



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO MULTIDISCIPLINAR EM  
PATOLOGIA TROPICAL**

**EFEITOS DAS ESPLENECTOMIAS TOTAL E PARCIAL EM  
CAMUNDONGOS COM INFEÇÃO PELO *PLASMODIUM*  
*berghei***

**RÓBSON MIGUEL DE ARAÚJO NEGREIROS**

**MANAUS  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO MULTIDISCIPLINAR EM  
PATOLOGIA TROPICAL**

**RÓBSON MIGUEL DE ARAÚJO NEGREIROS**

**EFEITOS DAS ESPLENECTOMIAS TOTAL E PARCIAL  
EM CAMUNDONGOS COM INFECÇÃO PELO  
*PLASMODIUM berghei***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Multidisciplinar em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre, na Área de Concentração Processo Saúde e Doença.

**Orientador: Prof. Dr. Gerson Suguiyama Nakajima**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira**

**MANAUS  
2008**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Negreiros, Róbson Miguel de Araújo

N385e Efeitos das esplenectomias total e parcial em camundongos com infecção pelo *Plasmodium berghei* / Róbson Miguel de Araújo Negreiros. - Manaus: UFAM, 2008.  
78 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) —  
Universidade Federal do Amazonas, 2008.

Orientador : Prof. Dr. Gerson Suguiyama Nakajima

Co-Orientador : Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira

1. Malária – Estudos de caso 2. Esplenectomia 3. Endemias  
I. Nakajima, Gerson Suguiyama II. Ferreira, Luiz Carlos de Lima  
III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 616.936-097(043.3)

## AGRADECIMENTOS

Aos professores doutores Gerson Suguiyama Nakajima e Luiz Carlos de Lima Ferreira, Orientador e Co-Orientador, pela orientação e acompanhamento.

À Coordenação do Mestrado Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela oportunidade para a realização do presente trabalho.

À Faculdade de Medicina e ao Instituto de Ciências Biológicas da UFAM, por ceder espaço e recursos para a realização desse trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina dos Santos pela orientação, treinamento, incentivo, e por disponibilizar materiais e equipamentos do Laboratório de Imunologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFAM.

Ao professor Dr. José Fernando Marques Barcellos, do Departamento de Morfologia do ICB da UFAM, responsável pelo Laboratório de Histopatologia, por disponibilizar materiais e equipamentos para a realização do trabalho.

Ao professor Fábio Tonissi Moroni, do Departamento de Ciências Fisiológicas do ICB da UFAM, responsável pelo Biotério dessa Universidade, por ceder os camundongos e disponibilizar materiais e espaço para realização desse trabalho.

Ao Dr. Roberto Sena Rocha, Diretor da Fundação Oswaldo Cruz no Amazonas e a Dra. Luiza Helena Carvalho, do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou de Minas Gerais, pela cessão da cepa do *Plasmodium berghei*, permitindo a realização do experimento proposto.

Aos alunos do Programa de Aprimoramento em Cirurgia Experimental do Departamento de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da UFAM, Linda Luciana Oliveira Santana e Fabiano Hiromichi Makimoto, por me acompanharem em todas as fases da realização deste projeto.

Aos colegas de mestrado pela amizade e incentivo.

Ao servidor José Riquelme, da Disciplina Fundamentos de Cirurgia e Anestesia, do Departamento de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da UFAM, pela responsabilidade e dedicação no trato dos animais.

Aos animais que com o sacrifício de suas vidas permitiram a realização desse experimento.

A Deus e à minha família, que me ensinaram que o êxito é o resultado do trabalho solidário.

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização desse trabalho.

Obrigado!

## RESUMO

A ablação total do baço aumenta o risco de morte por infecção, seja qual for a indicação, a faixa etária ou o agente infeccioso. O trauma é responsável por grande número de pacientes asplênicos, e a malária é endêmica na cidade de Manaus. O baço é crucial no controle da malária posto ser o responsável pelo clareamento dos parasitas que se realiza através da rede de filtração. O aumento da parasitemia implica na ampliação dessa rede para garantir a resolução da infecção. Estudou-se a evolução da parasitemia em camundongos com esplenectomia total, com esplenectomia parcial e não-esplenectomizados. A indução da infecção foi pelo *Plasmodium berghei*, com  $10^6$  hemácias infectadas. O índice de parasitemia dos animais submetidos a esplenectomia parcial foi de 13%, e dos com esplenectomia total de 104 %, quando comparados com os não-esplenectomizados ao final do experimento. Os níveis das imunoglobulinas M e G não demonstraram uma tendência quando comparados os diferentes grupos. O baço é indispensável para o controle da infecção malárica no camundongo. A manutenção de parte do tecido esplênico demonstrou a eficiência no controle da parasitemia, corroborando com estudos anteriores de que a asplenia dificulta o controle da parasitemia, tornando mais susceptíveis a cursos fatais.

Palavras-chave: Esplenectomia. Malária experimental. Sepses. Infecção fulminante.

## ABSTRACT

The total ablation of the spleen increases the risk of death by infection, whatever the indication, the age group or the infectious agent. The trauma is responsible for large numbers of splenectomized patients, and the malaria is an endemic pathology in Manaus. The spleen is crucial in the control of malaria because it's responsible for clearing the parasites that are done through the filtration's network. The increase of the parasitemia implies in an extension of that network to ensure the infection's resolution. It was studied the parasitemia's evolution in mice with total splenectomy, with partial splenectomy and non-splenectomized. The infection's induction was by *Plasmodium berghei*, with  $10^6$  red blood cells infected. The index of animal's parasitemia of subjected to partial splenectomy was 13%, and the index with splenectomy total of 104% when it is compared with non-splenectomized in the end of the experiment. The levels of immunoglobulin M and G don't show a trend when compared the different groups. The spleen is indispensable for the control of the malaric infection in the mouse. The maintenance of part of the fabric esplenic demonstrated to the efficiency in the control of the parasitemia, corroborating with previous studies of that the asplenia makes it difficult the control of the parasitemia, becoming easier to happen the fatal courses.

Keywords: Splenectomy. Experimental malaria. Sepsis. Overwhelming infection.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>cm</b>	centímetro
<b>CNS</b>	Conselho Nacional de Saúde
<b>CQ</b>	cloridrato de quetamina
<b>CX</b>	cloridrato de xilazina
<b>FM</b>	Faculdade de Medicina
<b>g</b>	grama
<b>IFPE</b>	infecção fulminante pós-esplenectomia
<b>IgG</b>	Imunoglobulina da classe G
<b>IgG1</b>	Imunoglobulina classe G, subclasse 1
<b>IgG3</b>	Imunoglobulina classe G, subclasse 3
<b>IgM</b>	Imunoglobulina da classe M
<b>Igs</b>	Imunoglobulinas
<b>i.m.</b>	intramuscular
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>IPA</b>	Incidência Parasitária Anual
<b>µL</b>	microlitro
<b>mL</b>	mililitro
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>NK</b>	natural killers (células matadoras)
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>P</b>	Plasmodium
<b>PIACM</b>	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Região Amazônica

<b>PNCM</b>	Programa Nacional de Controle da Malária
<b>PS 28</b>	Pronto Socorro 28 de Agosto
<b>PVPI</b>	polivinilpirrolidona iodo
<b>s.c.</b>	subcutânea
<b>UFAM</b>	Universidade Federal do Amazonas

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1 Malária.....	14
2.2 Risco da urbanização da transmissão da malária.....	16
2.3 Gravidade e importância da malária.....	18
2.4 Confirmação diagnóstica.....	19
2.5 Imunologia na malária.....	20
2.6 Esplenectomia e malária experimental.....	24
2.7 Os acidentes e as violências gerando pacientes asplênicos no Brasil.....	25
2.8 Infecção fulminante pós-esplenectomia.....	26
2.9 Importância do baço.....	28
2.10 Esplenectomia e técnicas conservadoras no trauma esplênico.....	30
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 Modelo de estudo.....	34
4.2 Universo de estudo e condições ambientais.....	34
4.3 Projeto piloto.....	35
4.4 Divisão em grupos e procedimentos.....	35
4.5 Procedimento experimental.....	36
4.5.1 Pré-operatório.....	36
4.5.2 Pré-anestesia.....	36
4.5.3 Ato anestésico.....	37
4.5.4 Ato operatório.....	37
4.5.5 Recuperação pós-anestésica e pós-operatória.....	41
4.6 Inoculação do plasmódio.....	44
4.7 Confeção do esfregaço e determinação da parasitemia.....	45
4.8 Coleta de sangue para quantificar os níveis totais das imunoglobulinas.....	47
4.9 Análise de sobrevivência.....	47
4.10 Análise estatística.....	48
4.11 Fluxograma da pesquisa.....	49
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>70</b>
9.1 Identificação.....	70
9.2 Recuperação pós-anestésica.....	70
9.3 Recuperação pós-operatória.....	71
9.4 Contagem de eritrócitos na câmara de Neubauer.....	71
9.5 Determinação da parasitemia .....	71
9.6 Monitoramento da parasitemia.....	72

<b>9.7 Determinação dos níveis das imunoglobulinas.....</b>	<b>72</b>
<b>9.8 Monitoramento dos níveis das imunoglobulinas.....</b>	<b>73</b>
<b>9.9 Sobrevida dos animais.....</b>	<b>74</b>
<b>9.10 Resultados para análise da parasitemia.....</b>	<b>75</b>
<b>9.11 Resultados para análise das imunoglobulinas.....</b>	<b>76</b>
<b>10. LISTA DE FIGURAS, QUADROS E GRÁFICOS.....</b>	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As endemias voltam a preocupar o Brasil e a malária, em particular, o Amazonas. Exemplos recentes da importância da acelerada urbanização no contexto da malária são as grandes invasões nas áreas do entorno das cidades de Manaus e Porto Velho, com ocupação desordenada, dificultando o planejamento e a execução de operações de controle da malária, ocasionando assim epidemia da doença (BRASIL, A malária no Brasil, 2005). No Amazonas a malária assumiu uma magnitude que obrigou as autoridades a decretar, em 2005, situação de emergência epidemiológica em dezesseis municípios, entre os quais estava o município de Manaus (AMAZONAS, Decreto n. 25.324, 2005). O aumento dos casos na capital está relacionado principalmente com os fluxos migratórios. As populações interioranas abandonam seus municípios por falta de mercado de trabalho e formam as periferias dos centros urbanos. Hoje, os serviços de saúde têm dificuldades para controlar a transmissão, pois lidam com populações que se deslocam de regiões malarígenas e vivem em precárias condições ambientais e sociais.

O potencial de expansão da malária no Amazonas deve preocupar as autoridades, haja vista a expansão desordenada da periferia da capital, e os grandes impactos ambientais no estado, como por exemplo, a construção de barragens hidrelétricas no rio Madeira, que inevitavelmente levará a chegada de trabalhadores de áreas malarígenas e não-malarígenas, e de massa secundária de pessoas, que irão para o comércio e para o ramo de diversão, entre outros.

Outrossim, verificamos que o trauma representa um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo, que tem provocado forte impacto na morbidade e letalidade das populações, as denominadas causas externas (DRUMMOND, 1992; GEYER; ALBARRÁN; BREIGEIRON, 2007). O trauma era a terceira causa global de mortalidade no

Brasil e no mundo. Era ainda a primeira causa de óbito na faixa entre cinco e quarenta anos, e era responsável por cerca de cinquenta por cento das mortes entre um e quinze anos, segundo o Programa de Enfrentamento às Emergências e Traumas do Ministério da Saúde do Brasil, 1990. As causas externas matavam, em nosso país, no final do século XX, por volta de cento e vinte mil pessoas por ano (BRASIL, Resolução CNS n. 309, 2001). A concentração dos acidentes e da violência é visualmente mais clara nas áreas urbanas, que concentram setenta e cinco por cento do total de mortes por causa da violência (BRASIL, Portaria MS n. 737, 2001). No ano de 2004, foram computadas cerca de 150.000 mortes decorrentes de traumatismos (Trauma e violência, 2008), e 450.000 pessoas com seqüelas irreversíveis (Trauma: devastadora doença do século XXI, 2008).

O baço é um dos órgãos parenquimatosos mais lesados nos traumatismos contusos de abdome e tórax inferior, e a conduta predominante ainda é a ablação total do órgão. A esplenectomia total aumenta o risco de morte por infecção tanto em adulto e principalmente em crianças, independente da indicação e da época após a cirurgia (BIROLINI; OLIVEIRA, 1985; FISCHER; SIEBERT JÚNIOR. Trauma esplênico. In: Cirurgia do Trauma, 2003; MARQUES; PETROIANU, 2003). Em Manaus, analisou-se no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico do Pronto Socorro 28 de Agosto (AMAZONAS, SAME. PS 28 de Agosto), as causas de trauma e violência nos últimos oito anos, como uma amostra do problema. Predominou o acidente de trânsito com 37,6%, com números acima dos índices nacionais relatados na década de 1990 e próximo dos atuais 40% (BIROLINI. In: DRUMMOND, 1992; TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE x TRAUMA 2008). Há coincidência entre as faixas etárias de maior ocorrência de trauma e malária: 0 a 40 anos (Programa de Enfrentamento às Emergências e Traumas do Ministério da Saúde, 1990; Resolução CNS n. 309, 2001; BRASIL, Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2005), o que aumenta a probabilidade de pacientes asplênicos cursarem com infecção

malárica. Existem poucos estudos prospectivos comparando a infecção malárica em pacientes que foram submetidos à esplenectomia total e em indivíduos não esplenectomizados (TRAETOW; FABRI; CAREI, 1980; NASSIF, et al., 2004).

Levaram a proposição do trabalho, o grande número de vítimas do trauma na capital do Amazonas, o expressivo número de rupturas traumáticas do baço e, em consequência, a ablação total esplênica; o grande número de pacientes com malária na cidade de Manaus, e, as complicações nos pacientes asplênicos. Em função das limitações dos ensaios clínicos, tornou-se necessário um modelo experimental adequado ao estudo da malária, no caso o camundongo, para responder como evolui o animal esplenectomizado com malária induzida pelo *Plasmodium berghei*.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Malária**

A malária é reconhecida como um grave problema de saúde do mundo, estimando-se segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), que 40% da população mundial viva em área de risco de transmissão da malária, em mais de cem países (ENGWERDA; BEATTIE; AMANTE, 2005; OMS, 2007). Ainda de acordo com a OMS, estima-se a ocorrência anual de 300 a 500 milhões de casos clínicos, e pelo menos um milhão de óbitos de crianças menores de cinco anos. A maioria dos óbitos, 90%, ocorre na África (RODRIGUES; TSUJI, 2000; BRASIL, Programa Nacional de Controle da Malária, 2003-PNCM; FERREIRA, M.S. Malária. Patologia, Fisiopatologia, Quadro Clínico e Diagnóstico. In: VERONESI: Tratado de Infectologia, 2005; OMS, 2007). Entre as doenças transmissíveis, a malária ainda é hoje o principal problema brasileiro (TAUIL, et al., 1985; BRASIL, PNCM, 2003), e continua sendo um grave problema de Saúde Pública na Região Amazônica (LADISLAU; LEAL; TAUIL, 2006).

No Brasil, a malária registra cerca de 600 mil casos por ano principalmente na região da Bacia Amazônica, incluindo os estados do Acre, do Amazonas, de Roraima, do Amapá, de Rondônia, do Pará, do Mato Grosso, do Tocantins e da região ocidental do Maranhão, onde ocorrem cerca de 99,5% dos casos, segundo os dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (2003). Devido a sua ampla incidência e aos efeitos debilitantes, a malária é a doença que mais contribui para a decadência do homem na Região Amazônica, além de reduzir os esforços das pessoas para desenvolver seus recursos econômicos, capacidade produtiva e melhorarem sua qualidade de vida. A incidência da malária na Amazônia continuou elevada em 2004, com incidência parasitária anual (IPA)



de 19,9 casos por 1000 habitantes (BRASIL, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2005).

A mais recente intervenção para controle da malária no Brasil foi o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Região Amazônica (PIACM), que foi lançado pelo Ministério da Saúde (MS) em julho de 2000, diante da grave situação da doença no país em 1999. O plano tinha como principal meta reduzir em 50% os casos da doença, até o final de 2002. Houve sensível redução no IPA em sete de nove Estados, representando uma queda no IPA da região de 31,9 para 19,9 no mesmo período. Embora a redução até 2002 tenha sido muito expressiva, a partir desse ano houve progressivo incremento, refletindo as dificuldades na sustentação das estratégias utilizadas até então para o controle dessa doença. Esse aumento pode ser atribuído, principalmente, às epidemias nas cidades de Porto Velho, Manaus e municípios do entorno, e Cruzeiro do Sul no Acre, iniciadas no ano de 2002 (BRASIL, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2005).

Na perspectiva de manter a malária em números aceitáveis no Brasil, surge em 2003, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) do Ministério da Saúde, com a proposição de fornecer as diretrizes para os governos federal, estadual e municipal, em parceria com a sociedade organizada, para desenvolverem as atividades necessárias ao controle da doença. Apesar dos avanços, diversos problemas não foram solucionados e a incidência da malária continua alta. A meta de eliminar a transmissão da malária em áreas urbanas nas capitais até 2006, não foi alcançada. Era preocupação do PNCM, ainda, ampliar o sistema de vigilância em estados não-amazônicos, onde nos últimos anos têm ocorrido surtos de malária. Estes Estados são receptíveis para a transmissão da doença, e o Serviço de Vigilância em Saúde de alguns municípios é carente de estrutura para o enfrentamento do problema (BRASIL, PNCM, 2003).

Apesar do desenvolvimento tecnológico e científico, a malária permanece como um dos maiores problemas de saúde a ser combatido. Segundo a OMS, a malária é a doença tropical mais preocupante, pois além de ser responsável por muitas mortes, é a enfermidade que mais acarreta problemas sócio-econômicos.

## **2.2 Risco da urbanização da malária**

Nos últimos anos, Manaus e Porto Velho apresentaram extensas áreas de aglomerados urbanos em regiões periféricas, configurando-se como importantes locais para a ocorrência da infecção por receberem intenso fluxo de pessoas que se deslocam de seus municípios em busca de oportunidades de trabalho ou necessidades comerciais. Esses dois municípios concentraram 26,9% e 22,9% dos casos de malária na Região Amazônica nos anos de 2003 e de 2004, respectivamente (BRASIL, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2005).

A expansão demográfica e econômica da capital do Amazonas é fruto da distorção de uma política de desenvolvimento que vem sendo posta em prática há décadas. O interior foi abandonado como se o Estado do Amazonas fosse apenas Manaus, a qual se transformou em cidade-estado. Sem uma política de fixação dos habitantes nos municípios do interior do Estado, a falta de estímulos às suas potencialidades econômicas e a expansão do Pólo Industrial de Manaus desencadearam o êxodo rural, ocasionando na capital uma expansão desordenada, manifestada pelas invasões na periferia urbana, tendo como consequência o desmatamento em amplas áreas, levando a perda do equilíbrio com o meio ambiente. Associados a estes fatores, somaram-se a construção de casas precárias, nas proximidades de igarapés, tanques para piscicultura, que juntos às condições ambientais de

calor e umidade, propiciam as condições adequadas à expansão dessa doença. Aproximou-se assim, esta população fragilizada de imigrantes internos e externos que, convivendo em precárias condições sociais e econômicas, tornou-se alvo fácil para as doenças entre as quais, a malária. O crescimento da população exacerbou as necessidades dos serviços de saúde e de ações sociais, com as repercussões decorrentes das desigualdades sociais, com reflexos nos índices das doenças infecciosas. Um aspecto importante na dinâmica da transmissão da malária, ocorrido no período do PIACM, foi o aumento do risco de urbanização da doença, contrariamente ao que o Plano previa em seu início (LADISLAU; LEAL; TAUIL, 2006).

