



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**  
**MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**

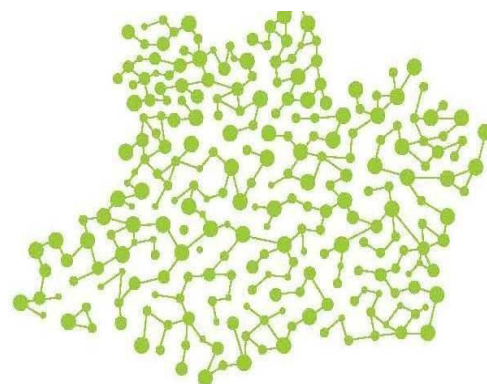


**PERFIL DE RETICULÓCITOS CIRCULANTES PÓS-DOAÇÃO DE SANGUE**  
**COMO POSSÍVEL FONTE DE CULTURA PARA *P. vivax***

**JOSÉ CARLOS DE MATOS AREOSA ALVES**

**MANAUS**

**2019**



**JOSÉ CARLOS DE MATOS AREOSA ALVES**

**PERFIL DE RETICULÓCITOS CIRCULANTES PÓS-DOAÇÃO DE SANGUE COMO  
POSSÍVEL FONTE DE CULTURA PARA *P. vivax*.**

Projeto de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para Qualificação no curso de *Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas*.

Orientador: Dr. Allyson Guimarães da Costa

Coorientador: Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda

**MANAUS**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Areosa, José Carlos

Perfil de reticulócitos circulantes pós-doação de sangue como possível fonte de cultura para *P. vivax*. José Carlos Areosa. – Manaus, 2019.

60f.

Dissertação (Mestrado) - Pós Graduação em Medicina Tropical – Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas. UEA/FMT, 2019

Orientador(a): Costa, Allyson Guimarães

Coorientador(a): Lacerda, Marcus Vinicius Guimarães de,

1. Cinética reticulocitária. 2. doação de sangue. 3. metabolismo de ferro. 4. *P. vivax*

## FOLHA DE JULGAMENTO

**PERFIL DE RETICULÓCITOS CIRCULANTES PÓS DOAÇÃO  
DE SANGUE COMO POSSÍVEL FONTE DE CULTURA PARA  
*P. vivax***

**JOSÉ CARLOS DE MATOS AREOSA ALVES**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

**Banca Julgadora:**

---

**Presidente**

---

**Membro**

---

**Membro**

## DEDICATÓRIA

*Dedico a minha mãe Vera Lúcia de Mattos Areosa Alves, mãe guerreira que sempre me apoiou, me incentivou e me mostrou sendo um exemplo de dedicação a sua família e de amor dedicado.*

*Dedico a meu pai José Carlos da Silva Alves, que em conjunto com minha mãe, sempre me deu suporte, animação para alcançar todas metas que precisava.*

*Dedico a meu tio Antônio Cardoso de Mattos Areosa, meu segundo pai, que, em conjunto com meus pais, me deu carinho, amor, oportunidades que nunca teria sem seu apoio incondicional e amor.*

*Dedico a meu irmão Danilo de Matos Areosa Alves, que em meus momentos de dúvidas e incerteza, sempre conseguiu me acalmar e animar para seguir em frente.*

*Dedico à memória meu irmão, Alexandre Augusto de Matos Areosa Alves, meu amado irmão, que, apesar de nosso pouco convívio devido a brevidade de caminhada na Terra e minha idade imatura, sempre vive comigo em memórias tenras e que feridas abertas de saudade.*

*Dedico a minha companheira, Luanda Luar, a quem me mostrou como amor é algo maravilhoso entre pessoas que se amam e entendem de verdade, e que sempre me incentivou e nunca deixou desistir nessa caminhada.*

*Dedico ao meu filho de coração, Arthur, que me aceitou em sua vida, por quem tenho amor incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Durante está árdua caminhada, a realização e finalização deste projeto se deu pela ajuda de diversas pessoas. Apesar de alguns nomes poderem ser esquecidos neste momento, sempre serão lembrados e terão mesma importância e mérito das pessoas mencionadas aqui.

Ao meu orientador Dr. Allyson Guimarães, por ter me aceitado como seu aluno e ter me incluído em seu grupo. Sempre esteve aberto para me ensinar, dar bronca, me aconselhar. Sou muito grato pela sua ótima orientação.

Ao meu coorientador Dr. Marcus Lacerda, pela orientação conselhos e participação no desenvolver do projeto

Ao Dr. Wuelton Monteiro, pela colaboração e orientações durante escrita e realização do projeto.

A todos da Fundação HEMOAM que autorizaram o estudo e auxiliaram na realização dele no Laboratório Multidisciplinar. Em especial, para os funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do HEMOAM, Márcia, Gleyde, Ronaldo, Francirney, Victória, Nívea pelo acompanhamento, conselhos, auxílios durante decorrer do projeto; Doutoradas Adriana, Andréa e Nadja por todo apoio e suporte para decorrer dos experimentos; Dra. Cinthia Xerez pela ajuda na requisição dos exames; aos funcionários do setor de doação por pela compreensão e auxílio durante as coletas; as funcionárias e alunas Jennifer, Vanessa, Stefanny e Talita, do setor de coletas por terem me auxiliado em diversos procedimentos e pelos ensinamentos; aos funcionários da DEP Alessandra, Luan, Anny e Rafaela, por todo suporte, auxílio, conselhos e até participação no estudo.

Aos participantes do estudo pela participação, pois, sem sua confiança, nada teria ocorrido.

Aos colegas da Turma de Mestrado 2017, pela troca de experiências, apoio e convívio durante esta trajetória.

Aos amigos e companheiros do grupo "*Trupe do Allyson*", Fábio, Juliana, Alicia, Lilyane, Fabíola, Fabiane, Najibe, Alex, e todos demais por todo apoio, auxílio durante esta caminhada, inclusive com participação

Aos meus amigos Adriana, Isadora, Zildete, Herick, Tayna e Débora, onde alguns me acompanham desde a infância, e outros desde faculdade, mas que

tiveram grande importância com palavras e ações de apoio e camaradagem, que tanto me ajudaram nesta caminhada.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, pelos seus conhecimentos e experiências transmitidas. Em especial, as secretárias Conceição Tufic e Iza Freitas por toda disposição para ajudar, auxiliar e aconselhar quando necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMT) por me permitir realizar tantos sonhos e conhecer tantas pessoas

A Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) por ceder o espaço físico e por permitir que os experimentos fossem realizados na instituição.

Ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Fundação HEMOAM e todos os técnicos que auxiliaram na realização desse projeto.

A toda a equipe do LABGEN da Fundação HEMOAM pela disponibilização de todos os equipamentos necessários para a realização dos experimentos.

À Fundação de Medicina Tropical- HVD e ao Instituto de Pesquisa Carlos Borborema pelo suporte execução do projeto de dissertação.

A Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela oportunidade de cursar o Mestrado Doenças Tropicais e Infecciosas.

A Fundação Bill e Melinda Gates pelo financiamento através do Instituto "ELIMINA" (Brazilian Institute on Malaria Elimination Science).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão financeira nesses dois anos de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudos.

## **DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa;



## RESUMO

A doação de sangue é um ato voluntário que possui grande importância para manejo de saúde. Entretanto, pode cobrar um preço na saúde do doador, pois a doação pode ser vista como uma hemorragia devido à perda significativa de eritrócitos, forçando o organismo à um aumento da eritropoiese. Reticulócitos são eritrócitos imaturos com presença de RNA residual e de organelas, que passam por diversos estágios até sua maturação final, processo que dura 2-3 dias. Devido à escassez de estudos envolvendo a cinética reticulocitária e metabolismo de ferro no curto prazo após doação de sangue (duas semanas), nosso estudo visa descrever como a cinética reticulocitária, parâmetros hematimétricos e metabolismo de ferro no curto prazo após doação de sangue. Trinta candidatos a doação de sangue foram recrutados aleatoriamente entre março a abril de 2019, quando preencheram um questionário e foram acompanhados por 15 dias, com análise laboratorial a cada 3 dias, começando com a doação. A contagem de reticulócitos foi feita pelo método manual e automático, com cinética reticulocitária feita por citometria de fluxo. Ferro, ferritina, transferrina, saturação de transferrina, PCR e valores hematimétricos foram avaliados também. A contagem de reticulócitos esteve elevada em três métodos diferentes, com cinética similar, com ocorrência de um pico no nono dia, incluindo estágios imaturos. Houve uma queda significativa no ferro e na saturação de transferrina do D6 ao D15. Foi possível demonstrar pelo nosso estudo a resposta fisiológica do corpo, no curto prazo, a doação de sangue e as alterações hematológicas e no metabolismo de ferro, além de demonstrar uma potencial nova fonte de reticulócitos para cultura de *P.vivax*.

**Palavras-chave:** Cinética reticulocitária, doação de sangue, metabolismo de ferro, *P. vivax*.

## ABSTRACT

Blood donation is a voluntary act which upholds great significance for health management. However, it takes a toll on donors' health, since that the donation can be seen as a hemorrhage due to significant loss of red blood cells, forcing the body to increase of erythropoiesis. Reticulocytes are immature erythrocytes with the presence of organelles and residual RNA, passing through varying stages until its full maturation, between 2-3 days. Due to the scarcity of studies on reticulocyte kinetics and iron metabolism in the short term after blood donation (up to two weeks), our study aims to describe how reticulocyte kinetics, hematimetric parameters and iron metabolism in the short-term after blood donation. Thirty blood donation candidates were randomly recruited between March to April 2019, when they filled a questionnaire and were followed for 15 days, with laboratory analysis every 3 days, starting with the donation. Reticulocyte count was made by manual and automated count, with reticulocyte kinetics done by flow cytometry. iron, ferritin, transferrin, transferrin saturation, CRP and hematimetric values were evaluated as well. Reticulocyte count was elevated in three different methods, with similar kinetics, with a peak on the nine day, including more immature stages. There was significant decrease on iron and transferrin saturation from D6 to D15. Our study we showed the short-term physiological response of the body to the blood donation and the hematological and iron metabolism alterations, showing a potential source for reticulocyte for *P. vivax* culture.

