quantidade de plaquetas circulantes (SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011). Isto porque alterações na morfologia plaquetária, ocorrem concomitantemente à diminuição da contagem plaquetária na malária, e como também é observado em outras patologias (DE MAST *et al.*, 2007; CHANDRA *et al.*, 2009). Acredita-se que estas alterações ocasionadas pela plaquetopenia estejam associadas a este aumento do volume médio das plaquetas (MPV), como resultado de uma aceleração do processo de fragmentação citoplasmática sem dano medular (CHANDRA *et al.*, 2009). Acredita-se que a resposta do MPV a redução na contagem de plaquetas na malária seja um efeito compensatório, no entanto mais estudos necessitam esclarecer a fisiopatologia dessa resposta. Logo, uma investigação mais minuciosa sobre os aspectos funcionais das plaquetas contribuirá para o aumento do conhecimento sobre a plaquetopenia na malária, que constitui-se como o quadro mais frequente na malária (LACERDA *et al.*, 2007, 2011; CHUA *et al.*, 2015). Assim, o presente estudo visou investigar a avaliação de biomarcadores com características clínicas e laboratoriais permitindo assim compreender a dinâmica destes mecanismos subjacentes a plaquetopenia na malária vivax.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGIA

A malária é uma doença febril com grande impacto na saúde (HOWES *et al.*, 2016). Mundialmente, aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas vivem em risco de infecção, sendo que cerca de 219 milhões de novos casos são relatados por ano, com estimativa de 435 mil mortes (OMS, 2017). O *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* são as duas principais espécies de malária em seres humanos, e ambas expõem aproximadamente cerca de 2,5 bilhões de pessoas ao risco de infecção (FOLEGATTI *et al.*, 2017). O *P. falciparum* está amplamente distribuído na África Subsaariana e também nas regiões do sudeste asiático. O *P. vivax* é o mais prevalente em diversas regiões das Américas e responsável por mais da metade de todos os casos de malária (NAING *et al.*, 2014). No Brasil, a ocorrência de *P. vivax* corresponde aproximadamente a 88% de todos os casos relatados de malária, seguido de *P. falciparum* com 12% dos casos (SIVEP-MALARIA, 2017).

O reconhecimento da gravidade da doença ocasionada pelo *P. vivax* é devido às evidências clínicas e as disfunções múltiplas associadas a órgãos com uma complexa forma de infecção desse parasita (LACERDA *et al.*, 2012; VAL *et al.*, 2017). Os dados atualizados mostraram um aumento do número de casos de malária, bem como dos riscos gerados em conflitos de crises econômicas em locais de área endêmica. Por conta disso, é necessário manter as estratégias na redução da transmissão, para que assim possa ocorrer uma diminuição nos casos de infecção por malária (OPAS, 2017).

2.2 ASPECTOS DO CICLO BIOLÓGICO

A malária possui um ciclo biológico complexo. Inicia-se com a picada do mosquito fêmea *Anopheles*, infectada por parasitas do gênero *Plasmodium*, após a inoculação dos esporozoítos na derme do hospedeiro humano (GUEIRARD *et al.*, 2010; MORAES, 2016; PHILLIPS *et al.*, 2017).

Os esporozoítos atravessam o tecido epitelial até chegarem nos vasos sanguíneos e nos gânglios linfáticos, onde migram para o fígado. Estes esporozoítos invadem os hepatócitos e são submetidos ao processo de maturação e de reprodução assexuada por

esquizogonia. Tal processo é conhecido por estágio pré-eritrocítico, onde um único esporozoítio pode muitas das vezes gerar milhares de merozoítos liberados na corrente sanguínea (GETHING *et al.*, 2012; GRAU *et al.*, 2012). Com essa invasão, o sistema imune já recebe estímulos para desencadear respostas no período sub-patente da infecção malárica. Exemplos de respostas imunológicas desencadeadas são: a apoptose das células infectadas, isolamento e destruição do parasita em compartimentos específicos, e a produção de IFN induzida pelo material genético do parasita (MESLIN *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2014; LIEHL *et al.*, 2015). Após o início da resposta imunológica durante a fase hepática, a maioria dos parasitas que conseguem escapar do sistema imune realizam uma replicação dentro dos hepatócitos, aumentando assim o quantitativo de parasitas exponencialmente (PRADO *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2016).

Os merozoítos infectantes são liberados na corrente sanguínea através dos merossomos, que são pequenas estruturas vesiculares formadas a partir da membrana plasmática do hepatócito. Estes merossomos infectam as hemácias na corrente sanguínea, iniciando o segundo estágio da reprodução assexuada, o ciclo eritrocítico - que é o estágio sintomático da doença (GALINSKI; MEYER; BARNWELL, 2013; WHITE *et al.*, 2014; OMS, 2016; COWMAN; HEALER; MARAPANA, 2016; WATERS, 2016; WASSMER, 2017).

No estágio eritrocítico, os merozoítos desenvolvem-se dentro das hemácias na forma de anel ou trofozoítio jovem, onde através da divisão nuclear forma-se o trofozoítio maduro o suficiente para dar origem a novos merozoítos. Esse estágio denominado esquizonte libera de 8 a 16 merozoítos na circulação, e estes merozoítos invadirão as hemácias, onde ocorre a divisão mitótica que formará novos esquizontes, reiniciando o ciclo eritrocítico (Fig. 1). Assim, os ciclos repetidos de invasão, replicação e liberação de novos merozoítos levam a um crescimento exponencial dos parasitas, levando a um paroxismo febril. O resultado do aumento da carga parasitária é o aumento das manifestações clínicas e a redução da contagem de plaquetas (MILLER; ACKERMAN; SU, 2013; GAZINELLI *et al.*, 2014).

O ciclo hepático acontece uma única vez, mas a fase eritrocítica ocorre por vários ciclos ou em repetições de intervalos regulares característicos a cada 48 horas em *Plasmodium vivax* (REY, 2001; STEVERSON, 2004; STURM *et al.*, 2006; YAMAUCHI *et al.*, 2007; MURRAY *et al.*, 2012). Quando observa-se estudos de infecções experimentais, a redução de plaquetas ocorre antes do início da

sintomatologia, quando a parasitemia ainda não superou o limiar do paroxismo febril (BERTOLINO; BOWEN, 2015). Acredita-se que ao final do ciclo hepático, o parasita possa ter a capacidade de induzir a tolerância imunológica assim evitando ser eliminado e realizando uma infecção produtiva nos hepatócitos liberando proteínas que podem desencadear uma resposta imune na fase assintomática, estes sinais oriundos da resposta imune levam a geração das alterações morfológicas das plaquetas (GAO *et al.*, 2014; HANISH *et al.*, 2015; HANSON *et al.*, 2015; BERTOLINO, BOWEN, 2015).

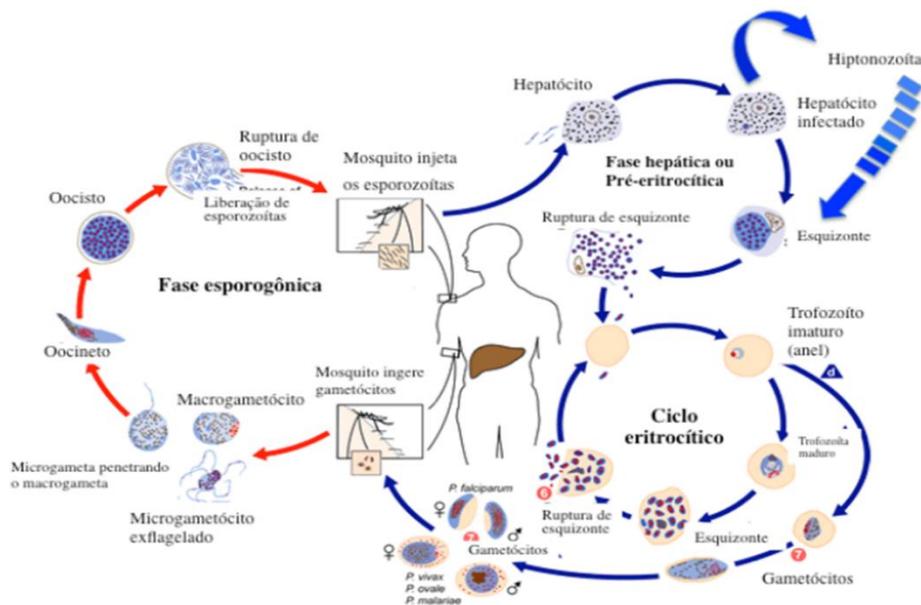


Figura 1: Ciclo Biológico da Malária. Fonte: CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 2016. Adaptado de <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>

2.3 MECANISMO DE FEBRE NA MALÁRIA

Os picos febris estão relacionados com a liberação de parasitas após a ruptura do esquizonte, indicando que alguma toxina malárica está relacionada com os sintomas e sinais de febre na infecção (ARTAVANIS; TONGREN; RILEY, 2003, JARAMILLO *et al.*, 2009).

Quando as hemácias parasitadas se rompem, elas liberam um pigmento malárico denominado hemozoína, que é fagocitado pelas células do sistema imune. Tal pigmento

acumula-se nos macrófagos do fígado e baço e desencadeia a ativação da resposta imunológica. Consequentemente, ocorre a produção de citocinas que estão associadas à febre, bem como o aumento de receptores ligados ao *Plasmodium*, promovendo a febre e os espasmos sintomáticos da malária (GAZZINELLI *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2016).

Assim, à medida que a hemozoína aumenta com o prolongamento da infecção ocorre uma indução e liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como, a Interleucina 1 beta (IL-1 β) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF), que estão associadas ao mecanismo de febre (Fig. 2) (WERE *et al.*, 2009; AWANDARE *et al.*, 2011). A citocina IL-1 β também é amplamente elevada na malária, sendo produzida de forma silenciosa e inativa, sob estímulo ela sofre uma ativação controlada por inflamassoma para poder se tornar ativa (BOZZA *et al.*, 2008; JARAMILLO *et al.*, 2009). O TNF está ligado diretamente ao processo inflamatório e é relacionado à gravidade na malária, sendo um resultado do consumo de plaquetas que ocorre na inflamação dos vasos das células (BRIDGES *et al.*, 2010; RAZA *et al.*, 2014). Os inflamassomas são complexos imunológicos, com várias funcionalidades moleculares nas células do sistema imune inato, em respostas a moléculas microbianas e sinais de estresse celular (ROWLEY *et al.*, 2011; YANG, *et al.*, 2012). São compostos por sensor de uma molécula adaptadora e caspase inflamatória, além de contribuírem para a indução da resposta inflamatória pela secreção das citocinas (HOTTZ *et al.*, 2015; GUO; CALLAWAY; TING, 2015). A presença do parasita é importante para desencadear a febre neste processo inflamatório (LEAL-SANTOS *et al.*, 2013).

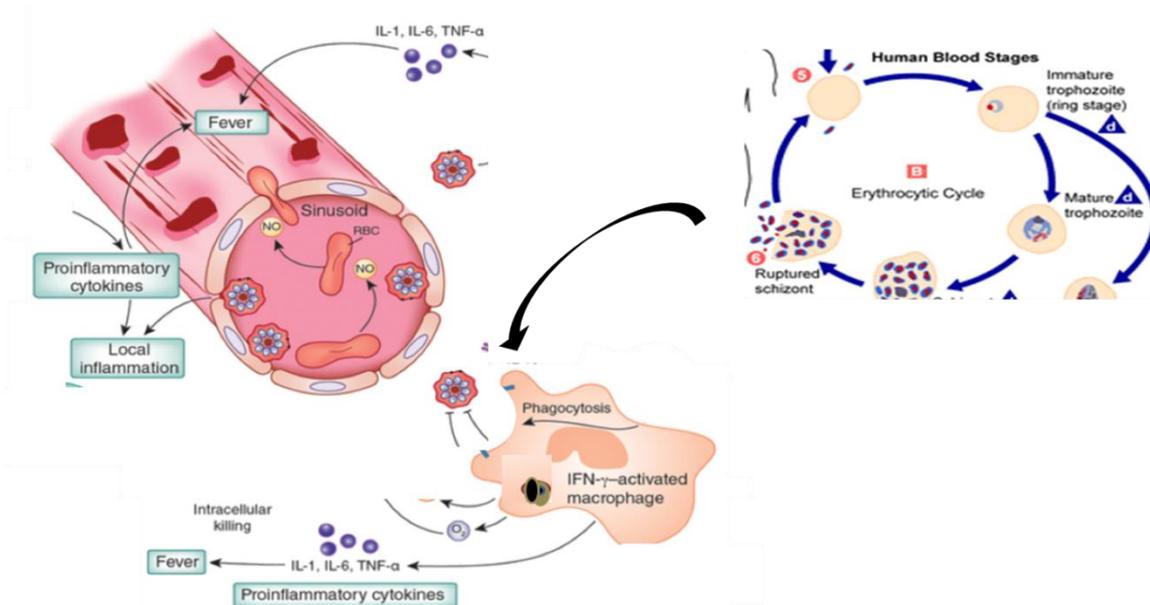


Figura 2. Mecanismo da febre na malária representada por macrófagos e citocinas inflamatórias. Fonte: Ann Stewart, V. *Nat Med*, 2013.

Outros achados sugerem que tanto a Interleucina 6 (IL-6) quanto Interleucina 10 (IL-10) também podem estar envolvidas na regulação da resposta imunológica durante a infecção malárica. Foi reportado uma correlação entre os níveis dessas citocinas e a carga parasitária em pacientes infectados por malária grave ocasionados por *P. vivax* (MENDONÇA *et al.*, 2013). Por outro lado, a relação entre aumento nos níveis de IL-6 e IL-10 e gravidade da malária é controverso, visto que outros autores mostraram aumento destas citocinas tanto em casos de malária grave quanto nos moderados (BORGES; FONTES; DAMAZO, 2013). Além disso, a administração da IL-6 recombinante em humanos foi associada ao aumento do número de plaquetas circulantes, enquanto que a administração de IL-10 provocou diminuição do número de plaquetas circulantes em voluntários saudáveis. Demonstrando que a plaquetopenia pode ser ocasionada pela redução na produção de plaquetas na medula óssea (CASALS *et al.*, 2006). Como essas citocinas podem ser representativas de respostas pró e anti-inflamatórias na malária, a relação delas com a fisiopatologia da plaquetopenia deve ser melhor elucidada visando a compreensão da resposta imune na origem da plaquetopenia na malária (CLAUSHUIS *et al.*, 2016; THACHIL *et al.*, 2017).

2.4 PLAQUETAS

As plaquetas são pequenos fragmentos celulares, com uma forma discoide, e tamanho variando de 1 a 3 µm de diâmetro. São oriundas dos megacariócitos residentes na medula óssea que as produzem por um processo de exocitose denominado de trombopoiese (PARISE, 2016). Quanto à função, pode-se inferir que as plaquetas são altamente especializadas e indispensáveis na hemostasia, pois são efetoras nas atividades de cicatrização de feridas, agregando-se em tecidos lesionados para evitar a perda excessiva de sangue. Assim, elas atuam como mecanismos efetores da inflamação, com excelente papel na imunidade inata e adaptativa (MACHLUS; ITALIANO, 2013).

As plaquetas podem participar na captura e na morte dos patógenos. A indução de plaquetas em redes extracelulares de neutrófilos que é denominado NET, um mecanismo a qual as plaquetas estimuladas com agonistas plaquetários podem formar a NET. A interação entre as plaquetas e bactérias pode promover uma agregação plaquetária como células que acumulam numerosas células nos compartimentos de infecções vasculares e principalmente na liberação de fatores inflamatórios ocasionando uma inflamação (FUCHS *et al.*, 2007; WARTHA *et al.*, 2008; JENNE; URRUTIA; KUBES, 2013).

2.4.1 FORMAÇÃO E ESTRUTURA

A formação das plaquetas se dá por uma complexidade de eventos, onde apenas um megacariócito libera centenas a milhares de plaquetas na corrente sanguínea. A formação ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, os fatores de crescimento promovem a maturação das plaquetas (endomitose). O tamanho delas é aumentado e seu componente genético é duplicado, sem a citocinese. O resultado é a formação de um citoplasma avantajado ocorrendo por longas extensões, onde a membrana serve para formar a estrutura da plaqueta, que é preenchida por grânulos específicos (MACHLUS; ITALIANO, 2013; PARISE, 2016).

Já na segunda etapa, ocorre à liberação das plaquetas, a exocitose é concluída em algumas horas. Ao gerar as plaquetas os megacariócitos remodelam todo o seu

citoplasma para gerar as pró-plaquetas, como uma linha de montagem liberando corpúsculos na extremidade das pró-plaquetas de cada extensão para assim formar as plaquetas. Durante a maturação plaquetária, ocorre o processo denominado de pré-plaqueta, o qual é formado por partículas maiores que as plaquetas. Assim, tais partículas tem a capacidade de transformar-se em pró-plaquetas, e este é o momento em que caem na corrente sanguínea. Estas extensões sofrem fragmentação liberando corpúsculos de forma discoide que são as plaquetas maduras (Fig. 3) (PATEL *et al.*, 2005; THON; ITALIANO, 2010; MACHLUS; ITALIANO, 2013; PARISE, 2016).

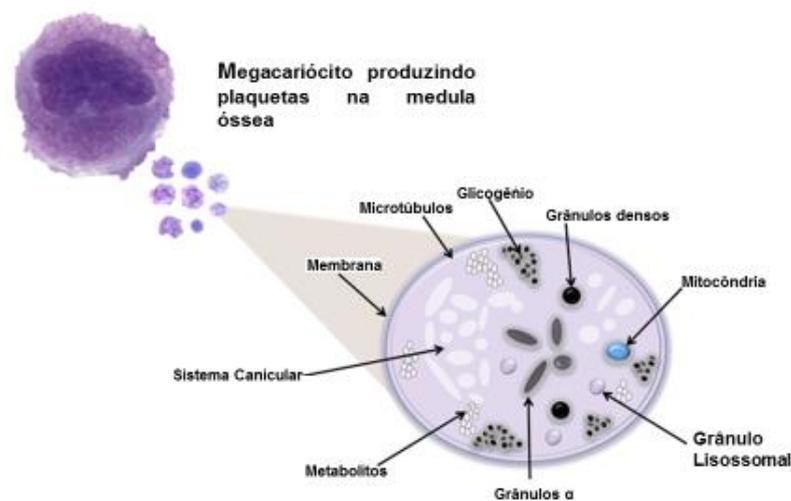


Figura 3: Formação Plaquetária. Fonte: ZAPATA, Juan C, V. Plos neglected tropical diseases, 2014.

No que se refere à estrutura das plaquetas, pode-se inferir que a organização celular das mesmas envolve um citoplasma formado por invaginações da membrana plasmática, delimitando uma rede complexa de canalículos, denominado sistema canicular aberto. Esta rede formada por estas invaginações dá um aspecto de dobras e promovem uma área ampla de superfície, que facilmente absorve proteínas e outras biomoléculas. No processo de ativação plaquetária, esta rede funciona como um sistema secretório de biomoléculas armazenadas em estruturas especializadas, denominadas grânulos α . Estes grânulos são as organelas mais abundantes nas plaquetas, e tem a função de armazenamento de biomoléculas e proteínas, que incluem reguladores da coagulação, fibrinólise, citocinas e as moléculas de adesão (SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011).

Outros grânulos existentes e menos abundantes são os grânulos densos. Eles estocam moléculas como ADP (Adenosina Difosfato), ATP (Adenosina Trifosfato) e serotonina. As plaquetas são ricas em mitocôndrias, peroxissomas e lisossomas, sendo os principais componentes de formação dos microtúbulos marginais, e da mobilidade do citoesqueleto que mantêm a organização e sua forma discoide das plaquetas (Fig. 4) (THON *et al.*, 2010; SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011; BLAIR; FLAUMENHAFT, 2013).