A expansão da malária em 2005 não ocorreu apenas na cidade de Manaus (BRASIL, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2005), mas também em outros 15 municípios do estado, o que exigirá de nossos dirigentes uma mudança na política econômica e social, de modo a fixar os interioranos em seus municípios, e, até retornarem a estes, através de políticas de estímulos às suas potencialidades econômicas, gerando trabalho e riqueza. Não há planejamento urbano-ambiental para a expansão da capital amazonense, e há carência de informações à população de como se processa a transmissão da doença e de como evitá-la. Assim, grande parte do número de casos de malária em Manaus, estão diretamente ligados às invasões, ocorridas na periferia, que contribuem para a propagação da doença, posto que constituem processos de urbanização acelerados, desordenados, não acompanhados de infra-estrutura e serviços adequados, principalmente saneamento básico. Propiciam condições favoráveis à manutenção da endemia malárica na capital do Amazonas os seguintes fatores: a descontinuidade das medidas profiláticas; o aparecimento da resistência dos plasmódios às drogas; os fatores ambientais, econômicos, sociais e culturais, envolvendo o meio ambiente, natural e o construído, bem como a

expansão desordenada da cidade associados à vulnerabilidade da população da periferia (GONÇALVES, 1999).

### **2.3 Gravidade e importância da malária**

Na Amazônia, a maior parte dos casos é devido ao *Plasmodium vivax*. No entanto, é preocupante o incremento do percentual de casos de malária por *P. falciparum*, o que favorece a ocorrência da doença nas formas mais graves e de óbitos. No período de 1999 a 2004, houve aumento de malária pelo *P. falciparum* de 18,6% para 23,4%, e os Estados que contribuíram para este incremento foram: Amazonas, Amapá, Maranhão, Pará e Rondônia (BRASIL, A malária no Brasil, 2005). Outro fator a ser destacado, é que no ano de 2004 o grupo etário de 15 a 49 anos concentrou o maior percentual de casos – 59%, seguido dos grupos de até 15 anos – 32%, e acima de 49 anos – 9% (BRASIL, Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2005). A esplenomegalia em consequência de repetidos episódios da malária predispõe a lesão esplênica, particularmente nos casos de trauma de baixa intensidade (BOONE; WATTERS, 1995). A expansão da endemia na Amazônia e o risco da reintrodução da malária nas regiões onde ela já foi erradicada são problemas que devem causar crescente preocupação. Há risco de grandes epidemias, pois a maior parte da população não possui mais imunidade, se o parasita for introduzido, e as medidas imediatas de controle focal não se realizarem (TAUIL, et al., 1985; PNCM, 2003).

## 2.4 Confirmação diagnóstica

A confirmação do diagnóstico da malária é realizada pela demonstração da presença de parasitas em lâmina de sangue periférico: distensão e gota espessa. Estima-se que é possível encontrar parasitas quando a parasitemia é igual ou maior que dez parasitas por microlitro ( $\mu\text{L}$ ) (FERREIRA, M.S. Malária. Patologia, Fisiopatologia, Quadro Clínico e Diagnóstico. In: VERONESI: Tratado de Infectologia, 2005). A distensão do sangue periférico, corado com o Giemsa, permite a identificação da espécie infectante, o que é primordial importância para o tratamento. A gota espessa corada pelo azul do metileno-Giemsa, método de Walker, permite ter sensibilidade superior à distensão, quanto à detecção do plasmódio infectante, particularmente quando a parasitemia for baixa (SCHECHTER; MARANGONI, 1998). Inúmeros testes sorológicos para a detecção de anticorpos têm sido ensaiados nesta doença, mas nenhum deles, até o momento, pôde substituir a demonstração dos parasitas no sangue como método diagnóstico ideal nas formas agudas da doença (FERREIRA, M.S. Malária: Patologia, Fisiopatologia, Quadro Clínico e Diagnóstico. In: VERONESI: Tratado de Infectologia, 2005).

O diagnóstico hemoscópico, apesar de ser bastante específico, não é suficientemente sensível para detectar portadores assintomáticos, pessoas com baixa parasitemia e indivíduos que estejam entre uma crise e outra, ou, entre uma recaída e outra de malária pelo *P.vivax*. O diagnóstico sorológico permite a triagem em uma população, reduzindo-se o universo às pessoas com sorologia positiva. A sorologia encontra sua maior aplicação em áreas endêmicas, onde indivíduos parcialmente imunes raramente apresentam parasitas detectáveis por exame direto. Também se utiliza em locais onde existam focos isolados de transmissão em áreas não endêmicas, haja vista a enorme ameaça que representam em termos de malária pós-transfusional (TAUIL, et al., 1985). A

imunofluorescência indireta, hemaglutinação, ELISA e radioimunoensaio estão entre os mais usados rotineiramente, e tais métodos podem ser particularmente úteis em estudos soropidemiológicos, como a determinação da endemicidade de uma determinada área ou a identificação de um provável foco da doença. De todas as técnicas sorológicas mencionadas, a imunofluorescência indireta parece ser a mais sensível delas, e atualmente, tem sido a mais utilizada nos estudos de campo (FERREIRA, M.S. *Malária: Patologia, Fisiopatologia, Quadro Clínico e Diagnóstico*. In: VERONESI: *Tratado de Infectologia*, 2005). Uma limitação da imunofluorescência indireta, é que necessita de algum tempo para haver uma resposta do hospedeiro contra o parasita, e assim detectar-se os anticorpos testemunhas no soro (TAUIL, et al., 1985).

O método de diagnóstico oficialmente utilizado no Brasil é o de gota espessa que é simples, eficaz, baixo custo (PNM, 2003), de observação direta, exequível em campo, servindo não só para diagnosticar, mas também para monitorar a evolução clínica e terapêutica (FERREIRA, M.S. *Malária: Patologia, Fisiopatologia, Quadro Clínico e Diagnóstico*. In: VERONESI: *Tratado de Infectologia*, 2005).

## **2.5 Imunologia na malária**

A resposta imune do hospedeiro à malária é regulada tanto pelo sistema imune inato quanto pelo sistema imune adaptativo, bem como por fatores ambientais. A imunidade adquirida é espécie-específica e estágio-específica (MARSH, 1992). Em geral a aquisição da imunidade ativa contra a malária é lenta e necessita de repetidas exposições para ser mantida.

A imunidade inata na malária é composta por polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos e células “natural killer” (NK), esta última em particular possui papel relevante na lise de eritrócitos infectados pelo *Plasmodium*, pois é um importante produtor da citocina interferon (INF) (MOHAN; MOULIN; STEVENSON, 1997). As células NK são ativadas via receptores de célula T (TCR) quando ocorre associação deste receptor com moléculas de MHC I (PORCELLI; MODLIN, 1999). As células T apresentam forte expansão precocemente na infecção pelo plasmódio, contribuindo para o controle inato da malária. A ativação da imunidade inata e, portanto, de ligações não-antígeno-específica resulta em uma rápida secreção de citocinas pró-inflamatórias (PERLMANN; TROYE-BLOMBERG, 2002).

As citocinas pró-inflamatórias estão associadas à proteção contra os parasitas, principalmente o fator de necrose tumoral (TNF), que atua como agente protetor (TAVERNE; TAVERNIER; PLAYFAIR, 1987), sendo que concentrações elevadas desta citocina foram relacionadas com maior severidade da doença e com a mortalidade (KWIATKOWSKI, 1990). Em ratos a eliminação de parasitas pré-eritrocíticos requer principalmente células efectoras CD8+ produtoras de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) o qual elimina parasitas nos hepatócitos infectados (SCHOFIELD, et al., 1987).

Nagao e colaboradores (2008) referiram uma forte associação entre a Interleucina-12 (IL-12) e a parasitemia do *P. vivax*, sugerindo que seja o mediador direto desde a ruptura dos esquizontes até o episódio febril. A IL-12 e IFN- $\gamma$  reforçam sinergicamente a eliminação de plasmódios pelos mononucleares do sangue periférico. Por isso, se observa picos elevados de INF- $\gamma$  na presença da IL-12.

Principalmente em residentes de áreas endêmicas, a malária induz uma forte resposta imune humoral, com a produção predominante de IgM e IgG, porém esta infecção

promove um aumento das concentrações séricas de imunoglobulinas não específicas, devido a ativação policlonal de células B (PERLMANN; TROYE-BLOMBERG, 2002).

A imunidade protetora à malária adquirida em resposta à infecção natural é mediada por imunoglobulinas IgG, com especificidade para parasitas sanguíneos na fase assexuada. Não estão claro quais são os epítomos fundamentais reconhecidos por estes anticorpos e por quais mecanismos de sinalização de anticorpos os parasitas são neutralizados (HVIID; BARFOD, 2008). Os anticorpos contra os esporozoítos têm uma função menos importante.

O modelo experimental camundongo tem sido de importância ímpar no estudo dos potenciais mecanismos de proteção, no entanto, os parasitas de roedores não são patógenos naturais dos camundongos, sendo que muito do conhecimento foi adquirido através de infecções iniciadas por rotas não-naturais (LANGHORNE, et al., 2008).

Estudos envolvendo populações expostas à malária sugerem que a resposta imune na fase pré-eritrocitária da doença é limitada (OWUSU-AGYEI, et al., 2001), sendo que a expansão dos parasitas somente é efetivada na fase sanguínea, e normalmente é feita pela resposta imune humoral. Os mecanismos de ação da imunidade humoral na malária incluem a morte celular dependente de anticorpos e mediada por imunoglobulinas citofílicas (BOUHAROUN-TAYOUN, et al., 1995), o bloqueio da invasão dos eritrócitos pelos merozoítos (BLACKMAN, et al., 1990), e a ligação dos anticorpos na superfície de eritrócitos parasitados, induzindo um maior *clareamento* destas células (BULL, et al., 1998). Estudos em humanos e estudos experimentais com ratos demonstram o papel fundamental da morte celular dependente de anticorpos (JAFARSHAD, et al., 2007), entretanto alguns poucos estudos com modelo camundongo sugerem que o parasita pode ser eliminado sem a necessidade de opsonização (ROTMAN, et al., 1998; TAYLOR, et al., 2001).



O genoma de cada parasita contém genes que codificam moléculas chamadas PfEMP1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*), as quais estão situadas na superfície da eritrócitos infectados, onde funcionam como adesinas que permitem aos eritrócitos maduros se ligarem a receptores vasculares, assim impedindo a capacidade do hospedeiro de remover os eritrócitos infectados no baço. Variantes do PfEMP1 tem sido implicadas na patogênese e na imunidade protetora à malária por *P. falciparum*. Moléculas homólogas do PfEMP1 estão ausentes nos parasitas de roedores, sendo necessário portanto a adaptação do modelo murino através de tecnologia recombinante (HVIID; BARFOD, 2008).

Segmentos do PfEMP1 expostos na superfície celular são o mais óbvio alvo dos anticorpos protetores. Diferentes PfEMP1 antígenos têm afinidade para diferentes receptores, e o fato de o parasita poder alternar a expressão de receptores, expressando um variante por vez, atrasa o desenvolvimento da imunidade protetora (HVIID; BARFOD, 2008).

Uma complicação da infecção pelo *P. falciparum* que leva ao risco de morte é a malária cerebral. Sua patogênese é complexa e ainda não se sabe por qual razão somente um grupo de pacientes a desenvolve, ou ainda, o papel dos anticorpos no desenvolvimento ou proteção contra essa complicação. Diversos fatores tais como o seqüestro de eritrócitos infectados, citocinas inflamatórias e quimiocinas têm sido implicados em sua patogênese. A proteína de superfície dos merozoítos - 1 (MSP-1) é um dos mais bem caracterizados antígenos de *P. falciparum*. Durante a esquizogonia tardia, a MSP-1 é processada, e transformada em subunidades, as quais são essenciais para a invasão das hemácias. (LUCCHI, et al., 2008).

Tem sido demonstrado que anticorpos específicos para essas subunidades antigênicas inibem tanto a invasão de eritrócitos quanto o crescimento de parasitas *in vitro*.

Alguns estudos referem que as respostas de anticorpos ao MSP-1 foram correlacionadas com a imunidade clínica ao plasmódio, com a redução da parasitemia e da febre (LUCCHI, et al., 2008). Além disso, foram identificados inúmeros epítomos de linfócitos T dentro da subunidade MSP-1<sub>42</sub>, os quais podem auxiliar a função *T helper* necessária a produção dos anticorpos anti-MSP1 (LUCCHI, et al., 2008).

Não se conhece com exatidão os mecanismos da gênese da imunodepressão que acompanha a infecção malárica humana e experimental (DEMAR, et al., 2004). A esplenectomia parece remover uma fonte importante de macrófagos/monócitos do local do processo de reações imunes. A produção reduzida de ânion superóxido em esplenectomizados pode ser um dos fatores implicados na resposta deficiente do hospedeiro às infecções (BRANDT, et al., 2005).

## **2.6 Esplenectomia e malária experimental**

A maior parte dos conhecimentos sobre a função esplênica foi adquirida por meio de trabalhos experimentais. Muito pouco se sabe sobre a fisiologia do baço, daí a importância dos estudos em animais para compreender melhor este órgão. Desde o século XIX, as múltiplas operações sobre o baço têm constituído modelos experimentais úteis a várias pesquisas. As repercussões da esplenectomia no sistema mononuclear fagocitário têm sido amplamente estudadas por meio experimental. O acentuado decréscimo inicial de IgM, e de C<sub>3</sub> (a proteína mais abundante do complemento), e de outras opsoninas, como a tuftsin e a properdina, são compensadas pelo organismo. Esta adaptação ainda não foi bem estabelecida e constitui um assunto importante para se investigar (PETROIANU, 2003).

O baço é um ponto importante de encontro entre a informação antigênica do sangue e o sistema imune, devido a sua grande irrigação e a posição central na corrente sangüínea (TIMES; LEEMANS, 1991; BRANDT, et al., 2005). Muitos autores consideram que o baço tem papel fundamental na proteção antimalárica. Há dificuldade do entendimento de como atuaria esse órgão nessa doença.

As limitações dos ensaios clínicos impõem a realização de pesquisas em modelos experimentais para elucidar mecanismos e as respostas fisiopatológicas, imunológicas, entre outras. Imposições éticas impedem a realização de estudos seqüenciais em humanos, para uma maior compreensão da sucessão de eventos que ocorrem em um paciente com malária. Assim, os trabalhos experimentais formam a base para que os ensaios clínicos possam ser delineados com menor risco para os pacientes, mais consistentes, dando suporte às hipóteses a serem testadas.

Os roedores são os que melhor reproduzem as características clínicas e patológicas da malária no homem (NITICHEU, et al., 2003), no entanto, não existe um modelo murino que reproduza todas as características da malária em humanos (HUNT; GRAU, 2003). O *P. berghei* parasita os reticulócitos (NOGAMI, et al., 1998) assemelhando-se neste aspecto ao *P. vivax*, o qual predomina como agente infectante da doença na Amazônia brasileira (BRASIL, Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2005).

## **2.7 Os acidentes e as violências gerando pacientes asplênicos no Brasil**

A pobreza, a ignorância e os desajustes sociais são fatores geradores de violências e traumas. Neste contexto, analisaram-se os registros dessas ocorrências no SAME PS 28 de Agosto, no período de janeiro de 1999 a dezembro 2006, como uma amostra do trauma e da

violência na cidade de Manaus. Encontraram-se os seguintes resultados: acidente de trânsito 37,6%; violência interpessoal 32,3%; outras causas 30,1%, todos com potencial de gerar pacientes asplênicos, principalmente os acidentes de trânsito (BIROLINI; OLIVEIRA, 1985; PITCHER; CADE; MACKAY, 1989; RABELO; ABRANTES; DRUMOND, 1991; REZENDE; PETROIANU, 1998; OSIFO; ENEMUDO; OVUENI, 2007), que predominaram com aproximadamente 38%. Esses dados correspondem aos relatados por (BIROLINI. In: DRUMMOND, 1992): 1/3 acidente de trânsito; 1/3 violência interpessoal e 1/3 outras causas, e mais próximos ainda das ocorrências em nosso país atualmente, de 40% (TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE x TRAUMA, 2008). O trauma é a primeira causa de mortalidade na faixa de 5 a 40 anos; é também o responsável por cerca de 50% das mortes entre 1 a 15 anos (DRUMMOND, 1992; BRASIL, Portaria MS n. 737, 2001). Observa-se que há coincidência entre as faixas etárias onde ocorrem as maiores incidências de trauma e malária: de 0 a 40 anos. (BRASIL, Resolução CNS n. 309, 2001; BRASIL, Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2005).

A ablação total do tecido esplênico vem aumentando em áreas endêmicas de malária, como na cidade de Manaus, tornando os pacientes asplênicos mais susceptíveis a infecções graves por bactérias ou por parasitas como na malária.

## **2.8 Infecção fulminante pós-esplenectomia**

A esplenectomia total aumenta o risco de morte por infecção fulminante, tanto em adultos como em crianças, independente da indicação ou da época após a cirurgia (DI GREGORIO et al., 1996; TORRES, et al., 2000; MARQUES; PETROIANU, 2003). A

causa de sepse pós-esplenectomia não é inteiramente conhecida, mas dois fatores estão certamente envolvidos em sua patogenia: celular (fagocitose) e humoral (produção de anticorpos), ambos exercidos pelo sistema mononuclear fagocitário (MARQUES; PETROIANU, 2003).

King e Schumacker Jr. (1952) relataram complicações infecciosas graves pós-esplenectomia, constituindo-se no marco da literatura para a comprovação da associação entre esplenectomia e sepse. A alta mortalidade (50 a 80%) levou ao desenvolvimento dos tratamentos cirúrgicos conservadores. Embora haja grande número de casos publicados de infecção fulminante pós-esplenectomia, ainda não existem dados suficientes para determinar sua real incidência, o mecanismo exato da infecção, os fatores de risco associados, bem como as condições necessárias para o desenvolvimento da infecção fulminante no hospedeiro esplenectomizado (MARQUES; PETROIANU, 2003). Os indivíduos asplênicos e hipoasplênicos são mais susceptíveis a cursos fatais de malária. A importância do baço na infecção malárica reflete-se na esplenomegalia que se desenvolve com infecções repetidas. A função fagocitária esplênica é de primordial importância nessa enfermidade, e a esplenectomia total resulta na exacerbação do número de hemácias parasitadas na circulação (ALVES; WEIDANZ; WEISS, 1996; MARQUES; PETROIANU, 2003; ENGWERDA; BEATTIE; AMANTE, 2005; FAUCHER, et al., 2006). A IgM participa ativamente da defesa aguda contra infecções; é uma das opsoninas reduzida pela ablação total esplênica. O baço é o principal produtor de IgM do organismo (ALBERTI, et al., 2007). Pouco se sabe sobre o efeito da esplenectomia na malária humana. Há pequeno número de casos africanos, asiáticos e americanos descritos na literatura, com conclusões que não se apóiam (DEMAR, et al., 2004). No Brasil, há relato de malária letal pelo *P.malariae* em paciente asplênico, transmitida por transfusão sanguínea (KIRCHGATTER, et al., 2005).

