

GUILHERME VAZ DE MELO TRINDADE

**PREVALÊNCIA DE PSEUDOTROMBOCITOPENIA EM PACIENTES COM
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA**

BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS – BRASIL

2014

T833p Trindade, Guilherme Vaz de Melo.
Prevalência de pseudotrombocitopenia em pacientes com
Esquistossomose mansônica hepatoesplênica [manuscrito]. / Guilherme
Vaz de Melo Trindade. -- Belo Horizonte: 2014.
71f.: il.
Orientador: José Roberto Lambertucci.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Esquistossomose mansoni. 2. Trombocitopenia/epidemiologia. 3.
Erros de Diagnóstico. 4. Plaquetas. 5. Dissertações Acadêmicas. I.
Lambertucci, José Roberto. II. Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WC 810



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO GUILHERME VAZ DE MELO TRINDADE

Realizou-se, no dia 19 de dezembro de 2014, às 16:00 horas, Sala 022 - andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 272ª defesa de dissertação, intitulada "PREVALÊNCIA DA PSEUDOTROMBOCITOPENIA EM PACIENTES PORTADORES DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA", apresentada por GUILHERME VAZ DE MELO TRINDADE, número de registro 2013653489, graduado no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Jose Roberto Lambertucci - Orientador (UFMG), Profa. Maria das Gracas Carvalho (UFMG), Prof. Fausto Edmundo Lima Pereira (UFES).

A Comissão considerou a dissertação:

- Aprovada
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2014.

Prof. Jose Roberto Lambertucci

Profa. Maria das Gracas Carvalho

Prof. Fausto Edmundo Lima Pereira

GUILHERME VAZ DE MELO TRINDADE

**PREVALÊNCIA DE PSEUDOTROMBOCITOPENIA EM PACIENTES COM
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós graduação em Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Lambertucci

BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS – BRASIL

2014

Agradecimentos

Agradeço à minha avó Geni, pela inspiração, porque a amizade, amor e bem querer são eternos.

A minha mãe Benedita e meu pai Hércules, pelo incondicional amor e apoio, nos dias de chuva e de sol!

A minha irmã Débora, pela cumplicidade diária, pelos sorrisos, pela parceria e acima de tudo compreensão. Você é meu exemplo de confiança!

Ao meu irmão Marcelo, pela admiração, pelas caronas para escola. Aprendi a entender seu jeito de amar.

Agradeço aos amigos, companheiros e colegas: Guilherme, Júlia, Marina, Thiago, Patrícia, Iago, Samuel, Fernanda Vinhal, Cyro, Rivelle e João Paulo, por terem participado desta etapa dividindo de perto e de longe confiança, ânimo, amor, amizade, viagens, aventuras, sonhos, palavras de incentivos e força.

Agradeço aos familiares por entenderem minha ausência.

Agradeço ao meu orientador Professor José Roberto Lambertucci, por desde o primeiro momento ter sido minha referência em pesquisa, por ter praticamente pegado em minha mão e ensinado como se faz ciência.

Amor é fogo que arde sem se ver
É ferida que dói e não se sente
É um contentamento descontente
É dor que desatina sem doer

É um não querer mais que um bem querer
É andar solitário entre a gente
É um nunca contentar-se de contente
É um cuidar que ganha em se perder

É querer estar preso por vontade
É servir a quem vence, o vencedor
É ter com quem nos mata, lealdade

Mas como causar pode seu favor
Nos corações humanos amizade
Se tão contrário a si, é o mesmo Amor?

Luíz Vaz de Camões

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CTRDIP Orestes Diniz – Centro de Tratamento e Referência em Doenças Infeciosas e Parasitárias Oreste Diniz

EDTA – Ácido etileno-dinitro-tetra-acético

EHE – Esquistossomose MansônicaHepatoesplênica

fL - Fentolitros

HSS – *Hepatosplenicformofschistosomiasis*

HIV – Síndrome da Imunodeficiência Humana

µm – Micrometro

PECE – Programa Especial de Controle da Esquistossomose

PLTFONIO – Contagem de plaquetas através do método indireto de *Fonio*

PLTEDTAT1 – Contagem de plaquetas em amostras anticoaguladas em EDTA no momento 20 minutos

PLTEDTAT2 – Contagem de plaquetas em amostras anticoaguladas em EDTA no momento 180 minutos

PLTCITRATOT1 – Contagem de plaquetas em amostras anticoaguladas em citrato de sódio no momento 20 minutos

PLTCITRATOT2 – Contagem plaquetária em amostras anticoaguladas em citrato de sódio no momento 180 minutos

PTP – Pseudotrombocitopenia

LISTA DE FIGURAS E IMAGENS

Figura 1: Distribuição mundial das espécies de <i>Schistosoma</i>	18
Figura 2: Distribuição da esquistossomose no Brasil	19
Figura 3: Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	21
Figura 4: Box-plot dos valores de contagem das plaquetas para todos os exames realizados entre pacientes com EHE e sem EHE nos tempos 20 minutos e 180 minutos nas amostras anticoaguladas com EDTA e citrato de sódio.....	40
Figura 5: Fluxograma do estudo.....	30
Imagem 1: Hemácias bem distribuídas no esfregaço sanguíneo com fácil visualização das plaquetas.....	33
Imagem 2: Satelitismo plaquetário em citrato de sódio.....	34
Imagem 3: Grumo ou aglutinado de plaquetas.....	34
Imagem 4: Analisador hematológico T-890 (BECKMAN COULTER).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores das plaquetas no sangue de pacientes com e sem esquistossomose mansônicahepatoesplênica em amostras anticoaguladas com EDTA e Citrato de sódio nos momentos 20 e 180 minutos após a obtenção da amostra. Exames realizados no período de 25 de julho de 2014 a 07 de novembro de 2014 no ambulatório do Centro de Referência e Tratamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz.....38

Tabela 2: Valores das plaquetas no sangue de pacientes com e sem esquistossomose mansônicahepatoesplênica em amostras da polpa digital não anticoaguladas através do método indireto de Fonio (referência), e comparação estatística entre os grupos com e sem esquistossomose mansônicahepatoesplênica dos valores de contagem obtidos na metodologia de referência e nas metodologias automatizadas. Exames realizados no período de 25 de julho de 2014 a 07 de novembro de 2014 no ambulatório do Centro de Referência e Tratamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz.....39

Tabela 3: Descrição dos resultados do percentual de redução plaquetária entre os voluntários com esquistossomose mansônicahepatoesplênica e voluntário sem a doença. Exames realizados no período de 25 de julho de 2014 a 07 de novembro de 2014 no ambulatório do Centro de Referência e Tratamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz.....41

Tabela 4: Distribuição de frequência de grumo ou satelitismo plaquetário e da ocorrência de redução nos valores de exames que empregaram como anticoagulante EDTA e citrato de sódio. Exames realizados no período de 25 de julho de 2014 a 07 de novembro de 2014 no ambulatório do Centro de Referência e Tratamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz.....42

RESUMO

Introdução: Pseudotrombocitopenia (PTP) é um artefato de técnica gerado por erros pré analíticos (coleta, transporte, acondicionamento, temperatura e/ou composição química dos anticoagulantes empregados) que interferem na qualidade da amostra que será submetida aos processos analíticos automatizados. No caso da PTP induzida por anticoagulante, esta relacionada à exposição antigênica das glicoproteínas IIb/IIIa ao ácido etileno-dinitro-tetra-acético (EDTA). Pacientes que têm a contagem de plaquetas normal, quando vítimas de uma avaliação laboratorial espúria, podem estar sujeitos à iatrogenias terapêuticas e diagnósticas, como corticoterapia, punção medular, transfusão de concentrado de plaquetas ou mesmo esplenectomia. Além do mais, esses doentes com frequência não recebem um tratamento cirúrgico adequado devido à contraindicação de tais procedimentos com base em uma falsa baixa contagem de plaquetas. Chama a atenção o fato de alguns pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica (EHE) não poderem ser submetidos a procedimentos invasivos (realização de biópsias, extração de dentes, cirurgia oftálmica de catarata, escleroterapia das varizes do esôfago) que, em muitos casos, seria a melhor opção terapêutica, por apresentarem baixa contagem de plaquetas, que pode não corresponder à realidade. **Objetivo:** Estabelecer a prevalência de pseudotrombocitopenia (PTP) em pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica (EHE). **Pacientes e Métodos:** Para investigar a prevalência da PTP neste grupo de pacientes realizou-se estudo observacional transversal clínico laboratorial examinando-se amostras sanguíneas de pacientes com EHE e de grupo controle. O exame consistiu na contagem de plaquetas empregando-se o método indireto de *Fonio* (contagem microscópica) em amostra livre de anticoagulante, bem como na contagem de plaquetas automatizada utilizando-se sangue total em EDTA nos tempos 20 e 180 minutos e, simultaneamente, realizando o procedimento anterior substituindo o anticoagulante pelo citrato de sódio. Nos casos das amostras com anticoagulantes, foi realizado esfregaço sanguíneo no momento de cada contagem automatizada no intuito de identificar presença de grumos ou satelitismos que explicassem a falsa redução do número de plaquetas da contagem automatizada. **Resultado:** A prevalência de PTP nos pacientes com EHE foi determinada após a

comparação dos percentuais de redução da contagem de plaquetas, seus valores no método de referência e observações microscópicas das amostras. 7.5% do grupo de pacientes com EHE apresentou grumos de plaquetas e 0.0% no grupo controle sem EHE. Ao contrário do que a prática clínico laboratorial sugere, a prevalência de pseudotrombocitopenia em amostras anticoaguladas com citrato de sódio do grupo de pacientes com EHE foi 19.4% e 9.0% no grupo controle sem EHE. **Conclusão:** A prevalência de pseudotrombocitopenia nos pacientes com EHE foi de 7.5% com emprego de EDTA e 19.4% com citrato de sódio.

Palavras-chave: Erros pré analíticos, Esquistossomose, Plaquetas, Pseudotrombocitopenia.

ABSTRACT

Introduction: Pseudothrombocytopenia (PTP) is a technical artefact generated by pre-analytical errors (collection, transportation, packaging, temperature and employed anticoagulants chemical composition) that reduces sample quality in automated blood analysis. PTP is due to antigenic exposure of glycoprotein IIb/IIIa to ethylene-dinitrotetraacetic acid (EDTA). Patients with normal platelet counts and pseudotrombocytopenia may be subject to iatrogenic therapeutic and diagnostic investigation, such as, corticosteroids therapy, bone marrow puncture and platelet concentrate transfusion or splenectomy. Presently PTP patients often don't receive adequate surgical treatment because surgeons are not aware of the presence of a false low platelet count. Patients with hepatosplenic form of schistosomiasis (HSS) cannot be subject to invasive procedures that in many cases would be the best treatment option, because they have apparent low platelet count. **Aims:** Our aims were to determine the prevalence of Pseudothrombocytopenia in patients with hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni. **Patients and Methods:** We investigated PTP prevalence in this group of patients performing a clinical-laboratory cross sectional study examining blood samples of patients with HSS and health controls. We selected 136 volunteers, being 67 with HSS and 67 without the disease. The test consisted in platelet counting using *Fonio* indirect method (microscopic counting) in anticoagulant-free sample, automated platelet count using EDTA as anticoagulant in whole blood sample at times 20 and 180 minutes after collection, and simultaneously we performed the above procedure by changing the anticoagulant to sodium citrate. As we performed automated counts we also made a blood film from all samples in the at all analysis moments and submitted them to microscopic verification, checking for satellitism, clusters or clumps which would explain the automated false platelet count. **Results:** We found platelet clumps in 7.5% of HSS patients and none of the controls without HSS ($p=0.05$). Contrary to what the clinical and laboratory practice and guidelines suggests, PTP prevalence in anticoagulated samples with sodium citrate was 19.4% in HSS patients and 9.0 % in the group without HSS ($p<0.01$). **Conclusion:** The prevalence of PTP in patients with HSS is worse than currently believed and made worse by sodium citrate, the alternative anticoagulant.

Key words: Pre analytical errors, Schistosomiasis, platelet, Pseudothrombocytopenia

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS E IMAGENS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Epidemiologia da esquistossomose humana.....	18
2.2. Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	20
2.3. Esquistossomose mansônicahepatoesplênica.....	22
2.4. Plaquetas.....	22
2.5. Trombocitopenia.....	24
2.6. Pseudotrombocitopenia.....	24
2.7. Contagem de plaquetas automatizada.....	25
2.8. Contagem de plaquetas microscópica através do método indireto de Fonio.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivo geral.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. PACIENTES E MÉTODOS.....	28
4.1. Ambiente do estudo.....	28
4.2. Tamanho amostral.....	28
4.3. Critérios de inclusão e perfil dos voluntários.....	29
4.4. Critérios de exclusão.....	29
4.5. Fluxograma do estudo.....	30
4.6. Colaboradores do estudo.....	31
4.7. Plano de coleta de amostras e preparo do esfregaço sanguíneo.....	31
4.8. Contagem de plaquetas automatizada pareada.....	31
4.9. Coloração do esfregaço sanguíneo.....	32
4.10. Contagem de plaquetas e identificação de alterações.....	32

4.11. Análise estatística.....	35
5. RESULTADOS.....	37
6. DISCUSSÃO.....	44
7. CONCLUSÃO.....	47
8. PROPOSIÇÕES.....	48
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
10. ANEXOS.....	61

1. INTRODUÇÃO

A pseudotrombocitopenia (PTP) é um evento *in vitro* raro, considerado artefato de técnica que ocorre com o uso de contadores celulares automáticos quando há o emprego de anticoagulantes na amostra, em especial o ácido etileno-dinitro-tetraacético (EDTA). Neste caso, o fenômeno se deve à presença de anticorpos antiplaquetários que reconhecem a glicoproteína IIb/IIIa das plaquetas na presença desse anticoagulante. Na contagem diferencial por observador, nota-se a presença de agregados plaquetários ou de satelitismo em neutrófilos (COHEN,2000; BIZARRO,1995; BERKMAN,1991;PAYNE,1984).

Esse fenômeno ocorre não somente na presença do EDTA, mas também, em menor escala, com outros anticoagulantes ou quando a amostra é armazenada em temperatura ambiente antes de ser examinada (BIZARRO,1995). Tem sido postulado que para a correta quantificação das plaquetas sejam usados tubos contendo citrato de sódio 3,8% (PAYNE,1984) ou EDTA 5% coletados e examinados à 37°C imediatamente após a coleta (BIZARRO,1995).

Estudos de prevalência da PTCP variaram de 17% em pacientes acompanhados em um ambulatório de trombocitopenia (COHEN,2000), a 0,09 a 0,11% para a população em geral (SUAREZ et al.,1995; BERKMAN,1991;PAYNE,1984).

É importante que os pacientes que tenham plaquetas normais em número e função sejam corretamente avaliados, pois uma dosagem laboratorial irreal pode sujeitá-los à iatrogenias terapêuticas e diagnósticas (CHIA,2011; SUAREZ et al.,1995; BERKMAN,1991;PAYNE,1984). Além disso, esses doentes, com frequência, não recebem um tratamento cirúrgico adequado devido à contra-indicação do procedimento por uma falsa baixa contagem de plaquetas. Apesar de a plaquetopenia ser um achado explicável pela doença, foram evidenciados alguns casos de PTCP em pacientes portadores da Esquistossomose Mansônica Hepatoesplênica sob tratamento.

No Brasil, estima-se que cerca de 6 milhões de indivíduos estejam infectados e 25 milhões, expostos aos riscos de contrair a esquistossomose mansônica (CVEPAV, 2007). Em Minas Gerais, calcula-se que 5,3% da população seja portadora do helminto (DRUMMOND, 2010). Desse número, cerca de 5% têm a forma hepatoesplênica.