**Keywords:** Reticulocyte kinetics, Blood donation, Iron metabolism, *P. vivax*

## RESUMO LEIGO

A doação de sangue é um ato voluntário e não remunerado que é usado para diversos procedimentos na área de saúde, ajudando em salvar milhares de vidas. Entretanto, o processo de doação de sangue tem para saúde do doador, podendo causar mal-estar, fraqueza e outros sintomas, devido ao fato da grande perda de sangue retirado, levando o corpo a aumentar produção de sangue, ou células vermelhas. Os reticulócitos são células vermelhas jovens que passam por diversas mudanças em estrutura e de conteúdo até amadurecer completamente. É possível diferenciar o estágio em que se encontra por estas mudanças, e maior conhecimento sobre estas informações ajudariam na pesquisa de diversas doenças, entre elas a malária, doença que afeta profundamente a Região Amazônica. Nosso estudo teve como objetivo tentar responder como nosso corpo reage no curto prazo à uma doação de sangue, e ver se sangue dos doadores pode ser usado para em pesquisas de malária. Trinta doadores de sangue foram escolhidos aleatoriamente para participar do estudo no período de março à abril de 2019, onde eles preenchem um questionário e eram acompanhados por 15 dias, com análise laboratorial a cada 3 dias, começando com a doação. A contagem de reticulócitos foi feita por microscópio e máquina automática, e as mudanças de estágios foram analisadas por um aparelho automático específico. Foram analisados formato, conteúdo, quantidade e cor das células vermelhas, metabolismo de ferro e exame de inflamação também. A contagem de reticulócitos aumentou em três métodos diferentes, com movimentação parecida, alcançando maior valor no nono dia, incluindo estágios muito jovens. Houve uma diminuição em alguns componentes no metabolismo de ferro, começando no D6 ao D15. Foi possível demonstrar pelo nosso estudo a resposta do corpo, no curto prazo, a doação de sangue e as alterações no sangue e no metabolismo de ferro, e, apesar de ser necessário maiores estudos, o sangue de doadores de sangue podem ajudar na pesquisa de malária.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Distribuição geográfica da malária no mundo em 2017. ....	16
Figura 2. Características das espécies relevantes infectantes de mamíferos de <i>Plasmodium</i> .....	18
Figura 3. Mecanismos teorizados de infecção do <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> da medula óssea.....	20
Figura 4. Processo de amadurecimento dos reticulócitos.. ....	23
Figura 5. Mudanças celulares durante a eritropoiese.....	24
Figura 6. Principais problemas encontrados em culturas à longo prazo. ....	25

**LISTA DE ABREVIACOES E UNIDADES DE MEDIDA**

a.C	Antes de Cristo
CD71	Cluster of Differentiation 71
CD235a	Cluster of Differentiation 235a
<i>P.vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P.falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
uL	Microlitro
g/dL	Gramas por decilitro
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
TO	Tiazole Orange

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Considerações gerais sobre a malária .....	15
1.2 Epidemiologia da malária .....	16
1.3 Malária- <i>vivax</i> : doença negligenciada e seus impactos socioeconômicos .....	17
1.4 Medula óssea e seu papel como reservatório para <i>P. vivax</i> .....	19
1.5 Aspectos gerais sobre os reticulócitos .....	21
1.6 Cultura para <i>P. vivax</i> .....	24
1.7 Relevância do estudo .....	26
2. OBJETIVOS .....	27
2.1 Objetivo Geral .....	27
2.2 Objetivos Específicos .....	27
3. PRODUTOS DA DISSERTAÇÃO .....	28
4. LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....	45
5. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	45
6. CONCLUSÃO .....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
8. ANEXOS E APÊNDICES .....	53
8.1 Procedimento operacional Padrão (POP) – Coleta de Sangue Venoso .....	53
8.2 Procedimento operacional Padrão (POP) – Contagem manual de reticulócitos .....	55
8.3 Procedimento operacional Padrão (POP) – Citometria de Fluxo .....	57
8.4 Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa .....	58
8.5 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....	59

## 1. INTRODUÇÃO

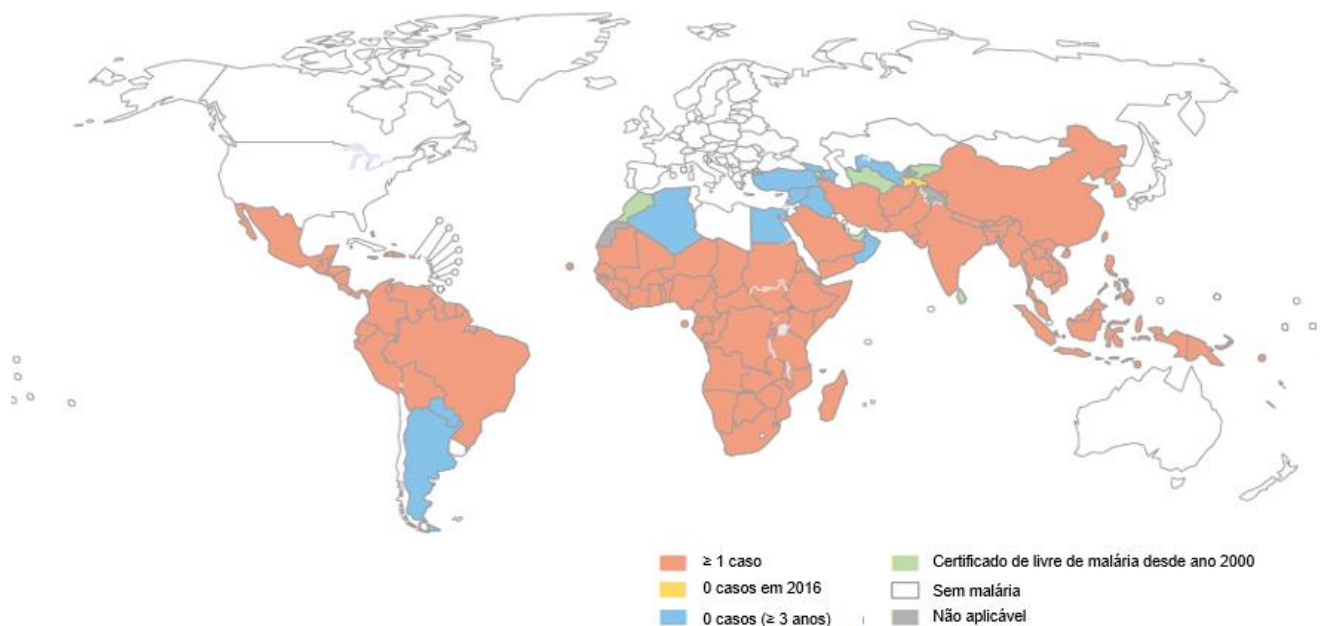
### 1.1 Considerações gerais sobre a malária

Com sua história diretamente entrelaçada com o surgimento do homem, a malária continua impactando a saúde da população humana, sendo considerada um grave problema de saúde mundial. Estudos recentes demonstram como a malária, inicialmente, uma parasitose dos símios, foi transmitida ao homem, provavelmente a 10.000 a.C (antes de Cristo) anos atrás. Desde então, seguiu o fluxo migratório dos primeiros seres humanos, sendo confirmado o DNA em diversas múmias no antigo Egito, além do registro de casos na China em 2.700 a.C. Foi uma constante ameaça às primeiras civilizações, fazendo parte da cultura dessas, como um instrumento de punição divina. Foram os antigos gregos, principalmente na figura do notório fisiologista Hipócrates a descrever os principais sintomas que a malária causava e diferenciando as formas clínicas com base na periodicidade do aparecimento da febre, além de sua associação em regiões pantanosas. Sua propagação se intensificava por novas regiões, principalmente durante períodos associados a problemas econômicos e sociais, com maior distribuição global durante ondas imigratórias, se alastrando, dessa forma, pelo globo (1–5).

A malária é uma doença causada por protozoários pertencentes à classe Sporozoa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. Sua transmissão é vetorial, através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* durante o seu repasto sanguíneo. Existem mais de 400 espécies de mosquitos do gênero *Anopheles*, no entanto, apenas 30 são vetores de importância médica, sendo o *Anopheles darlingi* o principal vetor no Brasil. Existem cinco espécies de *Plasmodium* que são capazes de infectar o homem, sendo elas: *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), *Plasmodium malariae* (*P. malariae*), *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) e *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*). As espécies *P. falciparum* e o *P. vivax* são as mais prevalentes em infecções humanas (6).

## 1.2 Epidemiologia da malária

A malária está disseminada em diversas extensões territoriais do globo, sendo uma doença que ameaça constantemente a saúde da população mundial, com casos notificados em mais de 91 países e territórios, somando um total de 3 bilhões de pessoas vivendo em locais considerados de risco para a transmissão da doença, como é possível ver na **Figura 01**. Em 2016, estima-se que ocorreram aproximadamente 216 milhões de casos de malária, com uma taxa de incidência de 63/1000 habitantes, resultando em 445 mil mortes. A África continua sendo o continente mais afetado pela doença, representando 90% de todos os casos do mundo, com 407 mil mortes (7).



**Figura 1.** Distribuição geográfica da malária no mundo em 2017.  
 Fonte: WHO, 2017 (7).

A espécie mais bem distribuída globalmente é o *P. vivax*, responsável por até 8% da malária diagnosticada no mundo, estando presente principalmente nos casos localizados nas Américas e Sudeste Asiático, enquanto que o *P. falciparum* se localiza principalmente no continente africano e é responsável pelas taxas de mortalidade da doença (7–9). O continente americano, em foco a América do Sul,



segue como uma das principais regiões afetadas pela malária e os países no qual o rio Amazonas realiza seu trajeto foram responsáveis por 50% dos casos em toda a região (10).

O Brasil, maior país da América do Sul e onde a malária é endêmica, representou, no ano de 2013, 40% dos casos da doença notificados na América Latina (11). A grande maioria dos casos reportados no país se concentra na Região Amazônica, com 99,7% dos casos notificados. A grande maioria dos casos relacionados a infecção de malária estão associados a infecção pelo *P. vivax*, com aproximadamente 83,7% dos casos positivos para esta espécie (12–15).