## 2.9 Importância do baço

O baço é o maior órgão linfóide e o mais vascularizado do corpo humano. Com localização ímpar entre as circulações sistêmica e a porta, é o elemento chave para remoção de hemácias durante a infecção malárica. A parasitemia tem seu controle dependente de um baço intacto (ENGWERDA; BEATTIE; AMANTE, 2005), sendo a malária em pacientes asplênicos graves e geralmente mortais (FAUCHER, et al., 2006).

As duas atividades mais importantes do baço no homem são as funções imunológicas e fagocitárias, as quais decorrem de sua composição, da riqueza da sua irrigação e por sua estrutura peculiar sendo comparado com um filtro interposto na circulação, da qual remove partículas, como células sangüíneas comprometidas, microorganismos e imunocomplexos.

Com estruturas distintas e funcionalmente associadas, o baço é constituído pela polpa branca, composta por células imunes, e pela polpa vermelha formada por uma rede de filtração e um depósito de células do sangue (CESTA, 2006). O baço retira do sangue hemácias senescentes, aberrantes, imunologicamente comprometidas, além de elementos particulados do sangue (KRÜCKEN, et al., 2005). O baço é o órgão responsável pelo clareamento dos parasitas, realizada através da rede de filtração localizada na polpa vermelha (ALVES; WEIDANZ; WEISS, 1996). Na malária, o aumento rápido de carga parasitária implica na necessidade de uma grande e rápida ampliação dessa rede para contrastar a parasitemia e garantir a resolução da infecção (GARNICA, et al., 2002).

Em pacientes asplênicos, observa-se uma dificuldade em realizar o clareamento do sangue, em controlar a infecção e evitar a reincidência da doença (FAUCHER, et al., 2006). A ablação total do órgão vem aumentando em áreas endêmicas de malária tornando os pacientes mais susceptíveis a infecções por bactérias e parasitas como na malária

(PETITHORY, et al., 2005). Em pacientes asplênicos que desenvolvem malária por *P. falciparum*, o risco é maior e a doença mais severa, em função da maior carga parasitária, apesar da administração correta do tratamento (DEMAR, et al., 2004; BACH, et al., 2005). O aumento da parasitemia causa um grande acúmulo de eritrócitos, levando a uma grande congestão do baço e em consequência, uma obstrução da circulação esplênica por volta do quarto dia após a infecção, e parada completa do fluxo sanguíneo no oitavo dia de infecção (KRÜCKEN, et al., 2005). A ampliação da rede de filtração, com influxo, proliferação e ativação de vários tipos celulares resulta na ampliação da capacidade do baço em realizar um rápido clareamento dos eritrócitos parasitados e de controlar a malária, além de permitir a realização da hematopoiese extramedular (GARNICA; SILVA; ANDRADE, 2003).

Durante o processo de ampliação do baço que ocorre na infecção malárica, todas as estruturas esplênicas, bem como as células que as compõem, arranjam-se, interagem entre si, e migram de uma região para outra promovendo uma maior capacidade do baço para resolução da infecção. Tal arranjo e interação são observados em malárias humanas (URBAN, et al., 2005) como de roedores (LEISEWITZ, et al., 2004), onde os limites entre as polpas branca e vermelha, assim como da zona marginal desaparecem durante a infecção.

Ocorrem disfunções hematopoiéticas na medula durante a infecção malárica, tornando-se os sítios com hematopoiese extramedular, como o baço, um importante local de hematopoiese durante essa doença. O baço é um importante local de hematopoiese e eritropoiese extramedular durante a malária. Este órgão não remove apenas as hemácias parasitadas da circulação, mas também remove os parasitas de seu interior desenvolvendo-as à circulação intactas (ENGWERDA; BEATTIE; AMANTE, 2005).

Quando o sangue entra no baço, o fluxo é reduzido na zona marginal, e o antígeno pode ser captado pelos macrófagos. Tanto a zona marginal como a polpa vermelha são locais potenciais para remoção de eritrócitos durante a malária, e o local de remoção dos

eritrócitos parasitados é de fundamental importância para a compreensão de como a resposta imune pode ser gerada contra o parasita e sua etiopatogenia (ENGWERDA; BEATTIE; AMANTE, 2005).

## **2.10 Esplenectomia total e técnicas conservadoras no trauma esplênico**

É notável que um indivíduo possa sobreviver à remoção de um órgão importante como o baço. A esplenectomia total, geralmente não causando severas complicações, sugere a existência de mecanismos compensatórios para a perda de várias funções esplênicas. Entretanto, vários efeitos da ablação total do baço são relatados, sendo essas influências na sua maior parte relacionadas às funções esplênicas no sistema imune. Relatou-se que a esplenectomia total afeta os níveis de imunoglobulinas no soro, em particular a IgM. Estes resultados são interpretados como indicação da existência de um mecanismo compensatório à nível de linfócitos B (ROZING; BRONS; BENNER, 1977). A retirada do baço repercute em outros órgãos, sobretudo na medula óssea, no sistema mononuclear fagocitário, nos linfonodos e no fígado (PETROIANU; MIRANDA; OLIVEIRA, 2008).

Constatou-se que após a retirada do baço, os pacientes morriam em maior número e mais precocemente do que a expectativa da população geral, não somente consequência de infecções graves, mas também por embolia pulmonar, infarto agudo do miocárdio e fenômenos ateroscleróticos (KING; SCHUMAKER JR, 1952; PIMPL, et al., 1989; ALBERTI, et al., 2007).

A esplenectomia parcial já havia sido descrita no início do século XIX, mas, somente após as publicações de Campos Christos (1959) este procedimento foi introduzido



na prática cirúrgica. A vascularização segmentar e terminal constituíram-se na base anatômica das esplenectomias segmentares (PINHEIRO,1982 ACCETTA, P; ACCETTA, I; PERROTA, 1983; RESENDE; PETROIANU, 1998).

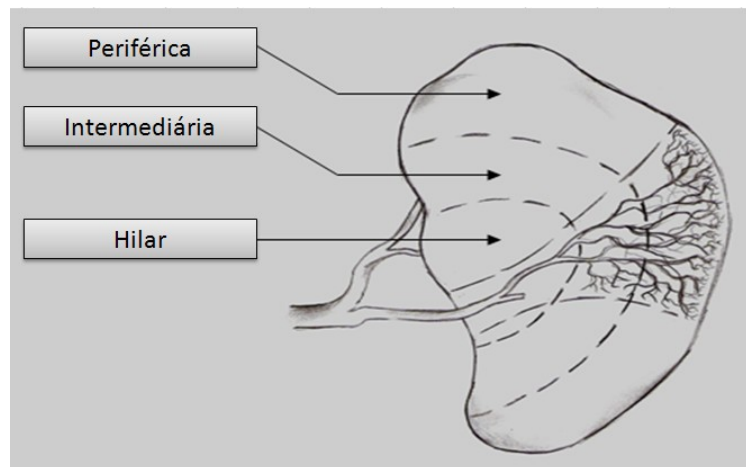


Figura 1. Divisão das áreas do baço.

A preservação do pólo superior esplênico, após a ligadura do pedículo vascular, foi proposta por Petroianu em 1982, e tem sido estudada clínica e experimentalmente em diversos trabalhos, e vem sendo realizada com sucesso desde 1984, posto ter o baço dupla irrigação dessa área (RESENDE; PETROIANU, 1998; PETROIANU, 2003).

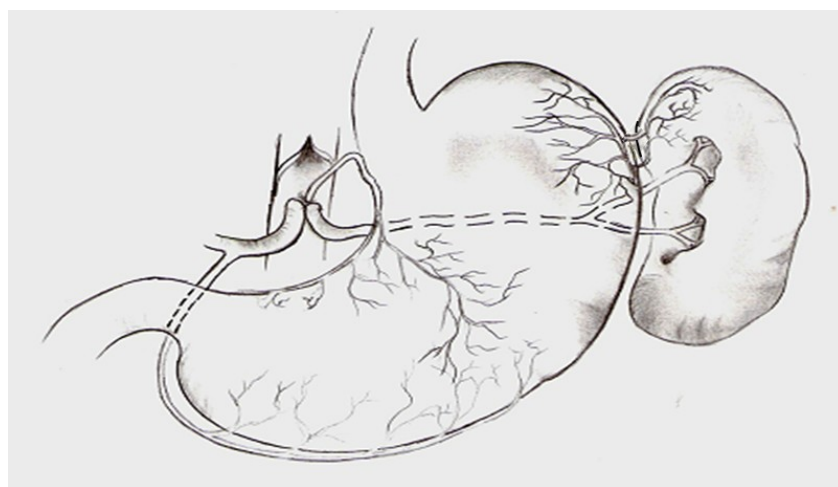


Figura 2. Dupla irrigação do baço

O baço é um dos órgãos mais lesados nos traumatismos abdominais fechados, principalmente em crianças (REZENDE; PETROIANU, 1998) e, é freqüentemente foco de lesões nos ferimentos penetrantes do flanco esquerdo, da transição tóraco-abdominal e do dorso (BIROLINI; OLIVEIRA, 1985; KOBATA; CHACON; LEONARDI, 1986; FISCHER; SIEBERT JÚNIOR. Trauma esplênico. In: Cirurgia do Trauma, 2003). As lesões esplênicas iatrogênicas são relativamente freqüentes no curso de operações no abdome superior, especialmente nas gastrectomias (PATIÑO, 2006). A causa mais comum de lesão esplênica é o traumatismo abdominal fechado produzido por acidente automobilístico (BIROLINI; OLIVEIRA, 1985; PITCHER; CADE; MACKAY, 1989; RABELO; ABRANTES; DRUMOND, 1991; SEPETIBA, et al., 1992; RESENDE; PETROIANU, 1998).

Analisaram-se os procedimentos cirúrgicos realizados nas lesões esplênicas, em 93 pacientes no PS 28 de Agosto, no período de julho de 2003 a julho de 2008. A esplenectomia total foi o procedimento mais realizado, em 73 pacientes (80%). Estes dados encontram-se como relatados por Sepetiba e colaboradores(1992), de que a ablação total esplênica foi o principal tratamento realizado.

Com as novas abordagens cirúrgicas aumentaram definitivamente as perspectivas e informações científicas, as quais contribuiram para rever conceitos, incentivar pesquisas e atualizar condutas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Estudar os efeitos das esplenectomias nos diferentes grupos de camundongos, esplenectomizados e não esplenectomizados, na infecção malárica induzida pelo *Plasmodium berghei*.

#### **3.2. Específicos**

3.2.1 Comparar a parasitemia e a sobrevivência nos camundongos com malária experimental, submetidos à esplenectomia total e parcial com os não esplenectomizados;

3.2.2 Comparar os níveis das imunoglobulinas IgM e IgG, no tempo do experimento, nos diferentes grupos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Modelo de estudo**

Estudo experimental em camundongos (*Mus domesticus domesticus*), linhagem *Swiss*, para avaliar a ação do *Plasmodium berghei* em animais esplenectomizados e não-esplenectomizados, com o objetivo de analisar a sobrevivência, a parasitemia, e os níveis de imunoglobulinas totais nos diferentes grupos. Optou-se pelo modelo murino por ser de fácil manuseio, baixo custo e boa tolerância a procedimentos cirúrgicos. O camundongo é o modelo experimental mais utilizado na pesquisa biomédica, que abrange imunologia, hematologia, parasitologia, entre outros (ANDERSEN, et al., 2004; LANGHORNE, et al., 2008).

O trabalho foi realizado observando-se os Princípios Internacionais para Pesquisa Biomédica envolvendo Animais (apud ANDERSEN, et al., 2004), e os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (1991).

### **4.2 Universo do estudo e condições ambientais**

Foram utilizados 50 camundongos fêmeas, não isogênicas, com quatro a cinco semanas de vida, pesando entre 15 a 20 gramas (g), fornecidas pelo Biotério da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os animais passaram por um período de aclimação de sete dias como preconizado por Waynforth e Flecknell (1992), em gaiolas de polipropileno com maravalha autoclavada e tampa de aço, cinco animais em cada uma,

em condições de temperatura de aproximadamente 27° C e 80% de umidade. Os camundongos tiveram livre acesso à água mineral e à ração comercial adequada à espécie (Labina® – ração para animais de laboratório), e foram mantidos em ciclos claro-escuros de 12 horas.

### **4.3 Projeto piloto**

Foram utilizados três camundongos nas mesmas condições (sexo, tempo de vida, peso e ambientais) dos utilizados no experimento. Foram testadas as substâncias e dosagens para pré-anestesia, sedação e anestesia; a coleta de sangue para o exame e confecção do esfregaço e para a titulação das imunoglobulinas. Finalmente, a inoculação intraperitoneal (i.p.) e as técnicas operatórias propostas foram realizadas, permitindo assim, a escolha mais adequada dos materiais e dos procedimentos.

### **4.4 Divisão em grupos e procedimentos**

Os animais foram recebidos, cinco animais em cada gaiola, para um período de aclimação de sete dias. No 6º dia os camundongos foram pesados e divididos aleatoriamente e equitativamente através de sorteio, em cinco grupos. A identificação individual dos animais e dos grupos realizou-se através de tintas não-tóxicas nas caudas dos camundongos, como estabelecido no protocolo de identificação. Os grupos também foram identificados pelas gaiolas. Anexo 9.1.

**Grupo 1.** Controle (n = 10): Nenhuma intervenção.

**Grupo 2.** Controle (n = 10): Anestesia geral, laparotomia e inoculação de sangue citratado não contaminado.

**Grupo 3.** (n = 10): Anestesia geral, laparotomia e inoculação de sangue citratado contaminado pelo *Plasmodium berghei*.

**Grupo 4.** (n = 10): Anestesia geral, laparotomia, esplenectomia parcial com remoção de 50% do baço, e inoculação do sangue citratado contaminado pelo *P. berghei*.

**Grupo 5.** (n = 10): Anestesia geral, laparotomia, esplenectomia total, e inoculação de sangue citratado contaminado pelo *P. berghei*.

## 4.5 Procedimento experimental

### 4.5.1 Pré-operatório

Cerca de três horas antes da cirurgia, os camundongos foram pesados e colocados em jejum para alimentos sólidos. As identificações individuais e dos grupos foram refeitas, e o peso de cada animal anotado em folha própria, para o cálculo das substâncias para o ato anestésico. Foram descartados um animal do Grupo 1 e dois do Grupo 2 por pesarem menos de 15 gramas.

### 4.5.2 Pré-anestesia

Utilizou-se como medicação pré-anestésica o sulfato de atropina, na concentração de 0,025%. Esta substância foi administrada via intra-muscular (i.m.), nos músculos do membro posterior à esquerda, com agulha 15 x 5G, seringa de um mL, na dosagem de 0.045 mg/kg, 15 minutos antes da cirurgia (MASSONE, 1998; ANDERSEN, et al., 2004).

#### 4.5.3 Ato anestésico

A anestesia foi administrada por via i.m., nos músculos do membro posterior, à direita, como preconizado por Waynforth e Flecknell (1992).

Utilizou-se a associação das substâncias nas dosagens de 16 mg/kg de cloridrato de xilazina (CX) 2%, e 60 mg/kg de cloridrato de quetamina (CQ) 5% (MASSONE, 1988; WAYNFORTH; FLECKNELL, 1992; XU, et al., 2007).

Após a imobilização farmacológica, o animal foi posicionado na mesa cirúrgica, em decúbito dorsal, e realizada a remoção dos pêlos da parede anterior do abdome, e da base anterior do tórax.

#### 4.5.4 Ato operatório

A anti-sepsia foi realizada com solução de polivinilpirrolidona iodo (PVPI) 10% (Fig. 3), e a seguir colocou-se o campo operatório (Fig.4). A técnica cirúrgica foi asséptica, seguindo os seguintes tempos operatórios:

##### **Nos grupos G2 e G3:**

Incisão mediana de aproximadamente dois centímetros (cm), seccionando todos os planos da parede abdominal (Fig.5). Mobilização do baço para o campo operatório, retornando a seguir ao seu sítio anatômico (Fig.6). Síntese da parede abdominal com chuleio simples em plano único, com fio de nylon 5-0 (Fig.14).

##### **No grupo G4:**

Incisão mediana de aproximadamente dois cm, seccionando todos os planos da parede abdominal (Fig.5). Mobilização do baço para o campo operatório (Fig.6) e exposição dos vasos esplênicos (Fig.7 e Fig.8) Ligadura dos vasos junto ao tecido esplênico a ser ressecado com fio de nylon 5-0, e sutura transfixante do baço, ponto em U, com fio de nylon 5-0, agulha traumática de 1,5 cm (Fig.9), e remoção de aproximadamente 50% da

massa esplênica (Fig.10). Síntese da parede abdominal com chuleio simples em plano único, com o mesmo tipo de fio cirúrgico (Fig.14).

### **Grupo 5:**

Incisão mediana de aproximadamente dois cm, seccionando todos os planos da parede abdominal (Fig.5). Mobilização do baço para o campo operatório (Fig.6). Exposição dos vasos esplênicos (Fig.7 e Fig.8). Ligadura dos vasos dos pedículos esplênico com fio de nylon 5-0 (Fig.11), e ablação total do baço (Fig.12). Síntese da parede abdominal com chuleio simples em plano único, com fio de nylon 5-0 (Fig.14).

O curativo da ferida operatória foi do tipo aberto, e tratado com cloreto de sódio (NaCl) 0,9% para limpeza da pele, e a seguir enxugou-se com gaze estéril. Posteriormente, aplicou-se a solução PVPI 10%. Todos os procedimentos anestésicos e cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Fundamentos de Cirurgia e Anestesia, do Departamento de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da UFAM.