As plaquetas são produzidas na medula óssea a partir dos megacariócitos. Elas são fragmentos citoplasmáticos anucleados presentes no sangue (CASTRO, 2007). Possuem em geral diâmetro de 1,3 a 3,5 microgramas, porém podem alterar seu tamanho em decorrência de enfermidades (LEWIS, 2006). Exerce sua função na hemostasia, processo pelo qual o organismo procura controlar a perda de sangue via um vaso rompido, impedindo assim que a hemorragia se protele por mais tempo. Elas circulam pela corrente sanguínea sob a forma inativa, e quando ocorre a lesão vascular elas formam um tampão mecânico durante a resposta hemostática (LORENZI, 2009).

A contagem normal de plaquetas em uma pessoa saudável é de 150.000 a 450.000 plaquetas/ μ L. A diminuição de plaquetas é denominada trombocitopenia ou plaquetopenia. O baixo número de plaquetas circulantes no sangue está geralmente associado com sangramento mucocutâneo. O aumento da quantidade de plaquetas é denominado trombocitose ou plaquetose. Nesses casos, alguns pacientes podem ter tendência de sangramento devido à falta de coesão das plaquetas, ou as plaquetas mantêm a sua capacidade de coesão, mas, devido ao seu número elevado, tendem a unir-se umas às outras, formando coágulos que podem bloquear um vaso sanguíneo e provocar lesões, conduzindo o paciente a um evento tromboembólico.

O que se observa na clínica é que a plaquetopenia é mais comum que a plaquetose e diversas são as causas destas anormalidades (PEERSCHKE, 2002).

Considerando a importância clínica destas alterações, a contagem plaquetária é de suma importância na avaliação de pacientes com doenças que as acometem (COMAR, 2013). Considerando que um enorme número dos pacientes portadores da forma hepatoesplênica apresentam contagem de plaquetas abaixo dos valores de referência, é de grande importância que seja estabelecida a real causa dessas trombocitopenias.

Acredita-se que a hipertensão portal na esquistossomose resulte da deposição de ovos do *S. mansoni* em ramos intra-hepáticos da veia porta, que desencadeiam resposta inflamatória granulomatosa, substituída ao longo do tempo por tecido fibroso. Como consequência da hipertensão portal pré sinusoidal, surgem esplenomegalia e circulação colateral, como varizes esofagianas e hemorroidárias que podem levar a hemorragia digestiva e eventual disfunção hepática (LAMBERTUCCI e BARRAVIERA, 1994; PRATA, 2002).

A contagem sérica de plaquetas tem sido apontada como marcador não invasivo da presença de hipertensão portal na cirrose por hepatites virais. Nestes casos, a redução das plaquetas poderia ser justificada pelo seqüestro esplênico, destruição autoimune das plaquetas e diminuição da trombopoetina. Na esquistossomose, o hiperesplenismo parece ser a causa da plaquetopenia. Em estudo de PETROIANU e colaboradores, 2005, verificou-se a normalização dos níveis das plaquetas após o tratamento cirúrgico da hipertensão portal mesmo nos casos em que o baço havia sido preservado. Os autores sugerem que a plaquetopenia na esquistossomose não deve ser decorrente de hiperesplenismo, mas do represamento sanguíneo no baço e sistema porta. Outros autores sugerem que na esquistossomose ocorre consumo crônico de plaquetas para compensar a coagulação intravascular disseminada. O papel da trombopoetina, que encontra-se reduzida na hepatite C (KAWASAKI *et al*, 2000) não parece ter relevância na esquistossomose (SOUZA *et al*, 2002).

Para esta contagem existem vários métodos. O primeiro método de referência para a determinação de plaquetas foi a contagem manual por microscopia de contraste de fase (FELLE *et al* 2005; SEGAL *et al* 2005). Em 2001, o International Council for Standardization in Haematology (ICSH) propôs um novo método, baseado na detecção imunológica por citometria de fluxo, usando isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado com anticorpo monoclonal CD61 (HARRISON *et al* 2000; KUNZ *et al* 2001; NORRIS *et al* 2003). Porém, os princípios utilizados para contagem plaquetária pela maioria dos analisadores hematológicos são a impedância eletrônica, a densidade óptica (*light scatter*) ou associação das duas metodologias (BAIN, 2004; BRIGGS *et al* 2000; SEGAL *et al* 2005).

Dentre os métodos existe ainda a contagem manual pelo método indireto de Fonio, que consiste em uma relação entre o número de eritrócitos com o número de plaquetas por campo da microscopia óptica (CARVALHO, 2008; FAILACE, 2003).

Atualmente, os métodos automatizados estão bem difundidos, devido à sua agilidade e facilidade na realização do hemograma, o que inclui a contagem de plaquetas. Entretanto, vale ressaltar que a contagem de plaquetas por microscopia é uma ferramenta na avaliação dos pacientes com doenças que acometem as plaquetas na medida em que adiciona informações úteis àquelas obtidas pelos analisadores hematológicos, além de servir de ferramenta de controle interno da qualidade das contagens automatizadas de plaquetas (MORENO et al 2002; NOSANCHUMK et al 1978).

A contagem manual pode contribuir por confirmar ou excluir os resultados duvidosos por equipamentos automatizados (FAILACE, 2003). Dentre estas situações, está o fenômeno de satelitismo ou agregação plaquetária, que podem originar resultados falsamente diminuídos.

O satelitismo pode levar a pseudotrombocitopenia que representa grave problema clínico que pode conduzir tanto a diagnósticos errados como a condutas terapêuticas desnecessárias, incluindo transfusões plaquetárias e em alguns casos à esplenectomia (BRAESTER, 2003).

Resultados falsamente aumentados podem também ocorrer devido a fragmentos citoplasmáticos de células leucêmicas, lipemia, presença de bactérias e leveduras, fragmentos de eritrócitos e micrócitos com volume próximo ao limite de corte (BAIN, 2006).

O presente estudo procura definir a prevalência da pseudotrombocitopenia em pacientes portadores da EHE e sugerir melhor método para quantificação plaquetária sérica, que reduza a interferência intrínseca do processo analítico, possibilitando a utilização da contagem plaquetária recentemente proposta por DRUMOND *et al.* 2014 na identificação da EHE em áreas endêmicas de poucos recursos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Epidemiologia da esquistossomose humana

A esquistossomose humana é causada por um platelminto trematódeo do gênero *Schistosoma*. Seis espécies desse trematódeo infectam humanos: *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* e *S. guineensis*, que parasitam as vênulas do mesentério, e *S. haematobium*, que parasita o plexo venoso vesical. O *S. mansoni* é encontrado no Brasil, Venezuela, Suriname, Caribe, África e Oriente Médio; o *S. japonicum*, na China, Indonésia e Filipinas; o *S. mekongi*, no Camboja e Laos; o *S. guineenses* e o *S. intercalatum*, nas florestas pluviais da África Central; o *S. haematobium* na África e Oriente Médio (Figura 1). A esquistossomose afeta 78 países e estima-se que ao menos 230 milhões de pessoas estejam infectadas e mais que 700 milhões vivem em áreas endêmicas. A infecção ainda é um problema de saúde pública em países em desenvolvimento e está associada às terríveis condições de saneamento básico (Organização Mundial de Saúde, 2014).

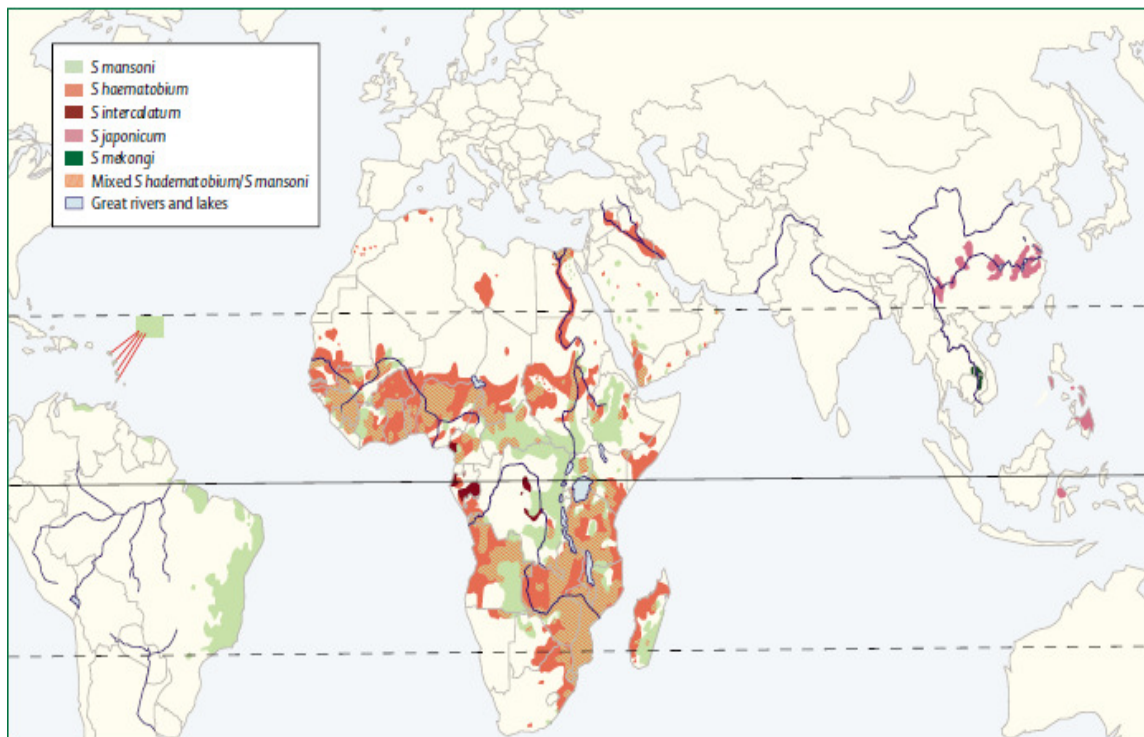


Figura 1 – Distribuição mundial das espécies de *Schistosoma* (GRYSEELS et al., 2006)

Descrita pela primeira vez no Brasil em 1908 por Pirajá da Silva, a esquistossomose é atualmente endêmica em 19 dos 27 estados federais (Figura 2) e estima-se que de 2,5 a 6 milhões de brasileiros estejam infectados e 25 milhões morem em área com risco de infecção (KATZ et al., 2000; Ministério da Saúde, 2014). Em 1975, o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE) foi implantado no Brasil pelo Ministério da Saúde (MS). Em 1988, o PECE foi incorporado à rotina do MS, perdendo o *status* de alta prioridade e sendo reiniciado com estrutura descentralizada em 1993 como Programa de Controle da Esquistossomose (DRUMMOND et al., 2010).

O tratamento em massa destaca-se como um dos fatores na redução da prevalência, da mortalidade e da morbidade pela esquistossomose (LAMBERTUCCI et al., 2000, MARTINS-MELO et al., 2014). Nos dias de hoje a OMS considera que a esquistossomose está controlada no Brasil (CHISTULO et al., 2004). No entanto, algumas áreas endêmicas mantêm transmissão ativa, inclusive com prevalência de até 20%, e surtos em áreas não endêmicas também são reportados (DRUMMOND et al., 2010; LAMBERTUCCI et al., 2013).

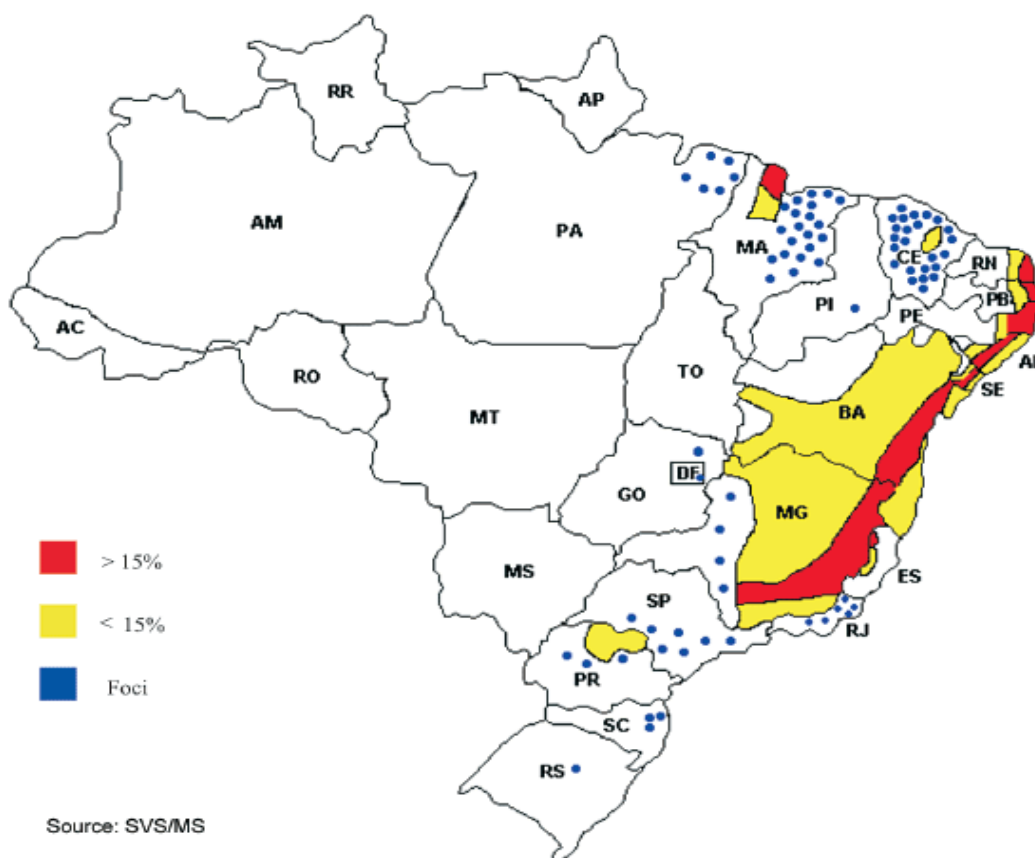


Figura 2 – Distribuição da esquistossomose no Brasil (DRUMMOND et al., 2006)

Minas Gerais e Bahia concentram 70% dos casos de esquistossomose no Brasil. Em Minas Gerais, 61% dos municípios têm transmissão ativa e quase 11 milhões de pessoas vivem em área endêmica (AMARAL & PORTO, 1994; DRUMMOND et al., 2006).

2.2. Ciclo de vida do *S. mansoni*

Vermes adultos de *S. mansoni*, que medem de um a dois centímetros de comprimento e 0,3 a 0,6 milímetros de largura, vivem, copulam e se alimentam de sangue nos vasos do sistema porta, primariamente as pequenas vênulas da veia mesentérica inferior e secundariamente os ramos da mesentérica superior ou os ramos intra-hepáticos da veia porta, e mais raramente o plexo hemorroidário e as arteríolas pulmonares. O macho adulto envolve a fêmea no canal ginecóforo de forma que o casal assume forma de verme nematoide ideal para a vida nas vênulas mesentéricas do hospedeiro definitivo, o homem. Os ovos, medindo 145 x 55 micrômetros, são ali depositados, causando a formação de granulomas em seu entorno quando impactam nas paredes dos vasos, sendo então expulsos na luz do intestino, em meio às fezes. No ambiente, os ovos eclodem em contato com a água fresca e liberam o miracídio. Esse penetra no tegumento do hospedeiro intermediário, o caramujo da espécie *Biomphalaria*, onde se multiplica assexuadamente. Dentro de 4 a 6 semanas, centenas de cercarias, com comprimento de 0,1 a 0,2 mm, deixam o hospedeiro invertebrado, nadando livremente na água até penetrar na pele humana. A cercaria, então, transforma-se em esquistossômulo, que alcança a vênula mais próxima para ser passivamente levado pela circulação venosa. Ele atravessa os capilares pulmonares para ganhar a circulação arterial e então concluir sua maturação em verme adulto nos vasos do sistema porta (LAMBERTUCCI, 2010) (Figura 3).