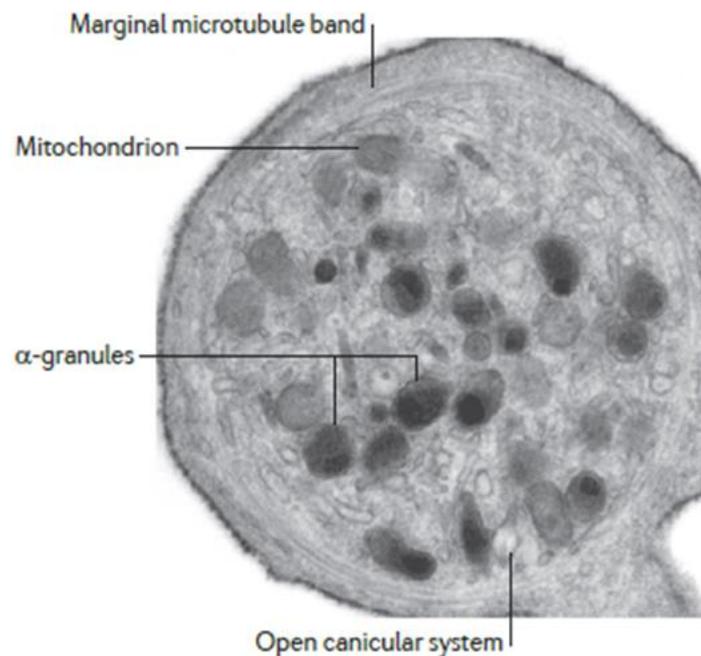


Figura 4: Estrutura das plaquetas. Fonte: SEMPLE *et al.*, *Nature* (2012)

2.4.2 INTERAÇÃO DAS PLAQUETAS NA HOMEOSTASIA

As contagens normais de plaquetas variam de 150.000 a 450.000 plaquetas por microlitro (YUN *et al.*, 2016; GROZOVSKY *et al.*, 2015; FREYNHOFER *et al.*, 2015).

As plaquetas estão envolvidas em diversos processos imunológicos, como a liberação com mediadores inflamatórios, que desencadeiam uma resposta inflamatória,

além de serem fatores de coagulação. Porém, ainda não está totalmente compreendido o papel das plaquetas como células efetoras contra patógenos (HOTTZ *et al.*, 2013; MACHLUS *et al.*, 2016).

Como elas expressam receptores de superfície, conseguem atuar modulando e exercendo um papel na modificação de outras células, tais como as células endoteliais, em respostas a lesões em processos hemostáticos (ASSINGER, 2014; PLUTHERO; KAHR, 2016). As plaquetas ativadas medeiam a adesão de neutrófilos ao endotélio e também aumentam suas funções pró-inflamatórias (SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011).

Embora as plaquetas sejam anucleadas, e conseqüentemente sem atividades transcricionais, elas possuem estoques de RNA e diversos mecanismos pós-transcricionais. Acredita-se que estes RNAs são remanescentes da endomitose dos megacariócitos (DENIS *et al.*, 2005; LANNAN *et al.*, 2015). Foi estabelecido que estes RNAs podem ativar a síntese proteica e alterar o proteoma das plaquetas por vias especializadas, podendo por horas sustentar o estímulo inicial de ativação e as interações nas células endoteliais nessas respostas (NISHIMURA *et al.*, 2012; HOTTZ 2014).

A ativação de plaquetas está envolvida na diminuição da vida útil das mesmas. E a expressão de receptores e a aderência atuam na depuração de plaquetas senescentes na periferia. A aderência plaquetária faz uma estimulação na adesão de plaquetas a leucócitos, e níveis altos de plaquetas e monócitos formam agregados, pela ligação de P-Selectina na superfície das plaquetas ativadas ao ligante da glicoproteína sobre os leucócitos. Essa agregação atua na modulação da resposta inflamatória (STEGNER; NIESWANDT, 2011; OZAKI; SUZUKI; INOUE, 2013; LEE; BERGMEIER, 2016; YUN *et al.*, 2016).

Dentre os ativadores de plaquetas, denominados agonistas solúveis, está o ADP, que é liberado pelas células endoteliais defeituosas e provoca uma grande ativação. O tromboxano, que também é produzido e liberado pelas plaquetas estimuladas, também tem um papel na maior ativação de outras plaquetas, aumentando a concentração de cálcio citosólico e ativando as vias de sinalização específicas. (JENNINGS *et al.*, 2009; HERTER; ROSSAINT; ZARBOCK, 2014; THOMAS *et al.*, 2015).

A trombina, epinefrina ou adrenalina também são agonistas de ativação das plaquetas, sendo os mais potentes. Eles são responsáveis pela conversão do fibrinogênio para estabilizar os tampões plaquetários, através dos receptores ativados por proteases na superfície das plaquetas. Este processo constitui-se como um mecanismo de proteção, contribuindo assim para conter um trauma em sangramento (Fig. 5) (JENNE; URRUTIA; KUBES, 2013; WEYRICH, 2014; BERNDT; METHAROM; ANDREWS, 2014).

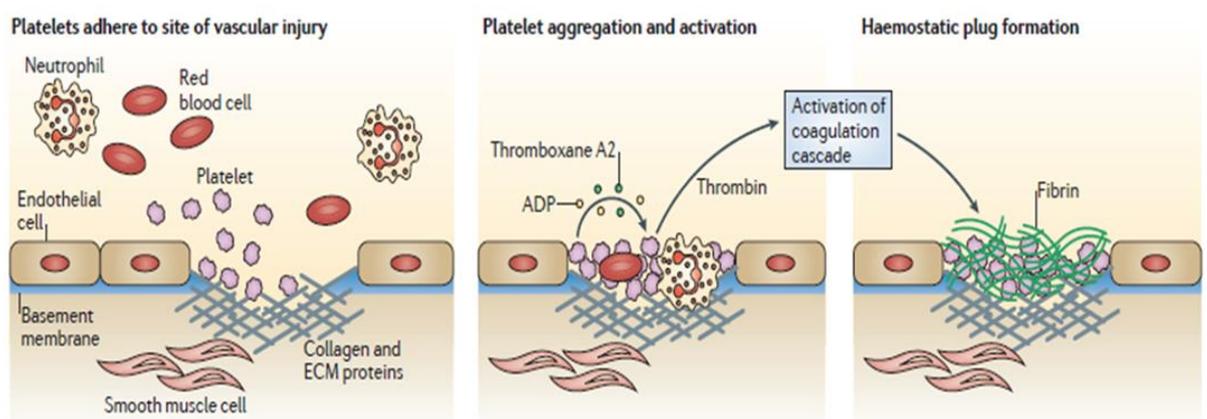


Figura 5: Função das plaquetas na hemostasia. Fonte: SEMPLE *et al.*, *Nature* (2012)

2.5 PLAQUETOPENIA NA MALÁRIA

A plaquetopenia é bastante comum na malária tanto em adultos quanto em crianças. Os mecanismos efetores associados já são bem estabelecidos na malária causada por *P. falciparum*, tais como a destruição mediada por anticorpos (KOCHAR *et al.*, 2010), queda na produção de plaquetas na medula óssea e aumento do consumo plaquetário por agregação ou adesão (GAUER; BRAUN, 2012). Acredita-se que na malária vivax ocorra pelos mesmos mecanismos e só é considerado como forma grave quando associado a outras manifestações (RAZA *et al.*, 2014).

A baixa contagem de plaquetas é caracterizada pelo número plaquetário inferior a 150.000 plaquetas (VIEIRA *et al.*, 2012; STOPPELAAR *et al.*, 2014). Se ocorrer em um evento isolado, não é considerado uma forma grave da doença, mesmo em pacientes com a contagem de plaquetas inferior ao normal (AUTINO *et al.*, 2012). Quando associado com outras alterações hematológicas, tais como anemia e bilirrubinemia, o acometimento pode evoluir para casos com uma maior gravidade (GÉRARDIN *et al.*, 2002; MAINA *et al.*, 2010; LEAL-SANTOS *et al.*, 2013; RIZVI *et al.*, 2013).

Quanto ao efeito direto da plaqueta como célula efetora da imunidade inata, já foi observado que a presença da plaquetopenia leva ao aumento da produção do parasita (SCHOFIELD, 2007). Esse feito sobre o *Plasmodium* ainda não foi bem elucidado, pois o aumento da parasitemia e a queda do número de plaquetas no início da infecção em voluntários podem estar relacionados a vários mecanismos que podem causar o consumo de plaquetas (DE MAST *et al.*, 2007). Isto condiz com uma premissa estabelecida em modelos experimentais de camundongos infectados, segundo o qual a medida que a parasitemia aumenta, o número de plaquetas diminui (Fig. 6) (JENNE; URRUTIA; KUBES, 2013; GRAMAGLIA *et al.*, 2017).

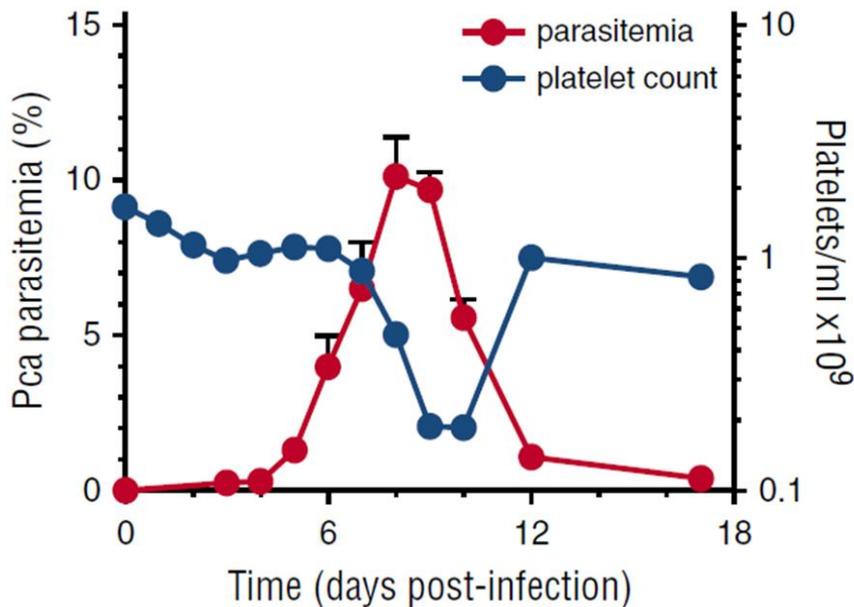


Figura 6: Correlação entre a queda da contagem de plaquetas e o aumento da parasitemia. Fonte: Gramaglia *et al* (2017).

A patogênese da plaquetopenia necessita de mais estudos para a compreensão da fisiopatologia da malária vivax (KLEIN; RONEZ, 2012; COELHO *et al.*, 2013). Portanto a presença do *Plasmodium vivax* pode levar a evolução desta plaquetopenia.

2.5.1 MORFOLOGIA PLAQUETÁRIA ASSOCIADA PLAQUETOPENIA.

As alterações morfológicas das plaquetas, tais como a mudança no volume médio (MPV) e a homogeneidade plaquetária (PDW), acarretam anormalidades funcionais (BYE; UNSWORTH; GIBBINS, 2016). Estes índices alterados são usados como possíveis marcadores de gravidade, ou de mal prognóstico, tais como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, dentre outros (WENDLAND; FARIAS; MANFROI, 2009; BERGOLI *et al.*, 2014).

As alterações plaquetárias em pacientes com malária são comumente relatadas. As extensões destes marcadores estão associadas com a gravidade da doença, e tudo indica que as plaquetas maiores têm um papel importante no processo inflamatório (THON; ITALIANO, 2012). No entanto, na malária por *P. vivax*, a relação entre os parâmetros alterados e o desfecho da doença permanecem controversos, não permitindo assim uma confirmação (BECCHI *et al.*, 2006; NOVELLI *et al.*, 2010; YURI *et al.*, 2011).

Estudos de infecção experimental em humanos voluntários com *P. falciparum*, demonstraram que o número de plaquetas já decai antes dos aparecimentos dos sintomas, isto é, quando não se tem a sintomatologia de febre, podendo ser um sinal que a plaquetopenia na malária pode ser do tipo destrutiva (Fig. 7) (MAST *et al.* 2007, 2010; CHANDRA, 2013).

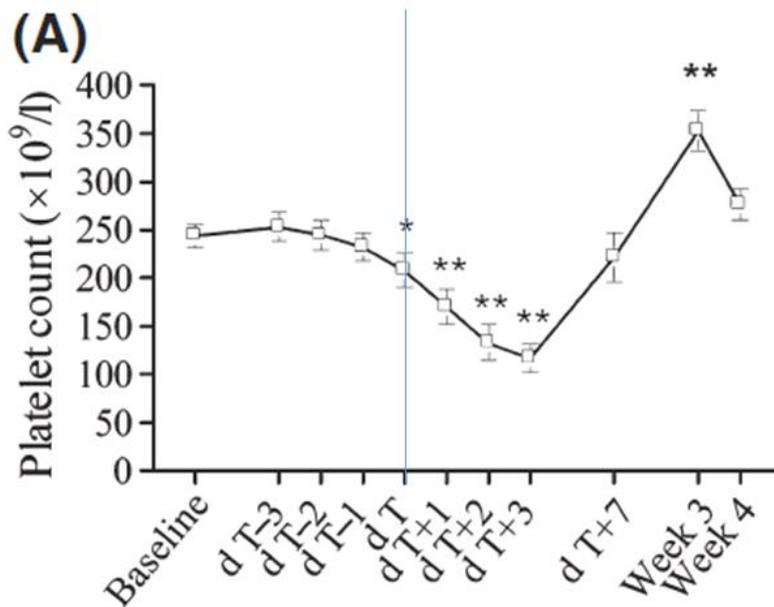


Figura 7: Índices de plaquetas em infecção humana. Fonte: De Mast *et al.*, 2010.

Já em pessoas saudáveis, foi descrito que o PDW e o MPV das plaquetas estão correlacionados negativamente, o que não ocorre em pessoas com plaquetopenia (Costa *et al.*, em submissão). A ativação plaquetária na malária pode ser a razão para que o aumento da largura de plaquetas e o aumento do volume sejam heterogêneos (CHANDRA *et al.*, 2009).

Na malária por *P. falciparum*, o aumento do volume plaquetário pode ser um preditor de infecção (CHANDRA *et al.*, 2013). É sugerido que o aumento do volume plaquetário poderia representar as mega plaquetas, que evitaria o sangramento na plaquetopenia grave. As causas de plaquetopenia e as alterações dos índices plaquetários ainda não estão completamente elucidados (Fig. 8) (VIZIOLI; MUSCARI; MUSCARI, 2009; TANWAR *et al.* 2012).

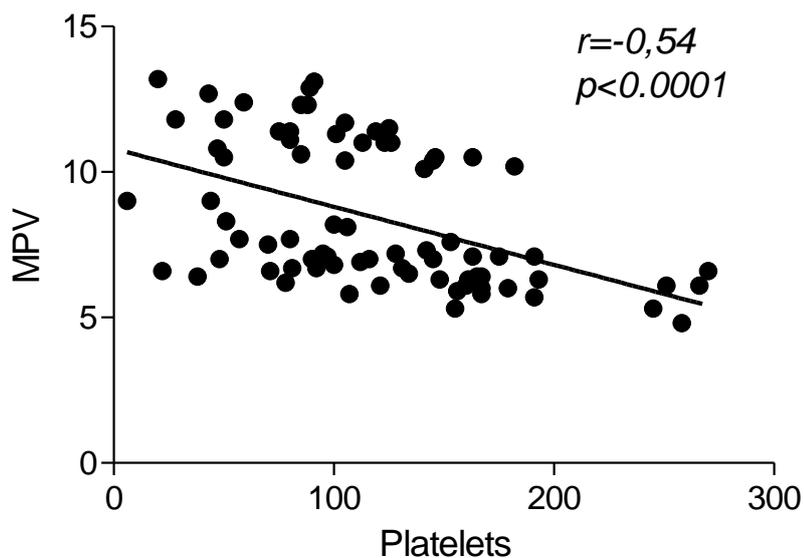


Figura 8: Correlação de plaquetas e volume plaquetário médio (MPV). Fonte: Costa *et al.*, (em submissão).

Estudos realizados em humanos e em modelos experimentais de camundongos mostraram que a elevação de MPV é resultado da resposta ao aumento celular. Assim, mesmo antes do aparecimento dos sintomas e ao aumento da parasitemia, a resposta celular atua modulando a produção e a liberação das plaquetas (Fig. 9) (AMIN; KULKARNI, 2004; GREISENEGGER *et al.*, 2004).

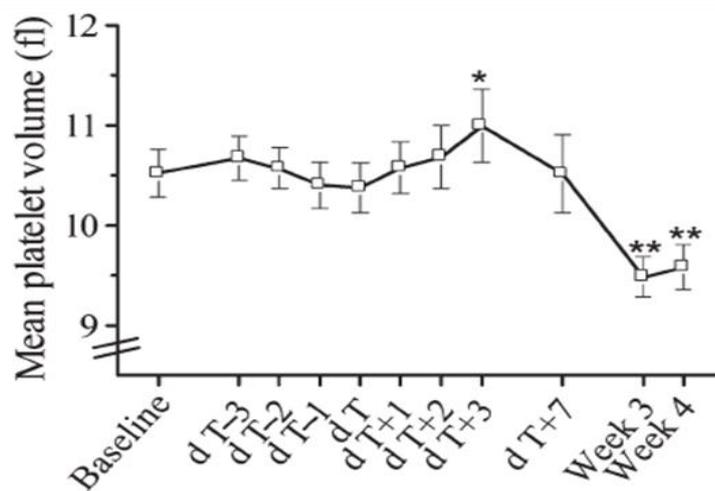
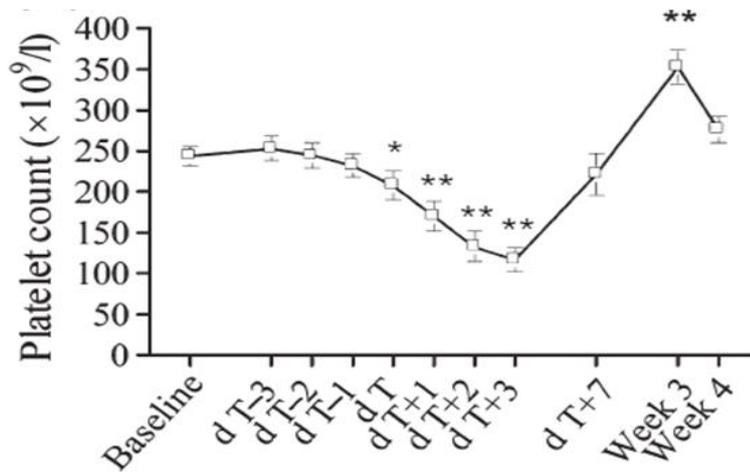


Figura 9: Plaquetas imaturas e índices plaquetários. Fonte: Mast *et al.*, 2010.

2.5.2 AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A agregação plaquetária ocorre por diferentes aspectos, gerando assim uma resposta com relevância na homeostasia (CUYPER *et al.*, 2013). Indutores da agregação plaquetária, tais como Adenosina Difosfato (ADP) e Adrenalina (ADR), são potentes agonistas plaquetários. Assim, geram um aumento da amplificação das plaquetas, com uma atividade pró-coagulante, favorecendo o surgimento de um trombo na reparação de um tecido lesado (YEAMAN, 2014; CARESTIA; KAUFMAN; SCHATNER, 2016).

Para uma resposta imunológica eficaz, a agregação das plaquetas é importante, pois este aglomerado se liga aos patógenos até que eles sejam fagocitados para dentro

do agregado plaquetário, contribuindo assim para a depuração dos microrganismos (JENNE; URRUTIA; KUBES, 2013).

Na malária, a agregação das plaquetas pode indicar uma hiperatividade plaquetária (AL DIERI; LAAT; HEMKER, 2012; YEAMAN; BAYER, 2013). A agregação pode estar relacionada com uma maior concentração de fator de Von Willebrand (VWF), que possui um aumento no início da malária, impedindo assim uma cascata de eventos na contribuição em evitar os eventos hemorrágicos, pois o nível de expressão e interação de CD42 com o fator von Willebrand é necessária como primeira fase na ativação plaquetária, na cadeia α do receptor GP1b de plaquetas. (AUTINO *et al.*, 2012).

A agregação de plaquetas na malária aumenta em respostas aos indutores. Contudo, ainda não está bem elucidado como estas mudanças ocorrem (MOHANTY *et al.*, 1988). São poucos os estudos em plaquetas sobre as alterações morfológicas e o comprometimento de suas funções, devido à ativação e agregação plaquetária excessiva na malária. Por outro lado, os estimuladores antagonistas evitam que as plaquetas percam sua conformidade. O ácido acetilsalicílico (AAS) é um potente anti-inflamatório, e um excelente inibidor da agregação de plaquetas (OLIVEIRA, 2001; MARSON; PASERO, 2006; DHANJAL *et al.*, 2007; GRASSI; DO CARMO, 2016; FERREIRA *et al.*, 2017).

Na malária, as plaquetas ficam bastante agregadas não respondendo aos estímulos, devido a uma ativação excessiva. Assim, a interação entre as plaquetas em resposta a estimuladores permite compreender sobre as anormalidades funcionais e estruturais nas plaquetas durante a infecção malárica (MOHANTY, D. *et al.*, 1988; SCHOFIELD, 2007).