Figura 3. Anti-sepsia e teste de reflexo

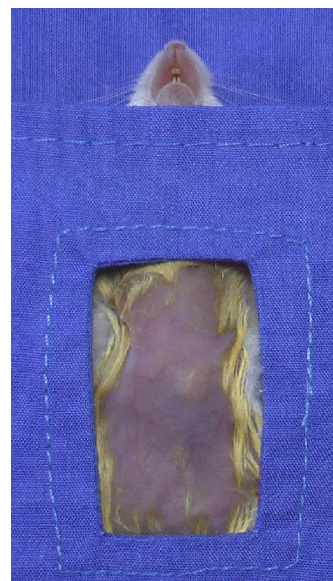


Figura 4. Assepsia





Figura 5. Incisão em epigástrico e mesogástrico



Figura 6. Mobilização do baço para o campo operatório

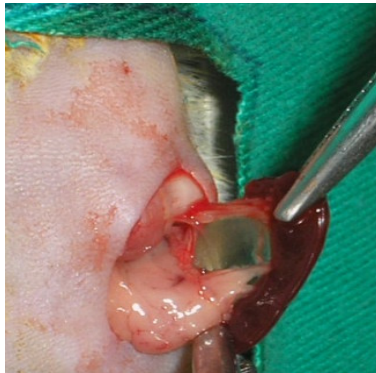


Figura 7. Exposição dos pedículos vasculares

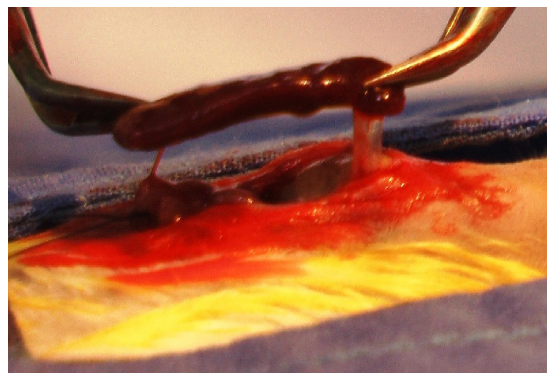


Figura 8. Exposição dos vasos esplenogástricos

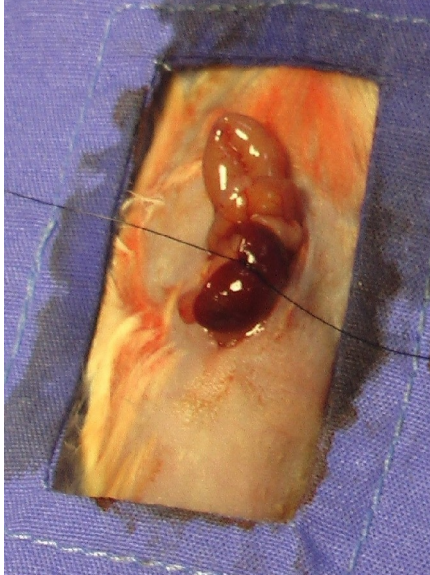


Figura 9. Ligadura dos vasos do segmento a ser ressecado. Sutura esplênica.

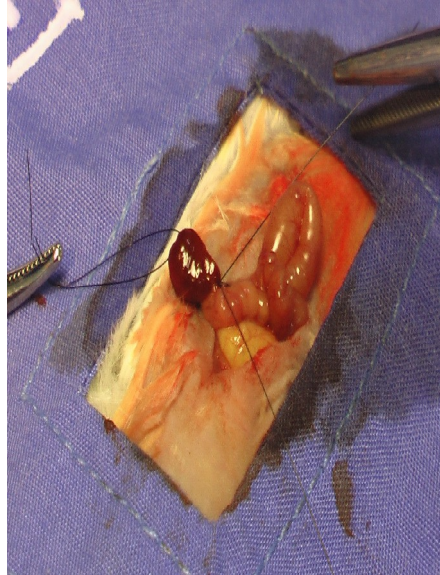


Figura 10. Aspecto final da esplenectomia parcial

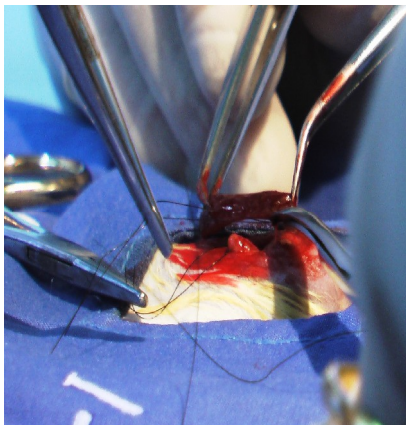


Figura 11. Ligadura dos dois pedículos vasculares para a esplenectomia total

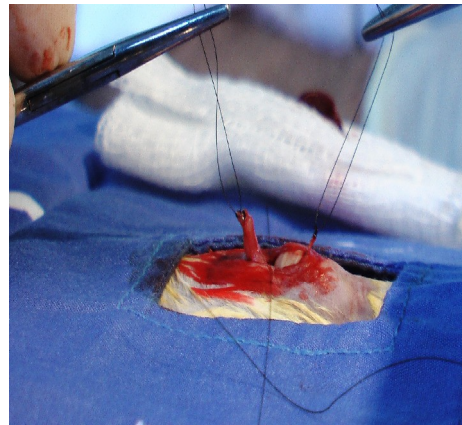


Figura 12. Aspecto final da esplenectomia total

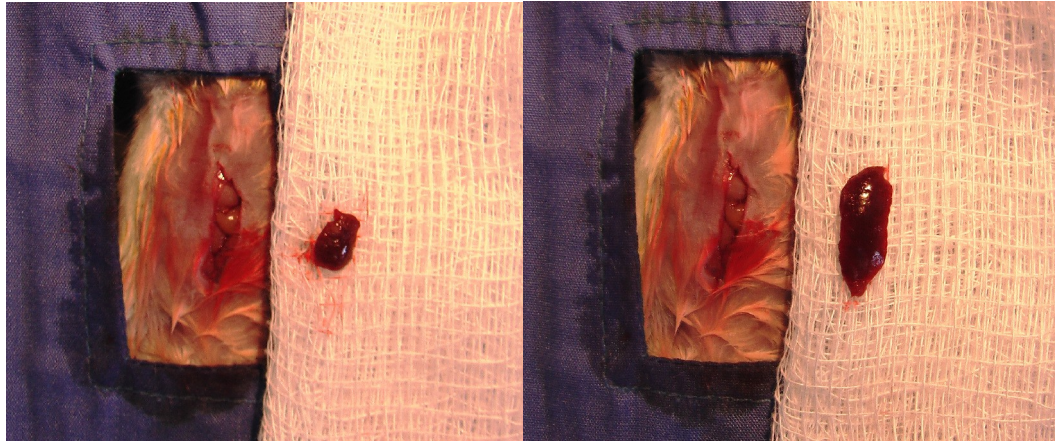


Figura 13. Comparação entre as esplenectomias parcial e total

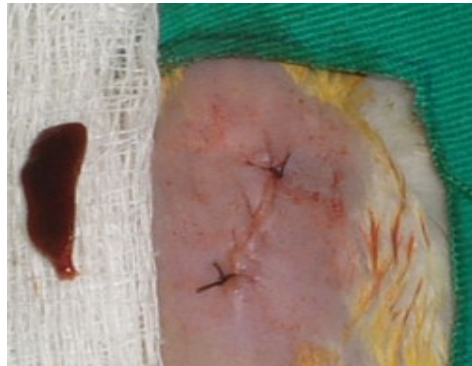


Figura 14. Síntese da parede

#### 4.5.5 Recuperação pós-anestésica e pós-operatória

Ao término das cirurgias, os camundongos foram hidratados com dois mL de NaCl 0,9% por via subcutânea (s.c.), nas áreas dorsolaterais da região cervical, com agulha 15 x 5G (ANDERSEN, et al., 2004) (Fig.15). A seguir os animais foram colocados em mesas de Mayo cobertas com campos duplos e lâmpada incandescente do foco cirúrgico, para proporcionar a temperatura de aproximadamente 30° C, na recuperação pós-anestésica.

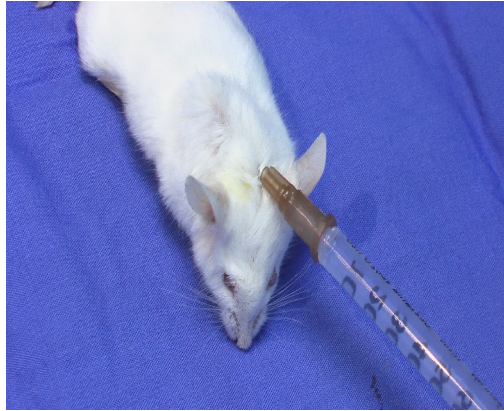


Figura 15. Hidratação pós-operatória.

Os animais foram observados e avaliados continuamente, e reavaliados ao término da cirurgia, aos 30 e aos 60 minutos. Anexo 9.2.

Através da resposta ao estímulo do pinçamento dos dedos das patas posteriores, avaliou-se a profundidade da anestesia. A ausência de resposta confirma o estágio anestésico-cirúrgico. Através da frequência respiratória e da coloração das patas, orelhas e focinhos, avaliou-se a função respiratória. Na ocorrência de insuficiência respiratória caracterizada pela frequência respiratória menor que 60 respirações / minuto, e / ou cianose de extremidades, procedeu-se a aspiração da orofaringe com agulha de gavagem para camundongo, conectada a seringa de três mL. A seguir administrou-se ar atmosférico através de máscara e respirador artesanal. Fig.16 e 17. No período de recuperação pós-anestésico, houve um óbito do Grupo 4 e um do Grupo 5. Não se encontrou sangramento no exame da cavidade peritoneal, o que levou à suposição de causa anestésica. Após a observação de 60 minutos, os animais foram avaliados e receberam pontuação pós-anestésica. Anexo 9.2

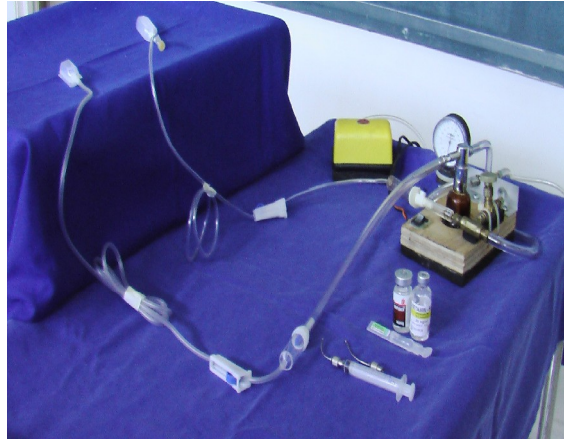


Figura 16. Vaporizador artesanal, materiais e substâncias anestésicas

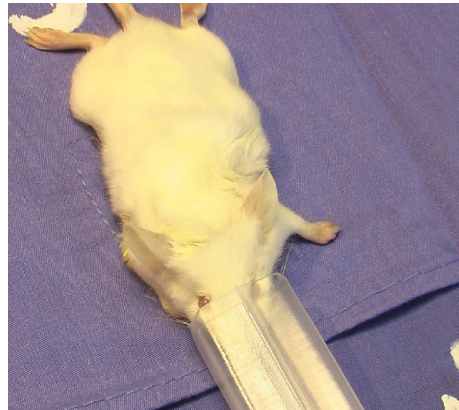


Figura 17. Utilização de máscara e respirador artesanal.

A cada três dias, as marcações individuais e dos grupos foram refeitas com tinta nas caudas dos animais. Na recuperação pós-operatória, os camundongos foram acompanhados e avaliados diariamente até o terceiro dia, e a seguir, de três em três dias por 12 dias. No 4º dia de pós-operatório houve um óbito do Grupo4. Na inspeção da cavidade peritoneal não se encontrou secreção purulenta ou sangue. Anexo 9.3

#### 4.6 Inoculação do plasmódio

Os inóculos iniciais da cepa ANKA do *Plasmodium berghei* foram fornecidos pelo Instituto René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz de Minas Gerais. A amostra de sangue foi descongelada à temperatura ambiente, e realizaram-se dois exames de esfregaço desta amostra, para determinação do índice de parasitemia. A seguir inoculou-se 0,1 mL do sangue associado a 0,1 mL de NaCl 0,9% via intra-peritoneal (i.p), em oito camundongos. Acompanhou-se através do exame de esfregaço a ascensão da parasitemia, e quando alcançou o percentual de 10%, retirou-se o sangue dos camundongos por punção do plexo venoso retro-ocular, sob sedação, com metade da dose anestésica preconizada. Como anticoagulante utilizou-se o citrato trissódico, na proporção de cinco partes de sangue para uma de anticoagulante, e encaminhado para a infecção dos grupos experimentais.

No 12º dia de pós-operatório, os animais dos grupos 3, 4 e 5 foram infectados via i.p., com um inóculo de  $10^6$  eritrócitos parasitados, contidos em 0,1 mL de sangue associado a 0,1 mL de NaCl 0,9%. Para a inoculação utilizou-se seringa de um mL e agulha 15 X 5G, puncionando-se o quadrante inferior esquerdo do abdome. Fig. 18

A técnica de contagem de hemácias na câmara de Neubauer utilizou a diluição em pipeta de Thomas (microdiluição). Anexo 9.4

Para a inoculação do sangue citratado não infectado, utilizou-se a mesma técnica de sedação, e os mesmos procedimentos para coleta e inoculação, como anteriormente descritas.

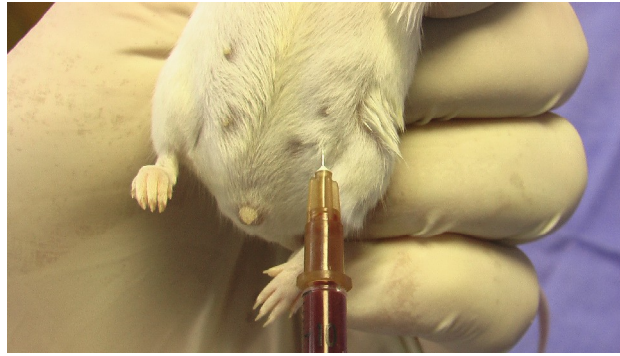


Figura 18. Inoculação via intraperitoneal

#### 4.7 Confeção do exame do esfregaço e determinação da parasitemia

A contenção física dos animais para a coleta de sangue realizou-se através de uma caixa plástica, previamente adaptada para a exposição da cauda (Fig.19). A opção deveu-se ao elevado número de animais a serem manipulados rotineiramente em diferentes dias. Este método facilitou o manuseio dos camundongos e a coleta da amostra de sangue, de forma prática, rápida e segura, para os animais e para os operadores.

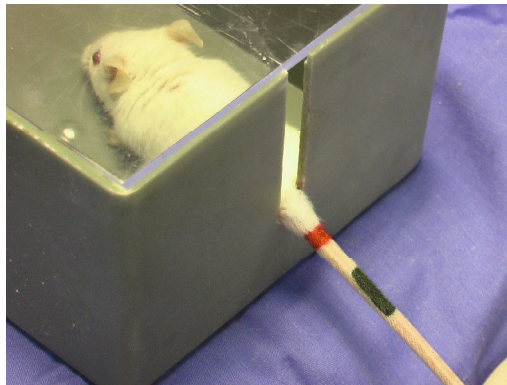


Figura 19. Contenção dos animais

A pesquisa hemoscópica de parasitas realizou-se no 3º, 5º, 7º, 9º e 12º dia, após a inoculação do sangue citratado, nos animais que receberam sangue contaminado. A anti-sepsia do local foi feita com álcool 70%. O sangue foi coletado através de uma

pequena incisão, na lateral da porção distal da cauda dos animais. Utilizou-se apenas a primeira gota de sangue sobre lâmina de vidro (Fig.20) espalhada por uma extensora, para a confecção do esfregaço do sangue periférico (Fig.21). O esfregaço foi fixado com metanol (VETEC Química Fina LTDA, Lote 0706982, RJ, Brasil) e corado pelo método de Giemsa (DOLES Reagentes e Equipamentos para Laboratórios LTDA, Lote GIEM 5061, GO, Brasil). Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água corrente e secadas à temperatura ambiente.

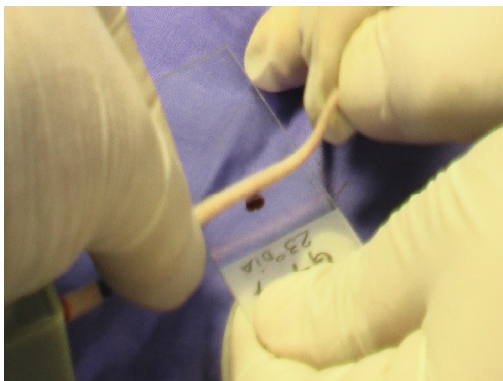


Figura 20. Coleta da gota de sangue para o esfregaço



Figura 21. Esfregaço sanguíneo

A parasitemia foi determinada através da visualização em microscopia óptica, aumento de 1000 x, análise de 10 campos, pelo percentual de hemácias parasitadas em relação ao total de hemácias examinadas (SILVA et al., 2003). Anexos 9.5 e 9.6. As lâminas do esfregaço foram lidas no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas – ICB da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

Optou-se pelo exame do esfregaço em função da rapidez, praticidade e baixo custo para o diagnóstico de hemoparasitas.

#### **4.8 Coleta de sangue para quantificar os níveis totais das imunoglobulinas**



No 6º, no 22º, e no 32º dia antes do sacrifício, foram realizadas coletas de sangue do plexo venoso retro-ocular (Fig.22), com pipeta de Pasteur, para quantificar os níveis de IgM e IgG. Foram coletados 0,20 mL de sangue, e do soro deste foram dosadas as Igs, utilizando-se o método DOT-ELISA conforme protocolo do laboratório de Imunologia da UFAM. Anexo 9.7 e 9.8. Todos os exames imunológicos foram realizados no Laboratório de Imunologia do Departamento de Parasitologia do ICB da UFAM.



Figura 22. Coleta de sangue do plexo venoso retro-ocular

A eutanásia foi realizada através da administração de sobredoses, com o triplo das utilizadas para o ato anestésico. Devido às limitações materiais, os grupos para esse exame foram constituídos de seis camundongos cada.

#### **4.9 Análise de sobrevivência**

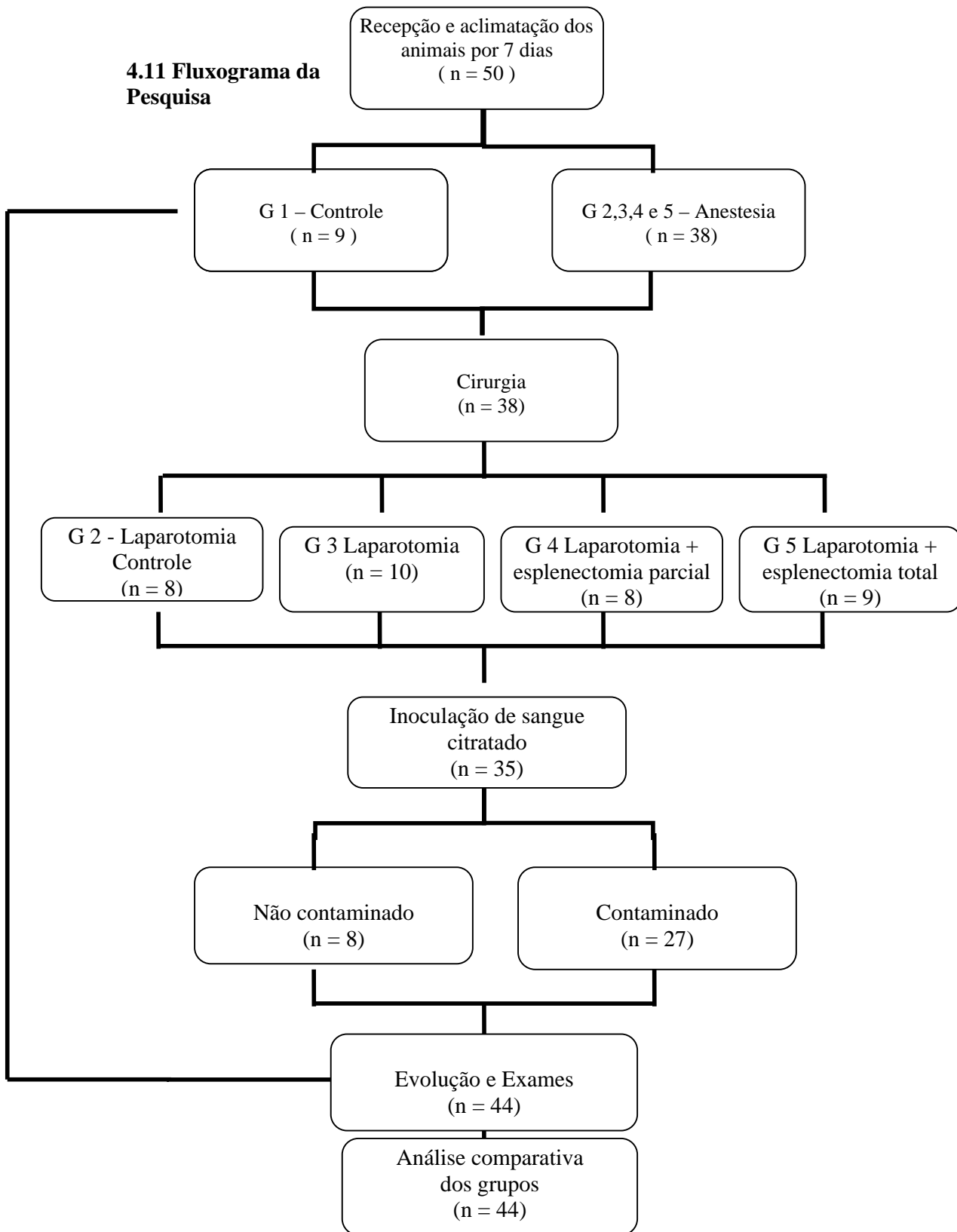
Os animais foram mantidos em gaiolas, como já descritos anteriormente, com evolução diária, registrando-a em livro no início da manhã e ao final da tarde. Anexo 9.9.