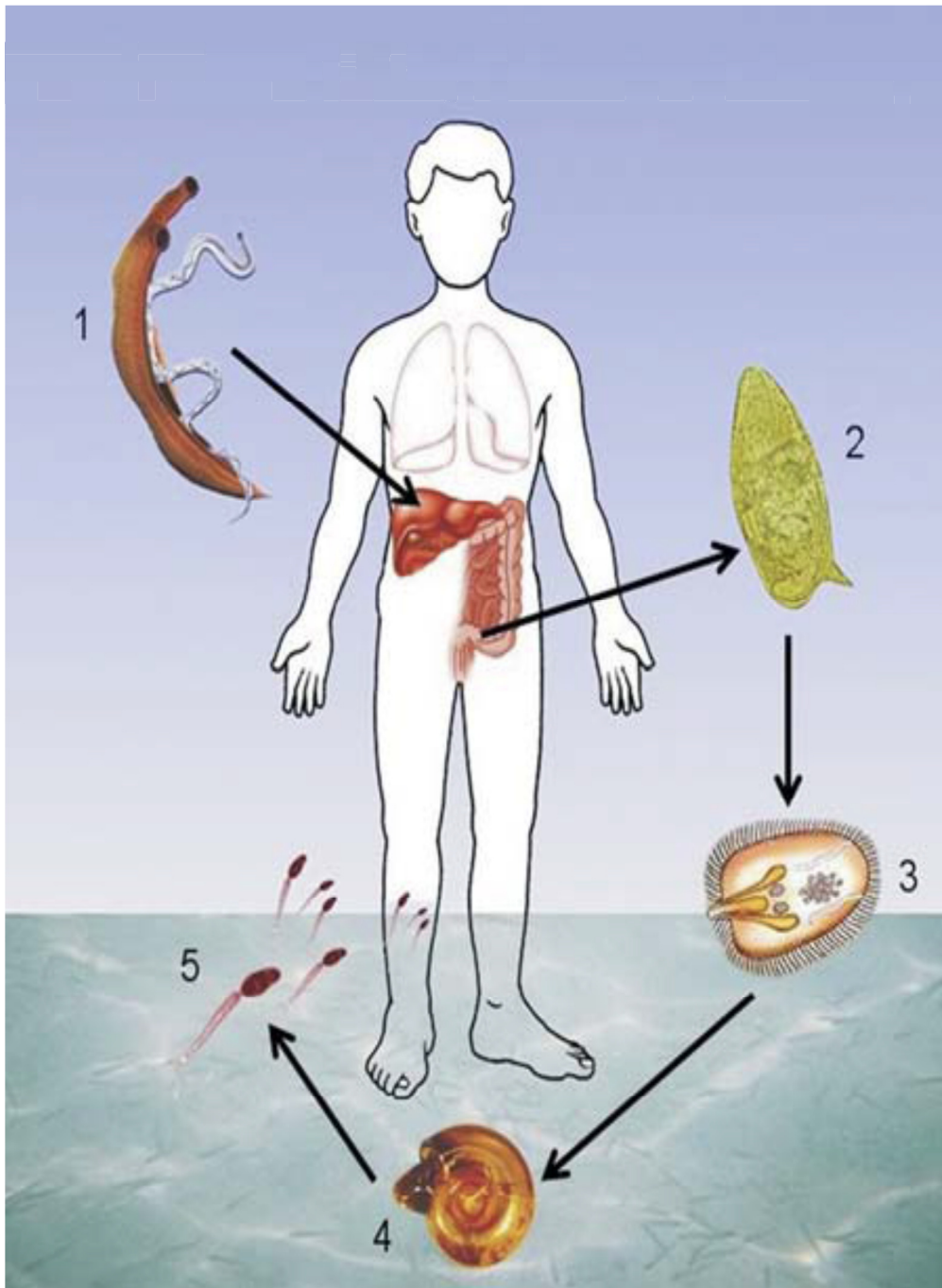


Figura 3 – Ciclo de vida do *S. mansoni*. (1) Vermes adultos macho e fêmea em cópula no sistema porta. (2) Ovo expelido no ambiente em meio às fezes humanas. (3) Miracídio liberado após eclosão do ovo quando em contato com água fresca. (4) Caramujo *Biomphalaria*, hospedeiro intermediário. (5) Cercárias, que deixam o caramujo e nadam livremente até penetrar na pele humana. (VALE & LAMBERTUCCI, 2012)

2.3. Esquistossomose mansônica hepatoesplênica

Esquistossomose hepatoesplênica é a forma crônica da doença e geralmente resulta da infecção por *Schistosoma mansoni*. Os fatores genéticos provavelmente predis põem certos indivíduos a desenvolver a esquistossomose hepatoesplênica. O aumento do fígado e do baço na infecção por *S. mansoni* é um processo patológico em evolução. O alargamento hepático é clinicamente reconhecido há 2 ou 3 décadas. Na maioria dos indivíduos com esquistossomose hepatoesplênica o baço está aumentado de tamanho. Esplenomegalia é resultado da congestão passiva crônica e hiperplasia do sistema reticuloendotelial.

Indivíduos com esquistossomose hepatoesplênica podem ser distinguidos dos outros com esquistossomose hepatointestinal basicamente pela presença de esplenomegalia identificada através da palpação abdominal (GERSPACHER LARA et al). A presença de ovos de *S. mansoni* nas fezes e baço palpável em paciente residente em área endêmica não é suficiente para identificação de pessoas com esquistossomose hepatoesplênica.

Estudos recentes demonstraram que em áreas endêmicas com prevalência de 23% (um exame parasitológico de fezes com duas lâminas) para *S. mansoni* contagens plaquetárias inferiores a 143.000 plaquetas/ μ L demonstraram ser um marcador da EHE de boa sensibilidade e moderada especificidade, podendo ser utilizado como ferramenta na triagem de indivíduos com a forma hepatoesplênica em área endêmica com prevalência semelhante. (DRUMMOND, 2014)

2.4. Plaquetas

Plaquetas são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos, que apresentam forma discóide, normalmente com diâmetro de 1,3 μ m a 3,5 μ m, espessura de aproximadamente 1,0 μ m e volume de 7,0 fL. São componentes sanguíneos especializados que ajudam a prevenir a hemorragia. O primeiro método de referência para a determinação de plaquetas foi a contagem manual por microscopia de contraste de fase.

As plaquetas são produzidas a partir da fragmentação dos megacariócitos, que consistem em células poliplóides muito grandes da medula óssea formadas pelo processo de endomitose. Sofrem de três a cinco ciclos de duplicação cromossômica sem divisão do citoplasma. Após deixar o espaço medular, 33% das plaquetas sofrem sequestro no baço e os outros 66% circulam durante 7 a 10 dias. Em condições normais, apenas uma pequena fração da massa plaquetária é consumida no processo de hemostasia, de modo que a maioria das plaquetas circulam até envelhecer, sendo removidas por células fagocíticas (HARRISON, 2006).

Os trombócitos, também chamados de plaquetas são corpúsculos anucleados que estão presentes na corrente sanguínea, produzidos a partir da megacariocitopoiese que ocorre na medula óssea. Elas possuem formato discoidal, com diâmetro que varia de 2 a 4µm e são provenientes da fragmentação citoplasmática de megacariócitos, sendo que cada uma destas células pode originar de 2 a 80 mil plaquetas em um período de 3 a 12 dias. O estímulo para a produção dos trombócitos se dá através de um hormônio produzido no fígado, a trombopoetina.

A contagem normal de plaquetas sanguíneas é de 150.000 a 450.000/ µL. A redução da contagem plaquetária estimula um aumento no número, tamanho e ploidia dos megacariócitos com a consequente liberação de plaquetas adicionais na circulação. Esse processo é regulado pela ligação da trombopoietina ao seu receptor nos megacariócitos. A trombopoietina é secretada continuamente em baixos níveis e liga-se firmemente às plaquetas circulantes. A ocorrência de redução da contagem plaquetária aumenta os níveis da trombopoietina livre, portanto estimula a produção dos megacariócitos e plaquetas (HARRISON, 2006).

A principal função das plaquetas é a formação do tampão mecânico durante a resposta hemostática normal à lesão vascular. Na ausência de plaquetas pode ocorrer vazamento espontâneo de sangue de pequenos vasos. A imobilização das plaquetas nos sítios de lesão vascular requer interações específicas plaqueta – parede vascular (adesão) e plaqueta – plaqueta (agregação). As condições de fluxo sanguíneo determinam as interações entre os ligantes e receptores específicos.

2.5. Trombocitopenia

A trombocitopenia ou plaquetopenia é causada por um de três mecanismos; produção diminuída pela medula óssea, aumento do sequestro esplênico, ou destruição acelerada das plaquetas. Incluem-se nestas classificações pacientes que possuem contagem plaquetária inferior a 150.000/ μL (HARRISON, 2006)

As principais causas de erros nas contagens de plaquetas resultam das características da amostra de sangue. Contagens falsamente baixas de plaquetas ocorrem em consequência à coagulação parcial da amostra, à agregação plaquetária devido a uma coleta difícil, quantidade de anticoagulante inadequada, processos infecciosos, indução pelo EDTA, satelitismo plaquetário, aglutininas plaquetárias frias e plaquetas gigantes, o que torna a contagem manual uma ferramenta essencial para identificar estas causas de contagens incorretas de plaquetas (MORENO et al, 2002).

2.6. Pseudotrombocitopenia

Pseudotrombocitopenia (PTP) consiste na contagem de plaquetas *in vitro* baixa em amostras de sangue colhidas em ácido etileno-dinitro-tetra-acético (EDTA). Essa diminuição é consequente à aglutinação das plaquetas ou, mais raramente, por satelitismo plaquetário em torno dos neutrófilos. A natureza fisiopatológica da pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA ainda não foi elucidada. No entanto, tem sido proposto que autoanticorpos presentes no plasma, na presença de EDTA, reconhecem e se ligam a um epítipo da glicoproteína IIb, integrante do complexo glicoproteína IIb/IIIa da superfície das plaquetas, promovendo a aglutinação (COHEN,2000; BIZARRO,1995; BERKMAN,1991;PAYNE,1984).

A PTP EDTA dependente é definida também como uma falsa diminuição da contagem plaquetária por artefato de laboratório e ocorre principalmente quando amostras sanguíneas colhidas com esse anticoagulante apresentam progressiva agregação plaquetária com o passar do tempo, resultando em valor reduzido da análise (MORALES, 2001).

2.7. Contagem plaquetária automatizada

A contagem de células por impedância foi primeiramente descrita por Wallace Coulter em 1956, se dá pelo fato de os glóbulos vermelhos serem pobres condutores de eletricidade, enquanto certos diluentes empregados na análise sejam bons condutores, essa diferença forma a base desse sistema de contagem. Dois eletrodos de platina mergulhados separadamente por um orifício de 60 a 100 micrômetros de diâmetro, sendo um no interior do equipamento e outro no líquido contendo as partículas a serem contadas, permite que cada partícula que passe pelo orifício desloque o volume de líquido, modificando de forma mensurável a impedância proporcional ao volume deslocado. Esses pulsos são amplificados e contados num volume de sangue predeterminado. Por esse método são contados eritrócitos, e em diferente diluição após lise das hemácias contam-se os leucócitos e as plaquetas (BACALL, 2009).

Em qualquer das metodologias disponíveis para contagens automatizadas em hematologia, seja ela impedância, método óptico ou imunológico, quando seus valores estão abaixo de 10.000 plaquetas/ μL , há uma imprecisão importante devido ao coeficiente de variação de 22 a 66% nesse intervalo.

Em contagens plaquetárias automatizadas iguais ou inferiores a 20.000/ μL , a variação pode chegar até a 50% (MALOK et al, 2007). Já no intervalo de 40.000 a 50.000 plaquetas/ μL , a variação é de 10% (FAILACE, 2003). Contagens superiores a 50.000 plaquetas/ μL apresentam coeficiente de variação de 3%.

Desta forma, a detecção de contagens de plaquetas falsamente diminuídas através da avaliação plaquetária em lâmina, filme sanguíneo, se faz necessária e relevante, sobretudo para evitar a investigação e o tratamento desnecessário do paciente em detrimento de erros do sistema analítico. A análise do filme sanguíneo pretende demonstrar fontes de erro para a automação através de eventos como plaquetas gigantes e agregadas. Investiga-se também a presença de fragmentos eritrocitários, citoplasmáticos de células leucêmicas, lipemia, e microcitoses (GLOSTER et al, 1985).

2.8. Contagem plaquetária microscópica através do método indireto de Fonio

O estudo microscópico é sempre iniciado em menor aumento, observando-se a distribuição das células especialmente nas margens e cauda do esfregaço. A contagem plaquetária no filme ou esfregaço sanguíneo deve ocorrer na região de espessura e distribuição adequada dos elementos sanguíneos. No momento inicial da observação deve-se verificar a qualidade da coloração executada, e adiante seguir nos aumentos do microscópio até a imersão quando é possível perceber os detalhes da regularidade do contorno dos elementos figurados do sangue (CARVALHO, 2008).

Segundo CARVALHO et al. 2008, o estudo do esfregaço sanguíneo permite verificar o número aumentado, diminuído e alterações morfológicas das plaquetas, além de definir alterações como trombocitose, trombocitopenia, tamanho e forma delas.

O método indireto de Fonio, determinam que a contagem de hemácias e plaquetas deve ser realizada simultaneamente no mesmo esfregaço, permitindo-se a correlação direta com o número de hemácias por microlitro. Geralmente os resultados obtidos no método indireto de Fonio podem gerar resultados ligeiramente superiores aos valores verdadeiros (CARVALHO, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estabelecer a prevalência de pseudotrombocitopenia (PTP) em pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica (EHE).

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Comparar a prevalência de pseudotrombocitopenia em pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica e controles sem esquistossomose.

3.2.2. Comparar a metodologia de referência (contagem microscópica pelo método Fonio indireto/ sem anticoagulante) com as contagens de plaquetas obtidas pelas duas metodologias (contagem automatizada pelo princípio da impedância/ anticoagulante EDTA; contagem automatizada pelo princípio da impedância/ anticoagulante citrato de sódio), a fim de evidenciar a mais adequada.

3.2.3. Evidenciar a frequência de ocorrência dos fenômenos de satelitismo plaquetário ou grumos plaquetários responsáveis pela pseudotrombocitopenia.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1. Ambiente do estudo

Para realização do estudo de prevalência da pseudotrombocitopenia em pacientes com a esquistossomose mansônica hepatoesplênica foram estudados pacientes e voluntários no período de 25 de julho de 2014 a 07 de novembro de 2014. O estudo recebeu aprovação institucional da Coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Estado de Minas Gerais (UFMG), do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG, da Unidade Funcional de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da UFMG, da Direção da Faculdade de Medicina da UFMG, do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, e por fim da Direção de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas da UFMG. É importante ressaltar que todos os pareceres estão anexados a esta dissertação.

Efetivamente a realização do estudo ocorreu no Centro de Referência e Tratamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz (CTRDIP Orestes Diniz) localizado à Alameda Álvaro Celso, 241, Santa Efigênia, e no Laboratório de Doenças Infecto parasitárias, sala 167, 1º andar, da Faculdade de Medicina da UFMG localizado à Avenida Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia. Nesses ambientes foram prospectados voluntários com EHE e voluntários sem EHE.