2.5.3 MECANISMOS DE DESTRUIÇÃO PLAQUETÁRIA

Os mecanismos efetores de destruição plaquetária são muito complexos associados aos níveis de citocinas inflamatórias, danos estruturais, agregação e baixa função plaquetária (PATEL *et al.*, 2004; ARAUJO *et al.*, 2008), complexos imunes gerados pelos antígenos maláricos podem conduzir ao sequestro através da fagocitose de plaquetas (COELHO *et al.*, 2013).

Os anticorpos antiplaquetários encontrados na superfície das plaquetas, (LACERDA *et al.*, 2011), podem ser desencadeados pela ligação destes anticorpos aos antígenos da malária que podem estar ligados as plaquetas (HANSON *et al.*, 2015), o agrupamento no baço (FRANKLIN *et al.*, 2011). Levando a coagulação intravascular associada com a adesão das plaquetas dentro dos vasos e a depuração por fagocitose de plaquetas (LAMPAH *et al.*, 2014). As evidências demonstram o envolvimento com a gravidade da doença, tendo em vista que as plaquetas liberam os mediadores inflamatórios (MORRELL *et al.*, 2014), tais como o óxido nítrico (ON), um mediador que atua na homeostase plaquetária. Quando ocorre a diminuição deste mediador na malária grave, tem-se associado com aumento e ativação do consumo das plaquetas (BOUTLIS; YEO; ANSTEY, 2006; YEO *et al.*, 2007).

Estudos demonstraram que citocinas são comumente liberadas durante a resposta inflamatória, contribuindo para a destruição plaquetária (ROGIER; GERARDIN; IMBERT, 2004; KLEIN; RONEZ, 2012). Em estudos de modelos experimentais com camundongos foram observados que o fator de necrose tumoral (TNF) está relacionado com o consumo plaquetário, e os níveis de Interferon gama (IFN γ) estão amplamente associados com a gravidade de malária (PIGUET; KAN; VESIN, 2002; WROCZYŃSKA *et al.*, 2005; CASALS *et al.*, 2006). Em humanos, foi recentemente comprovado que a fagocitose plaquetária está associada com aumento nos níveis de TNF α na plaquetopenia durante a malária pelo *P.vivax* (COELHO *et al.*, 2013). Acredita-se que pelo aprisionamento de plaquetas nos vasos ocorre a plaquetopenia quando induzida por TNF, gerando um alto consumo das mesmas podendo estar assim estando ligadas a inflamação (RAZA *et al.*, 2014).

O processo de apoptose ou morte celular é um regulador da vida útil das células, sendo realizada por um grupo de cisteínas denominadas caspases, que estão envolvidas diretamente na degradação de várias células (ANTINORI *et al.*, 2016). As plaquetas são capazes de sofrer apoptose, pois elas contêm caspases que podem ser ativadas *in vitro* por agonistas de plaquetas como a trombina (JENNINGS, 2009; YUN *et al.*, 2016). Essa ativação pode produzir uma fragmentação plaquetária, ou seja, pode mudar a conformação das plaquetas. Assim, as caspases podem contribuir para uma instabilidade das plaquetas, reduzindo a vida útil das mesmas na periferia ou circulação (MIRSAEIDI *et al.*, 2010; MITSUI *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo tem sido sugerido como um outro mecanismo, desempenhando um papel importante na destruição das plaquetas (SKUDOWITZ *et al.*, 1973; KELTON *et al.*, 1983). Os radicais livres estão associados negativamente com as plaquetas pela degradação oxidativa dos lipídios. Conseqüentemente, uma associação positiva da contagem de plaquetas com enzimas antioxidantes, como a peroxidase glutathionica, poderia ser um mecanismo compensatório das plaquetas ao enfrentar esse estresse oxidativo na malária (ARAÚJO *et al.*, 2008; LACERDA *et al.*, 2011; GAUER; BRAUN, 2012).

O oxigênio reativo desempenha um papel importante na cadeia respiratória, podendo resultar na exposição de estressores extracelulares, como irradiação de citocinas inflamatórias, e no metabolismo celular por reações enzimáticas (ARAUJO *et al.*, 2008). Contudo apesar de desempenharem esses papéis, vários eventos fisiológicos e patológicos podem aumentar a atividade pró-oxidante levando a um estresse oxidativo que acarreta em danos moleculares excessivos e lesão tecidual. (JANUEL *et al.*, 2006).

Vale ressaltar que em relação às plaquetas existem poucos estudos que explique o que acontece nesse fenômeno o que se sabe é que os reativos de oxigênio podem desempenhar um papel no processo de alteração estrutural das plaquetas concernente ao estresse oxidativo, pois as membranas plaquetárias não são resistentes no momento do estresse oxidativo, sendo conseqüentemente mais finas, ou seja, as plaquetas sofrem lise, assim quanto maior o aumento do estresse oxidativo maior será a lise plaquetária liberando todos os seus grânulos (EREL *et al.*, 2001). Portanto esse mecanismos ainda precisa ser melhor elucidado, com mais estudos que possam esclarecer as diferenças da associação do estresse oxidativo nas plaquetas pela infecção mediada pelo *Plasmodium vivax* (KUMAR *et al.*, 2006).

A produção defeituosa de plaquetas pode estar relacionada com problemas na medula óssea, devido os megacariócitos produzirem as mega-plaquetas como um mecanismo compensatório para tentar sustentar a homeostase. Isso explica por que a ocorrência de sangramento nos pacientes infectados é rara (WICKRAMASINGHE; ABDALLA, 2000; TANWAR *et al.*, 2012). Estudos ratificam que a associação da plaquetopenia é do tipo destrutiva, mas a atividade medular é preservada na malária, enquanto a produção das mega-plaquetas liberadas pelo megacariócitos evitaria o

sangramento mesmo em condição de uma plaquetopenia grave (Fig. 10) (NTAIOS *et al.*, 2008; MAINA *et al.*, 2010; MAST *et al.*, 2010; MUWONGE *et al.*, 2013).

A ocorrência rara de sangramento poderia ser devido ao aumento do volume plaquetário, assim a plaquetopenia na malária vivax seria destrutiva e o aumento do volume plaquetário exacerbado. Portanto, um estudo para avaliar aspectos funcionais das mega plaquetas, evidenciadas pelo MPV elevado em pacientes com plaquetopenia contribuirá para confirmar a hipótese de efeito compensatório. (SEMPLE; ITALIANO; FREEDMAN, 2011; LEAL-SANTOS *et al.*, 2013).

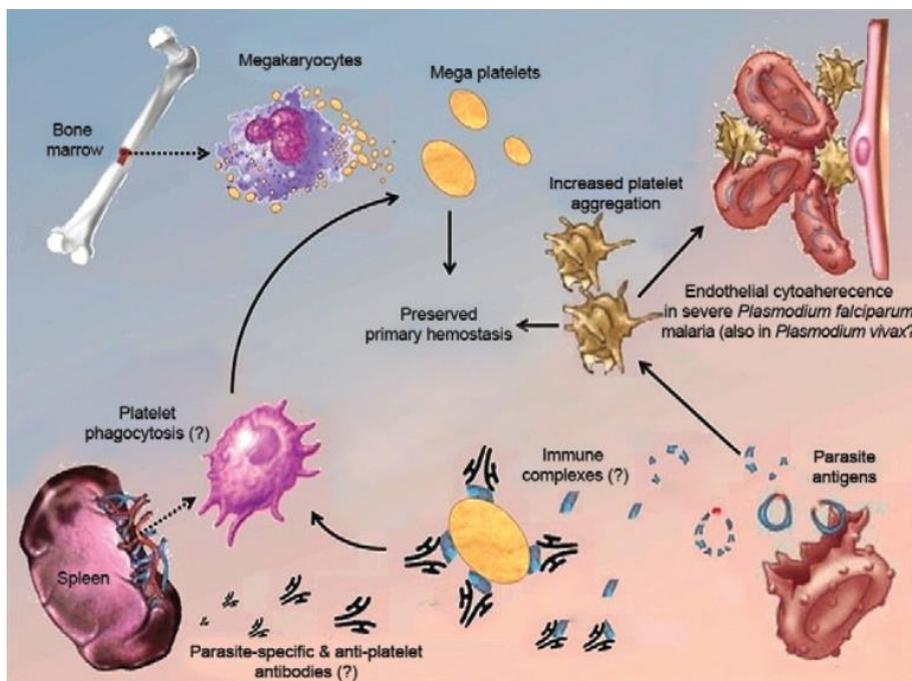


Figura 10: Mecanismos associados a destruição plaquetária na malária. Fonte: Lacerda *et al.* (2011)

3. JUSTIFICATIVA

A plaquetopenia é uma manifestação bastante comum na malária, quando manifestada isoladamente na infecção pelo *Plasmodium vivax*, ela não se caracteriza como grave ou complicada, nem é acompanhada por hemorragia grave. Sabe-se que a redução do número de plaquetas é devida tanto pela destruição e o consumo de plaquetas na periferia quanto pela queda na produção de plaquetas na medula óssea. No entanto, a informação sobre a contribuição de cada mecanismo responsável pela plaquetopenia da malária é escassa.

Mecanismos mediados por anticorpos e o aumento da ativação plaquetária acarretando agregação ou adesão participam na destruição e o consumo de plaquetas na periferia. Para isso, este estudo foi desenhado para estimar a contribuição de anticorpos antiplaquetários na remoção de plaquetas pelo sistema imune supostamente pela fagocitose no baço.

As alterações estruturais e funcionais decorrentes do aumento da ativação plaquetária acarretando o consumo de plaquetas na periferia foram estimadas por dois biomarcadores: i) o indicador superóxido Dihidroetídeo foi utilizado para avaliar qual a contribuição do estresse oxidativo na redução da contagem de plaquetas; ii) o nível de expressão de CD42, a cadeia α do receptor GP1b de plaquetas, foi usada para estimar a contribuição da adesão plaquetária, enquanto a interação de CD42 com o fator von Willebrand é necessária como primeira fase na ativação plaquetária.

Acredita-se que este estudo possa contribuir para a compreensão na dinâmica dos mecanismos adjacentes na plaquetopenia na malária vivax.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral:

Caracterizar as subpopulações plaquetárias através de biomarcadores e associar estas subpopulações aos mecanismos de destruição e consumo de plaquetas na plaquetopenia causada por malária vivax.

4.2. Específicos:

Caracterizar as subpopulações de plaquetas por citometria de fluxo em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*.

Identificar alterações morfológicas das plaquetas por meio da marcação de CD41b e indicador de estresse oxidativo.

Avaliar a agregação e granulosidade das subpopulações de plaquetas em respostas a estímulo agonista.

Avaliar a associação de anticorpos antiplaquetários do tipo IgM e IgG com a redução da contagem de plaquetas.

Avaliar a expressão de CD42 na formação de agregados plaquetários como mecanismo de consumo de plaquetas na periferia.

Associar os biomarcadores plaquetários com os mecanismos que levam a plaquetopenia.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Recrutamento de pacientes: Os pacientes infectados com *P. vivax* foram recrutados na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas (FTM-HVD). Após o paciente ter sido diagnosticado com malária vivax, abordamos o paciente, explicando-lhe que se trata de um estudo de pesquisa com seus benefícios à sociedade, os riscos relacionados à sua participação e as medidas para minimizá-los. Em seguida, o convidamos e apresentamos o estudo. Explicamos o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), para os pacientes maiores de 18 anos. Após terem concordado em participar do estudo, o paciente assinou dois termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE), sendo que uma cópia ficava sob seu poder, e outra em poder da equipe condutora do estudo. O sangue foi coletado previamente antes do início do tratamento antimalárico. O sangue de voluntários sadios (funcionários e estudantes da FMT-HVD e ILMD), que consentiram ao procedimento também foi coletado. O protocolo utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMT-HVD (**Número do Parecer:** 1.917.853). No total de 40 amostras de pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* foram recrutados neste estudo. Todos os dados do hemograma dos pacientes foram coletados e anotados o número de cruzeiros e a parasitemia por microlitro.

5.1.1. Critérios de inclusão e exclusão para os pacientes: Foram incluídos pacientes com malária vivax de ambos os sexos, com idade variando entre 18 a 70 anos. Não foram incluídos gestantes nem pacientes que estavam sob tratamento antimalárico. Foram excluídos pacientes que tiveram o diagnóstico positivo para dengue, Vírus da Imunodeficiência, Hepatite B, Hepatite C e Sífilis.

5.1.2. Critérios de inclusão e exclusão para os voluntários sadios: Os voluntários sadios incluídos no estudo possuíam idade entre 18 a 70 anos de idade, não apresentavam quadro febril.

5.2. Coleta do sangue e obtenção do plasma e plaquetas: Foi coletado 10 mL de sangue de cada doador, as amostras de sangue foram coletadas em tubos com Citrato (BD Biosciences, EUA), sendo realizado a coleta de dois tubos, os tubos utilizados para a separação das plaquetas foi sempre o segundo tubo coletado, pois estão livres de ativadores plaquetários e micropartículas, adaptado do protocolo de coloração para estudos de análises de plaquetas. Após a coleta, o sangue foi transferido para um tubo cônico de 50 ml, e centrifugado a 500×g por 20 minutos, sem freio, em temperatura ambiente. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi transferido para outro tubo cônico de 50 mL. Ao PRP adicionamos prostaglandina E1, (PGE1, Cayman Chemical) 1mg para evitar ativação plaquetária, e centrifugamos em 500×g, por 20 minutos, sem freio, em temperatura ambiente. Após a centrifugação armazenamos o plasma a -80°C em diferentes alíquotas, e as plaquetas ressuspensas em tampão PSG (Pipes 5mM, NaCl145 mM, glicose 5,5 mM, KCl 4 mM, Na₂HPO₄ 50 µM, pH 6,8) e 300 nM de PGE1.

Foi realizada uma nova centrifugação de 500×g, por 20 minutos, sem freio, e posteriormente o sobrenadante descartado. E novamente, adicionamos o tampão PSG e 300 nM de PGE1 para ressuspender as plaquetas, que foram centrifugadas a 500×g, 20 minutos, sem freio, para a separação plaquetária. O sobrenadante foi descartado e as plaquetas ressuspensas em tampão (PSG /PGE), após a repetição de três vezes, as plaquetas estavam lavadas. Assim, plaquetas foram homogeneizadas cuidadosamente com uma pipeta paster até todo o pellet dissolver em tampão (PSG /PGE), contendo em um volume final de 2 mL de plaquetas, para as marcações plaquetárias com os anticorpos fluorescentes específicos.

5.3. Avaliação da resposta de plaquetas frente a estímulos. As plaquetas foram fenotipadas por um marcador de superfície (anti-CD41bhumano FITC) que serve como um marcador de plaquetas. E Dihidroetídeo (DHE) para avaliar o estresse oxidativo na redução da contagem de plaquetas.

Posteriormente as plaquetas foram colocadas em contato com estímulos agonistas (Adrenalina) para agregação plaquetária, todos contendo os anticorpos monoclonais anti-CD41b e o indicador superóxido Dihidroetídeo (DHE). A expressão de (anti-CD42 humano PE) foi usada para estimar a adesão plaquetária. Medimos os níveis de anticorpos antiplaquetários no plasma rico em plaquetas (Anti IgM Humano APC e Anti-IgG humano FITC) para estimar a remoção de plaquetas.

A capacidade responsiva foi determinada pela alteração nos parâmetros de tamanho (FSC) e granulidade (SSC).

5.4. Leitura e análise das Amostras: As amostras foram lidas em equipamento de Citometria de fluxo FACS Canto II pela Plataforma do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), FIOCRUZ-Amazônia, e as análises foram realizadas no programa Flow-Jo, para obtenção dos dados plaquetários, para análise das populações de plaquetas, micropartículas e agregados.

5.5. Detecção de Co-infecção: Para exclusão de amostras co-infectadas com dengue, Vírus da Imunodeficiência, Hepatites B e C, Sífilis, foi realizado testes de ELISA e dois tipos diferentes de testes rápidos para confirmação dos resultados.

5.6. Análise estatística: A rede de correlação foi calculada a partir de dados numéricos, usando Pearson para dados paramétricos e Spearman para dados não-paramétricos. Plaquetas, micropartículas e agregados foram calculados em porcentagem (%) e número de eventos totais. A média da intensidade da fluorescência (MIF) foi calculada para cada marcador: CD41b, CD42, DHE, IgM e IgG. O teste de Mann Whitney foi usado para calcular porcentagem e número de eventos totais ou MIF quando duas populações foram comparadas.

6. RESULTADOS

A plaquetopenia na malária é causada por eventos multifatoriais já estabelecidos, no entanto, ainda não foi elucidado o quanto cada evento contribui na patogênese da manifestação hematológica. Em nosso trabalho utilizamos biomarcadores para estimar a contribuição do mecanismo proposto na plaquetopenia em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*, sabendo que a informação destes mecanismos fisiopatológicos ainda é escassa.

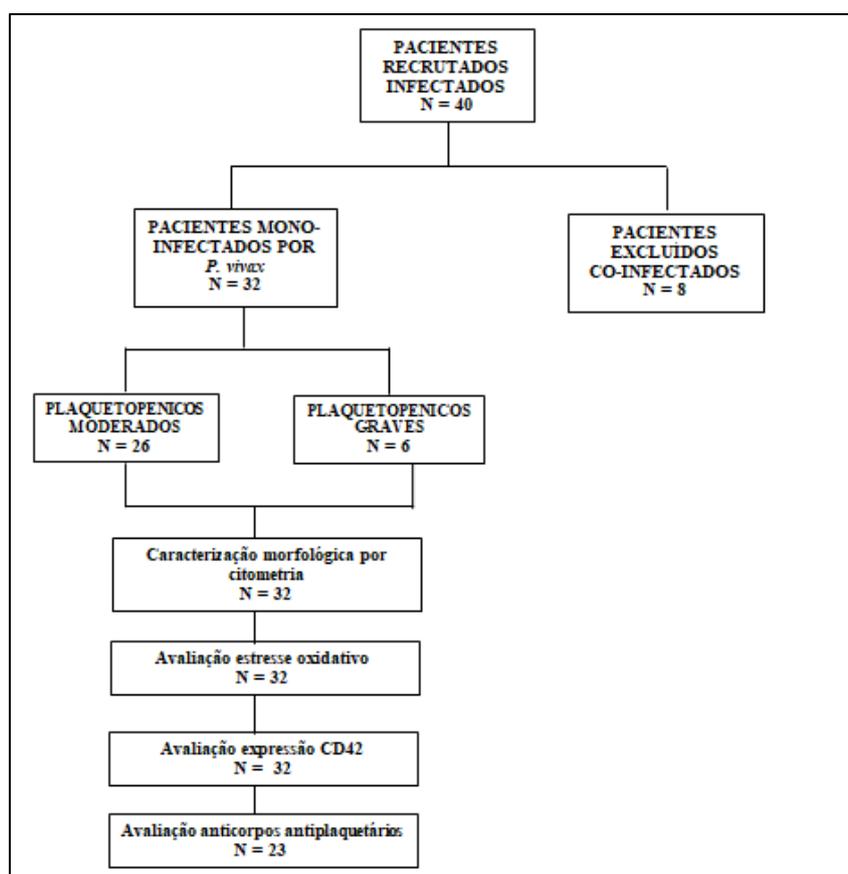


Figura 11: Fluxograma do estudo.

As coletas foram realizadas na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) no período de Janeiro a Novembro de 2018. Após a titulação dos anticorpos comerciais utilizados observamos a baixa intensidade na fluorescência devido a isso usamos uma quantidade maior nas marcações plaquetárias. Portanto o número de pacientes recrutados foi limitado e por isso as coletas foram realizadas por conveniência. Foram incluídos apenas pacientes com diagnóstico de

malária vivax, pacientes infectados pelo *P. falciparum* ou com malária mista não foram incluídos (Figura 11).

TABELA 1. Dados dos pacientes recrutados no decorrer do estudo.