### **1.3 Malária-*vivax*: doença negligenciada e seus impactos socioeconômicos**

O ciclo biológico das espécies de *Plasmodium* é similar, com exceção para alguns fatores específicos de cada espécie, sendo classificado como heteroxênico, tendo o homem como hospedeiro intermediário e o mosquito *Anopheles* spp., como hospedeiro definitivo. A fêmea do mosquito, durante repasto sanguíneo, inocula esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro intermediário, com posterior migração para o fígado. Nos hepatócitos, as formas inoculadas se transformam em esquizontes, forma assexuada, que origina milhares de merozoítos. Os merozoítos formam vesículas chamadas merossomos, que ao se romperem, entram novamente na circulação sanguínea, iniciando novo ciclo eritrocitário da doença. No interior dos eritrócitos, os merozoítos podem originar os trofozoítos que, por divisão nuclear, formam os esquizontes ou ainda gametócitos, forma sexuada capaz de infectar o vetor. A fragmentação dos esquizontes no interior das hemácias culmina com a hemólise e a liberação de novos merozoítos ou gametócitos na circulação, processo desencadeador do paroxismo febril e reinício do ciclo (16).

A patogênese da doença e seu espectro clínico dependem de vários fatores, como quantidade de células eritrocitárias parasitadas, características próprias do parasito, resposta imune do hospedeiro frente aos antígenos parasitários e as alterações biomecânicas e cito adesivas das células sanguíneas, conforme **Figura 02**. Por ser considerado a espécie que causa maior mortalidade e possui um modelo

de cultura *in vitro*, o *P. falciparum* é a mais estudada e no qual se tem um maior conhecimento sobre seu ciclo biológico e informações sobre agravamento da doença (17,18).

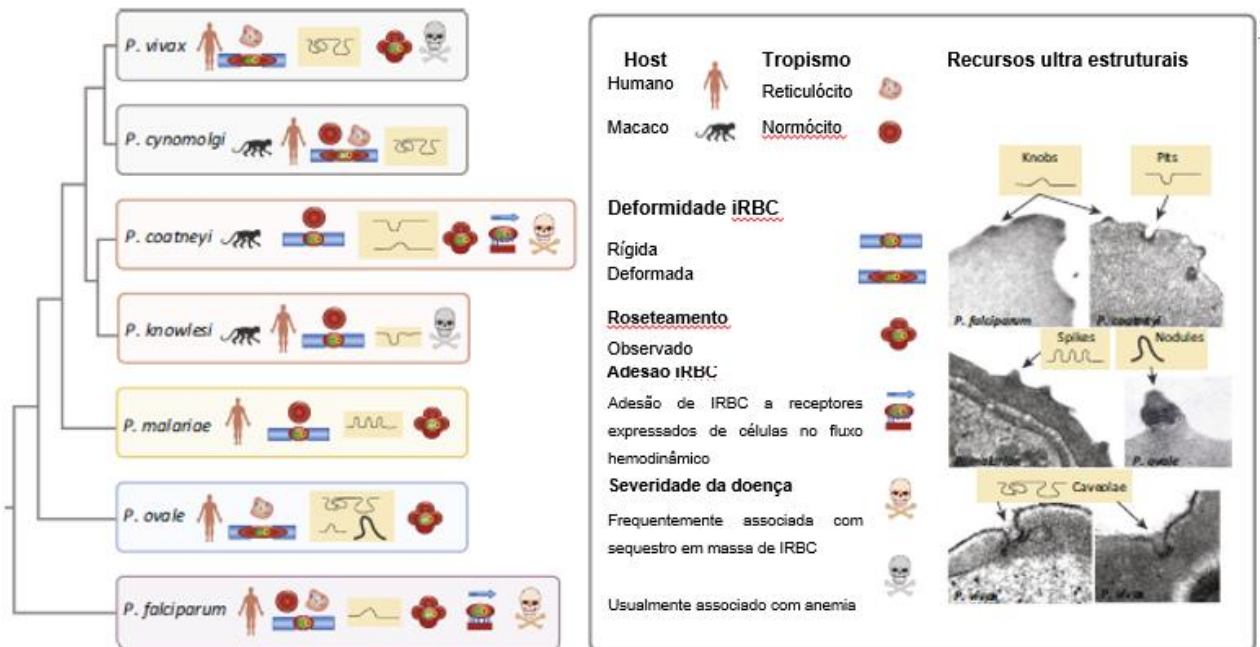


Figura 2. Características das espécies relevantes infectantes de mamíferos de *Plasmodium*. Fonte: Russel, (18).

Os investimentos e as ações voltadas para produção de conhecimento e combate a transmissão das infecções por *P. falciparum* fica bastante evidente através da redução na transmissão deste parasita e menor mortalidade em várias regiões do mundo. Enquanto que para o *P. vivax*, esse ganho de conhecimento e investimento não é observado, sendo associado principalmente as características de malária benigna para essa espécie. Desta forma, é possível observar um aumento e maiores dificuldades no combate da malária-*vivax*, fator bastante preocupante pela quantidade de pessoas em situação de risco de adoecerem e, dificultando, desta forma, o objetivo elencado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que é de erradicar a malária e evitar novos prejuízos a saúde da população exposta (19,20).

Uma abordagem pouco explorada, porém, importante para demonstrar o impacto e o tamanho da doença no mundo moderno, está em verificar qual impacto no qual a malária-*vivax* ocasiona ao sistema financeiro global. Foi possível constatar

o quão prejudicial ela é, podendo resultar em prejuízos na ordem de U\$ 1.400.000.000 – U\$ 4.000.000.000, com justificativa do grande impacto que tem sobre a mão-de-obra, devido as recidivas que podem ser recorrentes. Além disso, podem causar diversas complicações, como problemas respiratórios graves, anemia acentuada, picos de febre incapacitantes e que afetam todos as faixas etárias, resultando em problemas na capacidade de aprendizado em crianças e atingindo o desenvolvimento econômico da população, principalmente em países mais pobres, onde as pessoas não possuem acesso à saúde básica, levando a perda de produtividade e de poder financeiro nessas regiões (21,22).

Diversos estudo tem demonstrado que a malária-*vivax* é capaz de causar situações no qual a vida do paciente chega ao estado crítico, abrangendo desde dificuldade respiratória grave, trombocitopenia, malária cerebral, ruptura esplênica, coma, hepatite, insuficiência renal até anemia grave (23,24). Em populações vulneráveis, como neonatos e crianças, podem ser observados complicações respiratórias, anemia grave e choque, enquanto em gestantes, pode resultar em neonatos com baixo peso, parto prematuro e aborto espontâneo (25,26).

Além da problemática apresentada acima, à malária-*vivax* possui características biológicas diferentes do *P. falciparum*, como por exemplo as formas dormentes nos hepatócitos, denominadas de hipnozoítos, que, ao serem reativadas, levam aos eventos de recaídas. Outro fator agravante da doença se dá pela falta de alternativa aos medicamentos de primeira linha, como cloroquina, com estudos sobre a resistência do parasita ao medicamento e à primaquina, droga utilizada no tratamento de hipnozoítos, como problemas de aderência ao do longo tratamento, reações adversas à medicação (hemólise por deficiência da enzima G6PD) e variações genéticas relacionadas à biotransformação do medicamento no hospedeiro (27–30).

#### **1.4 Medula óssea e seu papel como reservatório para *P. vivax***

Com o crescente aumento no número de casos de malária-*vivax*, foram iniciadas novas pesquisas para entender diversos gargalos sobre os aspectos

imunológicos, patogênese e mecanismos do ciclo biológico. Uma das particularidades pode ser visualizada na **Figura 3**, relacionada ao tropismo do *P. vivax* em invadir eritrócitos imaturos, denominados reticulócitos (31).

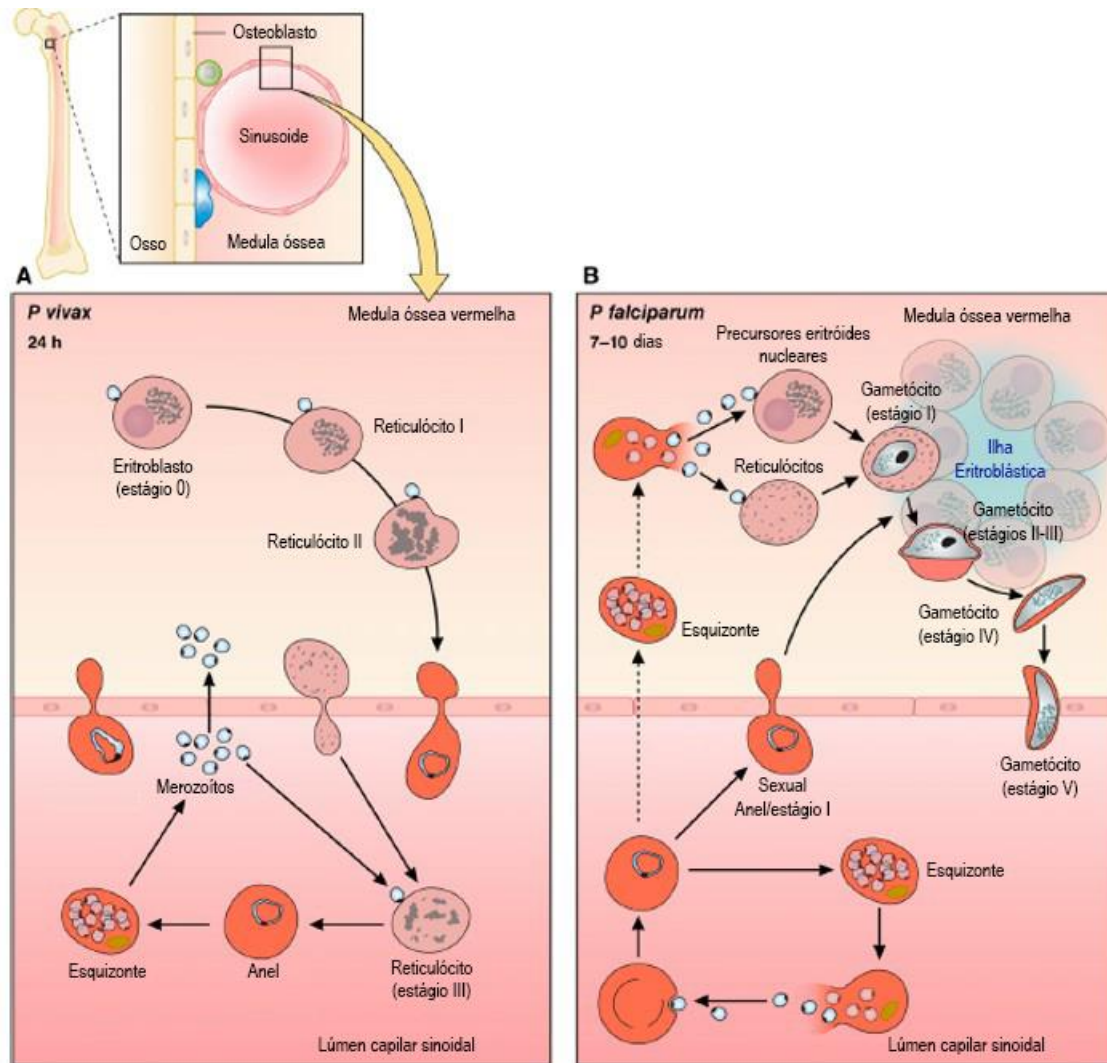


Figura 3. Mecanismos teorizados de infecção do *P. vivax* e *P. falciparum* da medula óssea. Fonte: Mayor, (32)