Todos sobreviveram ao período de análise, da inoculação até o 12º, quando foram sacrificados.

#### **4.10 Análise estatística**

A correlação dos dados e a análise estatística foram realizadas com as médias obtidas dos grupos, mais ou menos o desvio padrão das médias dos experimentos. Foram analisados os resultados pelo método estatístico considerado por ANOVA, e comparados os diferentes tratamentos com os controles, usando o programa Prism 3.0 GraphPad (Graphpad Software, inc., San Diego, C.A., U.S.A.). Foram consideradas as diferenças significativas quando a probabilidade de igualdade era menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4.11 Fluxograma da Pesquisa



Descartados três camundongos antes da cirurgia, por pesarem menos de 15 gramas: um do Grupo 1 e dois do Grupo 2. Dois animais morreram no pós-operatório imediato de causa anestésica, sendo um do Grupo 4 e um do Grupo 5. Um animal morreu no 4º dia de pós-operatório, do Grupo 4, de causa ignorada.

## 5. RESULTADOS

O presente experimento avaliou a parasitemia pelo *Plasmodium berghei* em camundongos submetidos à esplenectomia total (n=9), esplenectomia parcial (n=8) e um grupo controle (n=10), assim como quantificou os níveis de Imunoglobulinas do tipo M e do tipo G.

### **Parasitemia**

Os grupos de camundongos foram infectados por  $10^6$  hemácias parasitadas pelo *P.berghei* ANKA, e sua parasitemia foi acompanhada como descrita em Métodos. (Anexo 9.11)

A parasitemia foi progressiva nos três grupos, ao longo do período de infecção, persistindo até o final do experimento de 12 dias. (Quadro1, Gráfico 1)

GRUPO 3 1ª coleta/ 23º dia		GRUPO 3 2ª coleta/ 25º dia		GRUPO 3 3ª coleta/ 27º dia		GRUPO 3 4ª coleta/ 29º dia		GRUPO 3 5ª coleta/ 32º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA	INDIVÍDUO	PARASITEMIA	INDIVÍDUO	PARASITEMIA	INDIVÍDUO	PARASITEMIA	INDIVÍDUO	PARASITEMIA
3.1	10,80%	3.1	12,60%	3.1	16,50%	3.1	21,00%	3.1	31,20%
3.2	8,40%	3.2	11,30%	3.2	15,60%	3.2	21,70%	3.2	29,70%
3.3	7,70%	3.3	11,80%	3.3	14,60%	3.3	20,10%	3.3	28,20%
3.4	7,70%	3.4	10,80%	3.4	16,20%	3.4	20,40%	3.4	32,00%
3.5	9,80%	3.5	12,60%	3.5	15,40%	3.5	20,70%	3.5	31,70%
3.6	9,10%	3.6	11,70%	3.6	14,40%	3.6	20,00%	3.6	32,00%
3.7	8,80%	3.7	12,50%	3.7	14,30%	3.7	21,00%	3.7	30,30%
3.8	9,80%	3.8	12,90%	3.8	16,30%	3.8	20,10%	3.8	31,60%
3.9	7,50%	3.9	13,00%	3.9	17,10%	3.9	21,10%	3.9	32,00%
3.10	8,70%	3.10	12,40%	3.10	13,80%	3.10	20,00%	3.10	31,70%
<b>MEDIA</b>	<b>8,83%</b>	<b>MEDIA</b>	<b>12,16%</b>	<b>MEDIA</b>	<b>15,42%</b>	<b>MEDIA</b>	<b>20,61%</b>	<b>MEDIA</b>	<b>31,04%</b>

GRUPO 4 1ª coleta/23º dia		GRUPO 4 2ª coleta/25º dia		GRUPO 4 3ª coleta/27º dia		GRUPO 4 4ª coleta/29º dia		GRUPO 4 5ª coleta/32º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA	INDIVÍDUO	PARASITEMIA	INDIVÍDUO	PARASITEMIA	INDIVÍDUO	PARASITEMIA	INDIVÍDUO	PARASITEMIA
4.1	-	4.1	-	4.1	-	4.1	-	4.1	-
4.2	10,20%	4.2	15,10%	4.2	16,00%	4.2	25,00%	4.2	34,10%
4.3	-	4.3	-	4.3	-	4.3	-	4.3	-
4.4	9,10%	4.4	13,60%	4.4	15,20%	4.4	21,20%	4.4	35,20%
4.5	9,30%	4.5	15,60%	4.5	16,90%	4.5	21,00%	4.5	35,80%
4.6	9,10%	4.6	12,50%	4.6	14,10%	4.6	21,50%	4.6	35,90%
4.7	9,00%	4.7	16,30%	4.7	17,00%	4.7	24,30%	4.7	35,20%
4.8	9,50%	4.8	13,70%	4.8	15,70%	4.8	21,60%	4.8	33,30%
4.9	10,20%	4.9	12,80%	4.9	16,50%	4.9	23,10%	4.9	35,40%
4.10	9,50%	4.10	15,50%	4.10	17,00%	4.10	23,20%	4.10	35,20%
<b>MEDIA</b>	<b>9,49%</b>	<b>MEDIA</b>	<b>14,39%</b>	<b>MEDIA</b>	<b>16,05%</b>	<b>MEDIA</b>	<b>22,61%</b>	<b>MEDIA</b>	<b>35,01%</b>

GRUPO 5 1ª coleta/23º dia		GRUPO 5 2ª coleta/25º dia		GRUPO 5 3ª coleta/27º dia		GRUPO 5 4ª coleta/29º dia		GRUPO 5 5ª coleta/32º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA	INDIVÍDUO	PARASITEMIA	INDIVÍDUO	PARASITEMIA	INDIVÍDUO	PARASITEMIA	INDIVÍDUO	PARASITEMIA
5.1	12,60%	5.1	21,30%	5.1	33,50%	5.1	43,60%	5.1	63,80%
5.2	10,20%	5.2	21,80%	5.2	30,80%	5.2	46,70%	5.2	65,30%
5.3	12,30%	5.3	22,80%	5.3	31,80%	5.3	49,60%	5.3	62,30%
5.4	11,10%	5.4	21,40%	5.4	31,50%	5.4	44,90%	5.4	62,70%
5.5	10,40%	5.5	20,10%	5.5	30,50%	5.5	44,90%	5.5	63,50%
5.6	12,20%	5.6	18,20%	5.6	33,10%	5.6	47,50%	5.6	62,70%
5.7	13,70%	5.7	23,80%	5.7	33,60%	5.7	44,10%	5.7	63,40%
5.8	-	5.8	-	5.8	-	5.8	-	5.8	-
5.9	11,10%	5.9	21,90%	5.9	29,80%	5.9	43,60%	5.9	61,30%
5.10	11,80%	5.10	22,50%	5.10	30,50%	5.10	45,40%	5.10	64,00%
<b>MEDIA</b>	<b>11,71%</b>	<b>MEDIA</b>	<b>21,53%</b>	<b>MEDIA</b>	<b>31,68%</b>	<b>MEDIA</b>	<b>45,59%</b>	<b>MEDIA</b>	<b>63,22%</b>

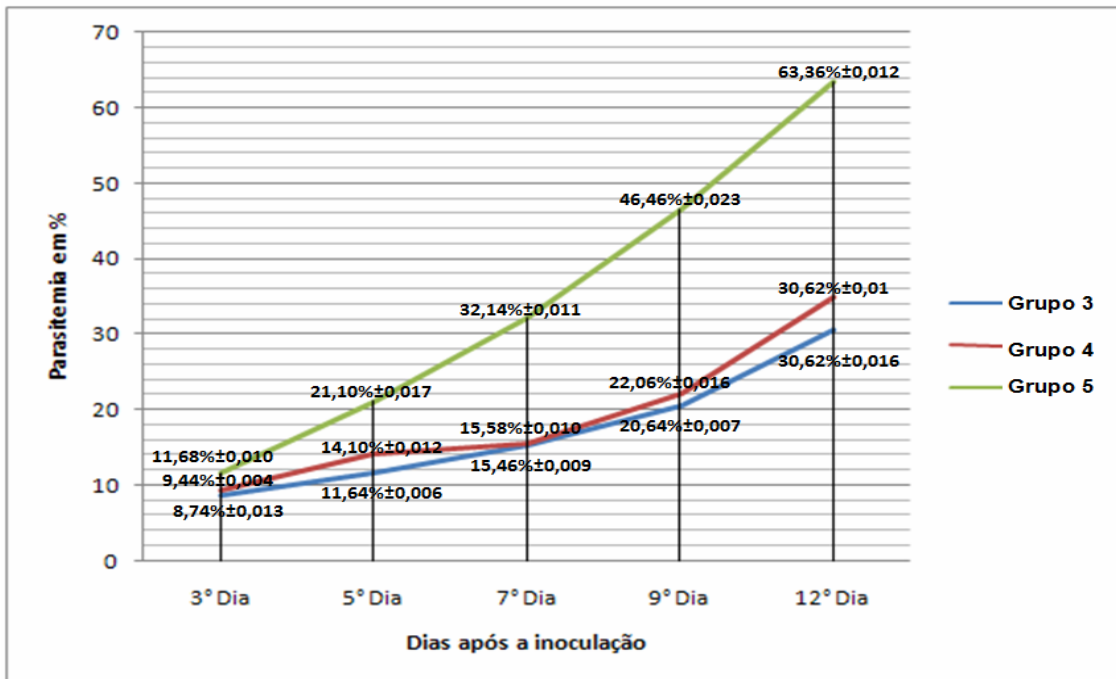


Gráfico 1. Curva da evolução das médias da parasitemia nos diferentes grupos infectados.

### **Testes Paramétricos**

O teste t-Student, “one tail” e pareado por dia, entre as **médias da parasitemia** nos diferentes dias foi estatisticamente significativa:

**G3 e G4:**  $p=0,0183$

**G3 e G5:**  $p=0,0155$

**G4 e G5:**  $p=0,0170$

### **Quantificação dos níveis de Imunoglobulinas**

Todos os grupos de camundongos infectados e não infectados; esplenectomizados e não esplenectomizados, foram acompanhados seguindo a metodologia, para quantificar os níveis de imunoglobulinas (Quadros 2, 3) e variação dos níveis de IgM e IgG (Gráficos 2 e 3).

Para a realização desses exames, utilizaram-se cinco grupos de camundongos, todos com ( $n= 6$ ).

Quadro 2. Quantificação das Imunoglobulinas M e G nos diferentes grupos.

GRUPO 1	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
controle negativo nenhum procedimento realizado	1	2048	1024	2048	2048	2048	16384
	2	4096	1024	1024	8192	131072	131072
	3	4096	2048	2048	32768	1024	8192
	4	2048	8192	8192	2048	16384	8196
	5	2048	2048	65536	8192	16384	65532
	6	16384	1024	8192	524288	32768	65532
	7						
	8						
	9						
	10						
MÉDIA		5120	2560	14506,7	96256	33280	49151,33

GRUPO 1	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
controle negativo nenhum procedimento realizado	1	7,624618986	6,931471806	7,624618986	7,624618986	7,624618986	9,704060528
	2	8,317766167	6,931471806	6,931471806	9,010913347	11,78350207	11,78350207
	3	8,317766167	7,624618986	7,624618986	10,39720771	6,931471806	9,010913347
	4	7,624618986	9,010913347	9,010913347	7,624618986	9,704060528	9,011401509
	5	7,624618986	7,624618986	11,09035489	9,010913347	9,704060528	11,09029385
	6	9,704060528	6,931471806	9,010913347	13,16979643	10,39720771	11,09029385
	7						
	8						
	9						
	10						
MÉDIA log		8,202241637	7,509094456	8,548815227	9,473011468	9,357486938	10,28174419

GRUPO 2	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
controle negativo Laparotomia e sangue citrado	1						
	2	4096	4096	512	4096	32768	131072
	3	1024	512	256	1024	512	512
	4	512	512	1024	512	2048	2048
	5	512	256	256	2048	512	128
	6	4096	2048	512	16384	8192	4096
	7	1024	1024	2048	4096	8192	8192
	8						
	9						
	10						
MÉDIA		1877,33	1408	1088	4693,333	8704	24341,33

GRUPO 2	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
controle negativo Laparotomia e sangue citrado	1						
	2	8,317766167	8,317766167	6,238324625	8,317766167	10,39720771	11,78350207
	3	6,931471806	6,238324625	5,545177444	6,931471806	6,238324625	6,238324625
	4	6,238324625	6,238324625	6,931471806	6,238324625	7,624618986	7,624618986
	5	6,238324625	5,545177444	5,545177444	7,624618986	6,238324625	4,852030264
	6	8,317766167	7,624618986	6,238324625	9,704060528	9,010913347	8,317766167
	7	6,931471806	6,931471806	7,624618986	8,317766167	9,010913347	9,010913347
	8						
	9						
	10						
MÉDIA log		7,162520866	6,815947276	6,353849155	7,855668046	8,086717107	7,971192576

GRUPO 3	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
controle positivo laparotomia e sangue citrado contaminado	1	4096	2048	4096	16384	131072	262144
	2	4096	512	1024	2048	1024	1024
	3	512	1024	2048	4096	32768	16384
	4	512	512	512	2048	2048	512
	5	4096	8192	65536	1024	8192	32768
	6	1024	4096	4096	2048	8192	8192
	7						
	8						
	9						
	10						
MÉDIA		2389,33	2730,67	12885,3	4608	30549,3	53504

GRUPO 3	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
controle positivo laparotomia e sangue citrado contaminado	1	8,317766167	7,624618986	8,317766167	9,704060528	11,78350207	12,47664925
	2	8,317766167	6,238324625	6,931471806	7,624618986	6,931471806	6,931471806
	3	6,238324625	6,931471806	7,624618986	8,317766167	10,39720771	9,704060528
	4	6,238324625	6,238324625	6,238324625	7,624618986	7,624618986	6,238324625
	5	8,317766167	9,010913347	11,09035489	6,931471806	9,010913347	10,39720771
	6	6,931471806	8,317766167	8,317766167	7,624618986	9,010913347	9,010913347
	7						
	8						
	9						
	10						
MÉDIA log		7,393569926	7,393569926	8,086717107	7,971192576	9,126437877	9,126437877

GRUPO 4	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Laparotomia Esplenectomia parcial sangue citrado contaminado	1	-	-	-	-	-	-
	2	512	1024	512	1024	4096	4096
	3	-	-	-	-	-	-
	4	1024	1024	1024	1024	4096	2048
	5	2048	2048	4096	8192	16384	16384
	6	4096	2048	4096	16384	32768	65536
	7	2048	4096	2048	32768	65536	65536
	8	262144	2048	4096	262144	131072	32768
	9						
	10						
MÉDIA		45312	2048	2645,33	53589,33	42325,3	31061,33

GRUPO 4	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Laparotomia Esplenectomia parcial sangue citrado contaminado	1	-	-	-	-	-	-
	2	6,238324625	6,931471806	6,238324625	6,931471806	8,317766167	8,317766167
	3	-	-	-	-	-	-
	4	6,931471806	6,931471806	6,931471806	6,931471806	8,317766167	7,624618986
	5	7,624618986	7,624618986	8,317766167	9,010913347	9,704060528	9,704060528
	6	8,317766167	7,624618986	8,317766167	9,704060528	10,39720771	11,09035489
	7	7,624618986	8,317766167	7,624618986	10,39720771	11,09035489	11,09035489
	8	12,47664925	7,624618986	8,317766167	12,47664925	11,78350207	10,39720771
	9						
	10						
MÉDIA log		8,202241637	7,509094456	7,624618986	9,241962407	9,935109588	9,704060528

GRUPO 5	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Laparotomia Esplenectomia total sangue citrado contaminado	1	8192	512	10244	8192	4096	1024
	2	2048	1024	1024	1024	32768	131072
	3	8192	4096	2048	8192	65536	262144
	4	1024	1024	2048	16384	32768	65536
	5	4096	4096	1024	8192	16384	16384
	6	2048	2048	4096	1024	16384	32768
	7						
	8						
	9						
	10						
MÉDIA		4266,67	2133,33	3414	7168	27989,3	84821,33

GRUPO 5	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Laparotomia Esplenectomia total sangue citrado contaminado	1	9,010913347	6,238324625	9,234447447	9,010913347	8,317766167	6,931471806
	2	7,624618986	6,931471806	6,931471806	6,931471806	10,39720771	11,78350207
	3	9,010913347	8,317766167	7,624618986	9,010913347	11,09035489	12,47664925
	4	6,931471806	6,931471806	7,624618986	9,704060528	10,39720771	11,09035489
	5	8,317766167	8,317766167	6,931471806	9,704060528	9,704060528	9,704060528
	6	7,624618986	7,624618986	8,317766167	6,931471806	9,704060528	10,39720771
	7						
	8						
	9						
	10						
MÉDIA log		8,086717107	7,393569926	7,7773992	8,433290697	9,935109588	10,39720771

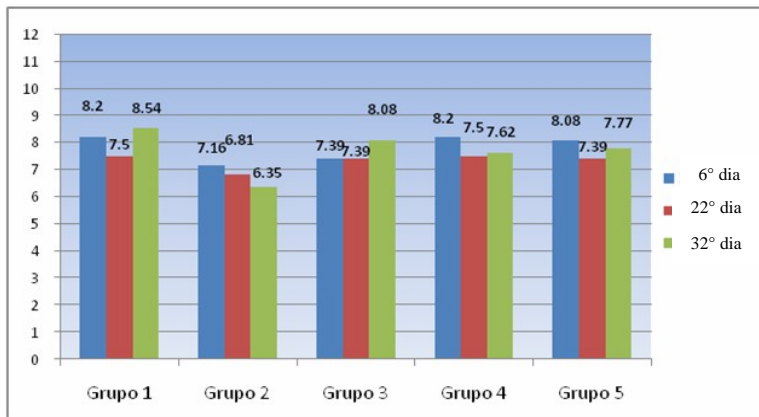


Gráfico 2. Variação dos níveis de IgM em logaritmos Neperianos

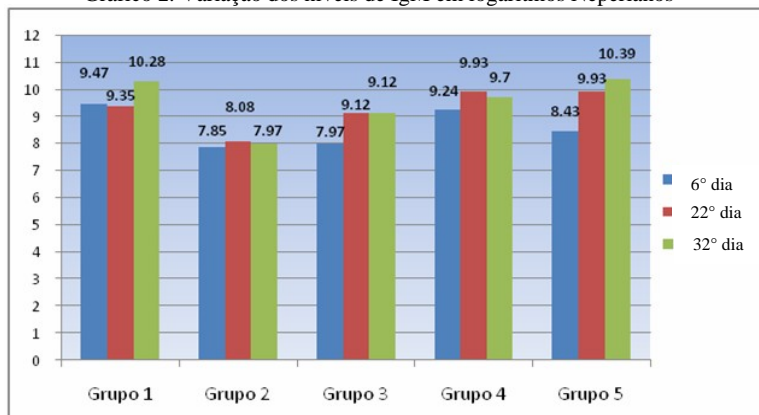


Gráfico 3. Variação dos níveis de IgG em logaritmos Neperianos

- G 1: Controle negativo. Sem procedimento.
- G 2: Controle negativo. Sangue citratado não contaminado.
- G 3: Controle positivo. Sangue contaminado.
- G 4: Esplenectomia parcial + sangue contaminado.
- G 5: Esplenectomia total + sangue contaminado.