	Malária	Saudáveis	
Idade	40 (29;49) [#]	26;44,5) [#]	0,0908
Parasitemia / uL	205 (73;235)	-	-
Dias de sintomas	4 (3;5)	-	-
Temperatura axilar	37,9 (37,8; 38,1)	-	-
WBC (x10 ³ /uL)	4,2 (3,2 ; 5,8) [#]	7,8 (7:8,95)	<0,0001
Linfócitos (x10 ³ /uL)	1,1 (0,5; 1,5) [#]	3,6 (2,94;4,95) [#]	<0,0001
Monócitos (x10 ³ /uL)	0,6 (0,3; 0,8)	0,7 (0,55;0,8)	0,3020
Neutrófilos (x10 ³ /uL)	2,4 (1,5; 3,6) [#]	4 (3,895;4,29) [#]	<0,0001
RBC (X10 ⁶ /uL)	4,2 (3,6;4,6)	4,03 (3,74;4,29) [#]	0,3359
HGB (g/dL)	13,4 (12;15,1)	15,2 (13,45;16,1) [#]	0,0105
HCT (%)	34,5 (30,2;39,9)	32,5 (30;36,35) [#]	0,1264
MCV (fL)	85,2 (83;87,7)	80,4 (76,3;84,55)	<0,0001
MCH (pg)	35,3 (28,5;37)	30,9(28,8;35,3)	0,1937
MCHC (g/dL)	40,7 (32,3; 43,7)	40,25 (33,6;42,35)	0,3905
PLT (x10 ³ /uL)	82 (64;107) [#]	324 (298,5;355,5)	<0,0001
PDW	41,9 (40,8;44,4)	39,5 (37,25;41,7) [#]	0,0002
MPV	9,7 (8,6;10)	10,5 (9,7;11,5)	0,0104

A maioria dos pacientes apresentam uma parasitemia média de duas cruzes, talvez por isso todos os pacientes recrutados estivessem plaquetopênicos, como descrito na Tabela 1.

6.1 Avaliação do Plasma Rico em Plaquetas

Os procedimentos de preparo do plasma rico em plaquetas (PRP) não causaram desequilíbrio em relação ao número de plaquetas original, pois o número de eventos adquiridos no citômetro de fluxo manteve uma correlação em relação com a contagem inicial (Fig. 12A). As plaquetas foram selecionadas pelo perfil de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e 30 mil eventos foram adquiridos (Figura 12B). O tempo de aquisição das plaquetas foi maior em pacientes em razão da contagem inicial de plaquetas, de modo que o número total de plaquetas no campo FSCxSSC não diferiu entre pacientes e indivíduos sadios (Figura 12C).

Dois marcadores foram usados para permitir a caracterização de alterações morfológicas das plaquetas: o anti-CD41b humano que é o marcador constitutivo de

plaquetas; e o Dihidroetídeo, usado como indicador de redox, ele é metabolizado pelas mitocôndrias das plaquetas e transformado em etídio que se intercala no material genético das plaquetas. O Dihidroetídeo (DHE) permite a caracterização de respostas redox pela geração de espécies reativas de oxigênio na ativação plaquetária por estímulos fisiológicos e patológicos.

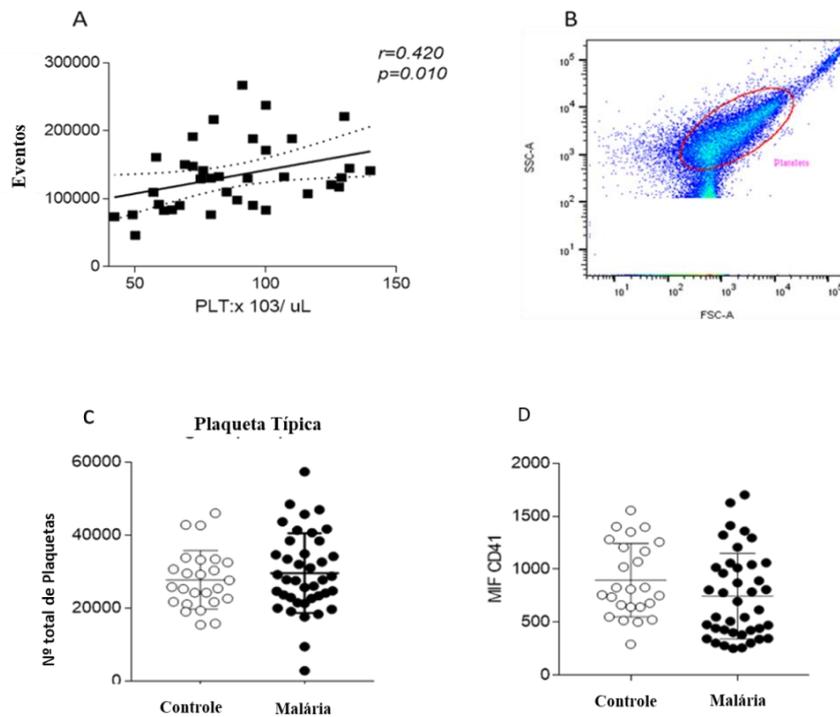


Figura 12: Análise em citometria de fluxo do Plasma Rico em Plaquetas: A) Demonstramos que o PRP não causou alteração no número de plaquetas. B) Adquirimos aproximadamente 30.000 eventos típicos de plaquetas. C) Foi adquirido quase o mesmo número de plaquetas para pacientes, o tempo para aquisição de 30.000 eventos foi maior. D) A diluição do anti-CD41b não foi diferente entre os controles e os pacientes pela média da intensidade de fluorescência (MIF).

A expressão do CD41b não diferiu entre os pacientes controles e os infectados pelo *Plasmodium vivax*, pois acreditávamos que o anti-CD41b poderia ser mais consumido em pacientes controles devido eles terem mais plaquetas circulantes, portanto não houve diferença entre eles, não ocorrendo nenhum viés com o anticorpo (Figura 12D).

Duas subpopulações de plaquetas foram caracterizadas no campo FSCxSSC da Figura 12B, a subpopulação CD41b+DHE+ e a CD41b+DHE- (Figuras 13A e 13B). ambas não mostram diferenças entre pacientes e indivíduos saudáveis, respectivamente (Figuras 13C e 13D).

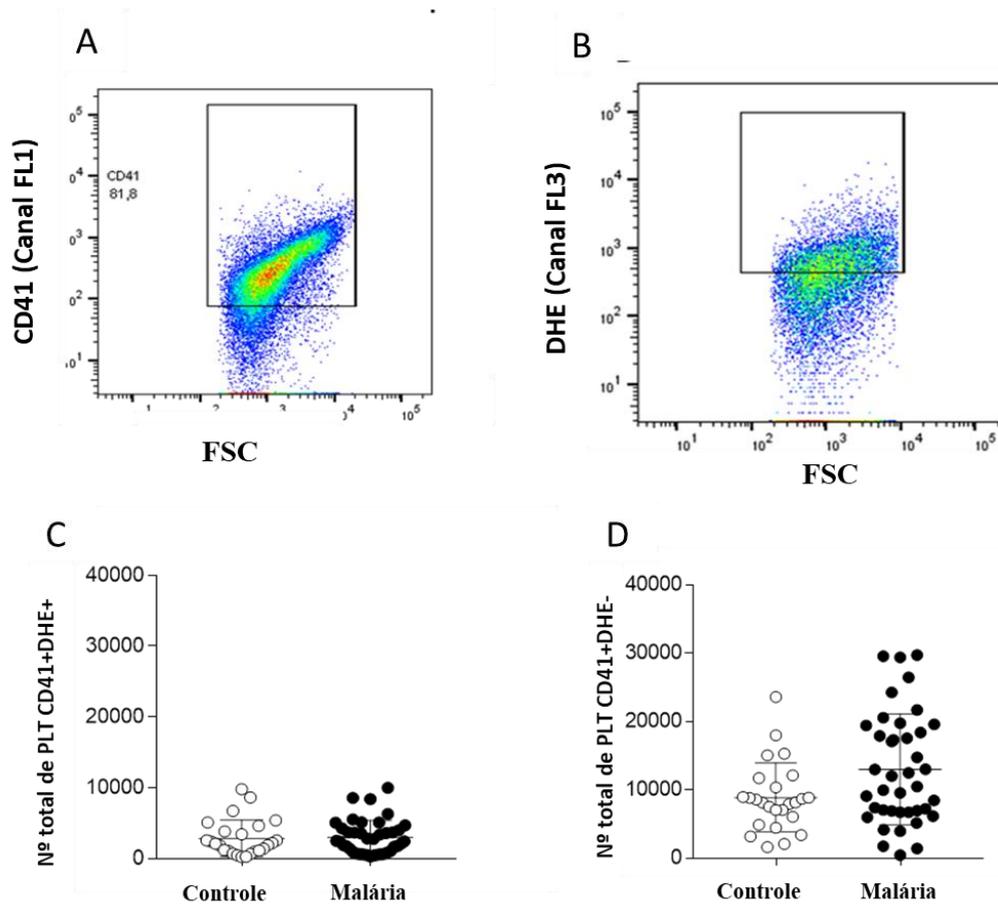


Figura 13: Determinação das subpopulações de plaquetas. Trinta mil eventos adquiridos em população de plaquetas entre os pacientes e os controles saudáveis. A) As populações de plaquetas foram delimitadas por CD41+ no canal FL1 versus dispersão FSC. B) as subpopulações CD41+ DHE+ e CD41+ DHE- no canal FL3 versus dispersão FSC. C) Comparação do número total de plaquetas CD41+ DHE+ entre os pacientes e controles saudáveis. D) Comparação do número total de plaquetas CD41+ DHE- entre os pacientes e controles saudáveis.

6.2 Associação do estresse oxidativo com a plaquetopenia.

As plaquetas foram analisadas neste experimento conforme a (Figura 14), observamos que a população plaquetária em A e B foram separadas e analisadas para que assim pudéssemos realizar uma comparação entre os pacientes infectados e os controles saudáveis nas plaquetas que foram adquiridas.

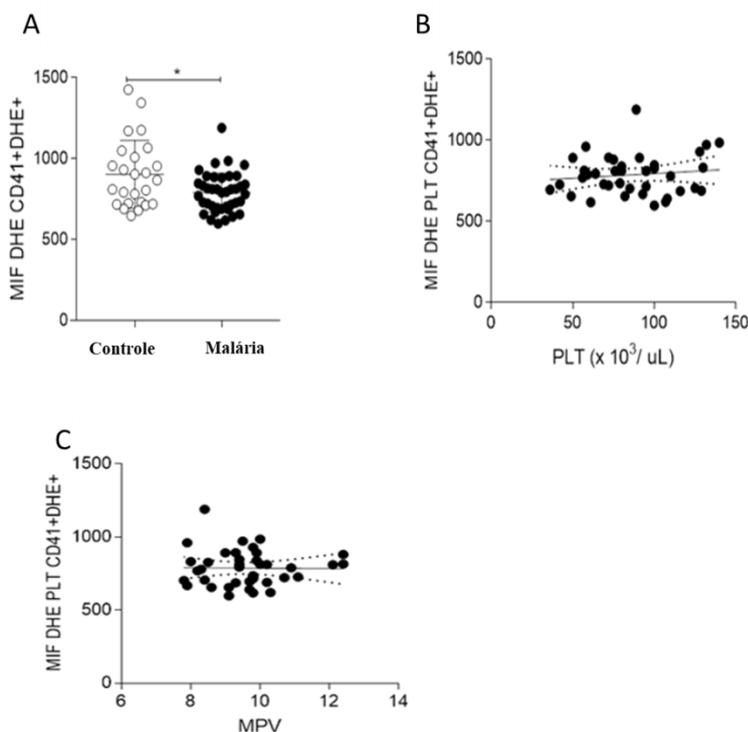


Figura 14: Avaliação de plaquetas e associação do estresse oxidativo baseado no número plaquetário. A) as subpopulações de Plaquetas. CD41+ DHE+ foram comparadas entre os pacientes e os controles saudáveis. Avaliação da média da intensidade de fluorescência (MIF) de Dihidroetídeo (DHE). B) Contagem de plaquetas. C) Média do volume das plaquetas (MPV).

O número de plaquetas baseado no indicador de geração de reativos de oxigênio, que foram delimitados em cada população nos canais de dispersão comparados ao seu tamanho. As análises de correlação entre o nível de DHE indicador de estresse oxidativo e os índices plaquetários, observamos que o estresse oxidativo não foi associado à plaquetopenia, mesmo quando incluindo os pacientes infectados que apresentaram um menor nível de estresse oxidativo.

6.3 Avaliação do estresse oxidativo após ativação plaquetária com adrenalina e formação de micropartículas (MP).

As micropartículas de plaquetas são originadas da veiculação de plaquetas ativadas, representam uma população heterogênea de pequenas vesículas revestidas por membrana, que variam de 0,1 a 1,0 μm , e contribuem para a trombogênese. A adrenalina como agonista para ativação plaquetária na formação de micropartículas

(MP). O pré-tratamento de plaquetas com adrenalina resulta no aumento significativo da microvesiculação.

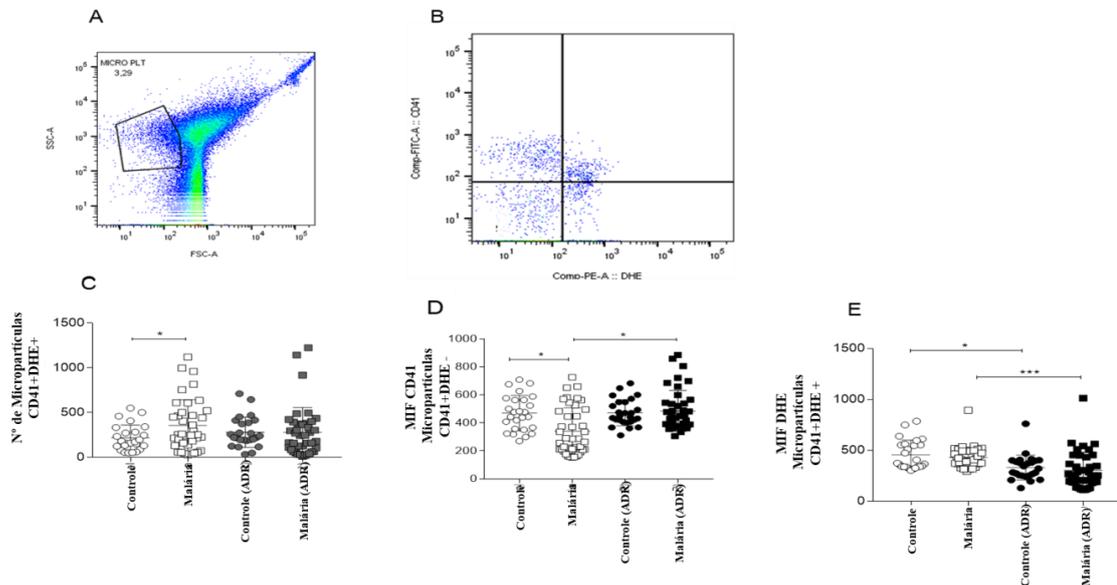


Figura 15: Avaliação de micropartículas CD41b+ DHE+. A) População de micropartículas (MP). B) Micropartículas CD41b+ DHE+. C) Número de micropartículas em CD41+ DHE+. D) Avaliação do nível de expressão de CD41b pela média da intensidade de fluorescência. E) Avaliação do nível de expressão de DHE pela média da intensidade de fluorescência.

As micropartículas aumentaram em pacientes infectados com malária em relação aos controles saudáveis. Aqui, a adrenalina (ADR) não teve algum efeito ao número de micropartículas em pacientes com malária (Figura 15). No entanto, o nível de CD41b nas micropartículas aumentou após a estimulação com Adrenalina. Em contrapartida o nível de DHE nas micropartículas diminuiu após a estimulação com a adrenalina, mesmo assim o estresse oxidativo em CD41b+DHE+ em micropartículas diminuiu após a estimulação pela adrenalina. Portanto, o estresse oxidativo não respondeu como um fator associado à plaquetopenia na malária vivax, incluindo as plaquetas, pois as micropartículas apresentaram menor nível de estresse oxidativo em relação a estas mesmas populações em controles saudáveis.

6.4 Anticorpos antiplaquetários na patogênese da plaquetopenia na malária vivax.

Os níveis de anticorpos IgM e IgG antiplaquetários foram comparados para estimar uma potencial contribuição da fagocitose na patogênese da plaquetopenia na malária vivax. O número de plaquetas depositadas em IgM foi maior nos pacientes plaquetopênicos infectados com malária, mas não ao nível de imunoglobulina. Os

níveis dos anticorpos antiplaquetários IgG (Fig.16) e IgM (Fig. 17) não diferiram nas plaquetas dos controles saudáveis.

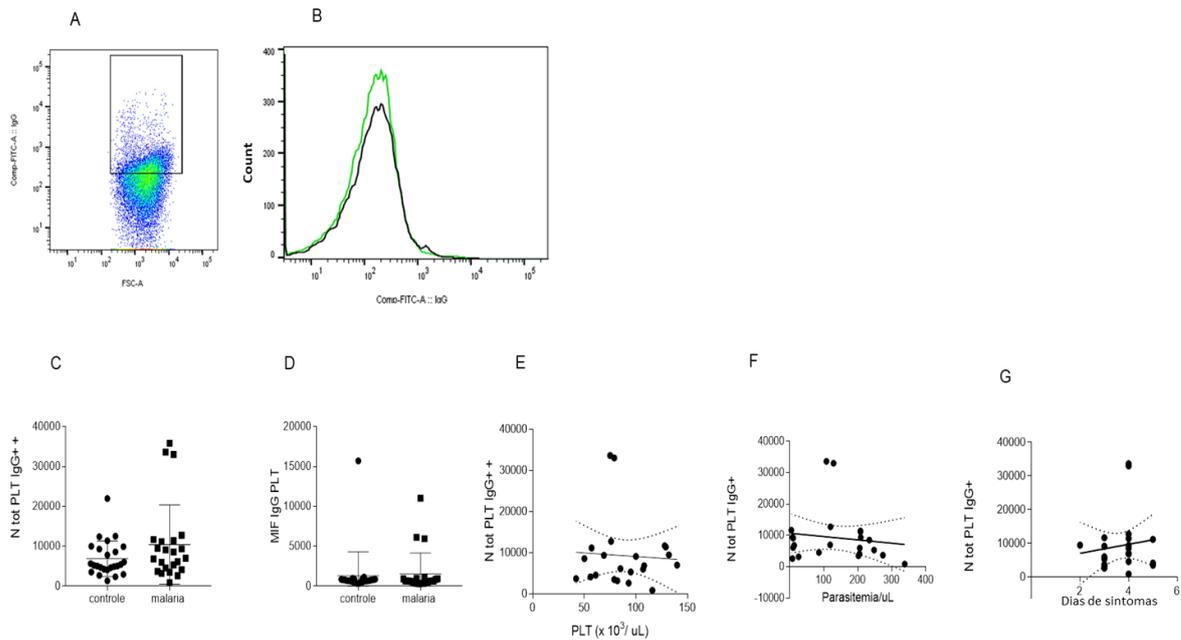


Figura 16. Avaliação dos níveis de anticorpos antiplaquetários IgG. A) Plaquetas duplamente coradas com anti-IgG FITC em plaquetas espalhadas pelo eixo FSC x SSC. B) Histograma mostrando o número de plaquetas com deposição de IgG entre paciente e controle saudável. C) Comparação entre número total de plaqueta e plaqueta IgG+ de pacientes infectados e controles saudáveis. D) comparação de MIF IgG em plaqueta IgG+. E-G) Análise de correlação entre número total de plaquetas IgG + e dados de características clínicas. E) contagem de plaquetas. F) parasitemia. G) dias de sintomas.

O número de plaquetas depositadas em IgM teve uma correlação negativa com a contagem de plaquetas, indicando que a fagocitose destas plaquetas pode estar representando uma manifestação na patogênese da plaquetopenia (Fig.17). Além disso em relação a parasitemia, dias de sintomas, o número de plaquetas em IgM foi invariante.