4.2. Tamanho amostral

O tamanho amostral foi determinado por cálculo amostral estabelecido de acordo com as prevalências de PTP encontradas na literatura, ou seja, 0,11% para a população em geral e 17,00% para ambulatórios de trombocitopenia. Utilizou-se para execução do cálculo o programa de computador “Epi info™ 7” do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), disponível gratuitamente em <http://wwwn.cdc.gov/epiinfo/7/index.htm>, obteve-se assim uma amostra (n) de

sessenta e sete pacientes para cada grupo, portadores da EHE e não portadores EHE, com um poder do estudo de 90% e nível de significância de 95%.

4.3. Critérios de inclusão e perfil dos voluntários

Os voluntários sem EHE para composição do grupo controle foram acompanhantes de pacientes do Centro de Referência e Tratamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz, funcionários e alunos da universidade e laboratório, abordados dentro da instituição e que aceitaram o proposto no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O grupo incluiu indivíduos maiores de 18 anos e menores que 68 anos, sem distinção de sexo, cor, classe ou grupo social. Esses indivíduos não residiam em áreas endêmicas da esquistossomose mansônica e não tinham história epidemiológica positiva, e negavam internação hospitalar nos últimos 6 meses.

Os voluntários com EHE são pacientes em acompanhamento clínico pelo Centro de Referência e Tratamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz residentes em Belo Horizonte ou interior de Minas Gerais e que aceitaram o proposto no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O grupo incluiu pacientes maiores de 27 anos e menores de 83 anos, sem distinção de sexo, cor, estado geral de saúde, classe ou grupo social. Para enquadramento no grupo portador de EHE os indivíduos apresentaram fibrose periportal e esplenomegalia à ultrassonografia, além de história epidemiológica positiva ou presença de ovos de *Schistosoma mansoni* nas fezes ou na biópsia retal.

4.4. Critérios de exclusão

Durante a abordagem foram excluídos voluntários para composição de ambos os grupos que tivessem história pregressa documentada de outras doenças que causem fibrose hepática, doença plaquetária, doenças autoimunes, coagulopatias, ou infecção por HIV.

Do grupo com EHE foi excluído um paciente que teve diagnóstico de infecção por HIV durante seu acompanhamento clínico. Da mesma forma, foi necessário excluir uma voluntária sem EHE que residiu mais de vinte anos em área endêmica.

4.5. Fluxograma do estudo

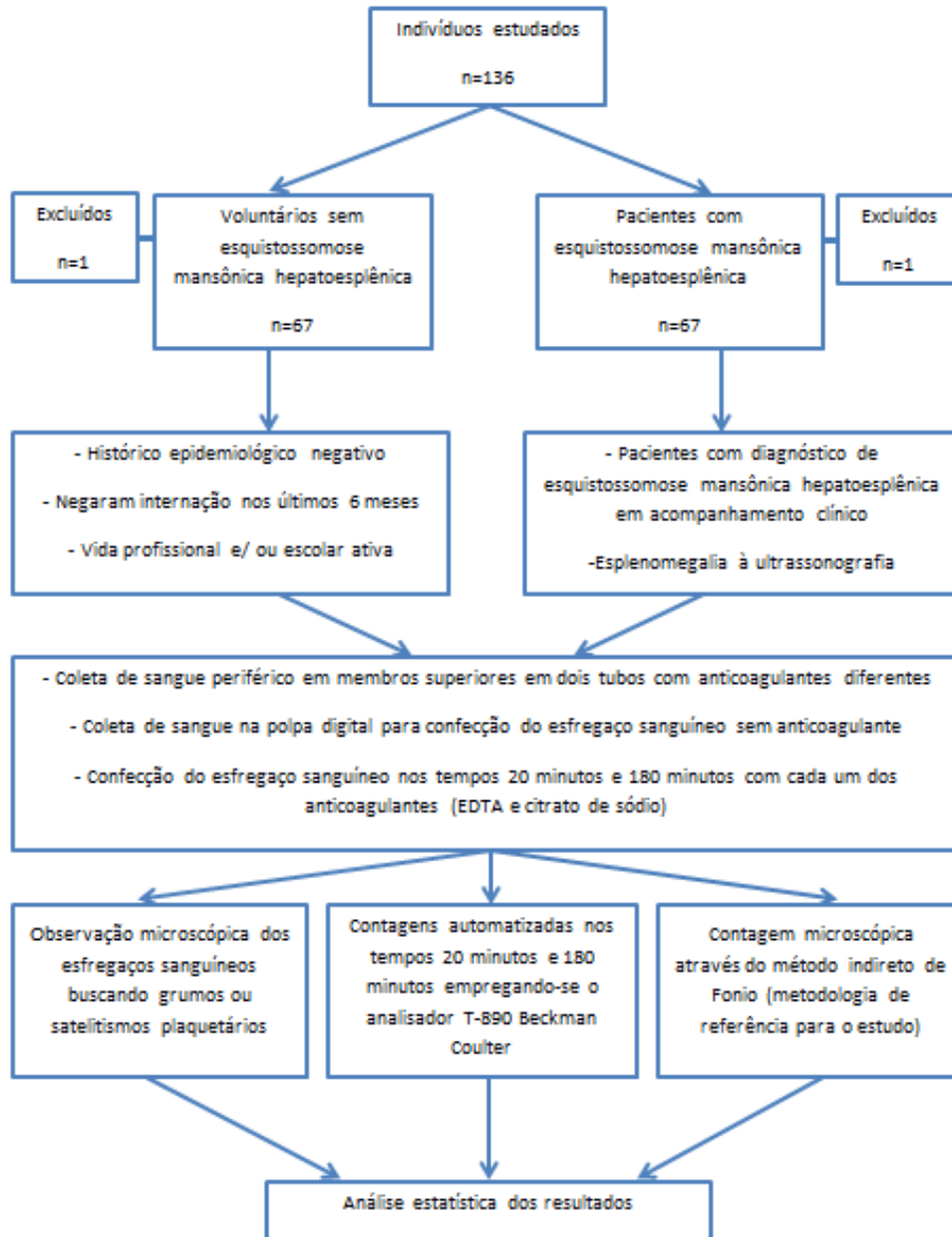


Figura 5: Fluxograma do estudo

4.6. Colaboradores do estudo

As análises clínicas e laboratoriais foram respectivamente realizadas por médico e farmacêutico, ambos intimamente envolvidos na coleta de dados, gerenciamento do processo analítico e acompanhamento dos pacientes portadores da EHE. Durante a coleta de dados uma acadêmica do curso de medicina foi envolvida na prospecção e documentação dos voluntários.

4.7. Plano de coleta de amostras e preparo do esfregaço sanguíneo

As amostras foram colhidas e processadas em ambiente com temperatura monitorada entre 22 e 28 graus Celsius. A flebotomia foi realizada com agulhas estéreis para coleta a vácuo, descartáveis e de uso único, em membros superiores com emprego de garrote e sem aplicação de “tapas” no vaso a ser puncionado.

Colheu-se de todos os voluntários através de punção venosa, amostras de sangue com emprego de dispositivo de coleta a vácuo, distribuídas em dois tubos, um deles contendo EDTA e outro contendo Citrato de sódio. Imediatamente após a coleta, realizou-se a punção digital e com esta amostra de sangue periférico confeccionou-se o esfregaço sanguíneo sem anticoagulante. Em seguida, após 20 minutos de homogeneização da amostra, simultaneamente à análise automatizada confeccionou-se um esfregaço sanguíneo para cada tipo de anticoagulante. Após 180 minutos repetiu-se o procedimento para cada um dos tubos com anticoagulantes distintos. Finalmente, obteve-se cinco lâminas com esfregaços sanguíneos para posterior análise.

4.8. Contagem plaquetária automatizada pareada (dois momentos do tempo)

Para realização da contagem automatizada de plaquetas foi empregado o analisador T-890 (BECKMAN COULTER) (Imagem 4). As análises foram realizadas em dois momentos do tempo para cada anticoagulante: vinte minutos após a coleta em EDTA (PLTEDTAT1) e citrato de sódio (PLTCITRATOT1); e cento e oitenta minutos após a coleta em EDTA (PLTEDT2) e citrato de sódio (PLTCITRATO2). Durante o intervalo de

uma análise e outra os espécimes foram mantidos sob temperaturas de 22 e 28 graus Celsius durante todo o tempo. Para evitar que interferência pré analíticas desdobrem-se em erros analíticos, os tubos com anticoagulante e amostra foram mecanicamente agitados por 20 minutos para correta homogeneização do sangue antes da análise em ambos momentos.

4.9. Coloração do esfregaço sanguíneo

Para coloração dos cinco esfregaços de cada voluntário foi empregado um sistema de coloração diferencial dos elementos figurados do sangue tipo bateria de coloração, panótico rápido. Todas as lâminas de amostras anticoaguladas e sem anticoagulantes foram corados pelo mesmo método.

4.10. Contagem plaquetária e a identificação de alterações

Como metodologia de referência para contagem plaquetária foi selecionada a microscopia óptica, empregando-se o método indireto de Fonio em esfregaço sanguíneo periférico, sem adição de anticoagulante, proveniente de punção da polpa digital. Nesse método as plaquetas foram contadas em dez campos observacionais no formato de "C", na porção final do esfregaço, entre o corpo e a cauda. A contagem obtida foi relacionada com o número de eritrócitos por mm^3 de sangue. Os campos observados possuíam distribuição ideal das hemácias, ou seja, elas se tangiam mas nunca se sobrepunham (Imagem 1).

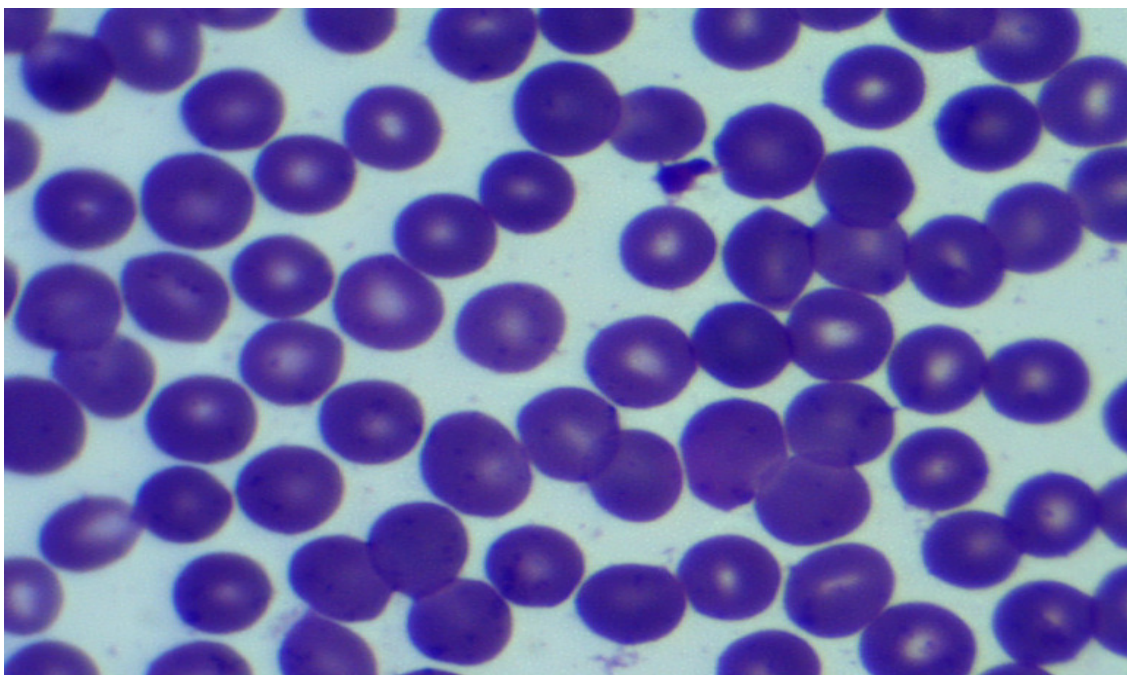


Imagem 1: Hemácias bem distribuídas no esfregaço sanguíneo com fácil visualização das plaquetas.

Todas as lâminas de amostras anticoaguladas foram examinadas e a observação foi pautada na evidência de aglutinação de plaquetas ou satelitismo plaquetários observados em vinte campos observacionais também no formato de “C”, na porção final do esfregaço, entre o corpo e a cauda. Os resultados dos eventos foram categorizados em “SIM”, quando eram encontrados grumos plaquetários (Imagem 3) ou satelitismo (Imagem 2), e “NÃO”, para ausência desses eventos. Foram considerados grumos plaquetários os emaranhados de plaquetas com no mínimo três plaquetas. Nos casos de satelitismo, foram considerados eventos reportáveis situações nas quais plaquetas se apresentaram distribuídas ao redor de todo o perímetro de neutrófilos ou linfócitos.

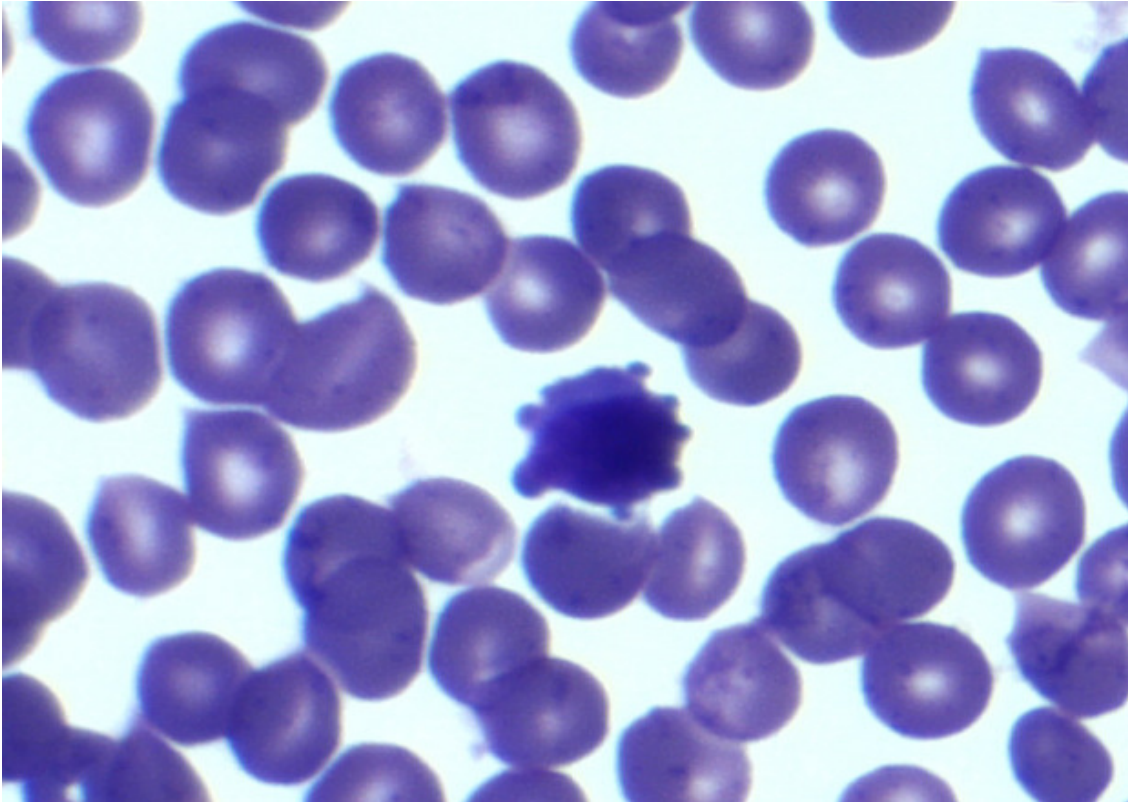


Imagem 2: Satelitismo plaquetário em citrato de sódio.