- G 1: Controle negativo. Sem procedimento.
- G 2: Controle negativo. Sangue citratado não contaminado.
- G 3: Controle positivo. Sangue contaminado.
- G 4: Esplenectomia parcial + sangue contaminado.
- G 5: Esplenectomia total + sangue contaminado.

## Testes Paramétricos

### Correlação entre as médias de IgM e IgG

As médias dos níveis de imunoglobulinas IgM e IgG apresentaram-se estatisticamente **significantes** entre os grupos 1 e 5, pela análise do método ANOVA, com  $p=0,0301$  e  $p=0,0238$  respectivamente.

A análise de variância (ANOVA) não se apresentou significativa em uma análise de corte dos camundongos:  $p=0,4119$  para IgM e  $p=0,2451$  para IgG.



**Correlação entre as médias de parasitemia e os níveis de IgM**

O teste t-Student entre as médias da parasitemia e os níveis de IgM ou entre as médias de parasitemia e os níveis de IgG foram  $p = 0,0764$ , portanto não significantes.

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a parasitemia em camundongos submetidos à esplenectomia total, esplenectomia parcial e não esplenectomizados, infectados pelo *Plasmodium berghei*. Avaliou também a variação dos níveis de IgM e IgG totais em camundongos infectados e não infectados; esplenectomizados e não esplenectomizados, no tempo do experimento.

Para destacar a importância do baço, ressaltamos:

O baço só veio a ter sua visibilidade imunológica, sua biologia funcional e sua importância clínica, após meta-análises das evoluções clínicas de corte de pacientes asplênicos, que desvendaram tendências de sepse, embolia pulmonar e infarto do miocárdio (KING, SCHUMAKER JR, 1952; ROBINETTE, FRAUMENI JR, 1977);

O aumento da susceptibilidade à infecção é bem reconhecido em pacientes asplênicos, e tem levado cirurgiões pesquisadores a buscarem alternativas visando à preservação do órgão. Apesar da esplenectomia segmentar ter sido discutida desde o século passado, coube a Campos Christo (1959) sistematizar e apresentar esta técnica operatória. Outra técnica para preservação cirúrgica do baço foi sistematizada e apresentada por Petroianu na década de 1980, após cinco anos de estudos experimentais, e vem sendo realizada desde 1984. A nova técnica foi denominada de esplenectomia subtotal, e preserva o pólo superior esplênico que é vascularizado pelos vasos esplenogástricos. Sua utilização tem sido realizada no trauma esplênico grave, na hipertensão porta, entre outras (PETROIANU, 1983; PETROIANU, 1988; RESENDE; PETROIANU, 1997; RESENDE; PETROIANU, 2001);

A retirada do baço repercute em outros órgãos, sobretudo na medula óssea, no sistema mononuclear fagocitário, nos linfonodos e no fígado (PETROIANU; MIRANDA; OLIVEIRA, 2008);

Os agentes etiológicos mais frequentes nas infecções fulminantes pós-esplenectomias (IFPE) são as bactérias encapsuladas: *Streptococcus pneumoniae* (mais da metade de todas as infecções), *Haemophilus influenzae* tipo B e *Neisseria pneumoniae*. Segundo Singer (1973), estes três patógenos são responsáveis por 73% das IFPE. Indivíduos asplênicos ou hipoasplênicos também são mais susceptíveis a cursos fatais de malária causada por *Plasmodium sp* (KIRCHGATTER, et al, 2005);

O baço desempenha papel imune fundamental especialmente quando microorganismos ou outros antígenos entram em contato com o hospedeiro diretamente por via sanguínea, visto sua função na recirculação linfocitária (SCHWARTZ, et al.,1982);

O baço representa um grande reservatório de linfócitos e exerce importante papel na produção de anticorpos em especial a IgM (LLENDE; SANTIAGO-DELPIN; LAVARGNE, 1986);

Por ter sua importância pouco esclarecida e pelo fato de sua ausência ser compatível com a vida, até hoje este órgão vem sendo retirado indiscriminadamente no trauma e em diversas doenças (CAMPOS CHRISTO, 2001);

A importância do baço na resposta imunitária orgânica e de outras atribuições desse órgão levou a uma nova orientação no tratamento das afecções esplênicas. A indicação e a abordagem cirúrgica tornaram-se mais conservadoras (KING; SCHUMAKER JR, 1952; CAMPOS CHRISTO, 1959; PETROIANU, 2003);

Os episódios repetidos da malária levam à esplenomegalia, que predispõe a lesões esplênicas, particularmente nos casos de trauma de baixa intensidade (BOONE; WATTERS, 1995);

O modelo experimental camundongo tem sido de importância ímpar no estudo dos potenciais mecanismos de proteção à infecção malárica (LANGHORNE, et al., 2008). Os roedores são os que melhor reproduzem as características clínicas e patológicas da malária humana (NITICHEU, et al., 2003). Camundongos submetidos a ablação total esplênica apresentam deficiência na produção de anticorpos naturais como IgM, devido a acentuada diminuição de linfócitos B1-a (WARDEMANN, et al., 2002).

No presente trabalho todos os grupos tiveram evolução crescente da parasitemia.

- **Não esplenectomizados (controle com parasitemia)**

A curva de parasitemia nos camundongos não esplenectomizados apresentou uma evolução lenta e progressiva, sem resolução até o final do experimento:  $31,04 / 8,83 = 3,51$  (3,5 vezes maior), semelhante ao reportado na literatura por GARNICA, et al., 2002.

- **Esplenectomia parcial**

Nos camundongos submetidos à esplenectomia parcial, com remoção de 50% do tecido esplênico, a parasitemia ficou muito próxima dos índices do grupo controle:  $35,01 / 9,49 = 3,69$  (3,7 vezes maior ao final do experimento), o que leva a crer que o fator clareamento foi observado também no estudo experimental.

- **Esplenectomia total**

Nos camundongos com esplenectomia total, a parasitemia exacerbou-se progressivamente, quando comparados com o grupo controle:  $63,22 / 11,71 = 5,39$  (5,4 vezes maior ao final do experimento). Estes resultados estão de acordo com os relatos na literatura já que o baço é o responsável pelo clareamento dos parasitas (ALVES ;

WEIDANZ; WEISS, 1996), além de ser o órgão chave para remoção de hemácias parasitadas durante a infecção malárica (ENGWERDA; BEATTIE; AMANTE; 2005), e pela sua dificuldade na realização desta função (clareamento) no controle da infecção nos pacientes asplênicos (FAUCHER et al., 2006).

Comparando o grupo 3 com o grupo 4 (esplenectomizado parcial), tomando a primeira amostra, observamos que a diferença era menor que 1% (0,66), e ao final menor que 4% (3,97), favoráveis ao grupo 4, na média.

Ao se comparar o grupo 3 com o grupo 5 (esplenectomizado total), verificamos que a diferença torna-se maior no segundo, observando-se uma parasitemia menor que 3% (2,88) na primeira amostra, elevando-se ao final para 32% (32,18), na média.

- **Variação dos níveis de Imunoglobulinas**

A variação dos níveis de IgM e IgG comparada entre os diferentes grupos não traduziu um direcionamento entre as intervenções e os resultados no presente experimento. Pouco se tem evoluído, mesmo em nível experimental, sobre o conhecimento da função do tecido esplênico, haja vista não existirem parâmetros que mostrem diretamente a sua função (RESENDE; PETROIANU, 2001). O fato de não se ter constatado que os camundongos com esplenectomia total e parcial não demonstraram significativas diferenças nos níveis séricos, principalmente de IgM, de fase aguda, sugere que outros órgãos compensem a função esplênica. Existem controvérsias na literatura no que se refere aos níveis de imunoglobulinas em pacientes esplenectomizados (CLAYER et al., 1994; ZOLI et al., 1994).

A quantificação dos níveis das imunoglobulinas traduz apenas a parte humoral, não sendo o mais adequado para avaliar a função esplênica e em particular a imunológica.

No futuro, alicerçados com novas técnicas laboratoriais, incluindo-se a biologia molecular, a citometria de fluxo entre outras, teremos chance de entender melhor estes resultados incipientes e desvendarmos, assim, as funções esplênicas, e a possibilidade de que outros órgãos, especialmente o fígado, possam compensar a função esplênica na malária experimental em camundongos esplenectomizados.

## 7. CONCLUSÃO

O estudo experimental utilizando camundongos inoculados com o *Plasmodium berghei* para se observar e quantificar a parasitemia e os níveis de imunoglobulinas (IgM e IgG) respectivamente, nos levou às seguintes conclusões:

- A parasitemia induzida pelo *P.berghei* ANKA em camundongos, evoluiu de forma progressiva em todos os grupos, com sobrevida de todos os animais inoculados, no tempo do experimento do presente trabalho;
- Nos animais não-esplenectomizados comparados aos submetidos à esplenectomia parcial, observou-se um pequeno aumento no índice de parasitemia e um significativo aumento nos animais nos quais se realizaram a ablação total do baço, ao final do período do experimento;
- A esplenectomia parcial demonstrou a eficiência do tecido esplênico remanescente para controlar a parasitemia;
- Nos camundongos submetidos à esplenectomia total observou-se a dificuldade para realizar o clareamento do sangue e controlar a infecção;
- A variabilidade dos níveis totais da IgM e IgG não forneceram dados significativos para a análise da função imunológica do baço, em camundongos com infecção malárica;
- A importância do remanescente esplênico no clareamento das hemácias parasitadas pelo *Plasmodium berghei* demonstrou ser eficiente, de modo a evitar sérias complicações decorrentes da malária em camundongos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, W.L.; LUCENA, M.S.M.M. de; SCHLOBACH, M.C. **Cirurgia conservadora do trauma esplênico na criança.** Revista da Associação Médica Brasileira, Rio de Janeiro, v. 40, n.2, p.113-7, abr.-jun. 1994.

ACCETTA, P.; ACCETTA, I.; PERROTA, U. **Segmentação esplênica. Estudo anatomo-radiológico.** Revista Brasileira de Cirurgia, Rio de Janeiro, v. 73, n. 4, p. 211-18. 1983.

ALBERTI, L. R; ROCHA R.F; CALDEIRA, D. A. M; PETROIANU, A. **Mortalidade pós-esplenectomia em modelo animal.** Rev. Bras. Hematol.Hemoter. São José do Rio Preto: v.29, n.2, abr.-jun. 2007.

ALVES, H.J.; WEIDANZ, W.; WEISS, L. **The Spleen in Murine *Plasmodium Chabaudi Adami* Malaria: Stromal Cells, T Lymphocytes and, Hematopoiesis.** The American Journal Tropical Medicine and Hygiene, Pennsylvania, v. 55, n.4, p. 370-78, oct.1996.

AMAZONAS. Decreto n. 25.324, de 13 de setembro de 2005. Declara situação de emergência epidemiológica nos municípios de Manaus, Autazes, Careiro Castanho, Careiro da Várzea, Iranduba, Itacoatiara, Itapiranga, Manacapuru, Maraquiri, Novo Airão, Presidente Figueiredo, Rio Preto da Eva, São Sebastião do Uatumã, Silves, Tefé e Uruará, e dá outras providências. In: **Diário Oficial do Estado do Amazonas**, Manaus, 2005.

AMAZONAS. Secretaria de Estado da Saúde. Serviço de Arquivo Médico e Estatístico do Pronto-Socorro 28 de Agosto, 2006.

ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.;MAGALHÃES,L.E de.;TUFIK.S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação.** São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2004.

BABIOR, B.M. **Superoxide: a two-edge sword.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v.30, n. 02, p.141-55, feb. 1997.

BACH, O.; BAIER, M.; PULLWITT A.; FOSIKO N.; CHAGALUKA, G.; KALIMA, M.; PFISTER, W.; STRAUBE, E.; MOLYNEUX, M. **Falciparum malaria after splenectomy: a prospective controlled study of 33 previously splenectomized Malawian adults.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Jena, v. 99, n.11, p. 861-7, nov. 2005.

BIROLINI, D.; OLIVEIRA, M.R. **Cirurgia do Trauma.** Atheneu, Rio de Janeiro, p.544, 1985.

BLACKMAN, M.J.; HEIDRICH, H.G.; DONACHIE, S.; MCBRIDE, J.S.; HOLDER, A.A. **A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies.** Journal of Experimental Medicine, Londres, v. 172. p. 379–382, jul. 1990.

BOONE, K.E.; WATTERS, D.A.K. **The incidence of malaria after splenectomy in Papua New Guinea.** British Medical Journal., Manchester, v. 311, n. 7015, p.1273, nov.1995.



BOUHAROUN-TAYOUN, H.; OEUVRAY, C.; LUNEL, F.; DRUILHE, P. **Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages.** Journal of Experimental Medicine, v. 182, n.2, p. 409–18, aug. 1995.

BRANDT, C.T.; LEITE, C.R.C.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; BRANDT FILHO, C.; MANHAES-DE-CASTRO, F.M.; BARBOSA-DE-CASTRO, M.M. **Evaluation of the effect of splenectomy with autologous spleen tissue implantation in some monocyte functions in children with hepatosplenic schistosomiasis mansoni.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte, v.38, n.1, jan.-feb. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Programa de Enfrentamento às Emergências e Traumas, 1990.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Aprova a proposta do Ministério da Saúde de Política Nacional de Redução de Morbimortalidade por Acidente e Violência. Resolução n. 309, de 08 de março de 2001. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, mar. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Aprova a Política Nacional de Redução da Morbimortalidade por Acidente e Violências. Portaria n. 737, de 16 de maio de 2001. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 maio. 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Programa Nacional de Controle da Malária, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. A malária no Brasil, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Situação epidemiológica de malária no Brasil, 2005.

BULL, P.C. ; LOWE, B.S.; KORTOK, M.; MOLYNEUX, C.S.; NEWBOLD, C.I.; MARSH, K. **Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria.** National Library of Medicine v.4, n. 3, p. 358–360, 1998.

CAMPOS CHRISTO, M; LIBERATO, DIDIO. **Partial and segmental splenectomies: an overview from 1959 (first splenic segmentectomy) to 1993.** ABCD Arq. Bras. Cir. Dig. v. 9, n.4, p.116-29, out.-dez. 1994.

CAMPOS CHRISTO, M. **Baço : cirurgia e história.** Rev. Méd. Minas Gerais.v.11, n.4, p.251-4, 2001

CESTA, M.F. **Normal structure, function, and histology of the Spleen.** Toxicol Pathol, v. 34, n.5, p.455-65, 2006.

CLAYER, M.T.R; DREW, P.A; LEONG,A.S.Y; JAMIESON, C.G. **IgG-mediated phagocytis in regenerated splenic tissue.** Clin. Exp. Immunol. v.97, p.242-7, 1994.

DEMAR, M.; LEGRAND, E.; HOMMEL, D.; ESTERRE, P.; CARME, B. **Plasmodium falciparum malaria in splenectomized patients: two cases report in French Guiana and**

**a literature review.** The American Journal Tropical Medicine and Hygiene, v.71, n.3, p.290-93, apr. 2004.

DI GREGORIO, S.; GONZÁLEZ, L.; PAVÓN, J. C.; NOVARA, H.; VALERGA, M.; BASES, O.; ADAROO, F. **Sepsis post-splenectomia y púrpura fulminans por streptococcus pneumoniae.** Rev. Argent. Infectol. v.9, n.7, p. 6-9, 1996.

DRUMMOND, J.P. **Trauma e Anestesiologia.** MEDSI, São Paulo, p. 201, 1992.

ENGWERDA, C.R.; BEATTIE L.; AMANTE F.H. **The importance of spleen in malaria.** Trends in Parasitology, v.21, n.2, p. 75-80, feb.2005.

FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. **Anestesia em cães e gatos.** 1ª ed. São Paulo: Roca, p. 389, 2002.

FAUCHER, J.F.; CRÉANTOR, C.; HUSTACHE-MATHIEU, L.; CHIROUZE, C.; MILLON, L.; HOEN, B. **Atypical course of falciparum malaria in an asplenic patient.** Press Med, v.35, n. 5, p. 793-5, may. 2006.

FERREIRA, M.S. **Malária: Patologia, Fisiopatologia, Quadro Clínico e Diagnóstico.** In: VERONESI: Tratado de infectologia. 3ª. ed. São Paulo Atheneu, 2005.

FISCHER, C.A.C; SIEBERT JÚNIOR, M.de S. **Trauma esplênico.** In: Cirurgia do Trauma. Condutas Diagnósticas e Terapêuticas. São Paulo: Atheneu, 2003.

GARNICA, M.R.; SOUTO, J.T.; SILVA, J.S.; DE ANDRADE, H.F.JR. **Stromal cell derived factor 1 synthesis by spleen cells in rodent malaria, and the effects of in vivo supplementation of SDF-1 alpha and CXCR4 receptor blocker.** Immunology letters, v. 83, n.1, p. 47-53, aug. 2002.

GARNICA, M.R.; SILVA, J.S.; ANDRADE JR, H.F. **Stromal cell-derived factor-1 production by spleen cells in affected by nitric oxide in protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi CR in C57BL/6j mice.** Immunology letters, v.89, nº2-3, p. 133-42, oct. 2003.