Em ambas as espécies de *Plasmodium* já foram observados a presença de parasitos na medula óssea, associadas a razões específicas pertinentes às etapas de seu ciclo biológico (33–35). O *P. vivax* possui um tropismo por células sanguíneas mais restrita que o *P. falciparum*, que infecta células sanguíneas maduras ou imaturas, enquanto que o *P. vivax* parasita apenas células bem imaturas. Sabe-se que, células imaturas que possuem uma maior quantidade de

proteína de membrana CD71 sofrem maior invasão por esse parasito, principalmente para a manutenção de seu ciclo biológico (36).

Desta forma, o conhecimento de como ocorre a maturação dos reticulócitos em eritrócitos é importante para entender os mecanismos de invasão dos parasitas do gênero *Plasmodium*, principalmente o *P. vivax*. Além disso, descrever quais são os receptores que podem ser utilizados para estagiar o processo de maturação nas formas mais imaturas dos reticulócitos pode auxiliar no entendimento dos mecanismos biológicos do parasito e na descrição das possíveis interações entre os receptores eritróides e os seus ligantes que permitem o processo de invasão parasitária (37).

### **1.5 Aspectos gerais sobre os reticulócitos**

Os reticulócitos podem ser definidos como eritrócitos imaturos, no seu estágio final antes da maturação completa. Foram descobertos por Wilhelm Erb em 1865, ao observar a presença de eritrócitos granulados após hemorragias ou tratamento de suplementação de ferro (38).

Sua principal diferença para os eritrócitos está na presença de diversas organelas intracelulares, como ribossomos, mitocôndria e poliribossomos, levando a aparência reticular, além de seu tamanho, aproximadamente 20% maior que as hemácias maduras. São originários da medula óssea, onde, como os eritrócitos, podem sintetizar hemoglobina em menor concentração. Pode atuar como substituto de emergência para as hemácias, em decorrência de processos que resultam na insuficiência de oxigênio circulante ou perda de eritrócitos, mantendo a distribuição de oxigênio ao organismo até a estabilização da situação e normalização no número dessas células (39).

A presença dos restos nucleares e organelas, que possuem uma quantidade significativa de RNA, permitem a utilização de colorações que causem a precipitação do material genético, como Azul Cresil Brilhante, Novo Metileno Azul ou Acridine Orange, permitindo a identificação dos mesmos em microscopia ótica. Seu processo

de maturação ocorre em duas etapas, uma na medula óssea, durando 72 horas, e o segundo na corrente sanguínea, durando 24 horas. Apesar de serem precursores dos eritrócitos, os reticulócitos são uma população heterogênea, que possuem características morfológicas, bioquímicas e funcionais diferentes (40).

Na década de 1930, Heilmeyer e Westhauser perceberam diferenças na população de reticulócitos, percebendo uma diminuição da granulação conforme ocorria uma maturação dessas células, podendo ser classificadas de acordo com as características observadas na **Figura 4**, onde as mesmas poderiam ser (40,41):

- Grupo 0: Representa o precursor do reticulócito, denominado normoblasto ortocromático, antes de ocorrer o processo de perda nuclear pela célula;
- Grupo I: Ocorre a perda do núcleo do reticulócito imaturo, possuindo uma grande massa de RNA onde estava previamente o núcleo. É encontrada na medula óssea e representa 0,1% da população de reticulócitos em indivíduos normais;
- Grupo II: A massa acumulada de RNA diminui, se espalhando sobre citoplasma e a formação do sistema reticular. É encontrada na medula óssea e representa 0,7% da população de reticulócitos em indivíduos normais;
- Grupo III: Ocorre maior separação dos grânulos de RNA e restos do sistema reticular. Está em transição da medula óssea para circulação periférica, sendo encontrada quase em sua totalidade neste último local. Representa 32% da população de reticulócitos em indivíduos normais;
- Grupo IV: Poucos restos do sistema reticular e RNA, devido a sintetização de proteínas necessárias para maturação em eritrócito. É encontrada na circulação periférica e corresponde a 67,2% da população de reticulócitos em indivíduos normais.

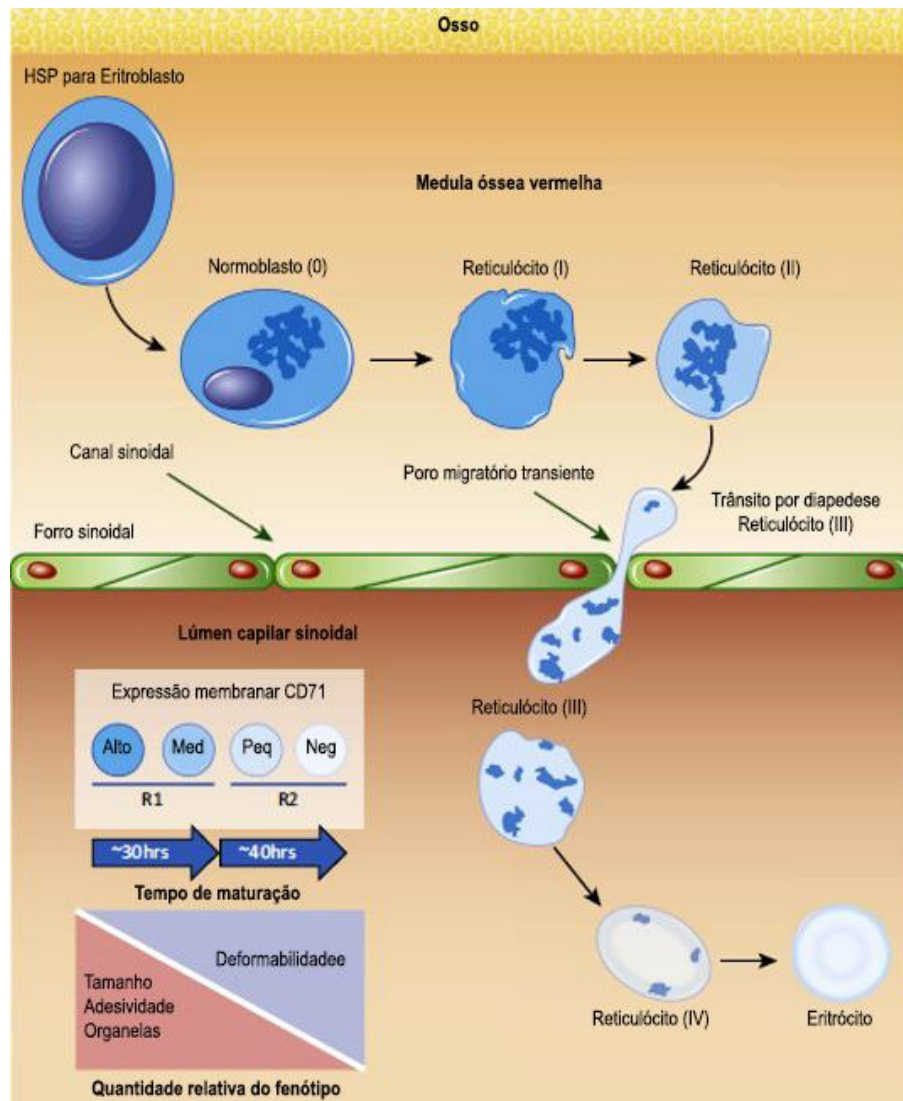


Figura 4. Processo de amadurecimento dos reticulócitos. Fonte: Russel, (18).

Durante o processo de maturação, o reticulócito passa por diversas etapas, entre elas a remodelação da membrana, exclusão de organelas, mudanças na expressão metabólica proteica e a exclusão por vesículas exossomais de receptores transmembranais protéicos (42). Esse último processo é importante para a utilização de testes, como o de imunofenotipagem, visando entender melhor o processo de amadurecimento e identificação das etapas e permitindo identificar moléculas não acessíveis por microscopia ótica, como demonstrado na **Figura 5**.

Entre os receptores utilizados para identificação de reticulócitos, o de maior importância está no receptor de transferrina (CD71), cuja função no reticulócito imaturo está em auxiliar no processo de síntese de hemoglobina pela entrada de ferro, ocorrendo sua exocitose por formação de exossoma no final da maturação, sendo específico para formas não maduras de eritrócitos (36,43). Outra proteína membrana utilizada, em conjunto com CD71 é a glicoforina A (CD235a), sendo um dos principais componentes de membrana de toda linha eritrocitária (44).