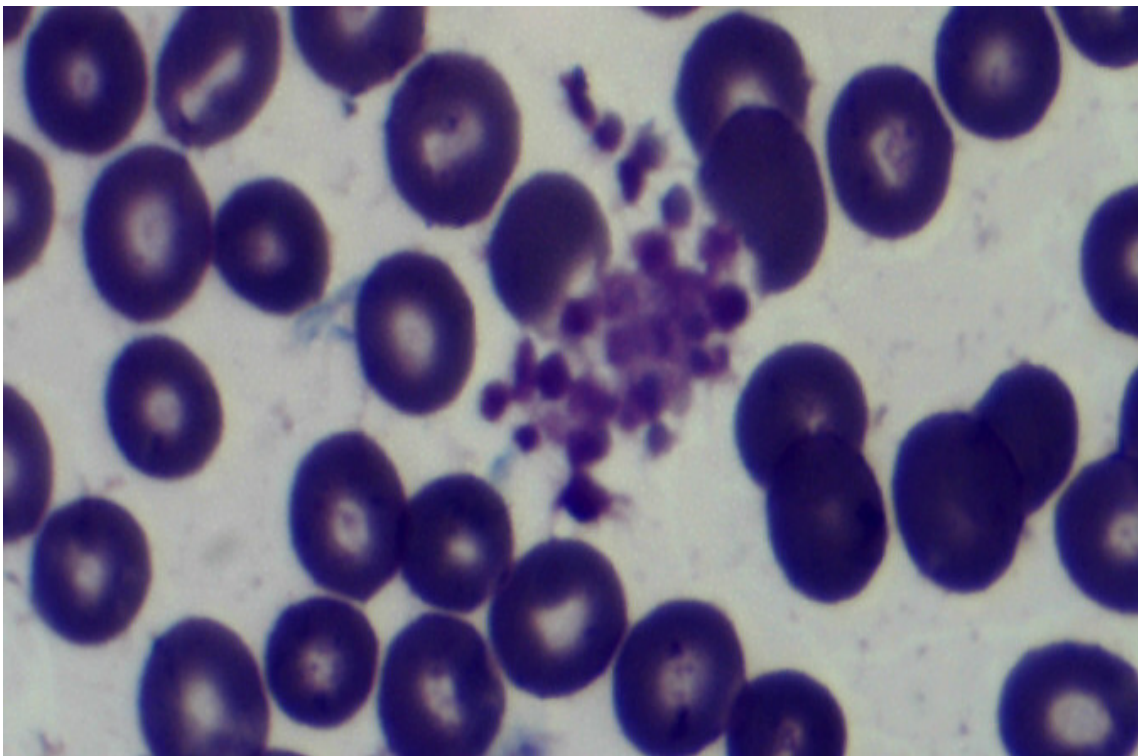


Imagem 3: Grumo ou aglutinado de plaquetas.



Imagem 4: Analisador hematológico T-890 (BECKMAN COULTER)

4.11. Análise estatística

Realizou-se inicialmente análise descritiva de todas as variáveis investigadas por meio de tabelas de distribuição de frequências e cálculo de medidas de tendência central (média e mediana) e variabilidade (mínimo, máximo e desvio padrão). Também foram construídos gráficos do tipo *Box-plot* para ilustração dos resultados. Na sequência foi testada a normalidade das variáveis numéricas por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para comparação dos exames realizados foram utilizados os testes t-pareado, quando analisadas as variáveis com distribuição Gaussiana e Wilcoxon para variáveis com distribuição assimétrica. Ambos os testes são apropriados para comparação de variáveis numéricas, considerando-se dados pareados, isto é, o mesmo paciente em dois momentos diferentes.

Na sequência a variação observada nos testes comparativos entre as contagens plaquetárias realizadas em tempo 20 minutos e 180 minutos foi categorizada em “SIM” e “NÃO”, de acordo com o coeficiente de variação do intervalo plaquetário evidenciado, considerando como “SIM” as variações acima do ponto de corte definido

para cada faixa dos níveis plaquetários, conforme os seguintes intervalos, 0 a 30.000 – 50%, 30.001 a 55.000 – 10%, e 55.001 a 500.000 – 3%.

Todas as análises foram realizadas para os casos e controles separadamente. Num segundo momento, procedeu-se a comparação entre casos e controles por meio do teste de Mann-Whitney, quando se considerou variáveis numéricas e teste Qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher para variáveis categóricas. Em todas as situações, considerou-se nível de significância de 5% e o programa de computador para análise estatística adotado foi o SPSS versão 20.0 (IBM).

5. RESULTADOS

As análises laboratoriais geraram resultados quantitativos e qualitativos. Os resultados quantitativos foram os de contagem plaquetária através do método de referência, método indireto de Fônio (PLTFONIO), e os de contagem automatizada PLTEDTAT1, PLTEDTAT2, PLTCITRATOT1 e PLTCITRATOT2. Outro resultado quantitativo foi o percentual de redução entre as duas medidas automatizadas de cada paciente, percentual de redução em EDTA (%REDUEDTA) e percentual de redução em Citrato de sódio (%REDUCITRATO). Os métodos qualitativos demonstraram presença (SIM) ou ausência (NÃO) de grumos ou satelitismo plaquetário.

Todos os resultados são de enorme importância na definição da prevalência da PTP em pacientes portadores da EHE, visto que o critério de classificação relaciona a redução plaquetária nos dois tempos e a presença de grumos ou satelitismo plaquetário.

Os resultados plaquetários distribuíram-se simetricamente para o grupo sem EHE e assimetricamente para o grupo com EHE. A Tabela 1 traz a descrição dos resultados da análise automatizada entre os grupos estudados.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1 foram analisados um total de 67 voluntários com EHE e observou-se, entre eles, mediana dos valores plaquetários de 56.000/ μL no PLTEDTAT01 e de 58.000/ μL no PLTEDTAT02, sem diferença significativa nesse caso ($p > 0,05$). No entanto, quando empregado o Citrato de sódio como anticoagulante, ainda entre os casos, o valor mediano de PLTCITRATOT1 foi de 45.000/ μL reduzindo para 35.000/ μL em PLTCITRATOT2, sendo essa redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

A mesma tendência foi observada entre os 67 voluntários sem EHE, com medianas idênticas (237.000 plaquetas/ μL) nos dois exames que empregaram EDTA como anticoagulante PLTEDTAT01 e PLTEDTAT02 ($p > 0,05$) e valores significativamente maiores ($p < 0,05$) no PLTCITRATOT1 (185.000 plaquetas/ μL) se comparado com o PLTCITRATOT2 (183.000 plaquetas/ μL).

Tabela 1: Valores das plaquetas no sangue de pacientes com e sem esquistossomose mansônica hepatoesplênica em amostras anticoaguladas com EDTA e Citrato de sódio nos momentos 20 minutos após a obtenção da amostra e 180 minutos depois. Exames realizados no período de 25 de julho de 2014 a 07 de novembro de 2014 no ambulatório do Centro de Referência e Tratamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz.

GRUPO	ESTATÍSTICAS	CONTAGEM DE PLAQUETAS EM EDTA NO TEMPO 20 MINUTOS (PLTEDTAT1)	CONTAGEM DE PLAQUETAS EM EDTA NO TEMPO 180 MINUTOS (PLTEDTAT2)	CONTAGEM DE PLAQUETAS EM CITRATO DE SÓDIO NO TEMPO 20 MINUTOS (PLTCITRATOT1)	CONTAGEM DE PLAQUETAS EM CITRATO DE SÓDIO NO TEMPO 180 MINUTOS (PLTCITRATOT2)
VOLUNTÁRIOS COM ESQUISSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA	n	67	67	67	67
	Média	72403,0	71641,8	57656,7	47656,7
	DP	51314,9	51352,5	40160,5	36085,1
	Mínimo	15000,0	17000,0	14000,0	11000,0
	Máximo	310000,0	307000,0	215000,0	185000,0
	Percentil 25	39000,0	37000,0	32000,0	22000,0
	Mediana	56000,0	58000,0	45000,0	35000,0
	Percentil 75	90000,0	90000,0	64000,0	56000,0
	VALOR DE p*		0,451		<0,001
VOLUNTÁRIOS SEM ESQUISSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA	n	67	67	67	67
	Média	242522,4	244671,6	186373,1	178014,9
	DP	44206,3	49380,8	50538,0	42850,5
	Mínimo	135000,0	132000,0	73000,0	69000,0
	Máximo	368000,0	421000,0	268000,0	251000,0
	Percentil 25	212000,0	210000,0	149000,0	151000,0
	Mediana	237000,0	237000,0	185000,0	183000,0
	Percentil 75	279000,0	282000,0	220000,0	207000,0
	VALOR DE p*		0,245		0,014
VALOR DE p**	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

DP: Desvio padrão

*Comparação Tempo 1 x Tempo 2 – Teste de Wilcoxon

**Comparação Casos x Controles – Teste Mann-Whitney

Quando se comparam os voluntários com e sem EHE, para todos os exames foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$), sempre com maiores valores das plaquetas entre os voluntários sem EHE se comparados com o grupo com EHE.

No exame empregando a metodologia indireta de Fônio (Tabela 2), no grupo com EHE, a mediana dos valores das plaquetas foi de 55.293,3/ μL , sendo que esse valor pode ser considerado estatisticamente igual ao resultado de ambos os exames que empregaram EDTA como anticoagulante ($p > 0,05$), mas significativamente superior aos resultados encontrados pelos exames que empregaram Citrato de sódio como anticoagulante ($p < 0,001$).

Tabela 2: Valores das plaquetas no sangue de pacientes com e sem esquistossomose mansônica hepatoesplênica em amostras da polpa digital não anticoaguladas através do método indireto de Fonio (referência), e comparação estatística entre os grupos com e sem esquistossomose mansônica hepatoesplênica dos valores de contagem obtidos na metodologia de referência e nas metodologias automatizadas. Exames realizados no período de 25 de julho de 2014 a 07 de novembro de 2014 no ambulatório do Centro de Referência e Tratamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz.

GRUPO	ESTATÍSTICAS	CONTAGEM MICROSCÓPICA DE PLAQUETAS ATRÁVES DO MÉTODO INDIRETO DE FONIO (PLTFONIO)	COMPARAÇÕES ENTRE O MÉTODO DE REFERÊNCIA, MÉTODO INDIRETO DE FONIO E OS RESULTADOS DAS ANÁLISES AUTOMATIZADAS EM DIFERENTES ANTICOAGULANTES	VALOR DE p*
VOLUNTÁRIOS COM ESQUISOSSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA	n	67		
	Média	71879,2	PLTFONIO x CONTAGEM DE PLAQUETAS EM EDTA NO TEMPO 20 MINUTOS	0,162
	DP	50662,6	PLTFONIO x CONTAGEM DE PLAQUETAS EM EDTA NO TEMPO 180 MINUTOS	0,891
	Mínimo	16660,0	PLTFONIO x CONTAGEM DE PLAQUETAS EM CITRATO DE SÓDIO NO TEMPO 20 MINUTOS	<0,001
	Máximo	308560,0	PLTFONIO x CONTAGEM DE PLAQUETAS EM CITRATO DE SÓDIO NO TEMPO 180 MINUTOS	<0,001
	Percentil 25	39375,0		
	Mediana	55293,3		
	Percentil 75	93070,0		
VOLUNTÁRIOS SEM ESQUISOSSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA	n	67		
	Média	242743,0	PLTFONIO x CONTAGEM DE PLAQUETAS EM EDTA NO TEMPO 20'	0,733
	DP	43450,2	PLTFONIO x CONTAGEM DE PLAQUETAS EM EDTA NO TEMPO 180'	0,355
	Mínimo	136360,0	PLTFONIO x CONTAGEM DE PLAQUETAS EM CITRATO DE SÓDIO NO TEMPO 20'	<0,001
	Máximo	365670,0	PLTFONIO x CONTAGEM DE PLAQUETAS EM CITRATO DE SÓDIO NO TEMPO 180'	<0,001
	Percentil 25	211650,0		
	Mediana	237650,0		
	Percentil 75	276075,0		
	VALOR DE p**	<0,001		

DP: Desvio padrão

*Comparação Tempo 1 x Tempo 2 – Teste de Wilcoxon

**Comparação Casos x Controles – Teste Mann-Whitney

Entre os voluntários sem EHE foi novamente observada a mesma tendência. A mediana da contagem de referência foi de 237.650 plaquetas/ μL , valor considerado estatisticamente igual ($p>0,05$) aos resultados de ambos os exames quando EDTA foi utilizado como anticoagulante, mas superior a ambos os resultados dos exames que empregaram o citrato de sódio ($p<0,05$).

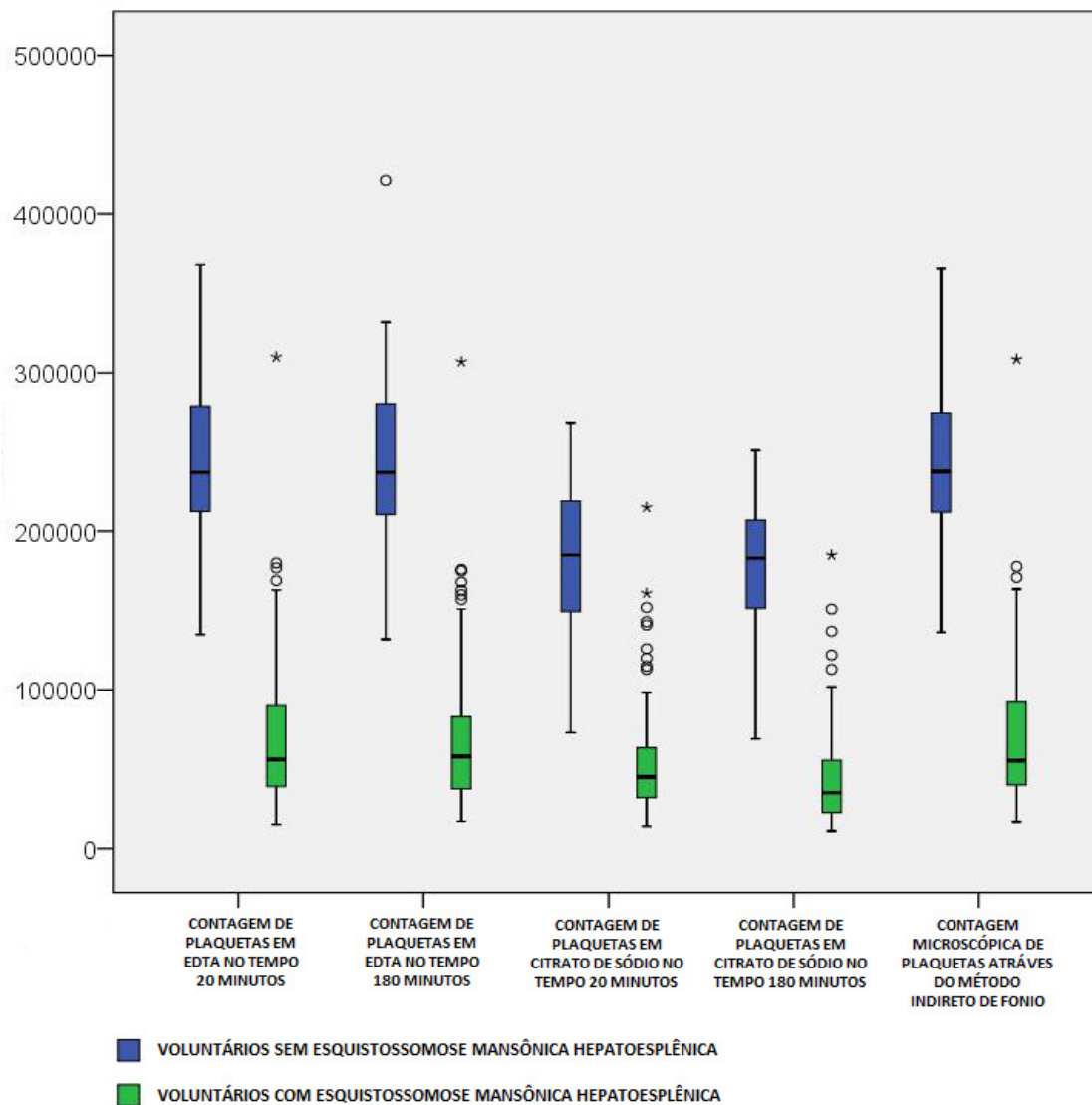


Gráfico 1: *Box-plot* dos valores de contagem das plaquetas para todos os exames realizados entre pacientes com EHE e sem EHE nos tempos 20 minutos e 180 minutos nas amostras anticoaguladas com EDTA e citrato de Sódio. Os desenhos do *Box-plot* do canto direito da figura representam as contagens pelo método referência deste estudo (Fonio indireto).