GEYER, P.G.; ALBARRAN. C.B.; BREIGEIRON, R. **Trauma Renal.** Acta Médica. Porto Alegre, v. 18. p. 291-97, 2007.

GONÇALVES, M.J.F. **Estudo sobre a relação da malária com as alterações ambientais e urbanização em Manaus.** Manaus: U.A., 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Centro de Ciências do Ambiente da Universidade do Amazonas, 1999.

HUNT, N.H.; GRAU, G.E. **Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria.** Trends Immunol, v. 24, n.9, p.491-9, sept. 2003.

HVIID, L.; BARFOD, L. **Malaria vaccines: immunity, models and monoclonal antibodies.** Trends in Parasitology, v. 24, n.9, p.393-395, 2008.

JAFARSHAD, A.; DZIEGIEL, M.H.; LUNDQUIST, R.; NIELSEN, L.K.; SINGH, S.; DRUILHE, P.L. **A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved**

**in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcγRII and FcγRIII.** J. Immunol., v. 178, p.3099-3106, 2007.

KING. H.; SCHUMACKER, Jr. H.B. **Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy.** Ann Surg, Indianapolis, v.136, n.2, p. 239-42, 1952.

KIRCHGATTER, K.; NOGUEIRA, S.L.; PADILHA, A.; CURADO, I.; BOULOS, M.; DI SANTI, S.M. **Lethal malaria caused by Plasmodium malariae in an asplenic patient.** BMJ, n. 331, p. 576-b, 2005.

KOBATA, C.M.; CHACON, J.P.; LEONARDI, L.S. **Traumatismo do baço: esplenectomia?** Anais. Paul. Med. Cir.,v.113, n. 1/2, p. 19-25, jan.-jun.1986.

KRÜCKEN, J.; MEHNERT, L.I.; DKHIL, M.A.; EL-KHADRAGY, M.; BENTEN, W.P.M.; MOSSMANN, H.; WUNDERLICH, F. **Massive destruction of Malaria-Parasitized Red Blood Cells despite Spleen Closure.** Infect. and Immun., v.73, n.10, p. 6390-98, 2005.

KWIATKOWSKI, D. **Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria.** Immunol. Lett., v.25, p.213-16, 1990.

LADISLAU, J.L. de B.; LEAL, M. do C.; TAUIL, P. L. **Avaliação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Região da Amazônia Legal, Brasil, no contexto da descentralização.** Epidemiologia e Serviço de Saúde, Brasília, v.15, n.2, p.9-20, jun. 2006.

LANGHORNE, J.; NDUNGU, F.M.; SPONAAS, A.; MARSH, K. **Immunity to malaria: more questions than answers.** Nature Immunol., v.9, n.7, p.725-732, 2008.

LEISEWITZ, A.L; ROCKETT, K.A.; GUMED, B.; JONES, M.; URBAN, B.; KWIATKOWSKI, D. P. **Response of the splenic dendritic cell population to malaria infection.** Infec. Immun., v.72, n.7, p.4233-9, jul. 2004.

LIANOU, P.E. ; BASSARIS, H.P.; SKOUTELIS, A.T.; VOTTA, E.G.; PAPAVALASSIOU, J.T.; PHAIR, J.P. **Transient improvement of poltmophonuclear leucocyte function by splenectomy in beta-thalassemia.** Med. Microb. Immun., n.176, p. 209-15, 1987.

LLENDE, M; SANTIAGO-DELPIN, E.A; LAVARGNE, J. **Immunobiological consequences of splenectomy: a review.** J. Surg. Res. v. 40, n.1, p.85-94, 1986.

LUCCHI, N.W.; TONGREN, J.E.; JAIN, V.; NAGPAL, A.C.; KAUTH, C.W.; WOHLBIER, U.; BUJARD, H.; DASH, A.P.; SINGH, N.; STILES, J.K.; UDHAYAKUMAR,V. **Antibody responses to the merozoite surface protein-1 complex in cerebral malaria patients in India.** Malaria Journal, v.7, n.121, jul. 2008.

MARQUES, R.G.; PETROIANU, A. **Infecção fulminante pós-esplenectomia.** Arquivo de Gastroenterologia, Rio de Janeiro, v.40, n.1, p. 47-54, jan.-mar. 2003.

MARSH, K. **Malária - A neglected disease?** Parasitology, v.104, S53-69, 1992.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária. Farmacologia e Técnicas.** Rio de Janeiro: Guanabara, p.235, 1988.

MOHAN, K.; MOULIN, P.; STEVENSON, M.M. **Natural Killer Cell Cytokine Production, Not Cytotoxicity, Contributes to Resistance Against Blood-Stage Plasmodium chabaudi as Infection.** J. Immunology, v.159, n.10, p. 4990-98, 1997.

NAGAO, Y; KIMURA-SATO, M; CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR, P; THONGRUNGIAT, S; WILAIRATANA,P; ISHIDA, T; TAN-ARIYA,P; SOUZA, J. B; KRUDSOOD, S; LOOAREESUWAN, S. **Suppression of Plasmodium falciparum by serum collected from a case of Plasmodium vivax infection.** Malaria J. v.7, n.113, 2008.

NASSIF, L. S.; REPKA, J.C.D.; NASSIF, A.C.T; BRANCO FILHO, A.J; OLANDOSKI, M. **Efeitos da esplenectomia na peritonite causada por lesão traumática do cólon: estudo em ratos.** Rev. Assoc. Med. Bras., Rio de Janeiro, v.50, n.3, p. 268 -71,2004.

NITICHEU, J. ; BONDUELLE, O. ; COMBADIÈRE, C. ; TEFIT, M. ; SEILHEAN, D. ; MAZIER, D. ; COMBADIÈRE, B. **Perforin-Dependent Brain-Infiltrating Cytotoxic CD8+ Lymphocyte Mediate Experimental Cerebral Malaria Pathogenesis.** J. Immun..., v.170, n.4, p. 2221-8, feb. 2003.

NOGAMI, S.; WATANABE, J.; NAKAGAKI, K.; NAKATA, K.; SUZUKI, H.; SUZUKI, H.; FUJISAWA, M.; KODAMA, T.; KOJIMA, S. **Short Report: involvement of macrophage scavenger receptors in protection against murine malaria.** The Am. J. Trop. Med. and Hyg., v.59, n.5, p. 843-5, 1998.

OSIFO, O.D.; ENEMUDO, R.E.; OVUENI, M.E. **Splenic injuries in children: The challenges of non operative management in a developing country.** Journal. of Ind. Assoc. of Ped. Surg., v. 12, n. 4, p. 209-13, 2007.

OWUSU-AGYEI, S.; KORAM, K.A.; BAIRD, J.K.; UTZ, G.C.; BINKA, F.N.; NKRUMAH, F.K.; FRYAUFF, D.J.; HOFFMAN, S.L. **Incidence of symptomatic and asymptomatic Plasmodium falciparum infection following curative therapy in adult residents of northern Ghana.** Am. J. Trop. Med. Hyg, v. 65, n.3, p.197-203, 2001.

PATIÑO, J.F. **Trauma del bazo.** Oficina de Recursos Educativos. Bogotá, out. 2006.

PERLMANN,P.; TROYE-BLOMBERG, M. **Malaria and immune system in humans.** v.80, p.229-242, 2002.

PETITHORY, J.C.; KHELIL,A.; GALÉAZZI, G.; ARDOIN, F. **Malaria in splenectomized patients. Three Fatal cases.** Presse Med. v.34, n.7, p.519-21, apr. 2005.

PETROIANU, A. **Esplenectomia subtotal e anastomose esplenorrenal proximal, para o tratamento da hipertensão portal.** Rev. Bras. Cir. v.73, n.2, p.101-4, 1983.

PETROIANU, A. **Treatment of portal hypertension by subtotal splenectomy and central splenorenal shunt.** Postgrad Med. J. v.64, n.747, p.38-41, 1988.

PETROIANU, A. **Subtotal splenectomy and portal variceal disconnection in the treatment of portal hypertension.** Can. J. Surg. v.36, n.3, p.251-254, 1993.

PETROIANU, A. **Subtotal splenectomy for treatment of patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia.** Int. surg. v.81, n.2, p.177-9, 1996.

PETROIANU, A. **Avaliação da função fagocitária em remanescentes de esplenectomia subtotal e auto-implante esplênico autógeno.** Rev. Bras. de Hematol. e Hemoterapia, v.25, n.1, p.25-30, 2003.

PETROIANU, A.; MIRANDA, M.E.; OLIVEIRA, R.G. **Blackbook Cirurgia: Doenças cirúrgicas do baço.** Belo Horizonte: Blackbook, p.328-37, 2008.

PIMPL, W.; DAPUNT, O.; KAINDL, H.; THALHAMER, J. **Incidence of septic and thromboembolic-related deaths after splenectomy in adults.** Brit. J. Surg., v.76, n.5, p.517-21, dec.2005.

PINHEIRO, L. C. de S. **Contribuição à técnica da esplenectomia parcial. Bases experimentais.** Rev. Bras. de Cir., Rio de Janeiro, v.72, n.3, p.137-46, mai.- jun. 1982.

PITCHER, M.E.; CADE, R.J.; MACKAY, J.R. **Splenectomy for trauma: morbidity, mortality and associated abdominal injuries.** ANZ, Journal of Surg. Austrasian, v.59, n.6, p.461-63, 1989.

Princípios Ético na Experimentação Animal (1991), Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/COBEA, <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>. 1991.

PORCELLI, S. A.; MODLIN, R.L. **The CD1 system: Antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids.** Ann. Rev. Immunology, v.17, p. 297-329, 1999.

RABELO, G. D.; ABRANTES, W. L.; DRUMOND, D. A. F. **Esplenectomia versus cirurgia conservadora no trauma esplênico.** Rev. Bras. Cir., Rio de Janeiro, v.18, n. 3, p. 80-6, mai.-jun. 1991.

RESENDE, V; PETROIANU, A. **Subtotal splenectomy for treatment of severe splenic injuries.** J. Trauma. v.44, n.5, p. 933-5, 1998.

RESENDE, V; PETROIANU, A. **Funções do remanescente esplênico após esplenectomia subtotal ou auto-implantes esplênicos para tratamento de lesões graves do baço humano.** Rev. Med. Minas Gerais. v.11, n.1, jan.- mar. 2001.

ROBINETTE, C.D; FRAUMENI JR, J.F. **Splenectomy and subsequent mortality in veterans of the 1939-45 war.** Lancet. v.2, n. 8029, p.127-9, 1977.

RODRIGUES, E.G.; TSUJI, M. **Malária vaccine development: Various immunization regimens for efficient induction of protective anti-malaria immunity.** Ciênc. Cult, São Paulo, v.52, n.415, p.288-94, jul.-out.2000.

ROTMAN, H.L.; DALY, M.; CLYNES, R.; LONG, C. A. **Fc receptors are not required for antibody-mediated protection against lethal malaria challenge in a mouse model.** *J. Immunol.*, v.161, p.1908-12,1998.

ROZING, J.; BRONS, N.H.C.; BENNER, R. **Effects of splenectomy on the humoral immune system.** *Imunology.*, v.34, p.909-17,1977.

SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. **Doenças Infecciosas. Conduta Diagnóstica e Terapêutica.** 2ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998.

SCHOFIELD, L.; VILLAQUIRAN, J.; FERREIRA, A.; SCHELLEKENS, H.; NUSSENZWEIG, R.; NUSSENZWEIG, V.  **$\gamma$  Interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites.** *Nature Immunol.*, v.330, p. 664-66, dec. 1987.

SCHWARTZ, P.E.; STERIOFF, S.; MUCHA, P.; MELTON, L.J.; OFFORD, K.P. **Postsplenectomy sepsis and mortality in adults.** *JAMA*, v.248, n.18, p.2279-83, nov.1982.

SEPETIBA, R.J. de C.; BOTELHO, L. J.; ARAÚJO P de A.; KRUEL N.F.; DALRI J.C. **Manejo do Trauma esplênico.** *Rev. Bras. Cir.*, Rio de Janeiro, v.82, n.2, p.71-5, mar.-abr.1992.

SILVA, P.R. de M.; SILVA, K.L.T.; GONÇALVES FILHO, P.; BARANDAS, J.F.; PEREIRA, G. C. **Malária ocular: estudo histopatológico experimental das alterações coriorretinianas.** *Arq.Bras. de Oftalmologia*, São Paulo, v.66, n.33, mai.-jun. 2003.

TAUIL, P.; DEANE, L.; SABROZA, P.; RIBEIRO, C. **A malária no Brasil.** *Cad. de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.1, n. 1, p. 71- 111, jan.-mar. 1985.

TAVERNE, J.; TAVERNIER, J.; PLAYFAIR, J.H. **Recombinant tumour necrosis factor inhibits malaria parasites in vivo but not in vitro.** *Immunol. Lett.* v.67, n.1-4, 1987.

TAYLOR, P.R.; SEIXAS, E.; WALPORT, M.J.; LANGHORNE, J.; BOTTO, M. **Complement contributes to protective immunity against reinfection by *Plasmodium chabaudi* parasites.** *Infect. Immun.* v.69, p.3853-59, 2001.

TIMES, W.; LEEMANS, R. **Splenic auto-transplantation and the immune system.** *Ann. of Surg.* n.215, p.256-60, 1991.

TORRES, O.J.M.; MACEDO, E.L.; PICCIANI, E.R.G.; NUNES,P.M.S.; COSTA, J.V.G.; CARVALHO, A.B.; LOBATO JUNIOR, P. de S. **Estudo histológico da regeneração esplênica de ratos submetidos à esplenectomia subtotal.** *Acta Cir. Bras.*, São Paulo, v.15, n.2, abr.-jun. 2000.

TRAETOW, W.D.; FABRI, P.J.; CAREY, L.C. **Changing indications for splenectomy.** *Arch.Surg.* v.115, p.447- 51, 1980.

TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE x TRAUMA. Disponível em: <<http://www.tdah.com.br/paginas/gaetah/boletim3.htm>> Acesso em: 04 jul.2008.

Trauma: devastadora doença do século XXI. Disponível em: <[http://www.brasilmedicina.com.br/noticias/pgnoticias\\_det.asp?anaselect=3&codigo](http://www.brasilmedicina.com.br/noticias/pgnoticias_det.asp?anaselect=3&codigo)> Acesso em: 04 jul.2008.

Trauma e violência. Projeto de Atenção Nacional ao Trauma. Sociedade Brasileira de Atendimento Integrado ao Traumatizado. Disponível em: <<http://www.sbait.org.br/projeto.php>>. Acesso em: 04 jul.2008

URBAN, B.C.; HIEN, T.T.; DAY, N.P.; PHU, N.H.; ROBERTS, R.; PONGPONRATN, E.; JONES, M.; MAI, N.T.H.; BETHELL, D.; TURNER, G.D.H.; FERGUSON, D.; WHITE, N.J.; ROBERTS, D.J. **Fatal plasmodium falciparum malaria causes specific patterns of splenic architectural disorganization.** Infect Immun., v.73, n.4, p.1986-94, apr.2005.

WARDEMANN, H; BOEHM, T; DEAR, N; CARSETTI, R. **B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen.** J. of Exp. Med, v.195, p.771-80, 2002.

WAYNFORTH, H.B.; FLECKNELL, P.A. **Experimental and Surgical Technique in the Rat.** 2. ed. San Diego, California, USA: Academic Press. p.383, 1992.

World Health Organization. Health Topics, Malaria [homepage on the Internet]. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/malaria/>>. Acesso em: 11 jul. 2007.

XU, Q.; MING, Z.; DART, A. M; DU, X-J. **Optimizing dosage of ketamine and xylazine in murine echocardiography.** Clin. and Experim. Pharmacol. and Physiol., v.34, n.5-6, p. 499-07, 2007.

ZOLI, G; CORAZZA, G. R; DAMATO, G; BARTOLI, R; BALDONI, F; GASPARIN, G. **Splenic autotransplantation after splenectomy: tuftsin activity correlates with residual splenic function.** Br. J. Surg. v.81, p.716-8; 1994.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Identificação

Identificação (grupos e números dos animais)		
Na base da cauda contornando-a (grupos)	1,0 cm da marcação do grupo	
<b>G 1</b> (n = 10) SEM MARCAÇÃO	1   Marrom	6 — Marrom
<b>G 2</b> (n = 10) VERDE	2   Verde	7 — Verde
<b>G 3</b> (n = 10) AZUL	3   Azul	8 — Azul
<b>G 4</b> (n = 10) VERMELHO	4   Vermelho	9 — Vermelho
<b>G 5</b> (n = 10) PRETO	5   Preto	10 — Preto

Protocolo 5.1. Identificação dos grupos e dos animais

### 9.2 Recuperação pós-anestésica

PARÂMETROS	Nº. de pontos	Ao Término da cirurgia	30 min. após	60 min. após
<b>1. Atividade motora</b>				
A. Deambulando.	2			
B. Movendo os membros sem deambular.	1			
C. Incapaz de mover os membros.	0			
<b>2. Respiração:</b>				
A. Frequência respiratória > 60 e ausência de cianose de extremidades.	2			
B. Frequência respiratória < 60 ou cianose de extremidades.	1			
C. Frequência respiratória < 60 e cianose de extremidades.	0			
<b>3. Consciência:</b>				
A. Completamente acordado.	2			
B. Reagindo ao estímulo doloroso (pinçamento).	1			
C. Não respondendo ao estímulo doloroso (pinçamento).	0			
<b>4. Cor:</b>				
A. Rosada (coloração normal).	2			
B. Pálida.	1			
C. Cianótica.	0			
<b>Total</b>	<b>0 a 8</b>			
Camundongo nº:	Grupo:	Data:	Alta:	h.

Protocolo 5.2. Avaliação do animal em recuperação pós-anestésica. Critérios de alta. Pontuação pós-anestésica (índice igual ou superior a seis são considerados seguros). Adaptação da Escala de Aldrete Kroulik, (WAINFORT; FLEKNELL, 1992) e (Andersen, et al.; 2004).



### 9.3 Recuperação pós-operatória

<b>Exame Físico</b>
Respiração
Narinas (secreção)
Olhos (brilho, secreção)
Coordenação motora (como se movimentar)
Comportamento (isolamento, ativo/luta ao manuseio)
Postura (normalmente, encurvada) e piloereção
<b>Incisão Cirúrgica</b>
Limpa
Suja
Edemaciada
Hiperemiada

Protocolo 5.3. Evolução clínica e recuperação pós-cirúrgica. Aspecto da incisão cirúrgica. Diariamente nos 3 primeiros dias, e a seguir, de 3 em 3 dias até o 12º dia após a cirurgia (ANDERSEN, et al.; 2004).

### 9.4 Contagem de eritrócitos na câmara de Neubauer

1	Homogeneizar o sangue;
2	Aspirar o sangue até a marca de 0,5 (pipeta de glóbulos vermelhos);
3	Limpar o sangue de fora da pipeta com papel ou gaze;
4	Aspirar o diluente até a marca 101;
5	Agitar manualmente (aproximadamente 5 minutos);
6	Desprezar as primeiras gotas e preencher a câmara de Neubauer;
7	Deixar a câmara em repouso alguns minutos (aproximadamente 5 minutos) e iniciar contagem;
8	Contar as hemácias de 5 quadrados médios e multiplicar por 10000.