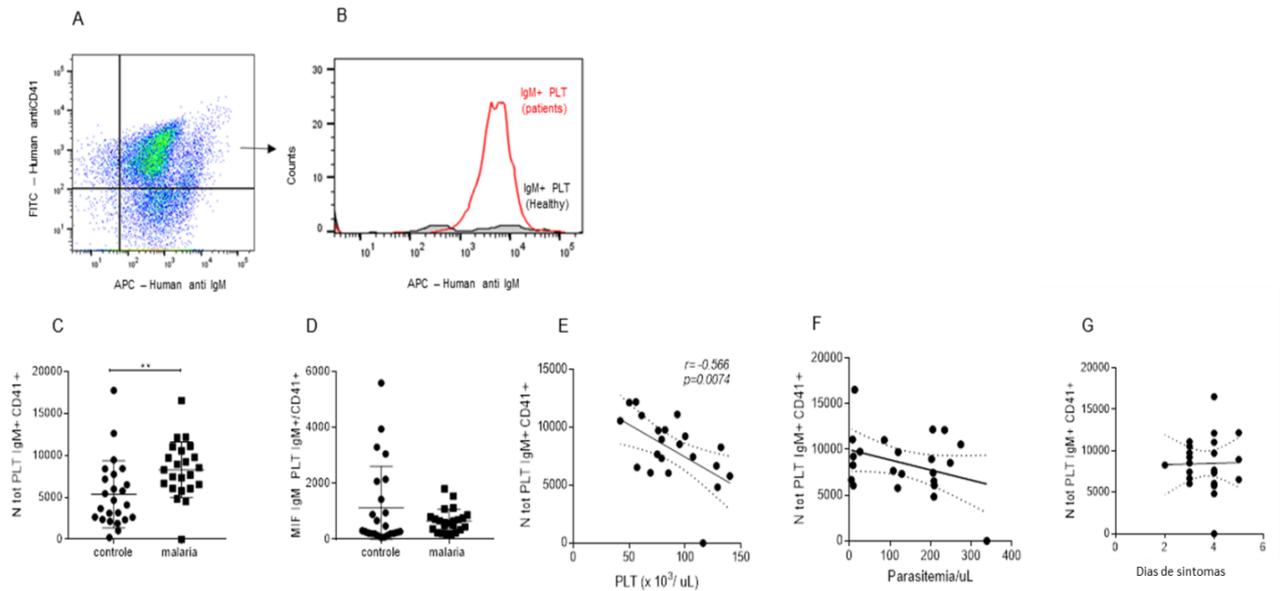


Figura 17. Avaliação dos níveis de anticorpos antiplaquetários IgM. A) Plaquetas duplamente coradas com anti-IgM APC e anti-CD41b FITC. B) Histograma mostrando o número de plaquetas totais com deposição de IgM entre pacientes infectados e controles saudáveis. C) Comparação entre plaquetas IgM+ CD41b+ entre os pacientes infectados e controles saudáveis. D) Comparação de MIF IgM em plaquetas IgM+ CD41b+. E-G) Análise de correlação entre número total de plaquetas IgM+ CD41b+ e dados de características clínicas, E) Contagem de plaquetas; F) Parasitemia; G) Dias de sintomas.

Para avaliar se os complexos imunes seriam gerados pelo antígeno da malária, se teria alguma memória, então comparamos a deposição de IgM e IgG nas plaquetas entre os pacientes com malária primária daqueles que já foram expostos a malária (Fig.18). Logo nenhuma diferença foi encontrada indicando que antígenos não relacionados à malária poderiam levar a remoção das plaquetas lesadas no baço.

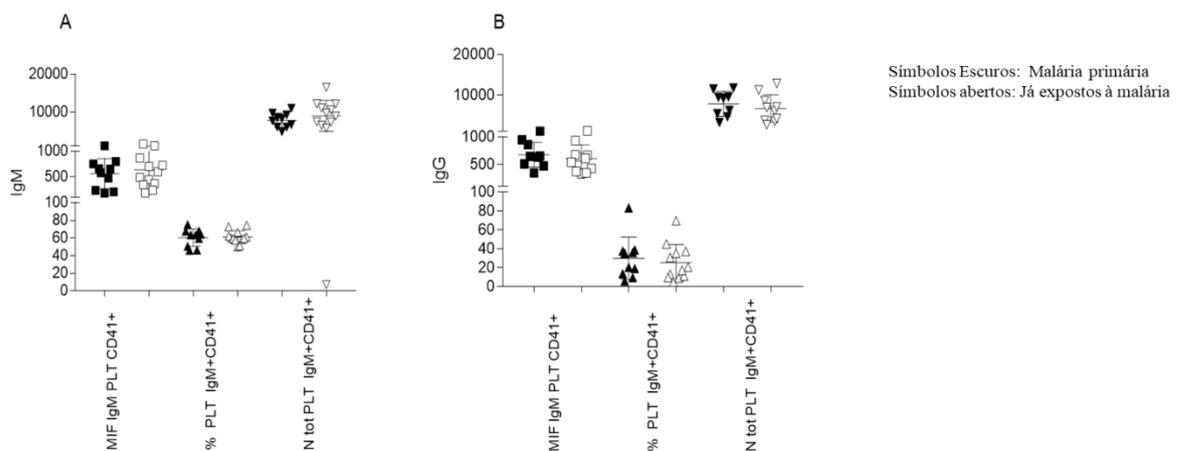


Figura 18. Avaliação dos níveis de anticorpos antiplaquetários IgM e IgG em pacientes com malária primária. A) IgM os símbolos pretos indicam uma malária primária e os símbolos abertos indicam indivíduos já expostos a malária B) IgG os símbolos pretos indicam uma malária primária e os símbolos abertos indicam indivíduos já expostos a malária.

6.5 Biomarcador para estimar a ativação plaquetária por trombos de formação medidos pelo número de agregados.

Os pacientes apresentaram percentual reduzido de agregados plaquetários CD42 + CD41b + em relação aos controles saudáveis. No entanto, a porcentagem de agregados plaquetários CD42 + CD41b + não foi associada à contagem de plaquetas (Fig. 19 A-D). De acordo com o modelo de malária humana, o efeito da plaqueta não contribuiu para a plaquetopenia no início da malária. Portanto nós avaliamos com o MPV (Volume plaquetário médio), pois alguns estudos indicam que este parâmetro poderia indicar uma associação com o aumento da plaquetopenia. Assim nossos dados de MPV não foram correlacionados com a contagem de plaquetas, mas quando avaliamos com dados mais precisos, como porcentagem de plaquetas CD41b +, o MPV mostrou uma correlação negativa (Fig. 19 D-E).

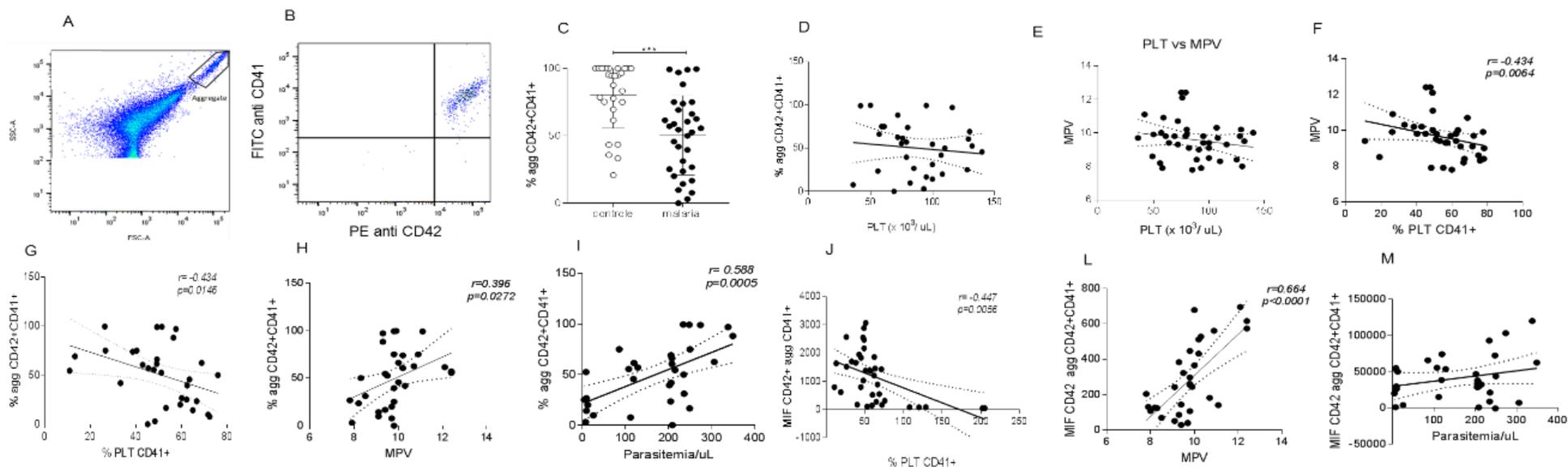


Figura 19. Avaliação da formação de trombos medida de plaquetas ativadas com base em agregados plaquetários CD42 + CD41 +. A) População de agregados. B) CD42 + CD41 + agregado plaquetário. C) Comparação da porcentagem (%) de CD42 + CD41 + agregado plaquetário entre pacientes e controles saudáveis. D) Análise de correlação entre % de CD42 + CD41 + agregado plaquetário e contagem de plaquetas. E) Contagens de plaquetas e MPV. F) Análise de correlação entre % de CD41 + plaqueta e MPV. G) Análise de correlação entre % de CD42 + CD41 + agregado plaquetário e % de CD41 + plaquetas. H) Análise de correlação entre % de CD42 + CD41 + agregado plaquetário e MPV. I) Análise de correlação entre % de CD42 + CD41 + agregado plaquetário e parasitemia. J) Análise de correlação entre MIF de CD42 em CD42 + CD41 + agregado plaquetário e % de CD41 + plaquetas. L) Análise de correlação entre MIF de CD42 em CD42 + CD41 + agregado plaquetário e MPV. M) Análise de correlação entre MIF de CD42 em CD42 + CD41 + agregado plaquetário e parasitemia.

Logo a porcentagem de agregados plaquetários CD42+ CD41+ demonstrou uma correlação negativa com a porcentagem de plaquetas CD41+, indicando que à medida que a plaquetopenia progride mais agregados são formados (Fig. 19 F-H). Além disso, tanto a porcentagem de agregados plaquetários CD42+ CD41+, quanto o MIF de CD42+ CD41+ destes agregados plaquetários apresentaram correlação positiva com o MPV e a parasitemia (Fig. 19 I-M). Assim, a interação do fator vWB e CD42 é a primeira fase na ativação plaquetária que leva à adesão/agregação plaquetária e conseqüentemente agrega a formação de trombo. Portanto, o aumento de agregados na malária é dependente de CD42 e ao longo da infecção eles são removidos da circulação com o aumento da plaquetopenia.

7. DISCUSSÃO.

A plaquetopenia é uma alteração hematológica muito frequente nas infecções agudas da malária quando manifestada isoladamente, ainda assim ela não está incluída nos atuais parâmetros de gravidade da Organização Mundial de Saúde (THAPA *et al.*, 2009; LACERDA *et al.*, 2012; BARBER *et al.*, 2013; LAMPAH *et al.*, 2014; NAING; WHITTAKER, 2018). No entanto, sua importância clínica é amplamente reconhecida na piora do estado clínico quando associada às características clínicas da malária grave, tais como perda da consciência prejudicada devido aos parasitas, convulsões múltiplas, dificuldade respiratória aguda, choque, lesão renal aguda, icterícia e hemorragia (EREL, *et al.*, 2001; HALDAR *et al.*, 2007; GELETA; KETEMA, 2016; VAL *et al.*, 2017).

A causa da plaquetopenia na malária envolve mecanismos associados com a destruição e consumo de plaquetas na periferia, e envolve fenômeno de adesão no endotélio e agregação plaquetária, a destruição por fagocitose mediada por anticorpos antiplaquetários associados com elevação dos níveis séricos de citocinas inflamatórias, e a elevação do estresse oxidativo levando a danos estruturais e funcionais (COX; MCCONKEY, 2010; DE MAST *et al.*, 2010; LACERDA *et al.*, 2011; TANWAR *et al.*, 2012; COELHO *et al.*, 2013). Embora esses mecanismos sejam bem conhecidos, pouco se sabe sobre a dinâmica desses fatores na plaquetopenia. Assim, esse estudo foi realizado para estimar a contribuição do mecanismo utilizando biomarcadores que possam permitir uma interpretação sobre essa dinâmica em pacientes infectados por *Plasmodium vivax*. Os resultados apontaram para a IgM como um fator predominante e ocorrendo precocemente, enquanto que, um efeito trombótico associado ao marcador CD42, pode ser observado em resposta ao MPV, o que supõe que essa manifestação decorre a medida que evolui a queda da contagem de plaquetas.

Os anticorpos antiplaquetários correlacionados com as contagens de plaquetas já são conhecidos há muito tempo, embora ainda exista controvérsia (KELTON *et al.*, 1983; LOOAREESUWAN *et al.*, 1992). Os estudos mostraram que os anticorpos antiplaquetários característicos na plaquetopenia podem ser de IgM e IgG (CINES *et al.*, 1985; WINIARSKI, 1989). Inclusive, alguns sugeriram que a presença destes anticorpos nas plaquetas inicia o processo de destruição plaquetária, em boa parte pela fagocitose de plaquetas (KERNOFF; BLAKE; SHACKLETON, 1980; GEORGE; SAUCERMAN, 1988; COELHO *et al.*, 2013). Outros autores mostram que na malária

causada pelo *Plasmodium falciparum*, anticorpos antiplaquetários poderiam estar associados na liberação de ATP das plaquetas, levando a uma formação de agregados, mas a principal atividade destes anticorpos antiplaquetários é a depuração das plaquetas (ALESSIO *et al.*, 1993). Nossos achados mostraram que a presença de anticorpos antiplaquetários do tipo IgM tiveram uma relação direta com a redução da contagem de plaquetas nesses pacientes plaquetopênicos.

A ligação de anticorpos antiplaquetários pode estar ligada as plaquetas mediadas por antígenos da malária (HANSON *et al.*, 2015). Assim, a ligação de antígenos parasitários ocorreria nas superfícies das plaquetas durante a infecção, e posteriormente a ligação secundária de anticorpos antimaláricos (KELTON *et al.*, 1983; YAMAGUCHI *et al.*, 1997; COELHO *et al.*, 2013). Segundo os autores, esses anticorpos antiplaquetários que deveriam desempenhar algum papel na infecção da malária acabariam tendo um papel na fisiopatologia na plaquetopenia. No entanto, essa teoria ainda é controversa, pois um relevante estudo realizado com infecção experimental por *P. falciparum* em voluntários humanos sugeriu que anticorpos IgM antiplaquetários não seriam específicos contra antígenos do parasita (DE MAST *et al.*, 2010). Nossos resultados mostraram que além de uma correlação negativa de IgM com a contagem de plaquetas, os níveis de IgM e IgG antiplaquetários não foram maiores nos pacientes infectados que já haviam sido expostos a malária, concordando com a ideia de anticorpos antiplaquetários associados com a plaquetopenia seriam contra antígenos do hospedeiro (DE MAST *et al.*, 2010). Além disso, nossos resultados trazem um novo questionamento sobre quais antígenos estão associados a estes complexos imunes na malária vivax associados aos anticorpos antiplaquetários, e se dias de sintomas, parasitemia, e o número de plaquetas em IgM seriam invariantes, ou que fatores associados a fase aguda da doença poderia suscitar esse mecanismo.

Outro mecanismo importante na plaquetopenia na malária é o consumo via adesão e agregação (THAPA *et al.*, 2009; YEAMAN; BAYER, 2013). O CD42 é um componente do complexo que se liga ao fator de von Willebrand (VWF) nas plaquetas, e essa interação é reconhecidamente importante na origem da adesão a agregação plaquetária, e conseqüentemente associados a eventos de dano vascular (GEWIRTZ *et al.*, 2008; ZHENG, 2014). Para entendermos a relação da adesão plaquetária e a interação CD42 e (VWF), os resultados com os voluntários infectados experimentalmente com *P. falciparum* mostraram diminuição significativa na contagem

de plaquetas circulantes e aumento de CD42 solúvel, em decorrência do *shedding* de CD42 por enzimas desintegrinas do tipo ADAMS (*A Desintegrin And Metalloproteases*) (DE MAST *et al.*, 2007). O CD42 conhecido como sGPIb é o domínio externo do receptor GP1b e o principal receptor de plaquetas para o VWF. Os resultados com os voluntários mostraram aumentos de sGP1b no plasma para levar a uma clara atenuação da função plaquetária normal, considerado um mecanismo patogênico na malária (BRIDGES *et al.*, 2010; DE MAST *et al.*, 2009b). Segundo os autores, o *shedding* de integrinas, tais como o CD42 (conhecido como sGPIb) seria um mecanismo antagônico a aderência plaquetária para exacerbação da plaquetopenia na malária para evitar os eventos hemorrágicos (THAPA *et al.*, 2009; BRIDGES *et al.*, 2010; DE MAST *et al.*, 2009b; LACERDA *et al.*, 2011; YEAMAN; BAYER, 2013). Em nosso estudo todos os nossos pacientes estavam com uma contagem de plaquetas abaixo dos 150 000/ uL e talvez essa tenha sido a razão pela qual não houve nenhuma relação entre os níveis de CD42 nas plaquetas.

Por outro lado, os níveis de CD42 tiveram uma correlação positiva tanto com a quantidade de agregados de plaquetas quanto o MPV e parasitemia. Além disso, os pacientes mostraram um número de agregados menor que os controles sadios, que supõe os mesmos tenham sido removidos na circulação na fase aguda (CHOTIVANICH *et al.*, 2004; WASSMER *et al.*, 2008). Para interpretar este achado é importante colocar a parasitemia e o MPV como fenômenos que decorrem à medida que a plaquetopenia evolui. Em relação ao MPV, o aumento do MPV está associado à aderência plaquetária e ao aumento da expressão de moléculas de adesão em doenças cardiovasculares (CHU *et al.*, 2010; SLAVKA *et al.*, 2011). Recentemente, o aumento de MPV foi associado com a redução da contagem de plaquetas em pacientes infectados com malária vivax (COSTA *et al.*, em submissão), no entanto, esse fenômeno é controverso (LADHANI, *et al.*, 2002; LEAL-SANTOS *et al.*, 2013). Aqui, o MPV mostrou uma correlação negativa com a porcentagem de eventos reconhecidamente marcados como CD41+ pela Citometria de fluxo. O que provavelmente explicaria o porquê da controvérsia da relação direta entre MPV e plaqueta na malária.

Seguindo com a dinâmica, a interação do VWF com CD42 é uma das etapas iniciais da adesão e agregação plaquetária e, conseqüentemente, na formação de trombos (GRAU *et al.*, 2003; HOLLESTELLE *et al.*, 2006). Inclusive, a infecção experimental de *P. falciparum* mostrou que o *shedding* de CD42 ocorreu

simultaneamente com aumento de MPV e com a redução da contagem de plaquetas (DE MAST *et al.*, 2007). Aqui, os níveis de CD42 nos agregados tiveram uma relação com aumento de MPV e parasitemia. Embora os pacientes mostrassem uma redução de agregados, o aumento do MPV foi correlacionado positivamente tanto com quantidade agregados quanto a expressão de CD42 na superfície dos mesmos. Esses achados sugerem que a ausência de *shedding* estaria por trás da formação desses agregados, esse efeito aconteceria tardiamente em função da resposta do MPV, e a remoção dos agregados, observado nos pacientes, agiria indiretamente como causa da plaquetopenia.

O estresse oxidativo pode levar alterações morfológicas e apoptose plaquetária também está entre os processos imunopatológicos subjacentes à plaquetopenia da malária (EREL *et al.*, 2001; ARAUJO *et al.*, 2008; LACERDA *et al.*, 2011; TANWAR *et al.*, 2012; ABUBAKER *et al.*, 2017). Os reativos de oxigênio podem desempenhar um papel no processo de alteração estrutural das plaquetas concernente ao estresse oxidativo, pois as membranas das plaquetas são poucos resistentes no momento do estresse oxidativo, sendo conseqüentemente mais finas, ou seja, as plaquetas sofrem lise e assim quanto maior o aumento do estresse oxidativo maior será a lise plaquetária liberando todos os seus grânulos. (EREL *et al.*, 2001; LACERDA *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008). A geração de ânion superóxido pelas plaquetas é bem estabelecido e a formação reativas de oxigênio têm sido descrito como agentes críticos da ativação plaquetária e, especialmente, em condições patológicas, tais como doenças cardiovasculares (TANWAR *et al.*, 2012; ABUBAKER *et al.*, 2017). Aqui, o Dihidroetídeo (DHE) foi usado para a caracterização das respostas redox (ABUBAKER *et al.*, 2017) e não há diferença entre os dois grupos de pacientes e controles baseado no indicador redox DHE de estresse oxidativo, até mesmo no menor nível de estresse oxidativo. Em nossos resultados o estresse oxidativo não respondeu ao efeito direto como um fator ligado a plaquetopenia, mesmo quando estimulamos as plaquetas com o agonista Adrenalina não houve nenhum efeito relacionado às plaquetas no estresse oxidativo. Logo o estresse oxidativo não responde como um fator associado à plaquetopenia.

As micropartículas são significativamente abundantes quando atingem marcadores específicos das plaquetas, contudo elas não expressam marcadores de ativação quando estimulados com agonistas, são ricamente abundantes em indivíduos saudáveis, mas ainda não se sabe o tempo de meia vida dessas micropartículas, por isso

elas podem ser eliminadas das plaquetas na ausência de ativação plaquetária nos controles saudáveis (ITALIANO; MAIRUHU; FLAUMENHAFT, 2010). Isto corrobora com os nossos resultados, pois às micropartículas estão aumentadas em pacientes infectados, porém quando são estimuladas com a adrenalina não tem efeito algum no número total de micropartículas.