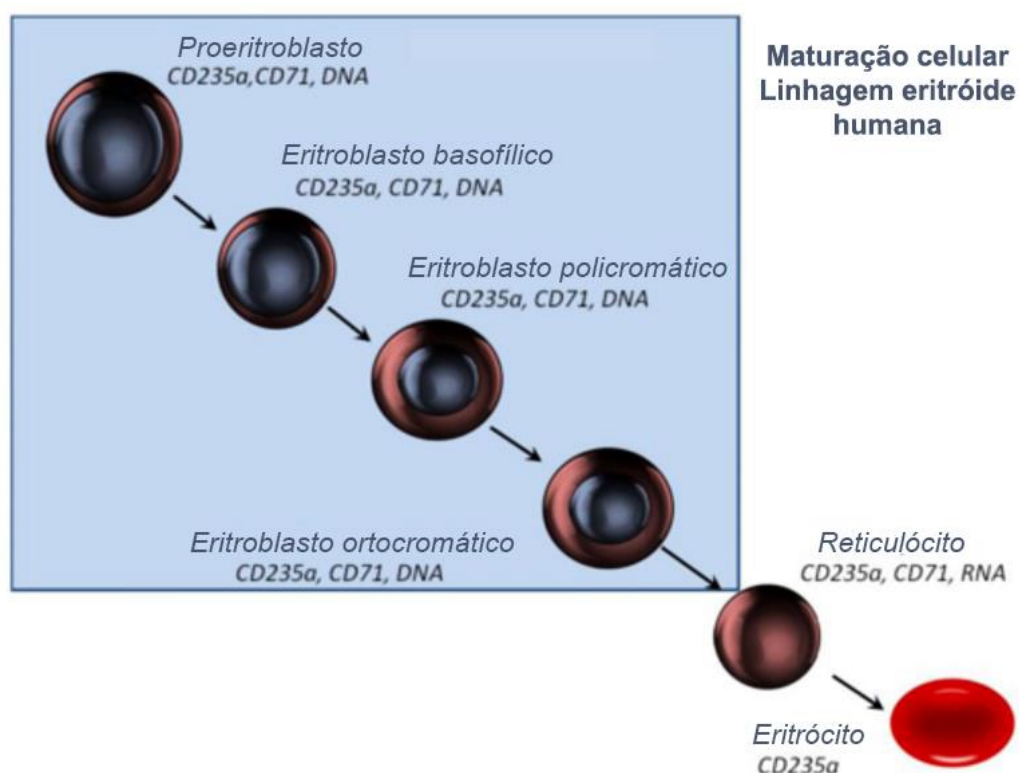


Figura 5. Mudanças celulares durante a eritropoiese. Fonte: Samsel, (44)

### 1.6 Cultura para *P. vivax*

A conscientização da ameaça do *P. vivax* para a população mundial renovou os esforços da comunidade científica para entender melhor diversas questões não conhecidas que podem ser fundamentais para ações de combate ao parasito. Um dos principais problemas está no fato de ainda não haver um modelo estabelecido de cultura para fase sanguínea do protozoário, dificultando a obtenção de maiores informações relacionadas a biologia do *P. vivax* (45).



Um dos maiores gargalos está na limitação da utilização de reticulócitos, mais especificamente, os estágios mais imaturos, como uma fonte constante para manter o meio suprido para a realização de invasões. Devido ao pouco tempo de vida em que permanecem antes de amadurecer e os diversos problemas exemplificados na **Figura 6**, não se tem atualmente uma fonte constante de reticulócitos para realizar trocas e manter o meio em condições para invasões parasitárias e consequente manutenção do parasito (46).

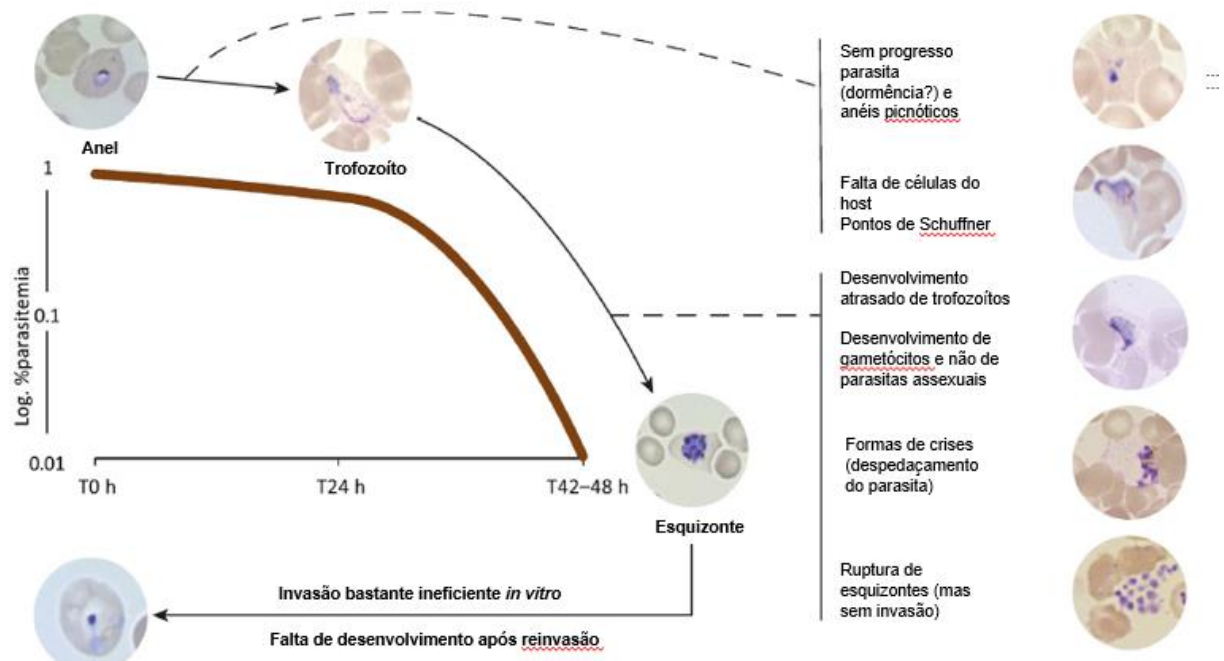


Figura 6. Principais problemas encontrados em culturas à longo prazo. Fonte: Thomsom-Luque,(46)

Por representarem 1% das células sanguíneas circulantes e possuírem uma curta duração de vida, torna-se difícil sua coleta em pacientes adultos, sendo necessário recorrer a outras fontes de amostras, como células de cordão umbilical e/ou derivados de células pluripotentes isoladas de cordões para utilização em cultura e de pacientes com hemocromatose. Entretanto, tais meios mostraram-se laboriosos, caros e de curta duração (47–49). Uma fonte ainda não explorada seria a utilização de indivíduos pós-doação de sangue, pois em situações de perda aguda de eritrócitos, os níveis de reticulócitos se elevam (50).

## 1.7 Relevância do estudo

A pesquisa para criação de um modelo de cultura para *P. vivax* é um objetivo perseguido desde o início do século XX, mas ainda não alcançado. Com o reconhecimento da gravidade clínica e os prejuízos econômicos que podem ser ocasionados pela malária-*vivax*, foram feitos diversos esforços e investimentos para diminuir o gap de conhecimento que se tem entre as duas principais espécies causadoras de malária no homem.

É especulado que um dos motivos para ineficiência de invasão dos merozoítos esteja na biodisponibilidade dos reticulócitos, pois alguns fatores, como estágio, fonte e armazenamento afetam a viabilidade da cultura. Entre as principais fontes utilizadas para esse fim estão o isolamento de reticulócitos de cordão umbilical, utilização de células troncos ou de pacientes que necessitem de sangria sanguínea constante, como pessoas com hemocromatose. Entretanto, são métodos caros e/ou de difícil obtenção. Uma fonte ainda não explorada seria a obtenção de amostras de doadores de sangue, onde, teoricamente, teriam níveis mais elevados de reticulocitose, devido à perda de sangue pós-doação, levando a uma necessidade de reposição.

Desta forma, verificar a possibilidade de doadores de sangue serem uma fonte de obtenção de reticulócitos para uma possível padronização de cultura para *P. vivax* é importante para auxiliar no andamento de diversos outros estudos sobre a biologia do parasito.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Descrever o perfil de reticulócitos circulantes em indivíduos pós-doação de sangue como possível fonte de cultura para o *Plasmodium vivax*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Demonstrar a cinética de reticulocitose em indivíduos pós-doação de sangue como possível fonte de cultura para o *Plasmodium vivax*;
2. Identificar os estágios dos reticulócitos em indivíduos pós-doação de sangue como possível fonte de cultura para o *Plasmodium vivax*.

### 3.PRODUTOS DA DISSERTAÇÃO

#### **Increased reticulocyte counting after blood donation: kinetics assay with iron metabolism and hematimetric parameters evaluation**

José Carlos Areosa<sup>1,2</sup>, Hiochelson Najibe Santos Ibiapina<sup>1,2</sup>, Wuelton Marcelo Monteiro<sup>1,2</sup>, Marcus Vinícius Guimarães Lacerda<sup>1,2,3,4</sup>, Allyson Guimarães Costa<sup>1,2,3,5,6,\*</sup>

1. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;
2. Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, Brazil;
3. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;
4. Instituto de Pesquisas Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ-Amazônia, Manaus, AM, Brazil.
5. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;
6. Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil;

#### **Key Points**

- After donation, there's a rise in reticulocyte numbers, with peak by the ninth day, including its immature stages.
- There's a significant variation on iron and transferrin saturation within the 15 days period.

## Introduction

Blood donation in Brazil is a voluntary, unpaid and altruistic action where an individual provides a portion of their blood for later transfusion<sup>1</sup>. Although it is important for blood replacement in hematological disabled individuals or in the treatment of several diseases, the procedure has an impact on the donor, with the onset of immediate or late adverse effects and resulting negative experience with blood donation<sup>2</sup>. Among the possible explanations for such adverse events, the donation can be seen as a hemorrhage due to significant loss of red blood cells, and as an initial response, there is an increase in reticulocyte count due to increased erythropoiesis<sup>3</sup>.

Reticulocytes are pre-erythrocyte cells, characterized by their morphology and presence of cytoplasmic organelles, observed with staining of intracellular content. The proportion of these cells under normal conditions is low, with 1-2% in the bloodstream<sup>4</sup>. The erythrocyte maturation process lasts between 2-3 days, through a complex process, with membrane remodeling, organelle exclusion, changes in protein metabolic expression and exosome vesicles exclusion of protein transmembrane receptors, such as the CD71 molecule<sup>5-7</sup>.