Protocolo 5.4. Técnica de contagem de eritrócitos na câmara de Neubauer. Diluição em pipeta de Thomas (microdiluição).

### 9.5 Determinação da parasitemia

1	Anti-sepsia da cauda com álcool 70%. Deixar secar.
2	Incisão na lateral da extremidade da cauda.
3	Coletar a primeira gota de sangue em lâmina de vidro.
4	Confeccionar o esfregaço com lâmina extensora.
5	Deixar secar à temperatura ambiente.
6	Fixar com metanol 99,8%.
7	Colocar as lâminas em placas próprias de acrílico e realizar coloração pelo método de Giemsa por 15 minutos.
8	Lavar as lâminas em água corrente e secar à temperatura ambiente.
9	Visualizar em microscopia ótica, aumento de 1000 x.
10	Contar o número de hemácias parasitadas e o número total de hemácias, através da leitura de 10 campos.
11	Determinar o índice de parasitemia em percentual.

Protocolo 5.5. Confeção de lâmina para o exame de esfregaço e determinação do índice de parasitemia (SILVA, et al., 2005).

### 9.6 Monitoramento da parasitemia

Grupos 3, 4 e 5		Dias das Coletas					
Nº	%	3º	5º	7º	9º	12º	Média Individual
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
<b>Média do Grupo</b>							

Protocolo 5.6 Monitoramento da parasitemia em percentual através do exame da gota estendida.

### 9.7 Determinação dos níveis das imunoglobulinas

1	Pipetar 150 µL de TBS em cada poço da placa da ELISA;
2	Realizar a diluição seriada das amostras;
3	Preparar a placa para DOT: placa acrílica + papel de filtro + placa de nitrocelulose e placa acrílica com furos;
4	Pipetar 5 µL das amostras diluídas da placa de ELISA para a placa de DOT;
5	Aguardar a placa de DOT secar;
6	Colocar a membrana de nitrocelulose em uma placa de Petri e adicionar leite desnatado, Molico®, para fazer o bloqueio da membrana (24h);
7	Descartar o excesso de leite e adicionar à placa de Petri 20 mL de TBS + 20 µL anti-imunoglobulina IgG ou do anti-imunoglobulina IgM;
8	Homogeneizar por 1 hora;
9	Lavar a membrana 5 vezes com PBS;
10	Adicionar à placa colocando uma solução composta por DAB (5mg) + TBS (30 mL) + peróxido de hidrogênio a 0,015% (15 a 20 µL), durante 5 minutos;
11	Lavar a placa com água;
12	Deixar secar.

Protocolo 5.7. Técnica para determinar os níveis das Imunoglobulinas G e M. Utilizou-se o método DOT-ELISA, conforme protocolo do Laboratório de Imunologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFAM.

### 9.8 Monitoramento dos níveis das Imunoglobulinas G e M

Grupos 1,2,3,4 e 5	1° amostra		2° amostra		3° amostra	
	IgM	IgM	IgM	IgG	IgM	IgG
N° Dias	6° dia		22° dia		32° dia	
1						
2						
3						
4						
5						
6						

Protocolo 5.8. Acompanhamento das alterações dos níveis das imunoglobulinas no 6°, 22° e 32° dia, dos grupos controles e experimentais.

### 9.9 Monitoramento de sobrevivência dos animais.

Grupos 1,2,3,4 e 5	Números dos camundongos										Grupos: 1 a 5. Descartes/ Óbitos Observações	
	Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10
Dias												
1												
2												Descartes de 2 camundongos:
3												1 do G 1 e 2 do G 2, por pesar
4												menos de 15 g, no 8º dia.
5												
6												
7												2 óbitos do G 4, 30 minutos após
8												o término da cirurgia, de causa
9												anestésica, no 8º dia.
10												
11												
12												1 óbito do G 5 , no 4º dia de pós-
13												operatório, de causa indetermi-
14												nada.
15												
16												
17												
18												
19												
20												
21												
22												
23												
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												
31												
32												

Protocolo 5.9 Evolução dos animais durante o experimento: descarte, óbitos pós-operatório e após inoculação.

## 9.10 Resultados para análise da parasitemia.

GRUPO 3 1ª coleta/ 23º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
3.1	10,80%
3.2	8,40%
3.3	7,70%
3.4	7,70%
3.5	9,80%
3.6	9,10%
3.7	8,80%
3.8	9,80%
3.9	7,50%
3.10	8,70%
<b>MÉDIA</b>	<b>8,83%</b>

GRUPO 3 2ª coleta/ 25º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
3.1	12,60%
3.2	11,30%
3.3	11,80%
3.4	10,80%
3.5	12,60%
3.6	11,70%
3.7	12,50%
3.8	12,90%
3.9	13,00%
3.10	12,40%
<b>MÉDIA</b>	<b>12,16%</b>

GRUPO 3 3ª coleta/ 27º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
3.1	16,50%
3.2	15,60%
3.3	14,60%
3.4	16,20%
3.5	15,40%
3.6	14,40%
3.7	14,30%
3.8	16,30%
3.9	17,10%
3.10	13,80%
<b>MÉDIA</b>	<b>15,42%</b>

GRUPO 3 4ª coleta/ 29º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
3.1	21,00%
3.2	21,70%
3.3	20,10%
3.4	20,40%
3.5	20,70%
3.6	20,00%
3.7	21,00%
3.8	20,10%
3.9	21,10%
3.10	20,00%
<b>MÉDIA</b>	<b>20,61%</b>

GRUPO 3 5ª coleta/ 32º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
3.1	31,20%
3.2	29,70%
3.3	28,20%
3.4	32,00%
3.5	31,70%
3.6	32,00%
3.7	30,30%
3.8	31,60%
3.9	32,00%
3.10	31,70%
<b>MÉDIA</b>	<b>31,04%</b>

GRUPO 4 1ª coleta/23º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
4.1	-
4.2	10,20%
4.3	-
4.4	9,10%
4.5	9,30%
4.6	9,10%
4.7	9,00%
4.8	9,50%
4.9	10,20%
4.10	9,50%
<b>MÉDIA</b>	<b>9,49%</b>

GRUPO 4 2ª coleta/25º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
4.1	-
4.2	15,10%
4.3	-
4.4	13,60%
4.5	15,60%
4.6	12,50%
4.7	16,30%
4.8	13,70%
4.9	12,80%
4.10	15,50%
<b>MÉDIA</b>	<b>14,39%</b>

GRUPO 4 3ª coleta/27º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
4.1	-
4.2	16,00%
4.3	-
4.4	15,20%
4.5	16,90%
4.6	14,10%
4.7	17,00%
4.8	15,70%
4.9	16,50%
4.10	17,00%
<b>MÉDIA</b>	<b>16,05%</b>

GRUPO 4 4ª coleta/29º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
4.1	-
4.2	25,00%
4.3	-
4.4	21,20%
4.5	21,00%
4.6	21,50%
4.7	24,30%
4.8	21,60%
4.9	23,10%
4.10	23,20%
<b>MÉDIA</b>	<b>22,61%</b>

GRUPO 4 5ª coleta/32º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
4.1	-
4.2	34,10%
4.3	-
4.4	35,20%
4.5	35,80%
4.6	35,90%
4.7	35,20%
4.8	33,30%
4.9	35,40%
4.10	35,20%
<b>MÉDIA</b>	<b>35,01%</b>

GRUPO 5 1ª coleta/23º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
5.1	12,60%
5.2	10,20%
5.3	12,30%
5.4	11,10%
5.5	10,40%
5.6	12,20%
5.7	13,70%
5.8	-
5.9	11,10%
5.10	11,80%
<b>MÉDIA</b>	<b>11,71%</b>

GRUPO 5 2ª coleta/25º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
5.1	21,30%
5.2	21,80%
5.3	22,80%
5.4	21,40%
5.5	20,10%
5.6	18,20%
5.7	23,80%
5.8	-
5.9	21,90%
5.10	22,50%
<b>MÉDIA</b>	<b>21,53%</b>

GRUPO 5 3ª coleta/27º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
5.1	33,50%
5.2	30,80%
5.3	31,80%
5.4	31,50%
5.5	30,50%
5.6	33,10%
5.7	33,60%
5.8	-
5.9	29,80%
5.10	30,50%
<b>MÉDIA</b>	<b>31,68%</b>

GRUPO 5 4ª coleta/29º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
5.1	43,60%
5.2	46,70%
5.3	49,60%
5.4	44,90%
5.5	44,90%
5.6	47,50%
5.7	44,10%
5.8	-
5.9	43,60%
5.10	45,40%
<b>MÉDIA</b>	<b>45,59%</b>

GRUPO 5 5ª coleta/32º dia	
INDIVÍDUO	PARASITEMIA
5.1	63,80%
5.2	65,30%
5.3	62,30%
5.4	62,70%
5.5	63,50%
5.6	62,70%
5.7	63,40%
5.8	-
5.9	61,30%
5.10	64,00%
<b>MÉDIA</b>	<b>63,22%</b>

- 1- Do 1º ao 7º dia correspondem ao período de aclimação.
- 2- No 8º dia foram realizados os procedimentos cirúrgicos.
- 3- No dia 20º foi inoculado o Plasmodium berghei
- 4- A coleta de sangue para a parasitemia foi realizada no 23º, 25º, 27º, 29 e 32º dia.

### 9.11 Resultados para análise das imunoglobulinas

GRUPO 1	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
controle negativo nenhum procedimento realizado	1	2048	1024	2048	2048	2048	16384
	2	4096	1024	1024	8192	131072	131072
	3	4096	2048	2048	32768	1024	8192
	4	2048	8192	8192	2048	16384	8196
	5	2048	2048	65536	8192	16384	65532
	6	16384	1024	8192	524288	32768	65532
	7						
	8						
	9						
	10						
MÉDIA		5120	2560	14506,7	96256	33280	49151,33

GRUPO 1	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
controle negativo nenhum procedimento realizado	1	7,624618986	6,931471806	7,624618986	7,624618986	7,624618986	9,704060528
	2	8,317766167	6,931471806	6,931471806	9,010913347	11,78350207	11,78350207
	3	8,317766167	7,624618986	7,624618986	10,39720771	6,931471806	9,010913347
	4	7,624618986	9,010913347	9,010913347	7,624618986	9,704060528	9,011401509
	5	7,624618986	7,624618986	11,09035489	9,010913347	9,704060528	11,09029385
	6	9,704060528	6,931471806	9,010913347	13,16979643	10,39720771	11,09029385
	7						
	8						
	9						
	10						
MÉDIA log		8,202241637	7,509094456	8,548815227	9,473011468	9,357486938	10,28174419

GRUPO 2	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
controle negativo Laparotomia e sangue citrado	1						
	2	4096	4096	512	4096	32768	131072
	3	1024	512	256	1024	512	512
	4	512	512	1024	512	2048	2048
	5	512	256	256	2048	512	128
	6	4096	2048	512	16384	8192	4096
	7	1024	1024	2048	4096	8192	8192
	8						
	9						
	10						
MÉDIA		1877,33	1408	1088	4693,333	8704	24341,33

GRUPO 2	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
controle negativo Laparotomia e sangue citrado	1						
	2	8,317766167	8,317766167	6,238324625	8,317766167	10,39720771	11,78350207
	3	6,931471806	6,238324625	5,545177444	6,931471806	6,238324625	6,238324625
	4	6,238324625	6,238324625	6,931471806	6,238324625	7,624618986	7,624618986
	5	6,238324625	5,545177444	5,545177444	7,624618986	6,238324625	4,852030264
	6	8,317766167	7,624618986	6,238324625	9,704060528	9,010913347	8,317766167
	7	6,931471806	6,931471806	7,624618986	8,317766167	9,010913347	9,010913347
	8						
	9						
	10						
MÉDIA log		7,162520866	6,815947276	6,353849155	7,855668046	8,086717107	7,971192576

GRUPO 3	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
controle positivo laparotomia e sangue citrado contaminado	1	4096	2048	4096	16384	131072	262144
	2	4096	512	1024	2048	1024	1024
	3	512	1024	2048	4096	32768	16384
	4	512	512	512	2048	2048	512
	5	4096	8192	65536	1024	8192	32768
	6	1024	4096	4096	2048	8192	8192
	7						
	8						
	9						
	10						
MÉDIA		2389,33	2730,67	12885,3	4608	30549,3	53504

GRUPO 3	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
controle positivo laparotomia e sangue citrado contaminado	1	8,317766167	7,624618986	8,317766167	9,704060528	11,78350207	12,47664925
	2	8,317766167	6,238324625	6,931471806	7,624618986	6,931471806	6,931471806
	3	6,238324625	6,931471806	7,624618986	8,317766167	10,39720771	9,704060528
	4	6,238324625	6,238324625	6,238324625	7,624618986	7,624618986	6,238324625
	5	8,317766167	9,010913347	11,09035489	6,931471806	9,010913347	10,39720771
	6	6,931471806	8,317766167	8,317766167	7,624618986	9,010913347	9,010913347
	7						
	8						
	9						
	10						
MÉDIA log		7,393569926	7,393569926	8,086717107	7,971192576	9,126437877	9,126437877

GRUPO 4	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Laparotomia Esplenectomia parcial sangue citratado contaminado	1	-	-	-	-	-	-
	2	512	1024	512	1024	4096	4096
	3	-	-	-	-	-	-
	4	1024	1024	1024	1024	4096	2048
	5	2048	2048	4096	8192	16384	16384
	6	4096	2048	4096	16384	32768	65536
	7	2048	4096	2048	32768	65536	65536
	8	262144	2048	4096	262144	131072	32768
	9						
	10						
<b>MEDIA</b>		45312	2048	2645,33	53589,33	42325,3	31061,33

GRUPO 4	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Laparotomia Esplenectomia parcial sangue citratado contaminado	1	-	-	-	-	-	-
	2	6,238324625	6,931471806	6,238324625	6,931471806	8,317766167	8,317766167
	3	-	-	-	-	-	-
	4	6,931471806	6,931471806	6,931471806	6,931471806	8,317766167	7,624618986
	5	7,624618986	7,624618986	8,317766167	9,010913347	9,704060528	9,704060528
	6	8,317766167	7,624618986	8,317766167	9,704060528	10,39720771	11,09035489
	7	7,624618986	8,317766167	7,624618986	10,39720771	11,09035489	11,09035489
	8	12,47664925	7,624618986	8,317766167	12,47664925	11,78350207	10,39720771
	9						
	10						
<b>MEDIA log</b>		8,202241637	7,509094456	7,624618986	9,241962407	9,935109588	9,704060528

GRUPO 5	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Laparotomia Esplenectomia total sangue citratado contaminado	1	8192	512	10244	8192	4096	1024
	2	2048	1024	1024	1024	32768	131072
	3	8192	4096	2048	8192	65536	262144
	4	1024	1024	2048	16384	32768	65536
	5	4096	4096	1024	8192	16384	16384
	6	2048	2048	4096	1024	16384	32768
	7						
	8						
	9						
	10						
<b>MEDIA</b>		4266,67	2133,33	3414	7168	27989,3	84821,33

GRUPO 5	Indivíduo	IgM			IgG		
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Laparotomia Esplenectomia total sangue citratado contaminado	1	9,010913347	6,238324625	9,234447447	9,010913347	8,317766167	6,931471806
	2	7,624618986	6,931471806	6,931471806	6,931471806	10,39720771	11,78350207
	3	9,010913347	8,317766167	7,624618986	9,010913347	11,09035489	12,47664925
	4	6,931471806	6,931471806	7,624618986	9,704060528	10,39720771	11,09035489
	5	8,317766167	8,317766167	6,931471806	9,010913347	9,704060528	9,704060528
	6	7,624618986	7,624618986	8,317766167	6,931471806	9,704060528	10,39720771
	7						
	8						
	9						
	10						
<b>MEDIA log</b>		8,086711707	7,393569926	7,7773992	8,433290697	9,935109588	10,39720771

- 5- As diluições são feitas em escalas de 1: xxxx, no entanto devido a funções do programa, inserimos somente para quanto foi feita a diluição da amostra, ficando os signos "1:" subentendidos .
- 6- Os grupos eram compostos por 10 indivíduos inicialmente. Houve perdas durante o procedimento cirúrgico e alguns grupos tiveram o número de indivíduos reduzidos.
- 7- Destes, somente 6 indivíduos de cada grupo foram analisados quanto a dosagem de imunoglobulinas devido a dificuldade na obtenção de membrana de nitrocelulose.
- 8- Há ao lado de cada grupo uma tabela com os valores de diluição em logaritmos neperianos (LN)

## 10. LISTA DE FIGURAS, QUADROS E GRÁFICOS

### 10.1 Lista de Figuras

- Figura 01 – Divisão das áreas do baço para procedimentos cirúrgicos (pág. 31)
- Figura 02 – Dupla irrigação do pólo superior esplênico (pág. 32)
- Figura 03 – Anti-sepsia e teste de reflexo (pág. 39)
- Figura 04 – Cuidados de assepsia (pág. 39)
- Figura 05 – Incisão cirúrgica. Laparotomia mediana (pág. 40)
- Figura 06 – Mobilização do baço para o campo operatório (pág. 40)
- Figura 07 – Exposição dos pedículos vasculares (pág. 40)
- Figura 08 – Exposição dos vasos esplenogástricos (pág. 40)
- Figura 09 – Ligadura dos vasos do pedículo do segmento a ser ressecado (pág. 41)
- Figura 10 – Esplenectomia parcial (pág. 41)
- Figura 11 – Ligadura dos pedículos vasculares para a esplenectomia total (pág. 41)
- Figura 12 – Aspecto final da remoção total do baço (pág. 41)
- Figura 13 – Comparação entre esplenectomia parcial e total (pág. 42)
- Figura 14 – Aspecto geral das cirurgias. Síntese da parede (pág. 42)
- Figura 15 – Hidratação pós-operatória (pág. 43)
- Figura 16 – Equipamentos, materiais e substâncias utilizadas na anestesia e na recuperação anestésica (pág. 44)
- Figura 17 – Ventilação com máscara e respirador artesanal (pág. 44)
- Figura 18 – Técnica de inoculação via intraperitoneal (pág. 46)
- Figura 19 – Caixa de contenção para administração de substância, identificação dos animais e coleta de sangue para esfregaço (pág. 46)
- Figura 20 – Técnica de coleta de sangue para esfregaço (pág. 47)
- Figura 21 – Técnica de esfregaço sangüíneo (pág. 47)
- Figura 22 – Técnica de coleta de sangue do plexo venoso retro-ocular (pág. 48)
- Figura 23 – Fluxograma da pesquisa (pág. 50)

### 10.2 Lista de Gráficos

- Gráfico 1 – Curva da evolução das médias da parasitemia (pág. 52)
- Gráfico 2 – Variação dos níveis de IgM (pág. 55)
- Gráfico 3 – Variação dos níveis de IgG (pág. 55)

### 10.3 Lista de Quadros

- Quadro 1 – Resultados da parasitemia nos grupos experimentais e controle (pág. 52)
- Quadro 2 – Resultado das imunoglobulinas M e G nos diferentes grupos (pág. 54)



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)