O estudo teve algumas limitações financeiras no decorrer do nosso estudo, devido a pouco orçamento concernente a crise financeira que o país se encontrava, tivemos que utilizar um anticorpo comercial com a titulação baixa, as nossas coletas foram realizadas por conveniência devido a pouco material para manusear, a separação de plaquetas é trabalhosa, pois deve ser manuseado com sensibilidade para não ocorrer ativação pela manipulação das plaquetas. Por outro lado, esse estudo representa um sistema inovador a análise das populações de plaquetas típicas, de micropartículas e agregados plaquetários utilizando a citometria de fluxo para estudar várias patologias (CUYPER *et al.*, 2013).

Portanto, a correlação direta entre anticorpos IgM e a redução da contagem de plaquetas indicou que anticorpos antiplaquetários sejam a causa principal da fisiopatologia da plaquetopenia nesses pacientes com malária vivax. Pelo fato da exposição à malária não diferenciá-los, os achados desse estudo sugerem que autoanticorpos estejam associados a esse mecanismo fisiopatológico, e conseqüentemente, abre perspectivas para investigar a origem dos antígenos. Além disso, a relação entre formação de agregados plaquetários dependente de CD42 e o menor número de agregados indica 1º) outra forma de consumo das plaquetas, e 2º) esse mecanismo fisiopatológico ocorre ao longo da infecção em razão de sua associação com o aumento do MPV. Em relação ao estresse oxidativo, não ficou evidente sua relação com estes pacientes, provavelmente porque todos os participantes já apresentavam algum grau de plaquetopenia. E finalmente, a análise das três alterações morfológicas das plaquetas por citometria se mostrou como uma ferramenta promissora para testes de função plaquetária em patologias.

8. CONCLUSÃO

A correlação negativa entre número de plaquetas IgM+ e as contagens plaquetárias indicaram que esses anticorpos antiplaquetários foram os principais fatores associados a plaquetopenia nestes pacientes.

O fato do número destes anticorpos antiplaquetários serem independentes da exposição prévia à malária indica que esses antígenos não são contra do parasita.

Os agregados plaquetários além de estarem relacionados com maior expressão de CD42 são removidos ao longo da infecção e contribuem com a progressão da plaquetopenia.

Com base no indicador redox DHE, o estresse oxidativo nas plaquetas e micropartículas não foram associados nesses pacientes com malária vivax e que já apresentavam certo grau de plaquetopenia.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUBAKER, A. *et al.* A novel flow cytometry assay using dihydroethidium as redox-sensitive probe reveals NADPH oxidase-dependent generation of superoxide anion in human platelets exposed to amyloid peptide β . **Platelets**, p. 1-9, 2017.
- AL DIERI, R. D, LAAT, B. HEMKER, H. C. Thrombin generation: what have we learned?. **Blood reviews**, v. 26, n. 5, p. 197-203, 2012.
- ALESSIO, M. *et al.* Platelet activation and inhibition of malarial cytoadherence by the anti-CD36 IgM monoclonal antibody NL07. **Blood**, v. 82, n. 12, p. 3637-3647, 1993.
- AMIN, M. A.; KULKARNI, H.R. Platelet distribution width (PDW) is increased in vaso-occlusive crisis in sickle cell disease. **Annals of hematology**, v. 83, n. 6, p. 331-335, 2004.
- ANGCHAIKUSIRI, P. Coagulopathy in malaria. **Thrombosis research**, v. 133, n. 1, p. 5-9, 2014.
- ANTINORI, S. *et al.* Imported *Plasmodium vivax* malaria with severe thrombocytopenia: can it be severe malaria or not?. **Malaria journal**, v. 15, n. 1, p. 105, 2016.
- ANTONELLI, L. R.V *et al.* The CD14+ CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. 2014.
- ARAÚJO, C. F. *et al.* The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with *P.vivax* malaria. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 6, p. 517-521, 2008.
- AREVALO, H. M. *et al.* Clinical profile of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in low and unstable malaria transmission settings of Colombia. **Malaria journal**, v. 14, n. 1, p. 154, 2015.
- ARTAVANIS, T. K.; TONGREN, J. E.; RILEY, E. M. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 133, n. 2, p. 145-152, 2003.
- ASSINGER, A. Platelets and infection—an emerging role of platelets in viral infection. **Frontiers in immunology**, v. 5, 2014.
- AUTINO, B. *et al.* Pathogenesis of malaria in tissues and blood. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 4, n. 1, 2012.
- AWANDARE, G. A. *et al.* Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced pro-inflammatory mediators in an in vitro model. **American journal of hematology**, v. 86, n. 2, p. 155-162, 2011.

BAKER, V. S. *et al.* Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. **Malar J**, v. 7, p. 41, 2008.

BARBER, B. E. *et al.* A prospective comparative study of knowlesi, *falciparum*, and *vivax* malaria in Sabah, Malaysia: high proportion with severe disease from *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium vivax* but no mortality with early referral and artesunate therapy. **Clinical infectious diseases**, v. 56, n. 3, p. 383-397, 2012.

BARBER, B. E. *et al.* A prospective comparative study of knowlesi, *P.falciparum*, and *P.vivax* malaria in Sabah, Malaysia: high proportion with severe disease from *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium vivax* but no mortality with early referral and artesunate therapy. **Clinical infectious diseases**, v. 56, n. 3, p. 383-397, 2013.

BEALE, P. J.; CORMACK, J. D.; OLDREY, T. B. N. Thrombocytopenia in malaria with immunoglobulin (IgM) changes. **Br Med J**, v. 1, n. 5796, p. 345-349, 1972.

BECCHI, C. *et al.* Mean platelet volume trend in sepsis: is it a useful parameter?. **Minerva anesthesiologica**, v. 72, n. 9, p. 749-756, 2006.

BERGOLI, L. C. C. *et al.* Volume plaquetário médio como preditor de desfechos cardiovasculares maiores e fluxo coronariano final em pacientes submetidos à intervenção coronária percutânea primária. **Revista brasileira de cardiologia invasiva. São Paulo. Vol. 22, n. 3 (2014), p. 240-244**, 2014.

BERNDT, M. C.; METHAROM, P.; ANDREWS, R. K. Primary hemostasis: newer insights. **Hemophilia**, v. 20, n. s4, p. 15-22, 2014.

BERTOLINO, P. BOWEN, D. G. Malaria and the liver: immunological hide-and-seek or subversion of immunity from within?. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 41, 2015.

BLAIR, P.; FLAUMENHAFT, R. Platelet α -granules: basic biology and clinical correlates. **Blood reviews**, v. 23, n. 4, p. 177-189, 2009.

BORGES, Q. I.; FONTES, C. J.F; DAMAZO, A. S. Analysis of lymphocytes in patients with *Plasmodium vivax* malaria and its relation to the annexin-A1 and IL-10. **Malaria journal**, v. 12, n. 1, p. 455, 2013.

BOUTLIS, C. S.; YEO, T. W.; ANSTEY, N. M. Malaria tolerance—for whom the cell tolls?. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 8, p. 371-377, 2006.

BOZZA, F. A. *et al.* Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC infectious diseases**, v. 8, n. 1, p. 86, 2008.

BRIDGES, D. J. *et al.* Rapid activation of endothelial cells enables *Plasmodium falciparum* adhesion to platelet-decorated von Willebrand factor strings. **Blood**, v. 115, n. 7, p. 1472-1474, 2010.

BYE, A.P.; UNSWORTH, A. J.; GIBBINS, J. M. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activators networks. **Journal of Thrombosis and Hemostasis**, v. 14, n. 5, p. 918-930, 2016.

- CARESTIA, A. KAUFMAN, T. SCHATTNER, M. Platelets: new bricks in the building of neutrophil extracellular traps. **Frontiers in immunology**, v. 7, 2016.
- CASALS-PASCUAL, C. *et al.* Thrombocytopenia in *P.falciparum* malaria is associated with high concentrations of IL-10. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 3, p. 434-436, 2006.
- CHANDRA, H. *et al.* Role of mean platelet volume as discriminating guide for bone marrow disease in patients with thrombocytopenia. **International journal of laboratory hematology**, v. 32, n. 5, p. 498-505, 2009.
- CHANDRA, H. *et al.* Role of mean platelet volume as discriminating guide for bone marrow disease in patients with thrombocytopenia. **International journal of laboratory hematology**, v. 32, n. 5, p. 498-505, 2010.
- CHANDRA, S. CHANDRA, H. Role of hematological parameters as an indicator of acute malarial infection in Uttarakhand state of India. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 5, n. 1, 2013.
- CHAVES, Y. O. *et al.* Immune response pattern in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 445, 2016.
- CHOTIVANICH, K. *et al.* Platelet-induced autoagglutination of Plasmodium falciparum-infected red blood cells and disease severity in Thailand. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 6, p. 1052-1055, 2004.
- CHU, S. G. *et al.* Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 8, n. 1, p. 148-156, 2010.
- CHUA, C. L.L. *et al.* High numbers of circulating pigmented polymorphonuclear neutrophils as a prognostic marker for decreased birth weight during malaria in pregnancy. **International journal for parasitology**, v. 45, n. 2, p. 107-111, 2015.
- CICMIL, M. *et al.* Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 signaling inhibits the activation of human platelets. **Blood**, v. 99, n. 1, p. 137-144, 2002.
- CINES, D. B. *et al.* Platelet antibodies of the IgM class in immune thrombocytopenic purpura. **The Journal of clinical investigation**, v. 75, n. 4, p. 1183-1190, 1985.
- CLARK, I. A. *et al.* Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malaria journal**, v. 5, n. 1, p. 85, 2006.
- CLARK, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. **Nature medicine**, v. 13, n. 4, p. 463-469, 2007.
- CLAUSHUIS, T. A.M *et al.* Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients. **Blood**, v. 127, n. 24, p. 3062-3072, 2016.
- COELHO, H. C. C. *et al.* Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria is related to platelets phagocytosis. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63410, 2013.

COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M.; ROBERTS, J. M. A retrospective examination of the effect of fever and microgametocyte count on mosquito infection on humans infected with *Plasmodium vivax*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 70, n. 6, p. 638-641, 2004.

COSTA, A.G. *et al.* Influência da infecção por *Plasmodium vivax* nos marcadores hematológicos e hepáticos em pacientes de um município da Região Amazônica brasileira. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 2, p. 11-19, 2017.

COSTA, A.G. *et al.* The Robust and Modulated Biomarker Network Elicited by the *Plasmodium vivax* Infection Is Mainly Mediated by the IL-6/IL-10 Axis and Is Associated with the Parasite Load. **Journal of immunology research**, v. 2014, 2014.

COSTA, A.G. *et al.* IL-17A levels and MPV indicate thrombopoiesis is not suppressed in early *P. vivax* malaria . **Malaria Journal**. Em submissão.

COWMAN, A. F., HEALER, J., MARAPANA, D. & Marsh, K. Malaria: biology and disease. **Cell** 167, 610–624 (2016).

COX, D.; MCCONKEY, S. The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria. **Cellular and molecular life sciences**, v. 67, n. 4, p. 557-568, 2010.

CUYPER, I. M. *et al.* A novel flow cytometry–based platelet aggregation assay. **Blood**, v. 121, n. 10, p. e70-e80, 2013.

DE MAST, Q. *et al.* ADAMTS13 deficiency with elevated levels of ultra-large and active von Willebrand factor in *P. falciparum* and *P. vivax* malaria. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 3, p. 492-498, 2010.

DE MAST, Q. *et al.* ADAMTS13 deficiency with elevated levels of ultra-large and active von Willebrand factor in *P. falciparum* and *P. vivax* malaria. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 3, p. 492-498, 2009.

DE MAST, Q. *et al.* Thrombocytopenia and release of activated von Willebrand Factor during early *Plasmodium falciparum* malaria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 4, p. 622-628, 2007.

DENIS, M. *et al.* Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. **Cell**, v. 122, n. 3, p. 379-391, 2005.

DHANJAL, T. S. *et al.* Minimal regulation of platelet activity by PECAM-1. **Platelets**, v. 18, n. 1, p. 56-67, 2007.

DINARELLO, C. A. *et al.* Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **Journal of Experimental Medicine**, v. 163, n. 6, p. 1433-1450, 1986.

DOUGLAS, N. M. *et al.* Major burden of severe anemia from non-*falciparum* malaria species in Southern Papua: a hospital-based surveillance study. **PLoS medicine**, v. 10, n. 12, p. e1001575, 2013.

EREL, O. *et al.* Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with vivax malaria. **Clinical biochemistry**, v. 34, n. 4, p. 341-344, 2001.

FERREIRA, F. L. B. *et al.* Evaluation of the immature platelet fraction contribute to the differential diagnosis of hereditary, immune and other acquired thrombocytopenia. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 3355, 2017.

FMDS, L. *et al.* Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 6, p. e1710, 2012.

FOLEGATTI, P. M. *et al.* A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. **Malaria journal**, v. 16, n. 1, p. 107, 2017.

FRANKLIN, B. S. *et al.* Malaria primes the innate immune response due to interferon- γ induced enhancement of toll-like receptor expression and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 14, p. 5789-5794, 2009.

FRANKLIN, B. S. *et al.* Plasma circulating nucleic acids levels increase according to the morbidity of *Plasmodium vivax* malaria. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19842, 2011.

FREYNHOFER, M. K. *et al.* Antiplatelet drugs in patients with enhanced platelet turnover: biomarkers versus platelet function testing. **Thrombosis and hemostasis**, v. 114, n. 3, p. 459-468, 2015.

FUCHS, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **The Journal of cell biology**, v. 176, n. 2, p. 231-241, 2007.

GELETA, G.; KETEMA, T. Severe malaria associated with *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* among children in Pawe Hospital, Northwest Ethiopia. **Malaria research and treatment**, v. 2016, 2016.

GALINSKI, M.R, MEYER, E.V.S., BARNWELL, J.W. *Plasmodium vivax*: Modern strategies to study a persistent parasite's life cycle. **Advances in Parasitology** 2013; 81: 1–20.

GAO, Y. *et al.* The impact of various platelet indices as prognostic markers of septic shock. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e103761, 2014.

GAUER, R. L.; BRAUN, M. M. Thrombocytopenia. **American family physician**, v. 85, n. 6, 2012.

GAZZINELLI, R. T. *et al.* Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p. 744-757, 2014.

GEORGE, J. N.; SAUCERMAN, S. Platelet IgG, IgA, IgM, and albumin: correlation of platelet and plasma concentrations in normal subjects and in patients with ITP or dysproteinemia. **Blood**, v. 72, n. 1, p. 362-365, 1988.

GÉRARDIN, P. *et al.* Prognostic value of thrombocytopenia in African children with *P. falciparum* malaria. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 66, n. 6, p. 686-691, 2002.

GEWIRTZ, J. *et al.* Platelet-delivered factor VIII provides limited resistance to anti-factor VIII inhibitors. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 6, n. 7, p. 1160-1166, 2008.

GETHING, P. *et al.* A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity. **PLoS neglected tropical diseases**, 2012.

GETHING, P. W. *et al.* A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 9, p. e1814, 2016.

GOMES, P. S. *et al.* Immune escape strategies of malaria parasites. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1617, 2016.

GONÇALVES, R. M. *et al.* Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium falciparum*?. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44394, 2012.

GRAMAGLIA, I. *et al.* Platelets activate a pathogenic response to blood-stage *Plasmodium* infection but not a protective immune response. **Blood**, v. 129, n. 12, p. 1669-1679, 2017.

GRASSI, E. A.; DO CARMO, A.M. Anti-agregantes plaquetários: ampliando conhecimento. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 13, n. 1, p. 131-143, 2016.

GRAU, G. E. *et al.* Immunopathology of thrombocytopenia in experimental malaria. **Immunology**, v. 65, n. 4, p. 501, 1988.

GRAU, G. E. R.; CRAIG, A. G. Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. **Future microbiology**, v. 7, n. 2, p. 291-302, 2012.

GRAU, G. E. *et al.* Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. **The Journal of infectious diseases**, v. 187, n. 3, p. 461-466, 2003.

GREISENEGGER, S. *et al.* Is elevated mean platelet volume associated with a worse outcome in patients with acute ischemic cerebrovascular events?. **Stroke**, v. 35, n. 7, p. 1688-1691, 2004.

GROZOVSKY, R. *et al.* Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. **Blood**, v. 126, n. 16, p. 1877-1884, 2015.

GUEIRARD, P. *et al.* Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 43, p. 18640-18645, 2010.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P.Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature medicine**, v. 21, n. 7, p. 677, 2015.

HANISCH, B. R. *et al.* Thrombocytopenia May Mediate Disease Severity in *Plasmodium Falciparum* Malaria Through Reduced Transforming Growth Factor Beta-1 Regulation of Pro-and Anti-Inflammatory Cytokines. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 34, n. 7, p. 783, 2015.

HALDAR, K. *et al.* Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 2, p. 217-249, 2007.

- HANSON, J. *et al.* The clinical implications of thrombocytopenia in adults with severe falciparum malaria: a retrospective analysis. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 97, 2015.
- HAROON, H. *et al.* Hide and seek: hematological aspects of malaria—a developing country perspective. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, n. 03, p. 273-279, 2013.
- HERTER, J. M.; ROSSAINT, J.; ZARBOCK, A. Platelets in inflammation and immunity. **Journal of Thrombosis and Hemostasis**, v. 12, n. 11, p. 1764-1775, 2014.
- HISAEDA, H. *et al.* Malaria: immune evasion by parasites. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 4, p. 700-706, 2005.
- HOJO-SOUZA, N. S. *et al.* On the cytokine/chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease. **Malaria journal**, v. 16, n. 1, p. 42, 2017.
- HOTTZ, E. D. *et al.* Inflammasome in platelets: allying coagulation and inflammation in infectious and sterile diseases?. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.
- HOTTZ, E. D. *et al.* Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. **Blood**, v. 122, n. 20, p. 3405-3414, 2013.
- HOTTZ, E.D. *et al.* Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 4, p. 1864-1872, 2014.
- HOTTZ, E.D. **Mecanismo de ativação plaquetária na dengue: Contribuições para a patogênese.** Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz. 2014.
- HOLLESTELLE, M. J. *et al.* von Willebrand factor propeptide in malaria: evidence of acute endothelial cell activation. **British journal of haematology**, v. 133, n. 5, p. 562-569, 2006
- HOWES, R. E. *et al.* Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 6_Suppl, p. 15-34, 2016.
- ITALIANO J.R, Joseph E.; MAIRUHU, A. T.A; FLAUMENHAFT, R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. **Current opinion in hematology**, v. 17, n. 6, p. 578, 2010.
- JAGANNATHAN, P. *et al.* IFN gamma/IL-10 co-producing cells dominate the CD4 response to malaria in highly exposed children. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 1, p. e1003864, 2014.
- JARAMILLO, M. *et al.* Synthetic Plasmodium-like hemozoin activates the immune response: a morphology-function study. **PLoS one**, v. 4, n. 9, p. e6957, 2009.
- JENNE, C. N.; KUBES, P. Platelets in inflammation and infection. **Platelets**, v. 26, n. 4, p. 286-292, 2015.

JENNE, C. N.; URRUTIA, R.; KUBES, P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. **International journal of laboratory hematology**, v. 35, n. 3, p. 254-261, 2013.

JENNINGS, L. K. *et al.* Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. **Thrombosis Hemostasis**, v. 102, n. 2, p. 248-257, 2009.

JANUEL, C. *et al.* Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx-4) localization in resting platelets, and compartmental change during platelet activation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 10, p. 1228-1234, 2006.

KARANIKAS, G. *et al.* Platelet kinetics and scintigraphic imaging in thrombocytopenic malaria patients. **Thrombosis and hemostasis**, v. 91, n. 03, p. 553-557, 2004.

KELTON, J. G. *et al.* Immune-mediated thrombocytopenia of malaria. **The Journal of clinical investigation**, v. 71, n. 4, p. 832-836, 1983.

KERNOFF, L. M.; BLAKE, K. C.; SHACKLETON, D. Influence of the amount of platelet-bound IgG on platelet survival and site of sequestration in autoimmune thrombocytopenia. **Blood**, v. 55, n. 5, p. 730-733, 1980.

KENANGALEM, E. *et al.* *Plasmodium vivax* infection: a major determinant of severe anemia in infancy. **Malaria journal**, v. 15, n. 1, p. 321, 2016.

KLEIN, E.; RONEZ, E. Peripheral hemophagocytosis in malaria infection. **Blood**, v. 119, n. 4, p. 910-910, 2012.

KOCHAR, D. K. *et al.* *Plasmodium vivax* malária. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 1, p. 132-4, 2005.

KOCHAR, D. K. *et al.* Thrombocytopenia in *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and mixed infection malaria: a study from Bikaner (Northwestern India). **Platelets**, v. 21, n. 8, p. 623-627, 2010.

KUMAR, A. *et al.* Thrombocytopenia--an indicator of acute vivax malaria. **Indian journal of pathology & microbiology**, v. 49, n. 4, p. 505-508, 2006.