No gráfico *Box-plot* pode-se perceber claramente resultados dos métodos aplicados e comparar o método de referência com os métodos automatizados nos diversos tempos propostos.

Tabela 3: Descrição dos resultados do percentual de redução plaquetária entre os voluntários com esquistossomose mansônica hepatoesplênica e voluntário sem a doença. Exames realizados no período de 25 de julho de 2014 a 07 de novembro de 2014 no ambulatório do Centro de Referência e Tratamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz.

GRUPO	ESTATÍSTICAS	PERCENTUAL DE REDUÇÃO EM EDTA (%REDUEDTA)	PERCENTUAL DE REDUÇÃO EM CITRATO DE SÓDIO (%REDUCITRATO)	VALOR DE p*
VOLUNTÁRIOS COM ESQUISSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA	n	67	67	
	Média	0,9	17,8	<0,001
	DP	11,6	24,3	
	Mínimo	-52,4	-122,9	
	Máximo	43,8	58,7	
	Percentil 25	-3,6	7,1	
	Mediana	0,0	19,0	
	Percentil 75	5,1	30,9	
VOLUNTÁRIOS SEM ESQUISSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA	n	67	67	
	Média	-0,7	2,4	0,036
	DP	5,9	17,3	
	Mínimo	-14,4	-83,1	
	Máximo	12,8	36,3	
	Percentil 25	-3,5	-4,8	
	Mediana	-0,5	5,9	
	Percentil 75	2,7	11,1	
VALOR DE p**		0,427	<0,001	

DP: Desvio padrão

*Comparação Tempo 1 x Tempo 2 – Teste de Wilcoxon

**Comparação Casos x Controles – Teste Mann-Whitney

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, no grupo dos pacientes com EHE, o percentual total de redução, independente da faixa dos valores plaquetários, teve mediana de 0% para o exame realizado em amostra anticoagulada com EDTA e de 19% para o exame realizado em amostra anticoagulada com citrato de sódio, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Já no grupo dos controles, o percentual de redução mediano foi de (-)0,5 para o exame realizado em amostra anticoagulada com EDTA e de 5,9% para o exame realizado em amostra anticoagulada com citrato de sódio. Também no grupo dos controles essa diferença foi significativa ($p < 0,05$).

Na comparação entre casos e controles não foram observadas diferenças no percentual de redução para o exame realizado em amostra anticoagulada com EDTA ($p>0,05$), apenas para o exame realizado em amostra anticoagulada com citrato de sódio ($p<0,05$), no qual foi observada maior redução mediana entre os casos (19%) do que entre os controles (5,9%).

Tabela 4: Distribuição de frequência da presença de grumo ou satelitismo plaquetário e da ocorrência de redução nos valores de exames que empregaram como anticoagulante EDTA e citrato de sódio. Exames realizados no período de 25 de julho de 2014 a 07 de novembro de 2014 no ambulatório do Centro de Referência e Tratamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz.

	VOLUNTÁRIOS COM ESQUISSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA		VOLUNTÁRIOS SEM ESQUISSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA		VALOR DE p
	n	PERCENTUAL	n	PERCENTUAL	
PRESENÇA DE GRUMO OU SATELITISMO PLAQUETÁRIO EM AMOSTRAS ANTICOAGULADAS COM EDTA					
NÃO	62	92,5	67	100,0	0,05*
SIM	5	7,5	0	0,0	
PRESENÇA DE GRUMO OU SATELITISMO PLAQUETÁRIO EM AMOSTRAS ANTICOAGULADAS COM CITRATO DE SÓDIO					
NÃO	54	80,6	61	91,0	0,08**
SIM	13	19,4	6	9,0	
PERCENTUAL DE REDUÇÃO ACIMA DOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO EM AMOSTRAS ANTICOAGULADAS COM EDTA					
NÃO	51	76,1	51	76,1	1,00*
SIM	16	23,9	16	23,9	
PERCENTUAL DE REDUÇÃO ACIMA DOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO EM AMOSTRAS ANTICOAGULADAS COM CITRATO DE SÓDIO					
NÃO	9	13,4	29	43,3	<0,001*
SIM	58	86,6	38	56,7	

*Teste Qui-quadrado de Pearson

**Teste exato de Fisher

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, a presença de grumo ou satelitismo ocorreu em 7,5% dos exames realizados em amostra anticoagulada com EDTA entre os casos e nenhum (0,0%) dos exames realizados em amostras anticoaguladas com EDTA entre os controles. Entretanto, essa diferença atingiu limiar de significância estatística ($p=0,05$). Já para os exames que empregaram como anticoagulante o citrato de sódio, a presença de grumo ou satelitismo ocorreu em

19,4% dos casos e 9% dos controles, desta vez sem diferença significativa entre os dois grupos ($p>0,05$).

No que se refere à ocorrência de redução percentual na comparação entre os dois exames das amostras anticoaguladas com EDTA o percentual de redução em ambos os grupos de voluntários foi exatamente igual (23,9%). Já nos exames das amostras anticoaguladas com citrato de sódio, o percentual de redução entre os casos foi de 86,6% e 56,7% entre os controles, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p<0,001$).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo identificou-se prevalência de pseudotrombocitopenia induzida por EDTA em 7,5% dos pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica ($p=0,05$).

Durante o acompanhamento de pacientes portadores da EHE percebeu-se uma frequência curiosa na variabilidade dos resultados de contagem de plaquetas de um mesmo indivíduo com o passar do tempo de seu acompanhamento. Como é comum o hiperesplenismo nesse grupo de pacientes, geralmente atribui-se essas variações nas contagens plaquetárias ao sequestro esplênico ou até mesmo ao consumo periportal.

Portanto, raramente se dava importância a esse achado laboratorial que simplesmente confirmava a cronicidade da doença e esses doentes por atingirem níveis baixos de contagem plaquetária não passavam por intervenções cirúrgicas devido a contraindicação clínica do procedimento, não raro eram obrigados a alterar o hábito de vida ou profissional devido aos riscos relacionados às trombocitopenias importantes.

O fato de grande parte dos pacientes com a EHE acompanhada da trombocitopenia atendidos no CTRDIP Orestes Diniz não poderem ser submetidos a procedimentos invasivos como a realização de biópsias, extração de dentes, cirurgias oftálmica de catarata, e escleroterapia das varizes do esôfago, que em muitos casos, seria a melhor opção terapêutica chamou a atenção e definiu nosso interesse em identificar a hipótese de a prevalência da pseudotrombocitopenia neste grupo de pacientes ser aumentada.

Existe um relato de caso deste evento descrito em 2011 por LAMBERTUCCI, et al. no qual foram descritos em uma internação hospitalar de um paciente proveniente de área endêmica com a EHE, valores de contagem plaquetária automatizada de zero a 93.000 plaquetas/ μL . A conclusão deste estudo identificou que se tratava de um caso de pseudotrombocitopenia induzida pelo anticoagulante EDTA.

A pseudotrombocitopenia induzida por EDTA se deve à presença de anticorpos antiplaquetários que reconhecem a glicoproteína IIb/IIIa das plaquetas na presença desse anticoagulante.

Esse achado explica a observação realizada pelos clínicos que acompanham pacientes provenientes de áreas endêmicas da esquistossomose no CTRDIP Orestes Diniz, e demonstra que os laboratórios clínicos são muitas vezes responsáveis por possíveis iatrogenias terapêuticas em detrimento de contagens falsamente baixas.

O uso do método de Fonio permite confirmar o diagnóstico de pseudotrombocitopenia pelo encontro de grumos plaquetários no esfregaço de sangue e no presente estudo sua importância foi demonstrada outra vez.

O método indireto de Fonio deve ser de uso rotineiro nos pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica e trombocitopenia em estudos de campo ou em serviços especializados (centros de referência em doenças infecciosas).

No hospital das clínicas da UFMG, por exemplo, não se relata o resultado do esfregaço sanguíneo nos hemogramas rotineiros de pacientes com trombocitopenia. Essa realidade se estende a outros laboratórios de renome na região metropolitana de Belo Horizonte que acabam por subestimar a possibilidade desse evento.

Devido ao aumento das demandas dos laboratórios clínicos e excesso de automação, alguns procedimentos vem sendo deixados de lado, como é o caso da contagem microscópica de plaquetas pelo método de Fonio, que embora aparentemente seja rudimentar pode alterar o curso da decisão clínica e promover indiretamente uma melhoria na qualidade de vida do paciente com a EHE.

Para certificação do procedimento empregado em nosso estudo, convidamos dez dos voluntários de ambos os grupos e solicitamos que realizassem o mesmo procedimento em laboratório de renome da região metropolitana de Belo Horizonte e os resultados foram equivalentes aos obtidos em nossa pesquisa.

Surpreendentemente, as contagens em citrato de sódio não demonstraram ser uma alternativa adequada para os casos de pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA, pois o percentual de redução da contagem plaquetária após 180 minutos de contato com o anticoagulante foi de 86,6% em pacientes com EHE, sendo que desses casos 19,4% podem ser interpretados como pseudotrombocitopenia induzida pelo citrato de sódio. Esse achado é parcialmente congruente com o proposto em 2001 por MORALES e colaboradores pois estes autores excluem o citrato de sódio na identificação do fenômeno da pseudotrombocitopenia, no entanto, contradiz totalmente PAYNE quem em 1984 postulou essa alternativa na identificação do fenômeno. A divulgação dessa informação foi tão forte que até hoje esse “dogma clínico” é aceito e praticado, ao contrário de se investigar o filme sanguíneo através do método indireto de Fonio.

7. CONCLUSÃO

1. Neste estudo a prevalência de pseudotrombocitopenia em pacientes portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica foi de 7,5%.
2. Ao comparar a prevalência de pseudotrombocitopenia em pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica e controles sem esquistossomose observou-se significância estatística limítrofe ($p=0,05$).
3. Ao comparar a metodologia de referência (contagem microscópica pelo método Fonio indireto/ sem anticoagulante) com as contagens de plaquetas obtidas pelas duas metodologias (contagem automatizada pelo princípio da impedância/ anticoagulante EDTA; contagem automatizada pelo princípio da impedância/ anticoagulante citrato de sódio), evidenciou-se que a alternativa mais adequada é a contagem automatizada pelo princípio da impedância/ anticoagulante EDTA, pois o percentual de redução da contagem plaquetária em citrato de sódio é estatisticamente ($p<0,001$), o que alteraria a interpretação do exame e a conduta clínica do médico assistente.
4. Evidenciou-se a formação de satelitismo ou grumos plaquetários em 5 dos 67 pacientes do grupo com esquistossomose mansônica hepatoesplênica quando empregou-se EDTA como anticoagulante e em 13 dos 67 pacientes do mesmo grupo quando empregou-se citrato de sódio como anticoagulante, evidencia que caracterizou a pseudotrombocitopenia induzida pelos anticoagulantes, achado que identificou uma maior ocorrência da pseudotrombocitopenia induzida pelo citrato de sódio nos pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica.

8. PROPOSIÇÕES

A partir deste estudo propõe-se a utilização da metodologia indireta de Fonio para investigação da pseudotrombocitopenia em pacientes trombocitopênicos com esquistosomose mansônica hepatoesplênica.

Outros estudos deverão esclarecer (confirmar ou não) os nossos achados acerca da contagem do número de plaquetas em amostras anticoaguladas com citrato de sódio.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFDHAL N.H.; NUNES,D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. Am. J. Gastroenterol., Malden, 2004:v. 99, n. 6, p. 1160-74, Jun.

AFDHAL, N.H. Biopsy or biomarkers: is there a fold standard for diagnosis of liver fibrosis. Clin. Chem., Baltimore, 2004 : v. 50, n. 8, p. 1299-1300.

AKWARI A.M., ROSS D.W., STASS S.A. Spuriously elevated platelet counts due to microspherocytosis. Am J Clin Pathol, 1982.

AL-MOFARREH M. ; AL-MOAGEL-ALFARAG M.; ASHOOR T.; SHADOOCHY, F. Duodenal varices. Report of 13 cases. Z Gastroenterol 1986 :24 (11) ; 673-680.

ANDRADE, Z .A. Schistosomal hepatopathy. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004 ; 99 (supl 1) :51- 57.

BACALL, Nydia S.. Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* [online]. 2009, vol.31, n.4, pp. 218-220. ISSN 1516-8484.

BAIN, B.J. Células sanguíneas: um guia prático. 3ª. ed. Porto Alegre, Artmed, 2004.

BARKUN, N.A. ; CAMUS, M. ; GREEN, L. ; MEAGHER, T. ; COUPAL, L. DE STEMPEL, J.GROVER,A.S. The bedside assessment of splenic enlargement. Am J Trop Med, v.91,p.512-518,1991.

BELL A., NEELY C.L. Smear platelet counts. South MedJ,1980.

BERKMAN N, MICHAELI Y, Or R, ELDOR A. EDTA-Dependant Pseudothrombocytopenia: a clinical study of 18 patients and a review of the literature. Am J Hematol. 1991;36:195-201.

BEZERRA,A.S.A. ; D'IPPOLITO,G. ; CALDANA, R.P. ;CECIN,A.O. ; SZEJNFELD, J. Avaliação hepática e esplênica por ressonância magnética em pacientes portadores de esquistossomose mansônica crônica. Raiol Bras, v.37, p.313-321,2004.

BEZERRA, A.S.A ; D'IPPOLITO G. ; CALDANA, R.P. ;CECIN, A.O. ; AHMED, M. ; SZEJNFELD, J. Chronic hepatosplenic schistosomiasis mansoni : magnetic resonance imaging and magnetic resonance angiography findings. Acta Radiol 2007 ; 48 : 125- 134.

BIZARRO N. EDTA-Dependant Pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. Am J Hematol. 1995; 50:103-9.

BOMMANA, V. ; SHAH, P. ; KOMETA, M. ; NARWAL, R. ; SHARMA, P. A case of isolated duodenal varices secondary to chronic pancreatitis with review of literature. Gastroenterol Res. 2010 ;3(6) :281-286.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010. Situação epidemiológica da esquistossomose no Brasil.SubHA/CGDT/DEVEP/SVS/MS. Brasília. Available

at:http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao_esquistossomose_brasil_a_bril2011.pdf.June,2014.