These cells participate in the stimulation of erythropoiesis by regulating iron through their soluble transferrin receptors (sTfR/CD71), and inhibiting the process during low iron levels<sup>8,9</sup>. In addition, changes in reticulocyte morphology made it possible to classify this population based on the amount of reticular organelles and CD71 receptor presence<sup>10</sup>. After the discovery of the CD71 receptor, it was possible to identify the tropism of *Plasmodium vivax* by reticulocytes, mainly from more immature stages, with a larger amount of this molecule<sup>10,11</sup>.

Among the main strategies for the study of reticulocyte kinetics, we can highlight the obtaining of umbilical cord cells from neonates, blood from patients with hemochromatosis and use of hematopoietic stem cells<sup>12</sup>. A possible alternative would be the use of blood donors due to the body's response to blood loss<sup>13</sup>. Due to the scarcity of studies on reticulocyte kinetics and iron metabolism in the short term after blood donation (up to two weeks), our objective was to characterize how hematological and metabolic processes occur in these individuals. Our results

demonstrated that occurs decreasing levels of iron metabolism components during the two weeks after donation, while observing increased numbers of reticulocytes counting, including more immature fractions.

## **Methods**

### **Ethical considerations**

The study was approved by the Research Ethics Committee at Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), process n°. 3.045.937/2018, in accordance with the Helsinki Declaration and Resolution 466/12 of the Brazilian National Health Board. All participants read and signed the written informed consent form.

### **Recruitment of Study Participants**

Thirty blood donation candidates were randomly recruited at the HEMOAM after clinical evaluation. They were asked to fill a questionnaire about blood donation, previous known diseases and self-medication. All study participants underwent molecular and serological screening recommended by Brazilian blood banks that included detection of Chagas' disease, hepatitis B and C, HTLV and HIV. Blood donors were followed for 15 days, with laboratory analysis every 3 days (Figure 1).

### **Collection of blood samples**

Approximately 8mL of peripheral blood was collected during blood donation and in the follow-up by venous puncture in tubes containing EDTA (BD Vacutainer® EDTA K<sub>2</sub>) and separator gel (BD SST tubes Gel II Advance®). Blood samples were then sent to the Clinical Analysis Laboratory at HEMOAM for hematimetric evaluation, reticulocyte count, flow cytometry assays, c-reactive protein and iron metabolites measurement.

### **Hematimetric parameters evaluation and reticulocytes automatic count**

EDTA blood samples were employed for assessing hematimetric parameters (Red blood cells [RBC]; Concentration hematocrit [CHT]; Hemoglobin [HGB]; Mean corpuscular volume [MCV]; Mean corpuscular hemoglobin [MCH]; Mean corpuscular hemoglobin concentration [MCHC]; Red cell distribution width [RDW]) and reticulocytes parameters (percentage [%] and Reticulocyte hemoglobin content [CHr]) using an ADVIA 2120i automated hematological analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown NY, USA).

### **Reticulocytes manual count**

Blood smears were prepared by staining using New Methylene Blue (NMB) in the 1:1 ratio and incubated at 37 °C in a dry water bath for 20 minutes. Afterwards, it was counter stained with Fast Panoptic kit and analyzed by optical microscope (1000x with immersion oil) for a 1000 cell count in duplicate and by two evaluators.

### **Flow cytometry reticulocyte count and stage classification**

An aliquot of 10uL of peripheral blood was stained with 1 mL BD Retic-Count™ FITC (Reticulocyte reagent system contend Thiazole Orange, Cat N°. 349204), 2uL anti-CD71 PE (Clone: M-A712, Cat N°. : 555537) and 2uL anti-CD235a APC (Clone: GA-R2 (HIR2), Cat N°. : 561775) for analysis of reticulocyte count and stage classification. Blood sample were incubated with fluorescent dye and monoclonal antibodies (mAbs) for 30 min, at room temperature, in the dark. Stained cells were run in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and a total of 100,000 events acquired for each sample. Reticulocyte count and stage classification was performed by specific gating strategies using the FlowJo software (version 10.6.1, TreeStar Inc. Ashland, OR, USA), with final step analysis is represented in Figure 2. The reticulocyte stages were classified by CD71 expression into: CD71<sup>Neg</sup> (F4), CD71<sup>Low</sup> (F3), CD71<sup>Med</sup> (F2) and CD71<sup>High</sup> (F1) (Figure 2D).

### **C-reactive protein and iron metabolites measurement**

C-reactive protein (CRP), serum iron (SI), serum ferritin (SF), transferrin and transferrin saturation (TS) were determined in serum samples using the immunoturbidimetry and chemiluminescence tests with Bioclin Systems 3000® (Bioclin Clinical Services, Quisaba, Cardiff, UK) and Access 2 Immunoassay System (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Transferrin saturation (TS) was calculated by using total iron binding capacity (TIBC) and SI in the following equation:  $\%TS = (SI/TIBC) \times 100$ . Data was reported as reference units.

### **Data mining and statistical analysis**

Demographic, blood donation and laboratory data were tabulated and stored using Microsoft Excel® Software (2010 version for Windows). The statistical analysis was presented in tables and graphs, elaborated in GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, CA, USA), considering that data have a non-parametric distribution. The

comparative analyses between the days were performed using Wilcoxon test, with significant values being set at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Demographic and blood donation characteristics of the study population**

All individuals in this study were clinical and serological evaluated. The mean age was 27 years, with the same proportion between gender and first blood donation in subjects. Of the regular donors, 60% performed donation within 6 months, with a mean seven donation. 13% of individuals reported previous diseases prior to donation. Table 1 summarizes the demographic and blood donation characteristics.

### **C-reactive protein concentration and hematimetric parameters remain normal post-blood donation.**

Table 2 summarizes the C-reactive protein concentration and hematimetric parameters in blood donor's during study follow-up. Among the 15 days follow-up were analyzed the concentrations CRP, RBC, HCT, HGB, MCV, MCH, MCHC, RDW and CHr each 3 days. No significant differences of the C-reactive protein concentration and hematimetric parameters were observed in the days evaluated.

### **Iron metabolism components levels decrease after blood donation.**

Iron metabolism levels were evaluated in the 15 days follow-up (Fig. 3). Iron and transferrin saturation significant decrease were observed from day 6 compared to D0 (Fig. 3A and 3D). However, they remained within the reference values even reduced after blood donation and begin to increase concentration on day 15.

### **Increase of reticulocytes counting after blood donation reaches peak on the 9 day with predominance of stage F2.**

A significant increase in the percentage of reticulocytes over the days was observed, peaking on the day 9 after blood donation in the three different counting methods (Figure 4A). Flow cytometry evaluation showed to be most sensitive method for counting when compared automatic and manual analysis (Figure 4B). Furthermore, it was possible to visualize the predominance of stage F4 reticulocytes in all analyzed days (Figure 5A). Kinetics of the other stages followed the reticulocyte counting in general, peaking on the day 9 and decrease in D15. However, only stage F2 showed a significant increase when compared to D0, from D6 to D15, peaking at D12 (Figure 5B).



## DISCUSSION

In this study we highlight the short-term physiological response of the body to the blood donation process and the possible hematological and iron metabolism components alterations. In addition, we analyzed reticulocyte kinetics and their maturation stage to describe a possible source of reticulocyte for *P. vivax* culture from blood donors. To our knowledge, this was the only study to perform serial post-blood donation collections and continuous follow-up for approximately two weeks.

The mean age and the number of repeat donors are according to literature<sup>14,15</sup>. The composition of the groups in relation to gender, first-time and repeat donors were the same, unlike other studies<sup>16</sup>. This phenomenon was random and differs from the literature due to the size of the sample. Thirteen percent of individuals reported known diseases prior donation (asthma/psoriasis), with no illness manifestation during the study.

In the evaluation of hematimetric parameters, in general, it was observed that there was no significant decrease or increase of these variables during the study period, with small individual variations, but without significant finding. It was possible to observe lower values of MCV, CHr, CHT, however, within the reference values established by the automated counter ADVIA2120i. This variation is in line with several previous studies showing that lower values of MCV, CHT, Chr and Hb values were decreased by deficient erythropoiesis, due to the lack of availability of iron stored in the organism<sup>17,18</sup>. Furthermore, all participants had normal CRP values, including two participants who reported previous inflammatory disease, thus avoiding influences on iron metabolism outcomes.

The iron metabolism of the study participants varied individually, but without significant differences for ferritin and transferrin, and there was a significance for iron values and transferrin saturation, starting from 6 days after donation and lasting in subsequent follow-ups. Although not decreasing below the reference value in most blood donors, it is important to highlight the impact of iron loss on the body, as the loss lasted largely during the study period after donation. This knowledge is the object of study by world blood banks, and a loss of up to 250 mg of iron per donation is estimated, which can be aggravated by iron-deficient diets or associated with conditions that impair iron absorption, such self-medication<sup>19</sup>.

Iron and transferrin saturation, an important component in the anemia evaluation panel, is one of the few factors that was not restored after 80 days after donation, as previously described<sup>20</sup>. In our study, we observed a significant decrease in this variable, showing a recovery trend on day 15. One of the main issues currently being studied about blood donation is the reaction of blood donors to the process, especially from individuals with frequent donations, as they may have latent iron deficiency, impairing erythropoiesis, which occurs in an iron deficient environment and may result in iron deficiency anemia<sup>21</sup>.

The flow cytometry (FC) technique presented the highest values when compared to automated and manual counting. In part, as seen by other studies, flow cytometry and manual counting may exacerbate low or normal reticulocyte values due to their greater ability to identify more immature stages, which would cause microscopy technicians questions or would not be identified by automated hematological counter<sup>22,23</sup>. Regardless of the technique used to count these cells, all had similar kinetics, with an increase in reticulocytes that reached the highest values on average on the ninth day, starting to decay from the twelfth day, a similar fact found in other studies, described increase only from 2 weeks after donation<sup>13,24</sup>.

The increased sensitivity of FC is a result of the use of the Thiazole Orange dye and the CD235a marker, as previously reported<sup>25</sup>. Between automatic and manual methods, it was observed in this study that there was an advantage of using automated hematological counter, with results similar to flow cytometry. However, due to the high values of inputs and equipment, as well as the necessary technical knowledge to use flow cytometry, in certain places there is a greater cost benefit in maintaining automated counting or even manual counting. The use of CD235a for confirmation of erythrocyte lineage in conjunction with Thiazole Orange for reticulocyte counts and CD71 for the more immature stages of these cells was employed in the staging of reticulocytes present in samples, according to Malleret *et al*<sup>26</sup>.