LACERDA, M.V.G. *et al.* Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: to what extent does this parasite kill?. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 8, p. e67-e74, 2012.

LACERDA, M.V.G. **Estudo da ativação e apoptose plaquetária na infecção malárica por *Plasmodium vivax***. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. 2007.

LACERDA, M.V.G. *et al.* Thrombocytopenia in malaria: who cares?. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 52-63, 2011.

LACERDA, M.V.G. *et al.* Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria journal**, v. 11, n. 1, p. 12, 2012.

- LADHANI, S. *et al.* Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome. **British journal of haematology**, v. 119, n. 3, p. 839-847, 2002.
- LAMPAH, D. A. *et al.* Severe malarial thrombocytopenia: a risk factor for mortality in Papua, Indonesia. **The Journal of infectious diseases**, v. 211, n. 4, p. 623-634, 2014.
- LANNAN, K. L. *et al.* Breaking the mold: transcription factors in the anucleate platelet and platelet-derived microparticles. **Frontiers in immunology**, v. 6, 2015.
- LEAL-SANTOS, F. A. *et al.* Altered platelet indices as potential markers of severe and complicated malaria caused by *Plasmodium vivax*: a cross-sectional descriptive study. **Malaria journal**, v. 12, n. 1, p. 462, 2013.
- LEE, R. H.; BERGMEIER, W. Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) and hemitam signaling and vascular integrity in inflammation and development. **Journal of Thrombosis and Hemostasis**, v. 14, n. 4, p. 645-654, 2016.
- LIEHL, P. *et al.* Innate immunity induced by *Plasmodium* liver infection inhibits malaria reinfections. **Infection and immunity**, v. 83, n. 3, p. 1172-1180, 2015.
- LOOAREESUWAN, S. *et al.* Thrombocytopenia in malaria. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 23, n. 1, p. 44-50, 1992.
- MACHLUS, K. R. *et al.* CCL5 derived from platelets increases megakaryocyte pro-platelet formation. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 921-926, 2016.
- MACHLUS, K. R.; ITALIANO, J. E. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. **J Cell Biol**, v. 201, n. 6, p. 785-796, 2013.
- MAINA, R. N. *et al.* Impact of *Plasmodium falciparum* infection on hematological parameters in children living in Western Kenya. **Malaria Journal**, v. 9, n. 3, p. S4, 2010.
- MARSON, P. PASERO, G. The Italian contributions to the history of salicylates. **Rheumatism**, v. 58, n. 1, p. 66-75, 2006.
- MAST, Q. *et al.* Thrombocytopenia and release of activated von Willebrand Factor during early *Plasmodium falciparum* malaria. **The Journal of infectious diseases**, v. 196, n. 4, p. 622-628, 2007.
- MAST, Q. *et al.* Thrombocytopenia in early malaria is associated with GPIb shedding in absence of systemic platelet activation and consumptive coagulopathy. **British journal of hematology**, v. 151, n. 5, p. 495-503, 2010.
- MCDONALD, B. *et al.* Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. **Cell host & microbe**, v. 12, n. 3, p. 324-333, 2012.
- MCKENZIE, F. E.; JEFFERY, G. M.; COLLINS, W. E. *Plasmodium vivax* blood-stage dynamics. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 3, p. 521-535, 2002.

MENDONÇA, V. R.R *et al.* Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria journal**, v. 12, n. 1, p. 69, 2013.

MESLIN, B. *et al.* Features of apoptosis in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 12, p. 1852-1859, 2007.

MILLER, L. H., ACKERMAN, H. C., SU, X. Z. & Wellems, T. E. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Med.** 19, 156–167 (2013).

MIRSAEIDI, M. *et al.* Thrombocytopenia and thrombocytosis at time of hospitalization predict mortality in patients with community-acquired pneumonia. **Chest**, v. 137, n. 2, p. 416-420, 2010.

MITSUMI, C. *et al.* Platelet activation markers overexpressed specifically in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 2, p. 400-411, 2016.

MOHANTY, D. *et al.* Functional and ultrastructural changes of platelets in malarial infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 3, p. 369-375, 1988.

MORAES, I.M.M. **Estudo da ativação e apoptose plaquetária na infecção malárica por *Plasmodium vivax***. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz. 2016.

MORRELL, C.N. *et al.* Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. **Blood**, v. 123, n. 18, p. 2759-2767, 2014.

MURRAY, C. J. *et al.* Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. **Lancet** 379, 413–431 (2012).

MUWONGE, H. *et al.* How reliable are hematological parameters in predicting uncomplicated *plasmodium falciparum* malaria in an Endemic Region?. **ISRN tropical medicine**, v. 2013, 2013.

NAING, C. *et al.* Is *Plasmodium vivax* malaria a severe malaria?: a systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, p. e3071, 2014.

NAING, C.; WHITTAKER, M. A. Severe thrombocytopenia in patients with vivax malaria compared to falciparum malaria: a systematic review and meta-analysis. **Infectious diseases of poverty**, v. 7, n. 1, p. 10, 2018.

NISHIMURA, S. *et al.* In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. **Blood**, v. 119, n. 8, p. e45-e56, 2012.

NOVELLI, E. M. *et al.* Clinical predictors of severe malarial anemia in a holoendemic *Plasmodium falciparum* transmission area. **British journal of hematology**, v. 149, n. 5, p. 711-721, 2010.

NTAIOS, G. *et al.* Increased values of mean platelet volume and platelet size deviation width may provide a safe positive diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. **Acta hematology**, v. 119, n. 3, p. 173-177, 2008.

OLIVEIRA, G. M. M. Anti-agregante plaquetário. **Rev SOCERJ**, v. 14, n. 1, p. 21, 2001.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. 2016. **World Health Organization**; 2016.

OZAKI, Y.; SUZUKI I. K.; INOUE, O. Platelet receptors activated via multimerization: glycoprotein VI, GPIb-IX-V, and CLEC-2. **Journal of Thrombosis and Hemostasis**, v. 11, n. s1, p. 330-339, 2013.

PARISE, Leslie V. Introduction to a review series: megakaryocytes to platelets in health and disease. **Blood** 2016.

PARK, J.-W. *et al.* Serum cytokine profiles in patients with *Plasmodium vivax* malaria: a comparison between those who presented with and without thrombocytopenia. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. 4, p. 339-344, 2003.

PATEL, S.R. *et al.* Differential roles of microtubule assembly and sliding in pro-platelet formation by megakaryocytes. **Blood**, v. 106, n. 13, p. 4076-4085, 2005.

PATEL, U. *et al.* Thrombocytopenia in malaria. **Journal of the national medical association**, v. 96, n. 9, p. 1212, 2004.

PHILLIPS, M.A. *et al.* Malaria. **Nature Reviews Disease Primers**, v.3, n. 17050, 2017.

PIGUET, P. F.; KAN, C. D.; VESIN, C. Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. **Apoptosis**, v. 7, n. 2, p. 91-98, 2002.

PIPER, R. *et al.* Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 60, n. 1, p. 109-118, 1999. World Health Organization: *World Malaria Report*. ; 2014.

PLUTHERO, F. G.; KAHR, W. H.A. Platelet production: new players in the field. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 797-799, 2016.

PRADO, M. *et al.* Long-term live imaging reveals cytosolic immune responses of host hepatocytes against *Plasmodium* infection and parasite escape mechanisms. **Autophagy**, v. 11, n. 9, p. 1561-1579, 2015.

RAZA, A. *et al.* Tumor necrosis factor, interleukin-6 and interleukin-10 are possibly involved in *Plasmodium vivax*-associated thrombocytopenia in southern Pakistani population. **Malaria journal**, v. 13, n. 1, p. 323, 2014.]

REY L. Parasitologia, Terceira edição. Ed. **Guanabara Koogan**, 2001.

RIZVI, I. *et al.* Complications associated with *Plasmodium vivax* malaria: a retrospective study from a tertiary care hospital based in Western Uttar Pradesh, India. **Annals of African medicine**, v. 12, n. 3, p. 155, 2013.

ROBINSON, L. J. *et al.* Strategies for understanding and reducing the *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* hypnozoite reservoir in Papua New Guinean children: a randomised placebo-controlled trial and mathematical model. **PLoS Med**, v. 12, n. 10, p. e1001891, 2015.

RODRIGUES, S. *et al.* Alterations in cytokines and hematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 154-162, 2014.

ROGIER, C.; GERARDIN, P.; IMBERT, P. Thrombocytopenia is predictive of lethality in severe childhood *P.falciparum* malaria. **Archives of disease in childhood**, v. 89, n. 8, p. 795-796, 2004.

ROSARIO, A. P. F.; LANGHORNE, J. T cell-derived IL-10 and its impact on the regulation of host responses during malaria. **International journal for parasitology**, v. 42, n. 6, p. 549-555, 2012.

ROWLEY, J. W. *et al.* Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. **Blood**, v. 118, n. 14, p. e101-e111, 2011.

SAMPAIO, V.S. *et al.* Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. **Rev Soc Bras Med Trop.**2015 Jun;48 Suppl 1:4-11.

SARAVU, K. *et al.* Thrombocytopenia in vivax and falciparum malaria: an observational study of 131 patients in Karnataka, India. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 105, n. 8, p. 593-598, 2011.

SCHOFIELD, L. Intravascular infiltrates and organ-specific inflammation in malaria pathogenesis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 130-137, 2007.

SEMPLE, J.W.; ITALIANO, J. E.; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 264-274, 2011.

SKUDOWITZ, R. B. *et al.* Mechanisms of thrombocytopenia in malignant tertian malaria. **Br Med J**, v. 2, n. 5865, p. 515-518, 1973.

SCHWARZENBERGER, P. *et al.* IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 11, p. 6383-6389, 1998.

SLAVKA, G. *et al.* Mean platelet volume may represent a predictive parameter for overall vascular mortality and ischemic heart disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 5, p. 1215-1218, 2011.

SOUZA L. F. M. *et al.* Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 6, p. e1710, 2012.

- STEGNER, D.; NIESWANDT, B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. **Journal of molecular medicine**, v. 89, n. 2, p. 109-121, 2011.
- STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 169-180, 2004.
- STOPPELAAR, S. F. *et al.* The role of platelets in sepsis. **Thrombosis Hemostasis**, v. 112, n. 4, p. 666-677, 2014.
- STOPPELAAR, S. F. *et al.* Thrombocytopenia impairs host defense in gram-negative pneumonia-derived sepsis in mice. **Blood**, v. 124, n. 25, p. 3781-3790, 2014.
- STURM, A. *et al.* Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287-1290, 2006.
- SVS-SIVEP- Secretaria de Vigilância em Saúde – **Ministério da Saúde** – Brasil. Boletim Epidemiológico 2017.
- TANWAR, G. S. *et al.* Thrombocytopenia in childhood malaria with special reference to *P. vivax* monoinfection: A study from Bikaner (Northwestern India). **Platelets**, v. 23, n. 3, p. 211-216, 2012.
- TEIXEIRA-CARVALHO, A. *et al.* Cytokines, chemokine receptors, CD4+ CD25 HIGH+ T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. **Acta tropica**, v. 108, n. 2, p. 139-149, 2008.
- THACHIL, J. Platelets and infections in the resource-limited countries with a focus on malaria and viral hemorrhagic fevers. **British Journal of Hematology**, 2017.
- THAPA, R. *et al.* Childhood *Plasmodium vivax* malaria with severe thrombocytopenia and bleeding manifestations. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 31, n. 10, p. 758-759, 2009.
- THOMAS, M.R. *et al.* The role of platelets in inflammation. **Thrombosis Hemostasis**, v. 114, n. 3, p. 449-458, 2015.
- THON, J. N. *et al.* Cytoskeletal mechanics of pro-platelet maturation and platelet release. **The Journal of cell biology**, v. 191, n. 4, p. 861-874, 2010.
- THON, J. N.; ITALIANO, J. E. Does size matter in platelet production?. **Blood**, v. 120, n. 8, p. 1552-1561, 2012.
- THON, J. N.; ITALIANO, J. E. Platelet formation. In: **Seminars in hematology**. WB Saunders, 2010. p. 220-226.
- TOUZE, J. E. *et al.* Platelet antibody activity in malaria thrombocytopenia. **Pathology biology**, v. 38, n. 7, p. 678-681, 1990.
- VAL, F. *et al.* Are respiratory complications of Plasmodium vivax malaria an underestimated problem?. **Malaria journal**, v. 16, n. 1, p. 495, 2017.
- VAN D. B. F. E. *et al.* Thrombocytopenia impairs host defense during murine *Streptococcus pneumoniae*. **Critical care medicine**, v. 43, n. 3, p. e75-e83, 2015.

- VIEIRA A. A. *et al.* Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. In: **Seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2012. p. 5-30.
- VIZIOLI, L.; MUSCARI, S.; MUSCARI, A. The relationship of mean platelet volume with the risk and prognosis of cardiovascular diseases. **International journal of clinical practice**, v. 63, n. 10, p. 1509-1515, 2009.
- WASSMER, S. C. *et al.* Investigating the pathogenesis of severe malaria: a multidisciplinary and cross-geographical approach. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 93, 42–56 (2015).
- WASSMER, S. C.; GRAU, G. E. R. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front?. **International journal for parasitology**, v. 47, n. 2-3, p. 145-152, 2017.
- WASSMER, S. C. *et al.* Platelet-induced clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from Malawian patients with cerebral malaria—possible modulation in vivo by thrombocytopenia. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 1, p. 72-78, 2008.
- WARTHA, F. *et al.* ETosis: a novel cell death pathway. **Sci. Signal.**, v. 1, n. 21, p. pe25-pe25, 2008.
- WATERS, A. P. Epigenetic roulette in blood stream *Plasmodium*: gambling on sex. **PLoS Pathog.** 12, e1005353 (2016).
- WENDLAND, A. E.; FARIAS, M. G.; MANFROI, W. C. Mean platelet volume and cardiovascular disease. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 5, p. 371-378, 2009.
- WERE, T. *et al.* Naturally acquired hemozoin by monocytes promotes suppression of RANTES in children with malarial anemia through an IL-10-dependent mechanism. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 8, p. 811-819, 2009.
- WEYRICH, A. S. Platelets: more than a sack of glue. **ASH Education Program Book**, v. 2014, n. 1, p. 400-403, 2014.
- WHITE, N. J. *et al.* Malaria. **Lancet** 383, 723–735 (2014).
- OMS. World malaria report 2017. Geneva: **Organização Mundial de Saúde**; 2017.
- WINIARSKI, J. IgG and IgM antibodies to platelet membrane glycoprotein antigens in acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. **British journal of haematology**, v. 73, n. 1, p. 88-92, 1989.
- WICKRAMASINGHE, S. N.; ABDALLA, S. H. Blood and bone marrow changes in malaria. **Best Practice & Research Clinical Hematology**, v. 13, n. 2, p. 277-299, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Severe malaria. **Trop. Med. Int. Health** 19 (Suppl. 1), 7–131 (2014).

- WROCZYŃSKA, A. *et al.* Cytokines and clinical manifestations of malaria in adults with severe and uncomplicated disease. **International maritime health**, v. 56, n. 1-4, p. 103-114, 2005.
- YAMAGUCHI, S. *et al.* Severe thrombocytopenia suggesting immunological mechanisms in two cases of *P.vivax* malaria. **American journal of hematology**, v. 56, n. 3, p. 183-186, 1997.
- YAMAUCHI, Lucy Megumi *et al.* *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1215-1222, 2007.
- YANG, H. *et al.* Interleukin-1 promotes coagulation, which is necessary for protective immunity in the lung against *Streptococcus pneumoniae* infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 207, n. 1, p. 50-60, 2012.
- YEAMAN, M. R.; BAYER, A. S. Antimicrobial host defense. In: **Platelets (Third Edition)**. 2013. p. 767-801.
- YEAMAN, M. R. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 426-437, 2014.
- YEO, T. W. *et al.* Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine–reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 11, p. 2693-2704, 2007.
- YUN, S.H *et al.* Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. **Bio Med research international**, v. 2016, 2016.
- YURI G. A. *et al.* Mean platelet volume: a link between thrombosis and inflammation?. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 1, p. 47-58, 2011.
- ZHENG, H. *et al.* . Immune evasion strategies of pre-erythrocytic malaria parasites. **Mediators of inflammation**, v. 2014, 2014.

10. ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Este documento será impresso em duas vias, sendo uma via do participante da pesquisa.

Projeto IMUNOPATO

Investigadores: Dr. Paulo Afonso Nogueira e Dr. Marcus Vinicius Lacerda

A proposta deste TCLE é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

Convite: Por ter visitado a FMT-HVD para o tratamento de malária você está sendo convidado a participar de uma pesquisa “**Imunopatologia na malária causada pelo *P.vivax***” na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, do Amazonas, Brasil, sob a responsabilidade dos pesquisadores Lucas Barbosa Oliveira e Paulo Afonso Nogueira da ILMD/FIOCRUZ – MANAUS. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento.

Objetivo do estudo: Investigar por que não há sangramento com a diminuição de plaquetas na malária pelo *Plasmodium vivax*, como ocorre na dengue por exemplo. E a pesquisa poderá ser usado no futuro para ajudar outras doenças.

Procedimento do estudo: Após o seu aceite, nós faremos um questionário sobre nome, endereço, idade, história de malária anterior, sintomas, e o resultado do exame de malária. Com seu consentimento, faremos a coleta de 10 ml de sangue que equivale a uma colher de sopa, coletaremos pela veia do antebraço e isto será realizado por uma técnica de saúde capacitada e treinada.

Informações técnicas: O sangue será utilizado em experimentos para e avaliar os fatores do sangue; a contagem de células brancas, células vermelhas e as plaquetas. Realizaremos dosagem fatores da resposta imunológica (plaquetas que fazem o sangue coagular), analisar as alterações do sangue na malária e a contagem de elementos eliminados pelo parasita no sangue.

Benefícios para o participante: Não há um benefício direto a você, participante, porém indiretamente você ajudará a compreensão do porquê não há sangramento na malária quando o número de plaqueta é baixo. No entanto, será beneficiado por contribuir para o avanço científico da doença.

Participação voluntária/desistência do estudo: A participação é totalmente voluntária, onde você só participa se quiser. Você não precisa fazer qualquer esforço especial para participar desse projeto, e receberá o mesmo tratamento e acompanhamento estabelecido pelo Ministério da Saúde. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com a equipe médica, ou com o tratamento, ou com o pesquisador. Ou seja, o acompanhamento e o tratamento da sua doença serão iguais, participando ou não na pesquisa. A qualquer momento você pode desistir e retirar seu consentimento do estudo se assim desejar, também sem qualquer prejuízo no tratamento e acompanhamento realizado pela instituição.

Riscos ou danos relacionados à Pesquisa: Como parte desse estudo nós coletaremos uma amostra de sangue, cerca de 10 ml que equivale a uma colher de sopa. Coletaremos pela veia do antebraço e isto será realizado por uma técnica de saúde muito bem treinada da gerencia de malária. Você pode sentir alguma dor ou desconforto por causa da coleta. Depois pode doer um pouco na região da picada da agulha e pode ficar com uma mancha roxa. Mas qualquer dor deve durar poucos segundos. A amostra de sangue coletada é muito pequena e não representa nenhum risco a saúde. Todos os cuidados serão tomados para minimizar esses riscos. A coleta será feita com material esterilizado e descartável sem risco algum para os pacientes.

Como a sua participação no estudo se dará uma única vez na ocasião em que você procurou o atendimento nesta unidade de saúde, consideramos que esta participação não irá gerar nenhum gasto, mas caso ocorra, estes gastos lhe serão ressarcidos. Caso a participação no estudo traga alguma lesão ou dano, você terá todos os direitos a indenização diante de eventuais danos decorrentes a pesquisa, conforme a RESOLUÇÃO Nº466/2012, CNS/MS.

Registros Médicos e confidencialidade: Todas as informações coletadas serão confidenciais, usadas somente no estudo em caráter científico. Nós não compartilharemos suas informações e não tornaremos público qualquer detalhe sobre você.

Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo sua identidade não será revelada em nenhuma hipótese nessas apresentações.

CEP/FMT-HVD: O Comitê de Ética da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (CEP/FMT-HVD) localiza na Av. Pedro Teixeira, nº 25 - Bairro Dom Pedro, CEP 69.040-000 - Manaus - Amazonas – Brasil. Contatos via

telefone (92) 2127-3572 e pelo e-mail cep@fmt.am.gov.br. Horário de funcionamento, de 2ª a 6ª feira das 8:00 as 12:00 horas.