BRIGGS C., HARRISON P., GRANT D., STAVES J., MACHINS.J. New Quantitative parameter on a recently introduced automated blood cell counter – THE XE 200TM. Clin Lab Med, 2000.

BROWNER, W. S. et al. Preparando-se para estimar o tamanho de amostra: hipóteses e princípios básicos. In: HULLEY, S. B. et al. Delineando a pesquisa clínica: Uma abordagem epidemiológica. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed. 2006. Capítulo 5, p. 69-82. Capítulo 6, p. 83-110.

CAIRO WORKING GROUP 1992. The use of diagnostic ultra-sound in schistosomiasis – attempts at standardization of methodology. *Acta Trop.*, Basel, 1992: v. 51, p. 45-63.

CARVALHO, W. F. Técnicas médicas hematologia e imunohematologia. 7ª Ed. Belo Horizonte, Coopmed, 2002.

CASTRO H. C., FERREIRA B. L. A., NAGASHIMA T., SCHULER A., RUEFF C., CAMISACA D., MOREIRA G., SCOVINO G., BORGES L., LEAL M., FILGUEIRA M., PASCHOAL P., BERNARDO V., BOURGUINHON S., RODRIGUES C. R., SANTOS D. O. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v42n5/a04v42n5.pdf>> Acesso: 30 outubro 2013.

Centro de Vigilância Epidemiológica Professor Alexandre Vranjac (CVEPAV). Vigilância epidemiológica e controle da Esquistossomose: normas e instruções. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 2007.

CHEEVER, A. W. a QUANTITATIVE POS MORTEM STUDY OF SCHISTOSOMIASIS MANSONI IN MAM. *Am J Trop Med Hyg*, v.17, p.38-64,1968.

CHIA, J.; HSIA, C.C. Pseudothrombocytopenia. *Blood*. 2011;117(16):4168.

COELHO E. Técnicas de estudo da coagulação. 3ª. ed. São Paulo, Santos, 1981.

COHEN, A.M.; CYCOWITZ, Z.; MITTELMAN M.; LEWINSKI, U.H.; GARDYN, J. The incidence of pseudothrombocytopenia in automatic blood analyzers. *Haematologia (Budap)*.2000;30(2):117-21.

COTA, G.F. et al. Ultrasound and clinical investigation of hepatosplenic schistosomiasis: evaluation of splenomegaly and liver fibrosis four years after mass chemotherapy with oxamniquine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, 2006: v. 74, n. 1, p. 103-107.

DITTRICH, S.; de MATTOS, A.A.; CHEINQUER, H.; de ARAÚJO, F.B. Correlation between platelet blood levels and the hepatic venous pressure gradient among patients with

cirrhosis]. Arq Gastroenterol. 2005 Jan-Mar;42(1):35-40. Epub 2005 Jun 22. Portuguese.

DRUMMOND, S.C.; PEREIRA, S.R.; SILVA, L.C.; ANTUNES, C.M.; LAMBERTUCCI, J.R. Schistosomiasis control program in the state of Minas Gerais in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz.2010; 105(4):519-23.

DUSSE, L.M.S. ; VIEIRA ,L.M. ; CARVALHO ,M.G. Pseudotrombocitopenia. JBPML, 2004 :v.40,n.5 :p.321-324.

EBOUMBOU, C. et al. Circulating markers of oxidative stress and liver fibrosis in Sudanese subjects at risk of schistosomiasis and hepatitis. Acta Trop., Basel, 2005: v. 94, p. 99-106.

FRASER, J. R. E. et al. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. J. Int. Med., Oxford, 1997: v. 242, p. 27-33.

FATAAR, S.; BASSIONY, H.; SATYANATH, S.; VASSILEVA, J.; HANNA, R. M. Characteristic sonographic features of schistosomal periportal fibrosis. AJR Am J Roentgenol. 1984 Jul;143(1):69-71.

FELLE P., MCMAHON C., ROONEY S., DONNELLY P., NI C.F. Platelets in the paediatric population:the influence of age and the limitations of automation. Clin Lab Haem, 2005.

FONIO A. Ueber ein neues verfahren der Blutplättchenzahlung. Deut Ztschr Chir,1912.

GERSPACHER-LARA,R.;PINTO-SILVA, R.A.; SERUFO, J.C.;DRUMMOND, S.C.;

GIGLIO A. D. KALIKS R. Princípios da hematologia clínica. 1ª ed. Barueri, Manole,2007.

GLOSTER E.S., STRAUSS R.A., JIMENEZJ.F., NEUBERGR.W., BERRY D.H., TURNERE.J.
Spurious elevated platelet counts associated with bacteremia. Am J Hematol, 1985.

GONZÁLES W., MORA A. Satelitismo plaquetario, Reporte de un caso. Disponível em:<
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462002000100007&lng=pt&nrm=iso> Acesso: 30 março 2013.

GREIPP P.R.. GRALNICK H.R. Platelet leukocyte adherence phenomena associated with thrombocytopenia. Blood, 1996.

GUÉCHOT, J. et al. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. Clin. Chem., Baltimore, 1996: v. 42, n. 4, p. 456-463.

HALFON, P. et al. Les marqueurs sanguins non invasifs de fibrose hépatique au cours de l'infection chronique par le virus de l'hépatite C. Rev. Med. Interne, Paris, 2006 : v. 27, p. 751-761.

HARRISON P., HORTON A., GRANT D, BRIGGSC., MACHIN S. Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. BR J Haematol, 2000.

HATZ, C.F. The use of ultrasound in schistosomiasis. Adv Parasitol 2001 ;48 :225-84.

HOFFBRAND A. V., PETTIT J. E., Platelets, Blood Coagulation and Haemostasis. London, Blackwell Science. 1993

HOFFBRAND A.V. Atlas colorido de hematologia clínica, São Paulo, Manole, 2001.

HSIEH A.T., CHAO T.Y., CHEN Y.C. Pseudothrombocytopenia associated with infectious mononucleosis. Arch Pathol Lab Med, 2003.

LAMBERTUCCI, J.R. .Splenic palpation for the evolution of morbidity due to schistosomiasis mansoni. Mem Inst Oswaldo Cruz.1998;93(Suppl 1):245-8.

HOFFBRAND, A.V. ; MOSS, P.A.H. Fundamentos de hematologia,2013.

IMPERIALE, T.F. ; SAID, A.T. ; CUMMINGS, O.W. ; BORN, L.J. Need for validation of clinical decision aids: use of the AST/ALT ratio in predicting cirrhosis in chronic hepatitis C. Am J Gastroenterol. 2000 Sep;95(9):2328-32.

KAMAL, S.M. ; TURNER, B. ; HE, Q. ; RASENACK, J. ; BIANCHI, L. ; AL TAWIL, A. ; NOOMAN, A. ; MASSOUD, M. ; KOZIEL, M.J. ; AFDHAL, N.H. Progression of fibrosis in hepatitis C with and without schistosomiasis: correlation with serum markers of fibrosis. Hepatology. 2006 Apr;43(4):771-9. KARDORFF, R. et al. Diagnostic value of connective tissue metabolites in Schistosoma mansoni related liver disease. Acta Trop., Basel, 1999 : v. 73, p. 156-164.

KATZ, N; CHAVES, A; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, São Paulo,1972: v.14, p. 397-400.

KAWASAKI T.; TAKESHITA, A.; SOUDA, K.; KOBAYASHI, Y.; KIKUYAMA, M.; SUZUKI F.; KAGEYAMA, F.; SASADA, Y.; SHIMIZU, E.; MUROHISA, G.; KOIDE, S.; YOSHIMIZU T.; NAKAMURA, H.; OHNO, R. Serum thrombopoietin levels in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. Am J Gastroenterol. 1999 Jul;94(7):1918-22.

KLOETZEL, K. Splenomegaly in schistosomiasis mansoni. Am J Trop Med,1962: v.11:p.472-476.

LAMBERTUCCI, J.R.; DUANI, H.; PRATA,P.H.; VOIETA,.I. Pseudothrombocytopenia in schistosomiasis mansoni. Rev Soc Bras Med Trop.2011;44:792.

LAMBERTUCCI ,J.R.; ROCHA ,R.S.; CARVALHO S.; KATZ, N. .Schistosomiasis mansoni in Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 1987;20(1):47-52.

LAMBERTUCCI ,J.R.; SILVA, R.A.; Gerspacher-Lara, R.; Barata, C.H. Acute Manson's schistosomiasis: sonographic features. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*1994;**88**(1):76-7.

LAMBERTUCCI, J. R. et al. Hepatosplenic schistosomiasis in field-based studies: a combined clinical and sonographic definition. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2001:v. 96, p. 147-150. Suplemento 1.

LAMBERTUCCI, J. R. et al. Magnetic resonance imaging and ultrasound in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro,2004: v. 37, n. 4, p. 333- 7.

LAMBERTUCCI, J. R. et al. Piogenic abscesses and parasitic diseases. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*,2001.b: v. 43, n. 2, p. 67-74.

LAMBERTUCCI, J.R.; BARRAVIERA, B. Esquistossomose mansônica. Estudo clínico . *JBM J Bras Med*, 1994:v.67:p.59-100.

LAMBERTUCCI, J.R.; SERUFO, J.C.; LARA, R.G.; RAYES, A.A.M.; TEIXEIRA, R.; NOBRE, V.; ANTUNES, C.M. Schistosoma mansoni:assessment of morbidity before and after control. *Acta Tropica* 2000;**77**(1):101-109.

LAMBERTUCCI J.R, SILVA L.C, ANTUNES C.M. Aspartate aminotransferase to platelet ratio index and blood platelet count are good markers for fibrosis evaluation in schistosomiasis mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007: **40**(5):599.

LAMBERTUCCI, J.R. ; ANDRADE, L.M. ; PINTO-SILVA, R.A. Magnetic resonance imaging of the liver in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.35,p.679-680,2002.

LAMBERTUCCI, J.R. ; SANTOS, L.C.S. ; ANDRADE, L.M. ; QUEIROZ, L.C. ; PINTO- SILVA, R.A. Magnetic resonance imaging and ultrasound in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop.*2004 ;**37**(4):333-7.

LAMBERTUCCI, J.R. ; SANTOS, L.C.S. ; ANDRADE, L.M. ; QUEIROZ, L.C. ; CARVALHO, V.T. ; VOIETA ,I. ; ANTUNES ,C.M. Imaging techniques in the evaluation of morbidity in schistosomiasis mansoni. Acta Trop.2008 ;108(2-3):209-17.

LAMBERTUCCI, J.R. ; VOIETA, I. ; RESENDE, V.M. Moderate and intense Symmers's fibrosis in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. Rev Soc Bras Med Trop.2009 ;42 :611-2.

LAMBERTUCCI, J.R. ; Gerspacher-Lara, R. ; PINTO-SILVA, R.A. ; BARBOSA, M.M. ; TEIXEIRA, R. ; BARBOSA, H.F. ; SERUFO, J.C. ; REZENDE, D.F. ; DRUMMOND, S.C. ; RAYES, A.M. The Queixadinha project :morbidity and control of schistosomiasis in an endemic area of the northeast os Minas Gerais, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop.1996 ;29 :127-135.

LAMBERTUCCI, J.R. Schistosoma mansoni : pathological and clinical aspects. In : Jordan P,Webb,G. editors.Human Schistosomiasis.³ ed. Wallingford : Cab International;1993.p.195- 235.

LAMBERTUCCI, J.R. Acute schistosomiasis mansoni : revisited and reconsidered. Mem Inst Oswaldo Cruz.2010 ;105(4):422-35.

LIPPI, G. ; PLEBANI, M. EDTA-dependent pseud thrombocytopenia : further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. Clin Chem Lab Med. 2012 ;50(8):1281-5.

LUBURICH,P. ; BRU, C. ; AYUSO, M.C. ; AZON,A. ; CONDOM, E. Hepatic Kaposi sarcoma in AIDS : US and CT findings. Radiology,v.175,p.172-174,1990.

MAHARAJ, B. ; MAHARAJ, R.J. ; LEARY, W.P. ; COOPAN, R.M. ; NARAN, A.D. ; PIRIE, D. ; PUDIFIN, D.J. Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. Lancet. 1986 Mar 8;1(8480):523-5.

MALOK M., TITCHENER E. H., BRIDGERS C., LEE B. Y., BAMBERG R., Comparison of two platelet count estimation methodologies for peripheral blood smears. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17691671>> Acesso em: 01 jun 2013.

MARINHO C. C. et al. Clinical versus ultrasound examination in the evaluation of hepatosplenic schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Sep.2006: v.101, p. 317-321, Suplemento 1.

MORENO A., MENKE D. Assessment of platelet numbers and morphology in the peripheral blood smear. Clin Lab Med, 2002.

NEIVA T. J. C., MACHADO M. J., HOEHN M., HERMES E. M., VITURI C. L., FERREIRA J. S., D'AMICO E. A. Evaluation of platelet aggregation in platelet concentrates: storage implications. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842003000400005&lng=pt&nrm=iso> Acesso: 12 jun 2013.

NORRIS S., PANTELIDOU D., SMITH D., MURPHY M.F. Immunoplatelet counting: potential for reducing the use of platelet transfusions through more accurate platelet counting. Br J Haematol, 2003.

NOSANCHUK J. S., CHANG J., BENNET J. M. The analytic basis for the use of platelet estimates from peripheral blood smear: Laboratory and clinical applications. American Journal of Clinical Pathology, 1978.

OLIVEIRA. H. P. Hematologia clínica. 3ª ed, São Paulo, Livraria Atheneu, 1992.

OLIVEIRA R. A. G., TAKADACHL M. M., NONOYAMA K., BARRETTO O. C. O. Is automated platelet counting still a problem in thrombocytopenic blood?. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-31802003000100005&lng=pt&nrm=iso> Acesso: 15 jun 2013.

OLIVEIRA R. A. G., TAKADACHL M. M., NONOYAMA K., BARRETTO O. C. O. The absolute recommendation of chamber Neubauer method for platelets counting instead of indirect methods in severe thrombocytopenic patients.

PAYNE BA, PIERRE RV. Pseudothrombocytopenia: a laboratory artifact with potentially serious consequences. Mayo Clin Proc. 1984;59:123-5.

PRATA, A. Esquistossomose mansoni. In: VERONESI R & FOCACCIA R (ED). Tratado de Infectologia. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2002. V.2,cap.107, p.1374-1392.

PRATA, A.; RUIZ-GUEVARA, R.; ANTUNES, C.M.; MARINHO, C.C.; QUEIROZ, L.C.; VOIETA, I.; LAMBERTUCCI, J.R. Comparison between clinical and ultrasonographic findings in cases of periportal fibrosis in na endemic área for schistosomiasis mansoni in Brazil. Ver Soc Bras Med Trop.2010;43(2)129-34.

PRATA, A. The role of the scientific research in the control of schistosomiasis in endemic areas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,2004:v. 99, p. 5-11. Suplemento 1.

PRATA, A. Influence of the host related factors in the development of the hepatosplenic formo f schistosomiasis mansoni. Mem Inst Oswaldo Cruz.1992;87(Suppl 4):39-44.

PRATA, A.; ANDRADE, Z. Fibrose hepática de Symmers sem esplenomegalia. O Hospital, Rio de Janeiro,1963: v.63, n.3, p.617-623.

QUEIROZ,L.C. ;DRUMMOND,S.C.; MATOS, M.L.; PAIVA, M.B.; BATISTA,T.S.; KANSAON,A.Z.; ANTUNES,C.M.; LAMBERTUCCI,J.R. Comparative randomised Trial of high and conventional doses of praziquantel in the treatment of schistosomiasis mansoni. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105(4):445-8.