In reticulocyte kinetics, it was possible to demonstrate a predominance of the most mature form (F4 stage) every day, despite its fall after donation. As previously described, reticulocyte stage F4 predominates in the circulation, with 24 hours to be transformed into erythrocytes<sup>27,28</sup>. Stage F3 (transition between immature stage in mature), presented increase after donation as a response of the body to blood loss.

However, a significant increase was observed only in the most immature stages, such as stage F2, corroborating the findings of Dijkstra et al<sup>29</sup>.

Although it was not possible to evaluate reticulocyte kinetics with the cell enrichment technique using CD71 antibody adsorbed magnetic beads in our study, the results shown are promising and may reach more than 50% of the total cells obtained in previous umbilical cord blood studies of healthy subjects<sup>30,31</sup>. In addition, in our study, it was possible to verify that reticulocyte values increased after blood donation, mainly from immature stages, with higher expression of the CD71 receptor, known for its importance in the process of invasion and asexual reproduction of protozoan *Plasmodium vivax*<sup>32,33</sup>. *P. vivax* has exclusive tropism for immature forms of reticulocytes, being of interest to further evaluate the percentage to be obtained with the techniques of cell enrichment of individuals after blood donation, as an alternative source of reticulocytes for use in invasion

Our study had limitations, such as: i) sample size; ii) not comparison between whole blood samples and cell enrichment samples; iii) not use of fraction of the blood sample infected by *P. vivax* to test its potential as an alternative source of reticulocyte and; iv) hepcidin and soluble transferrin receptor quantification.

In conclusion, we demonstrate that blood donation has an impact on hematimetric parameters and concentration of iron metabolism components. In addition, we have demonstrated that there is a decrease in iron metabolism components after two weeks of blood donation and that peak reticulocyte production occurs on day 9 post-donation, including more immature fractions. Thus, we suggest further studies to validate our results and evaluate the applicability of this new reticulocyte source for *Plasmodium vivax* in vitro culture assays.

### **Acknowledgments**

We would like to thank Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), in special interest, for all workers from the donors' sector, Genomics Laboratory and Clinical Analysis Laboratory for their help during the process and the study participants for enrolling in this study.

### **Authorship Contributions**

JCA, ACG, WMM, MVGL, designed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. JCA, HNSI and AC analyzed data. JCA and HNSI performed the

blood collections; JCA and ACG performed the experiments. HNSI, WMM and MVGL revised the manuscript. JCA, ACG, WMM, MVGL conceived and supervised the project, designed the experiments, interpreted the data, wrote, and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Funding**

Financial support was made by indirect funds from other study named “ELIMINA - Brazilian Institute on Malaria Elimination Science-selected work packages”, funded by Bill e Melinda Gates Foundation. JCA has a fellowship from FAPEAM (Masters student). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that no competing interest exists.

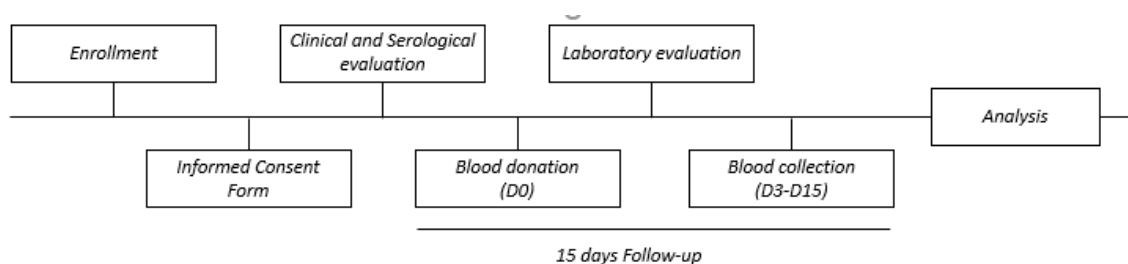
### **References**

1. Brazilian Ministry of Health. Resolução RDC N° 34. Brasília: Ministério da Saúde;2014.  
<https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20170553/04145350-rdc-anvisa-34-2014.pdf>.
2. Custer B, Rios JA, Schlumpf K, et al. Adverse reactions and other factors that impact subsequent blood donation visits. *Transfusion*. 2012;52(1):118–126.
3. Rishi G, Subramaniam VN. The relationship between systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *Biosci. Rep*. 2017;37(6):1–7.
4. Noulin F, Manesia JK, Rosanas-Urgell A, et al. Hematopoietic stem/progenitor cell sources to generate reticulocytes for Plasmodium vivax culture. *PLoS One*. 2014;9(11):.
5. Li H, Yang J, Chu TT, et al. Cytoskeleton Remodeling Induces Membrane Stiffness and Stability Changes of Maturing Reticulocytes. *Biophys. J*. 2018;114(8):2014–2023.
6. Griffiths RE, Kupzig S, Cogan N, et al. Maturing reticulocytes internalize plasma membrane in glycophorin A-containing vesicles that fuse with autophagosomes before exocytosis. *Blood*. 2012;119(26):6296–6306.

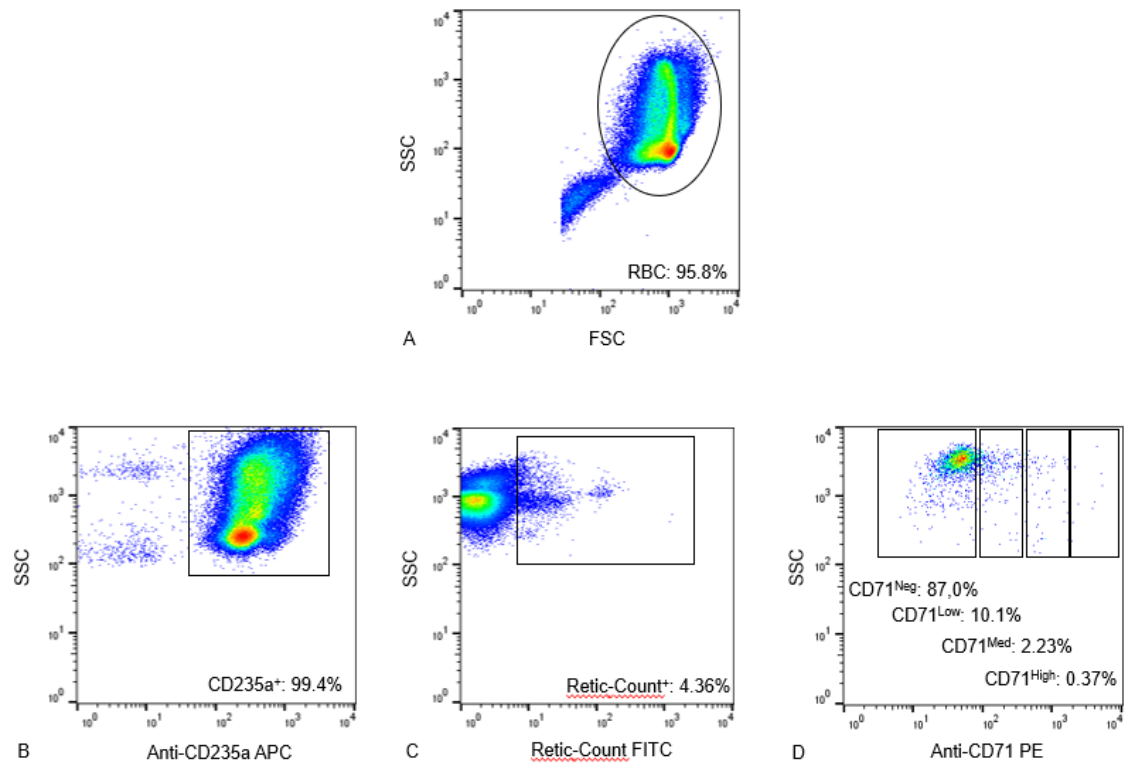
7. Skulski M, Bartoszewski R, Majkowski M, et al. Efficient method for isolation of reticulocyte RNA from healthy individuals and hemolytic anaemia patients. *J. Cell. Mol. Med.* 2019;23(1):487–496.
8. Van Beers EJ, Van Wijk R. Concise Guide to Hematology. *Concise Guid. to Hematol.* 2018;15–20.
9. Speeckaert MM, Speeckaert R, Delanghe JR. Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2010;47(5–6):213–228.
10. Kawabata H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic. Biol. Med.* 2019;133:46–54.
11. Martín-Jaular L, Elizalde-Torrent A, Thomson-Luque R, et al. Reticulocyte-prone malaria parasites predominantly invade CD71hi immature cells: implications for the development of an in vitro culture for Plasmodium vivax. *Malar. J.* 2013;12(1):434.
12. Bermúdez M, Moreno-Pérez DA, Arévalo-Pinzón G, Curtidor H, Patarroyo MA. Plasmodium vivax in vitro continuous culture: The spoke in the wheel. *Malar. J.* 2018;17(1):1–12.
13. Otgonbayar, E. Namjil MS et al. Ranges for Reticulocyte Fractions and Reticulocyte Hemoglobin of Mongolian Donors. *Cent. Asian J. Med. Sci.* 2017;3(1):55–61.
14. Zucoloto ML, Gonçalves T, Custer B, McFarland W, Martinez EZ. Comparison of the demographic and social profile of blood donors and nondonors in Brazil. *Heal. Soc. Care Community.* 2019;27(2):330–336.
15. Carlos AM, Souza BMB de, Souza RAV de, et al. Causes of microcytic anaemia and evaluation of conventional laboratory parameters in the differentiation of erythrocytic microcytosis in blood donors candidates\*. *Hematology.* 2018;23(9):705–711.
16. Mariano Gislón da Silva R, Kupek E, Peres KG. Prevalência de doação de sangue e fatores associados em Florianópolis, Sul do Brasil: estudo de base populacional. *Cad. Saude Publica.* 2013;29(10):2008–2016.
17. Baart AM, Balvers MGJ, Hopman MTE, et al. Reticulocyte hemoglobin content