Contatos ou dúvidas: Se você tiver qualquer pergunta ou preocupação sobre o estudo, por favor, vamos esclarecer isso agora. Mesmo assim se você desejar esclarecer dúvidas sobre a pesquisa sinta-se à vontade para contatar os pesquisadores do projeto. 1) Pesquisador principal Dr. Paulo Afonso Nogueira, laboratório DCDIA, que poderá ser encontrado no Centro de pesquisas Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ, das 08:00 às 17:00 horas, de segunda-feira a sexta-feira, situado no endereço Rua Teresina, nº 476 Adrianópolis - Manaus, AM – Brasil. Telefone: (92) 36212323. 2) O estudante pesquisador Lucas Barbosa Oliveira que poderá ser encontrado na Gerencia de Malária da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, das 08:00 as 12:00 horas, de segunda-feira a quinta-feira situado no endereço Rua Av. Pedro Teixeira, nº 25 - Bairro Dom Pedro – Manaus, AM-Brasil. Telefone: (92) 21273443.

Declaração de consentimento: Declaro que li e recebi a explicação do consentimento e objetivo do estudo, sendo esclarecidas todas as minhas dúvidas e estou concordando em participar do estudo. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome e a data do preenchimento. E por estar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expresse meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

O sangue colhido que sobrar poderá ser guardada no Freezer -80°C do Lab. DCDIA localizado Centro de pesquisas Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ adequando a RESOLUÇÃO CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011. Perguntamos se sr. (a) consente que esta amostra possa ser utilizada no futuro para outras pesquisas? Nós garantimos que estas pesquisas serão sobre o mesmo tema desta pesquisa e para elas será elaborado um novo projeto que será submetido à aprovação pelo sistema CEP/CONEP e você será procurado para assinar um novo TCLE. Você consente?

Sim ()

Não ()



Assinatura Datiloscópica.

Nome e assinatura do participante da pesquisa

____/____/____
Data

Nome e assinatura do entrevistador

____/____/____
Data

Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal

____/____/____
Data

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Para o responsável do paciente
(TCLE-do responsável)

Este documento será impresso em duas vias, sendo uma via do participante da pesquisa.

Projeto IMUNOPATO

Investigadores: Dr. Paulo Afonso Nogueira e Dr. Marcus Vinicius Lacerda

A proposta deste TCLE é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

Convite: Por ter visitado a FMT-HVD para o tratamento de malária, seu filho (a) (ou familiar) está sendo convidado a participar de uma pesquisa **“Imunopatologia na malária causada pelo *P.vivax*”** na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, do Amazonas, Brasil, sob a responsabilidade dos pesquisadores Lucas Barbosa Oliveira e Paulo Afonso Nogueira da ILMDFIOCRUZ – MANAUS. A qualquer momento seu filho (a) (ou familiar) pode desistir de participar e você como representante legal pode retirar seu consentimento.

Objetivo do estudo: Investigar por que não há sangramento com a diminuição de plaquetas na malária pelo *Plasmodium vivax*, como ocorre na dengue por exemplo. E a pesquisa poderá ser usado no futuro para ajudar outras doenças.

Procedimento do estudo: Após o seu aceite, nós faremos um questionário sobre nome, endereço, idade, história de malária anterior, sintomas, e o resultado do exame de malária. Com seu consentimento, faremos a coleta de 10 ml de sangue que equivale a uma colher de sopa, coletaremos pela veia do antebraço e isto será realizado por uma técnica de saúde capacitada e treinada.

Informações técnicas: O sangue será utilizado em experimentos para avaliar os fatores do sangue; a contagem de células brancas, células vermelhas e as plaquetas. Realizaremos dosagem fatores da resposta imunológica (plaquetas que fazem o sangue coagular) e analisar as alterações do sangue na malária e a contagem de elementos eliminados pelo parasita no sangue.

Benefícios para o participante: Não há um benefício direto a seu filho (a) (ou familiar), porém indiretamente seu filho ajudará a compreensão do porquê não há sangramento na malária quando o número de plaqueta é baixo. No entanto, será beneficiado por contribuir para o avanço científico da doença.

Participação voluntária/desistência do estudo: A participação é totalmente voluntária, onde seu filho (a) (ou familiar) só participa se quiser. Seu filho (a) (ou familiar) não precisa fazer qualquer esforço especial para participar desse projeto, e receberá o mesmo tratamento e acompanhamento estabelecido pelo Ministério da Saúde. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com a equipe médica, ou com o tratamento, ou com o pesquisador. Ou seja, o acompanhamento e o tratamento da doença de seu filho (a) (ou familiar) serão iguais, participando ou não na pesquisa. A qualquer momento seu filho (a) (ou familiar) pode desistir e retirar seu consentimento do estudo se assim desejar, também sem qualquer prejuízo no tratamento e acompanhamento realizado pela instituição.

Riscos ou danos relacionados à Pesquisa: Como parte desse estudo nós coletaremos uma amostra de sangue, cerca de 10 ml que equivale a uma colher de sopa. Coletaremos pela veia do antebraço e isto será realizado por uma técnica de saúde muito bem treinada da gerencia de malária. Seu filho (a) /familiar pode sentir alguma dor ou desconforto por causa da coleta. Depois pode doer um pouco na região da picada da agulha e pode ficar com uma mancha roxa. Mas qualquer dor deve durar poucos segundos. A amostra de sangue coletada é muito pequena e não representa nenhum risco a saúde. Todos os cuidados serão tomados para minimizar esses riscos. A coleta será feita com material esterilizado e descartável sem risco algum para os pacientes.

Como a participação de seu filho (a) (ou familiar) no estudo se dará uma única vez na ocasião em que você procurou o atendimento nesta unidade de saúde, consideramos que esta participação não irá gerar nenhum gasto, mas caso ocorra, estes gastos lhe serão ressarcidos. Caso a participação no estudo traga alguma lesão ou dano ao seu filho (a) / familiar, terá todos os direitos a indenização diante de eventuais danos decorrentes a pesquisa, conforme a RESOLUÇÃO Nº466/2012, CNS/MS.

Registros Médicos e confidencialidade: Todas as informações coletadas serão confidenciais, usadas somente no estudo em caráter científico. Nós não compartilharemos as informações e não tornaremos público qualquer detalhe sobre seu filho (a) / familiar.

Os registros médicos que trazem a identificação de seu filho (a) (ou familiar) e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, nem a sua identidade e nem a de seu filho (a) / familiar será revelada em nenhuma hipótese nessas apresentações.

CEP/FMT-HVD: O Comitê de Ética da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (CEP/FMT-HVD) localiza na Av. Pedro Teixeira, nº 25 - Bairro Dom Pedro, CEP 69.040-000 - Manaus - Amazonas – Brasil. Contatos via telefone (92) 2127-3572 e pelo e-mail cep@fmt.am.gov.br. Horário de funcionamento, de 2ª a 6ª feira das 8:00 as 12:00 horas.

Contatos ou dúvidas: Se você, ou seu filho (a) (ou familiar) tiver qualquer pergunta ou preocupação sobre o estudo, por favor, vamos esclarecer isso agora. Mesmo assim se você, ou seu filho (a) (ou familiar) desejar esclarecer dúvidas sobre a pesquisa sinta-se à vontade para contatar os pesquisadores do projeto. 1) Pesquisador principal Dr. Paulo Afonso Nogueira, laboratório DCDIA, que poderá ser encontrado no Centro de pesquisas Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ, das 08:00 às 17:00 horas, de segunda-feira a sexta-feira, situado no endereço Rua Teresina, nº 476 Adrianópolis - Manaus, AM – Brasil. Telefone: (92) 36212323. 2) O estudante pesquisador Lucas Barbosa Oliveira que poderá ser encontrado na Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, das 08:00 as 12:00 horas, de segunda-feira a quinta-feira situado no endereço Rua Av. Pedro Teixeira, nº 25 - Bairro Dom Pedro – Manaus, AM-Brasil. Telefone: (92) 21273443.

Declaração de consentimento: Declaro que li e recebi a explicação do consentimento e objetivo do estudo, sendo esclarecidas todas as minhas dúvidas e estou concordando na participação de meu filho (a) / familiar no estudo. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome e a data do preenchimento. E por estar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expresse meu consentimento para inclusão de meu filho (a) / familiar nesta pesquisa.

O sangue colhido que sobrar poderá ser guardada no Freezer -80°C do Lab. DCDIA localizado Centro de pesquisas Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ adequando a RESOLUÇÃO CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011. Perguntamos se sr. (a) consente que esta amostra possa ser utilizada no futuro para outras pesquisas? Nós garantimos que estas pesquisas serão sobre o mesmo tema desta pesquisa e para elas será elaborado um novo projeto que será submetido à aprovação pelo sistema CEP/CONEP e você será procurado para assinar um novo TCLE. Você consente?

Sim ()

Não ()



Assinatura Datiloscópica.

Nome e assinatura do responsável legal

_____/_____/_____
Data

Nome e assinatura do entrevistador

_____/_____/_____
Data

_____/_____/_____
Data

Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal

Data

TERMO DE ASSENTIMENTO

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO
Documento apresentado em duas vias, sendo uma via do participante da pesquisa.
(Adolescentes maiores de 12 anos e menores de 18 anos)

Informação geral: O assentimento informado para criança/adolescente não substitui a necessidade de consentimento informado dos pais ou guardiães. O assentimento assinado pela criança demonstra a sua cooperação na pesquisa.

Título do projeto: **Imunopatologia na malária causada pelo *P. vivax*.**

Investigadores: Dr. Paulo Afonso Nogueira e Dr. Marcus Vinicius Lacerda

Local da pesquisa: FIOCRUZ-MANAUS e FMT-HVD

Endereço: Rua Teresina, nº476 Adrianópolis – Manaus, AM- Brasil. Telefone: (92) 36212323.

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Podem ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao participante da pesquisa:

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa.

Qual o objetivo? Investigar do porquê não há sangramento na malária quando as plaquetas (que as células que fazem o sangue coagular) estão baixas.

Para que fazer a pesquisa? Para entender esse porquê na malária não ocorre o sangramento, como ocorre na dengue por exemplo. E a pesquisa poderá ser usado no futuro para ajudar outras doenças.

Como será feita? Faremos um questionário sobre você, seus dados pessoais como nome, endereço, idade, história de malária anterior, sintomas, e o resultado do exame de malária. Com seu consentimento faremos a coleta de 10 ml de sangue que equivale a uma colher de sopa, coletaremos pela veia do antebraço e isto será realizado por uma técnica de saúde capacitada e treinada da gerência de malária.

Benefício esperados como a pesquisa? Não há nenhum benefício para que você, porém indiretamente você ajudará a compreensão do porquê não há sangramento na malária quando o número de plaqueta é baixo. No entanto, será beneficiado por contribuir para o avanço científico da doença.

Caso você aceite participar, os procedimentos são: Com o sangue nós vamos contar a quantidade de células do sangue, conhecidas como células brancas, células vermelhas e as plaquetas.

Quais os riscos? Você pode sentir alguma dor, no local da coleta de sangue pode ficar roxo, ou desconforto por causa da picada da agulha. Mas qualquer dor deve durar poucos segundos. A quantidade de sangue é muito pequena e não representa nenhum risco a saúde. Todos os cuidados serão tomados para diminuir esses riscos. A participação é voluntária, isso quer dizer que, para que a gente possa fazer isso, você de concordar voluntariamente em participar da pesquisa, assinando o seu nome. Se você não quiser participar não terá nenhum prejuízo para o seu tratamento.

CEP/FMT-HVD: O Comitê de Ética da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (CEP/FMT-HVD) localiza na Av. Pedro Teixeira, nº 25 - Bairro Dom Pedro, CEP 69.040-000 - Manaus - Amazonas – Brasil. Contatos via telefone (92) 2127-3572 e pelo e-mail cep@fmt.am.gov.br. Horário de funcionamento, de 2ª a 6ª feira das 8:00 as 12:00 horas.

Contatos ou dúvidas: Se você tiver qualquer pergunta ou preocupação sobre o estudo, por favor, vamos esclarecer isso agora. Mesmo assim se você deseja esclarecer suas dúvidas sobre a pesquisa sinta-se a vontade para contatar os pesquisadores do projeto. Pesquisador principal Dr. Paulo Afonso Nogueira, laboratório DCDIA, que poderá ser encontrado no Centro de pesquisas Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ, das 08:00 às 17:00 horas, de segunda-feira a sexta-feira, situado no endereço Rua Teresina, nº 476 Adrianópolis - Manaus, AM – Brasil. Telefone: (92) 36212323. E o estudante pesquisador Lucas Barbosa Oliveira que poderá ser encontrado na Gerencia de Malária da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, das 08:00 as 12:00 horas, de segunda-feira a quinta-feira situado no endereço Rua Av. Pedro Teixeira, nº 25 - Bairro Dom Pedro – Manaus, AM-Brasil. Telefone: (92) 21273443.

Declaração de consentimento: Declaro que li e recebi a explicação do consentimento e objetivo do estudo, sendo esclarecidas todas as minhas dúvidas e estou concordando em participar do estudo. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome e a data do preenchimento. E por estar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expressei meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

O sangue colhido que sobrar poderá ser guardado no Freezer -80°C do Lab. DCDIA localizado Centro de pesquisas Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ adequando a RESOLUÇÃO CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011. Perguntamos se sr. (a) consente que esta amostra possa ser utilizada no futuro para outras pesquisas? Nós garantimos que estas pesquisas serão sobre o mesmo tema desta pesquisa e para elas será elaborado um novo projeto que será submetido à aprovação pelo sistema CEP/CONEP e você será procurado para assinar um novo TCLE. Você consente?

Sim ()

Não ()

Nome e assinatura do participante da pesquisa

____/____/_____
Data



Assinatura Datiloscópica.

Nome e assinatura dos pais / responsáveis

____/____/_____
Data



Assinatura Datiloscópica.

Nome e assinatura do entrevistador

____/____/_____
Data

Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal

____/____/_____
Data

Questionário epidemiológico
Pesquisa IMUNOPATO

Data ____/____/____

Dados do paciente:

Nº. da amostra: IP-_____

Nome: _____.

Idade: _____. Sexo: Masculino. Feminino.

Data de nascimento: ____/____/____.

Endereço: _____

Cidade: _____. Estado: _____.

Dados malária:

1. Qual malária ? Vivax Falciparum malariae Não detectado.

2. Parasitemia em cruzes: _____. Parasitemia por µl _____

3. Já teve malária anteriormente: Sim Não.

Se a resposta for Sim:

3.1 Quantos episódios de malária: _____, ou não sabe

3.2 Data da última infecção malárica (mm/aa): _____, ou não sabe

4. Tomou algum medicamento: Não Sim. Qual? _____, não sabe

5. Sintomas:

Quais sintomas Febre calafrios cefaleia dor abdominal Diarréia vômitos.

Dados hematológicos (a ser preenchido posteriormente)

WBC _____	LYM% _____
RBC _____	MXD% _____
HGB _____	NEUT% _____
HCT _____	LYM# _____
MCV _____	MXD# _____
MCH _____	NEUT# _____
MCHC _____	RDW_SD _____
PLT _____	RDW_CV _____
	MPV _____

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Imunopatologia na malária causada pelo P.vivax

Pesquisador: Paulo Afonso Nogueira

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 57293216.3.0000.0005

Instituição Proponente: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.917.853

Apresentação do Projeto:

A malária é a doença parasitaria mais comum nas regiões tropicais do mundo. Com Altas taxas de morbidade, cerca de 215 milhões de casos da doença e de 438 mil mortes atribuídas a ele (OMS, 2015). A malária é uma doença infecciosa, causada por parasitas protozoários, transmitida por mosquitos fêmeas do gênero Anófeles. A malária espalha-se em regiões tropicais e subtropicais, tendo a ocorrência com a maioria dos casos de malária concentrados na região Amazônica. Por outro lado, o P.vivax é responsável por cerca de 60 a 80% dos casos de malária no mundo, e contribui para a instabilidade política, social e econômica nos países em desenvolvimento. A malária é a doença parasitaria mais comum nas regiões tropicais do mundo. Com Altas taxas de morbidade, com cerca de 215 milhões de casos da doença e cerca de 438 mil mortes atribuídas a ele (OMS, 2015). A ocorrência de plaquetopenia é comum nas infecções por P. falciparum e P. vivax com os episódios de febre com níveis de plaquetas baixos são indicativos de malária. No entanto a patogênese da plaquetopenia na malária não está completamente elucidada. A investigação mais minuciosa destes mecanismos contribuirá principalmente para o aumento do escasso conhecimento sobre a patogênese da plaquetopenia na malária, que é o quadro mais frequente e severo na malária vivax. Além de auxiliar no desenvolvimento de um tratamento de suporte da plaquetopenia na malária. O mecanismo exato da plaquetopenia na malária não está

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 1.917.853

completamente elucidado, no entanto, existem mecanismos postulados para a patogênese, que envolveria destruição por apoptose ou depleção em gasto de plaquetas no processo apoptótico e trombótico -adesivo em superfícies endoteliais ativadas pela infecção (Lacerda et al., 2011, 2007). A trombocitopenia vem sendo mais estudada e foi observada que umas das anormalidades que vem sendo mais comumente vistas é a formação de plaquetas maiores que ajudam na liberação de megacariócitos jovens associados à trombocitopenia. A presença de medula óssea, em alguns casos de malária sugere que a trombocitopenia não é susceptível a destruição imunomediada de plaquetas que tem sido postulada como sendo a causa de trombocitopenia, na destruição periférica, sequestro esplênico, e consumo de plaquetas. (Haroon et al., 2013). Em estudos anteriores relataram que infecções maláricas poderiam ser diagnosticadas eficientemente usando a LDH plasmodial, e desde então a enzima tornou-se alvo de muitos estudos na imunopatogênese da malária, sendo uma ótima ferramenta que avalia a carga parasitária evidenciando que a parasitemia pode ser subestimada. Foi evidenciada que os acúmulos de hemozoina ocorrem a aquisição pelos fagócitos, ou seja, pelos monócitos que suprime a imunidade celular e aumenta a severidade da malária sendo sintetizado por trofozoítos e início de esquizontes que é adquirido por células fagocíticas e endoteliais. (Were, 2009). O sistema imune inato responde aos estímulos por diferentes tipos de receptores em relação ao Plasmodium, existem os diferentes tipos de receptores ao reconhecimento de padrões que iniciam um amplo espectro de mecanismos de defesa que medeiam a resistência do hospedeiro à infecção malárica. Por isso existe essa necessidade de estudarmos os perfis celulares, além de quimiocinas e citocinas dos eixos Th1, Th2 e TH- para avaliar como a resposta celular fica afetada pela influência da trombocitopenia, quais os mecanismos devem ser analisados para uma explicação da resposta imune inata, e observando as principais alterações hematológicas que ocorrem na infecção pelo Plasmodium vivax.

Trata-se do protocolo referente ao Projeto de Pesquisa Intitulado " Imunopatologia na malária causada pelo P.vivax", tendo como pesquisador responsável Paulo Afonso Nogueira, e como parte do grupo de pesquisa Lucas Barbosa Oliveira, Stefanie Costa Pinto Lopes e Marcus Vinicius Guimarães Lacerda. De acordo com a metodologia proposta trata-se de um estudo prospectivo e analítico, com N amostral de 50 pacientes plaquetopênicos e 50 não plaquetopênicos, pacientes com malária atendidos na FMT-HVD, e com idade a partir de 12 anos - 70 anos que serão entrevistados para possível inclusão no estudo. Haverá um

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 1.917.853

questionário epidemiológico e seus exames laboratoriais (hemograma) serão solicitados à Diretoria de Assistência Médica. Haverá coleta de sangue; os dados demográficos e clínicos serão coletados por meio de um questionário estruturado. Os pacientes serão atendidos pelos médicos da equipe do estudo que farão exame clínico e hemograma. Uma amostra de sangue será coletada. Para o grupo controle serão coletados no mesmo dia

indivíduos sadios e da mesma idade para evitar problemas com a coleta de plaquetas. Eles terão seus exames laboratoriais realizados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar a trombocitopenia em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*.

Objetivo Secundário:

Específicos: Realizar a coleta de amostras de pacientes e determinar a parasitemia e analisar hemozoína.

Realizando as colorações hematológicas de todas as lâminas. Realizar ensaio com Anti-LDH para observar plaquetopenia e trombocitopenia. Realizar procedimentos para imunofenotipagem celular em leucócitos com dosagem intracelular de citocinas. Realizar procedimentos para ensaio de fagocitose de hemácias fagócitos circulantes: macrófagos, monócitos. Realizar PCR em tempo real de todas as amostras para expressão gênica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta é relevante e dentro do contexto, é plenamente factível, portanto, devidamente instruído, está apto para análise.

Diante do exposto sugere-se que o parecer sobre EMENDA seja **APROVADO**.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 1.917.853

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está **APROVADO** e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 13 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br