REEDY, D.W.; LOO, A.T.; LEVINE, R.A. AST/ALT ratio > or = 1 is not diagnostic of cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. Dig Dis Sci. 1998 Sep;43(9):2156-9.

RICHTER,J.; DOMINGUES,A.L.; BARATA,C.H.; PRATA,A.R.; LAMBERTUCCI,J.R. Report of the second satellite symposium on ultrasound in schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz.2001;96(Suppl):151-6.

SEGAL H.C., BRIGGSC., KUNKA S., CASBARD A., HARRISON P., MACHIN S.J., MURPHY M.F. Accuracy of platelet counting haematology analysers in severe thrombocytopenia and potential impact on platelet transfusion. Br J Haematol, 2005.

SINHA, S.K.; MANDAL,P.K.; MALLICK,J. Pseudothrombocytopenia – a caveat. J Indian Med Assoc. 2011;109(7):476-8.

SOUZA MR, TOLEDO CF, BORGES DR. Thrombocytemia as a predictor of portal hypertension in schistosomiasis. Dig Dis Sci.2000;45(10):1964-70.

SOUZA,M.R.; AGUIAR,L.A.; GOTO,J.M.; CARVENTE,C.T.; TOLEDO,C.F.; BORGES,D.R. Thrombopoietin serum levels do not correlate with thrombocytopenia in hepatic schistosomiasis. Liver.2002;22:127-9.

SOUZA, C. Exame do abdome. In: LÓPEZ, M.; LAURENTIS-MEDEIROS, J. Semiologia Médica: As bases do diagnóstico clínico. 5ª edição. Rio de Janeiro: Revinter. 2004. Capítulo 47, p.722-735.

SUZUKI, A. et al. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Liver Int., Oxford,2005: v. 25, p. 779-786.

VAN D.M.,MACKENZIE M.A.,DINNISSEN J.W., KEIJZERM.H. Pseudoplatelet: a retrospective study of their incidence and interference with platelet counting. J. Clin Pathol, 2003.

VON A.N., EHRLICH B., SCOTT C.S., RIGGERT J., OELLERICH M. Cryoglobulins interfere with platelet counts by optical and impedance methods but not with CD61 immunoplatelet count. Clin Chem, 2001.

VOIETA, I.; QUEIROZ, L.C.; ANDRADE, L.M.; SILVA, L.C.; FONTES, V.F.; BARBOSA, A.Jr.; RESENDE, V.; PETROIANU A.; ANDRADE, Z.; ANTUNES, C.M.; LAMBERTUCCI, J.R. Imaging techniques and histology in the evaluation of liver fibrosis in hepatosplenic schistosomiasis mansoni in Brazil: a comparative study. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105:414-21.

10. ANEXOS

**Termo de consentimento livre e esclarecido e autorização para inclusão em
protocolo de pesquisa**

Introdução: Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa chamada: “PREVALÊNCIA DA PSEUDOTROMBOCITOPENIA EM PACIENTES PORTADORES DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA”. Nosso objetivo é verificar a ocorrência de um erro na contagem de plaquetas quando se usa contadores automáticos e um anticoagulante. Antes de aceitar participar dessa pesquisa clínica, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos.

Esclarecimentos: Nosso grupo realizará, além da entrevista, exame físico, ultrassonografia do abdome quando necessário, revisão de seu prontuário médico e coleta de dois tubos de ensaio de sangue e a realização de uma punção na digital de um dos dedos da mão. Esses tubos têm o mesmo tamanho dos que você está acostumado para seus exames de rotina. A técnica para coleta do sangue é idêntica à técnica utilizada para exames de sangue comuns.

O exame de ultrassonografia pode beneficiá-lo com o conhecimento do estágio evolutivo de sua doença. Todos os dados obtidos serão utilizados exclusivamente com a finalidade de pesquisa e os dados que o identificam serão mantidos em sigilo.

Nenhum paciente deixará de receber cuidados ou tratamento por ter se recusado a participar da pesquisa e seu tratamento não terá seu curso alterado pela pesquisa.

Segundo a Resolução 466/2012, nenhuma pesquisa é isenta de riscos, portanto é importante ressaltar que nenhum procedimento é isento de riscos. Há possíveis desconfortos que devem ser informados neste momento, durante a coleta de sangue você poderá sentir um ardor semelhante ao de uma picada de inseto e/ou sensação de medo relacionada à coleta de sangue, especialmente quando você não está acostumado a doar sangue ou realizar exames laboratoriais de rotina. Algumas pessoas sentem um incômodo quando a agulha está introduzida em sua veia e/ou quando o garrote pressiona seu braço. Raros casos desdobram-se em aparecimento de hematomas e/ou dor no local da punção.

Durante a realização da ultrassonografia você ficará deitado(a) em maca com os braços acima da cabeça, situação que pode gerar um leve desconforto postural. A fricção de uma sonda para obtenção das imagens ultrassonográficas contra sua pele será realizada com auxílio de um gel a base de água incolor que reduz o incômodo. Esse gel não é pegajoso e não mancha suas roupas.

Benefícios: Não haverá benefício pessoal da sua participação na pesquisa.

Confidencialidade: Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidenciais até onde é permitido por lei. No entanto, o pesquisador e sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG.

Desligamento: A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar a sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento. Seu médico poderá finalizar sua participação neste programa de pesquisa se forem identificadas outras causas de doença em seu fígado ou se o programa for cancelado por questões administrativas.

Novas descobertas: todos os novos achados durante a realização dessa pesquisa que possam influenciar seu desejo em continuar a participar deste estudo serão fornecidos a você assim que tais informações se tornarem disponíveis.

Emergência e contato com a Comissão de Ética: Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida ou apresentar qualquer problema médico, contate o Farm Bioquímico Guilherme Vaz de Melo Trindade no telefone (31) 9420-4902, ou o Médico Dr. José Roberto Lambertucci no telefone (31) 3409-9820. Nos casos de dúvidas sobre aspectos éticos contate o Comitê de Ética através do telefone (31) 3409-4592 localizado à Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2^o. Andar, sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil.

Consentimento: Eu, _____ declaro que fui bem informado(a) a respeito da pesquisa “PREVALÊNCIA DA PSEUDOTROMBOCITOPENIA EM PACIENTES PORTADORES DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA” e estou ciente de que não corro quaisquer riscos decorrentes da realização da ultrassonografia, de que os riscos decorrentes da coleta de sangue são muito pequenos e de que as informações obtidas são sigilosas e somente serão utilizadas para fins de pesquisa.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 2014.

Paciente ou responsável legal

Testemunha

Pesquisadores:

Professor Dr. José Roberto Lambertucci – FM/UFMG tel.: (31) 3409-9820

Farm° Bioquímico Guilherme Vaz de Melo Trindade – FM/UFMG tel.: (31) 9420-4902

Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG – Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil tel.: (31) 3409-4592

ANEXO II: Aprovação institucional da Coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Estado de Minas Gerais (UFMG)



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais
Infectologia e Medicina Tropical

Profa. Dra. Fabiana Simão Machado

PARECER

O projeto intitulado "Prevalência da pseudotrombocitopenia em pacientes portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica", que será orientado pelo Prof. José Roberto Lambertucci e desenvolvido pelo mestrando* Guilherme Vaz de Melo Trindade, na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, foi-me encaminhado para parecer sobre os aspectos éticos.

Constam no projeto: protocolo detalhado da pesquisa contendo, descrição da mesma, plano e coleta de dados, condições de execução do projeto pelos laboratórios/instituições envolvidas, dados pessoais do pesquisador responsável. Constam ainda: informações relativas aos sujeitos da pesquisa, descrição do recrutamento de indivíduos e os procedimentos a serem seguidos. O termo de consentimento livre e esclarecido está claro e na forma de convite, contendo os riscos e benefícios da pesquisa. Finalmente, constam as referências bibliográficas relativas aos fundamentos do projeto e abordagem metodológica.

Mérito:

O projeto apresentado contém objetivos coerentes e relevantes. O grupo envolvido consta de pesquisadores capacitados para conduzir este estudo. A pesquisa visa estabelecer a prevalência de Pseudotrombocitopenia nos pacientes portadores de Esquistossomose Mansônica Hepatoesplênica. Nesse contexto, dosagem laboratorial apropriada/fidedigna do número de plaquetas e de sua função é imprescindível para evitar à iatrogenias terapêuticas e diagnósticas.

Os pesquisadores propõem comparar as contagens de plaquetas obtidas pelas três metodologias empregadas a fim de evidenciar a mais adequada, e comparar tal contagem em pacientes não esplenectomizados e pacientes que foram submetidos à esplenectomia. A prevalência de Pseudotrombocitopenia será comparada em pacientes com esquistossomose

Av. Antônio Carlos, 6.627 - Campus Universitário - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Telefones: 55 (031) 3409-2510- Fax: 55 (031) 3409-2614- E-mail: macinadofs@icb.ufmg.br

1

* Onde lê-se "Guilherme Vaz de Melo", leia-se "Guilherme Vaz de Melo"

Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina / UFMG
Av. Prof. Alfredo Balena, 190 - 5º andar
CEP: 30130-100 - Funcionários - BH/IMG



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais
Infecção e Medicina Tropical

Profª. Dra. Fabiana Simão Machado

mansônica hepatoesplênica (EHE) e não portadores (67 pacientes portadores de EHE serão selecionados).

Cotejadas com as diretrizes e aspectos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos estabelecidos pela Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, as propostas do presente projeto tem a necessária fundamentação científica, são exequíveis – consideradas a competência das equipes e das condições dos laboratórios envolvidos – e são plenamente aceitáveis do ponto de vista ético.

Parecer: Face ao exposto, concluo pela eticidade do projeto supramencionado. Salvo melhor juízo.

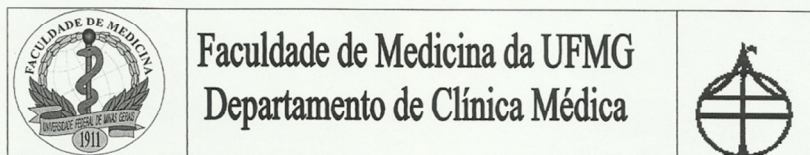
Belo Horizonte, 4 de outubro de 2013.

← 05.10.13,
projeto aprovado pelo BPC
Cien., da Faculdade de Infecção e
Medicina Tropical.

Prof. Vanderick Alencar Nobre Jr.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infecção e Medicina Tropical
Faculdade de Medicina - UFMG

Profª. Drª. Fabiana Simão Machado

ANEXO III: Aprovação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG




PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E
MEDICINA TROPICAL
PROJETO DE MESTRADO

ALUNA: Guilherme Vaz de Melo Trindade
ORIENTADOR: Prof. José Roberto Lambertucci

O projeto "*Prevalência da Pseudotrombocitopenia em Pacientes Portadores de Esquistossomose Mansônica Hepatoesplênica*" foi aprovado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, conforme parecer anexo, datado de 09/10/2013. Assim fica ratificada sua aprovação pelo Departamento de Clínica Médica para encaminhamento ao COEP/UFMG.

Belo Horizonte, 11 de outubro de 2013.


Prof. Unai Tupinambas
Chefe do Departamento de Clínica Médica
UFMG - 193406 SIAPE: 6467325-4
71 Prof. Ricardo de Menezes Macedo
Chefe do Departamento de Clínica Médica

ANEXO IV: Aprovação da Unidade Funcional de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Parecer da Unidade Funcional de Clínica Médica

Comissão de análise de projetos de pesquisa, extensão, ensino, especialização e pós-graduação.

Nome do Projeto: PREVALÊNCIA DA PSEUDOTROMBOCITOPENIA EM PACIENTES PORTADORES DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HEPATOESPLÊNICA

Autores: Guilherme Vaz de Melo Trindade

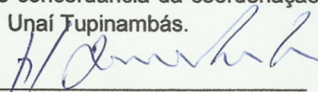
Descrição breve do projeto: Estabelecer a prevalência de PTCP nos pacientes portadores de Esquistossomose Mansônica Hepatoesplênica. Comparar a prevalência de PTCP em pacientes com EHE e não portadores. Comparar as contagens de plaquetas obtidas pelas três metodologias empregadas a fim de evidenciar a mais adequada. Evidenciar a frequência de ocorrência dos fenômenos de satelitismo plaquetário, grumos plaquetários ou plaquetas gigantes responsáveis pela PTCP. Comparar a contagem de plaquetas em pacientes não esplenectomizados e pacientes que foram submetidos à esplenectomia.

Sugestões/esclarecimentos: O projeto deverá ser divulgado para todos os profissionais do Serviço envolvidos na execução do mesmo, assim como os resultados obtidos.

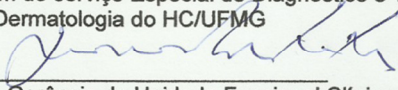
Conclusão:

1. Aprovado sem ressalvas (X). Poderá ser iniciado imediatamente.
2. Aprovado com ressalvas (). Poderá ser iniciado, mas os esclarecimentos deverão ser encaminhados para UFCLM, no máximo em uma semana para aprovação definitiva, sob pena de não aprovação.
3. Não aprovado (). Necessita de modificações substanciais antes de ser iniciado.

OBS: O estudo teve a anuência e concordância da coordenação do Serviço Especial de Diagnóstico e Tratamento de DIP, Unai Tupinambás.


Vera Lúcia de Araújo Nogueira Lima

Coordenação de enfermagem do serviço Especial de Diagnóstico e Tratamento de Dermatologia do HC/UFMG


José Roberto Siqueira Castro – Gerência da Unidade Funcional Clínica Médica – UFCLM

José Roberto Siqueira Castro
Insc. 10440X CRM: 11269
Gerente da Unidade Funcional
Clínica Médica - HC/UFMG

José Roberto Siqueira Castro
Insc. 10440X CRM: 11269
Gerente da Unidade Funcional
Clínica Médica - HC/UFMG

Belo Horizonte, 12 de dezembro de 2013.

ANEXO V: Aprovação da Direção da Faculdade de Medicina da UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão.

Belo Horizonte, 24 de julho de 2014.

PROCESSO: Nº 190/13 “Prevalência da pseudotrombocitopenia em pacientes portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica”

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 24/04/2014, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE **relatório** parcial ou final, após um ano.

P/ GuiLiteemê

Atenciosamente,

PROF.ª ANDRÉA MARIA SILVEIRA Diretora do Ensino, Pesquisa e Extensão/HC-UFMG
Diretora da DEPE/HC-UFMG
Insc. 143561 CRM 19822

Sr.
Prof. José Roberto Lambertucci
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina

ANEXO VI: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

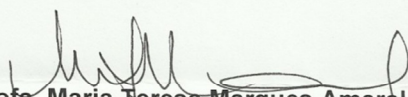
Projeto: CAAE – 25095814.0.0000.5149

**Interessado(a): Prof. José Roberto Lambertucci
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina- UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 24 de abril de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "**Prevalência da pseudotrombocitopenia em pacientes portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO VII: Aprovação da Direção de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas da UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão

DECLARAÇÃO

Declaramos para fins de comprovação no Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos – COEP/UFMG que o projeto de pesquisa intitulado **“PREVALÊNCIA DA PSEUDOTROMBOCITOPENIA EM PACIENTES PORTADORES DE ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HEPATOSPLÊNICA”** responsabilidade da Prof. Jose Roberto Lambertucci, foi recebido na Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão/HC-UFMG para registro e avaliação.

Belo Horizonte, 13 de dezembro de 2013.

Elzi Cota Vilela
Secretaria da Diretoria do HC/UFMG