- in a large sample of the general Dutch population and its relation to conventional iron status parameters. *Clin. Chim. Acta.* 2018;483:20–24.
18. van den Berg K, Swanevelder R, Ingram C, et al. The iron status of South African blood donors: balancing donor safety and blood demand. *Transfusion.* 2019;59(1):232–241.
  19. Kiss JE, Vassallo RR. How do we manage iron deficiency after blood donation? *Br. J. Haematol.* 2018;181(5):590–603.
  20. Schotten N, Jong PCMP De, Moretti D, et al. The donation interval of 56 days requires extension to 180 days for whole blood donors to recover from changes in iron metabolism. *Blood.* 2016;128(17):2185–2188.
  21. Tiwari AK, Bhardwaj G, Arora D, et al. Applying newer parameter Ret-He (reticulocyte haemoglobin equivalent) to assess latent iron deficiency (LID) in blood donors—study at a tertiary care hospital in India. *Vox Sang.* 2018;113(7):639–646.
  22. Buttarello M, Bulian P, Farina G, et al. Flow Cytometric Reticulocyte Counting: Parallel Evaluation of Five Fully Automated Analyzers: An NCCLS-ICSH Approach. *Am. J. Clin. Pathol.* 2001;115(1):100–111.
  23. Davis B, Bigelow N. davis 1990 argumentação cf aumento.pdf. *Karger.* 1990;58(2):99–106.
  24. Stangerup I, Kramp NL, Ziegler AK, et al. Temporary impact of blood donation on physical performance and hematologic variables in women. *Transfusion.* 2017;57(8):1905–1911.
  25. Viana KA, Martins Filho OA, Dusse LMS, et al. Reticulocyte count: comparison among methods. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 2014;50(5):339–345.
  26. Malleret B, Li A, Zhang R, et al. Regular Article Plasmodium vivax : restricted tropism and rapid remodeling of. *Red Cells.* 2015;125(8):1314–1325.
  27. Piva E, Brugnara C, Spolaore F, Plebani M. Clinical Utility of Reticulocyte Parameters. *Clin. Lab. Med.* 2015;35(1):133–163.
  28. Malleret B, Xu F, Mohandas N, et al. Significant Biochemical, Biophysical and Metabolic Diversity in Circulating Human Cord Blood Reticulocytes. *PLoS One.*

- 2013;8(10):.
29. Dijkstra A, Hurk K Van Den, Bilo HJG, Slingerland RJ, Vos MJ. Brief report. *Transfusion*. 2018;1–5.
  30. Russell B, Suwanarusk R, Costa FTM, et al. A reliable ex vivo invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax* Methods Twenty milliliters of cord blood were collected on lithium heparin from. 2011;118(13):74–82.
  31. Borlon C, Russell B, Sriprawat K, et al. Cryopreserved *Plasmodium vivax* and cord blood reticulocytes can be used for invasion and short term culture. *Int. J. Parasitol.* 2012;42(2):155–160.
  32. Malleret B, Rénia L, Russell B. The unhealthy attraction of *Plasmodium vivax* to reticulocytes expressing transferrin receptor 1 (CD71). *Int. J. Parasitol.* 2017;47(7):379–383.
  33. Gruszczyk J, Kanjee U, Chan L-J, et al. Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for *Plasmodium vivax*. *Science* (80-. ). 2018;359(6371):48 LP – 55.

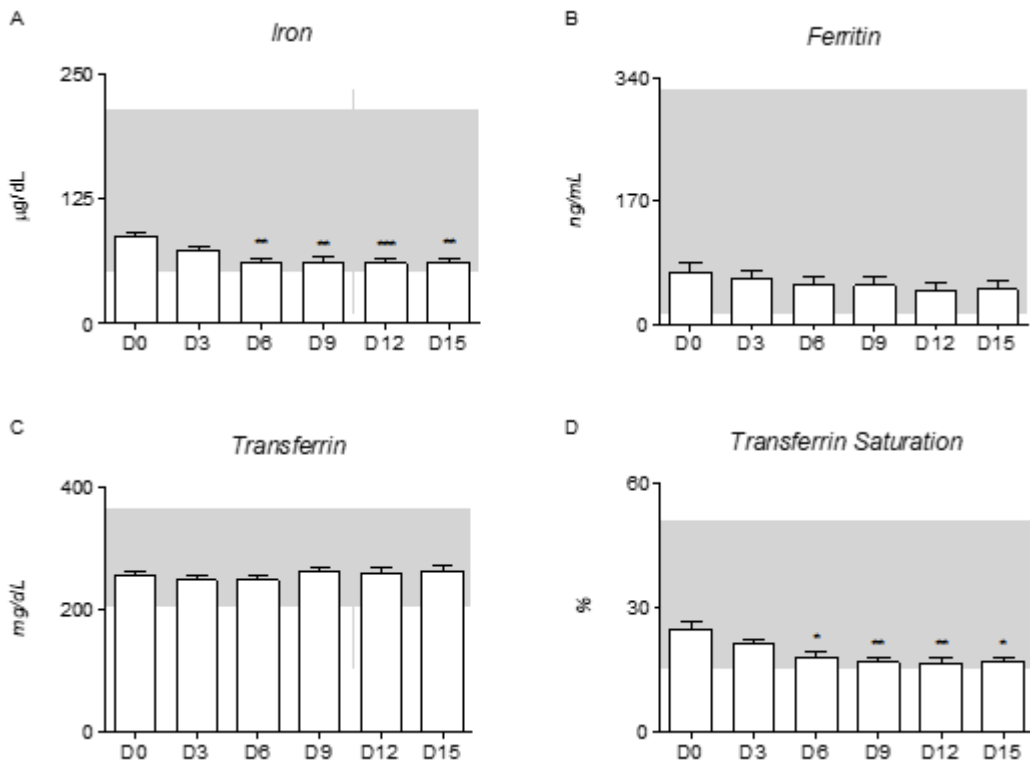


**Fig 1. Flowchart of the study.** The enrollment of participants happened between March to April of 2019 and were approached after the clinical evaluation. They were informed about the study, and, if they showed interest, signed the Informed Consent Form. After, they went to the donation room, where, besides the blood donation, peripheral blood was collected in EDTA and gel separator tubes for serological and molecular evaluation by HEMOAM and for the first sample for this study (D0). Afterwards, each participant had a 15 days follow-up, with interval of 3 days between each other (D3, D6, D9, D12, D15) for laboratory evaluation of each sample and finishing with an analysis of all procedures performed.

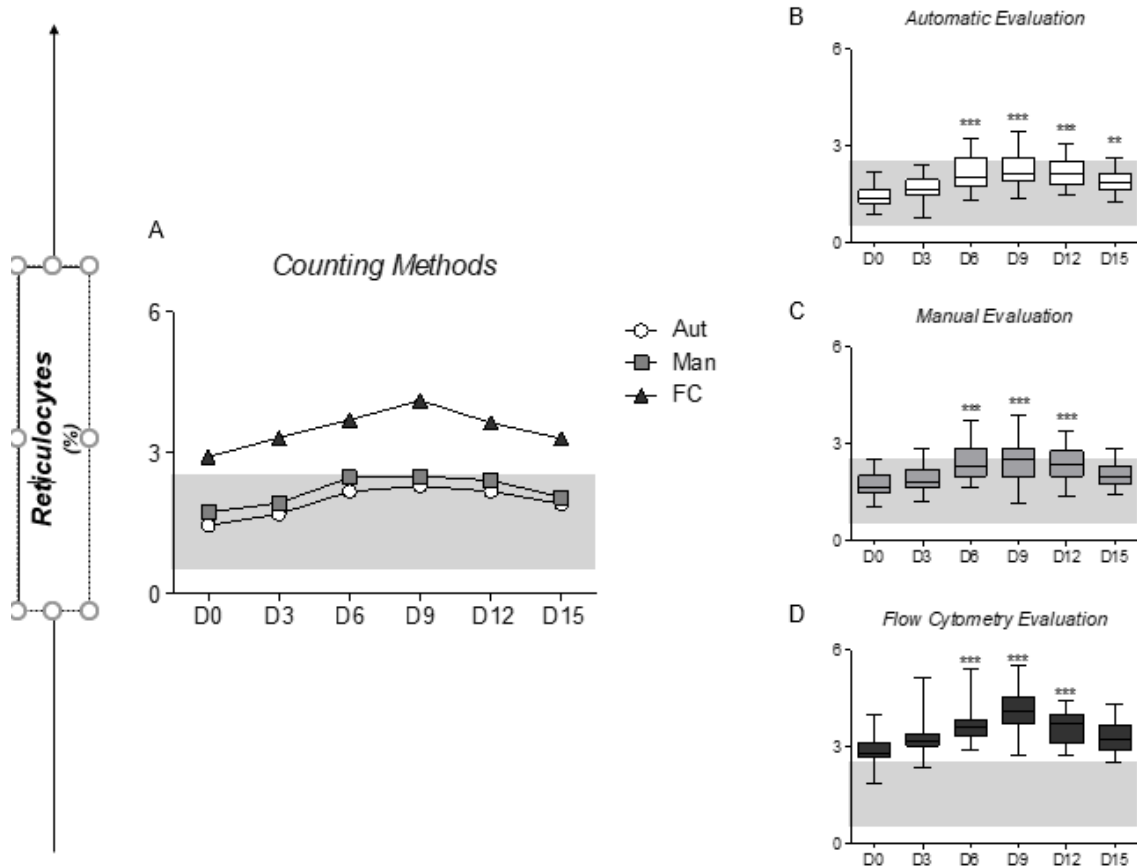


**Fig 2. Reticulocyte count and stage by Flow Cytometry strategy.** A) Selection of erythrocyte population based on morphological parameters (Forward scatter [FSC] x Side Scatter [SSC]). B) Confirmation of selected population using anti-CD235a APC, specific for identification of erythroid cell lineage. C) Thiazole Orange staining of reticulocyte population. D) reticulocyte stages according to levels of anti-CD71: CD71<sup>neg</sup> (F4), CD71<sup>low</sup> (F3), CD71<sup>med</sup> (F2) and CD71<sup>high</sup> (F1).

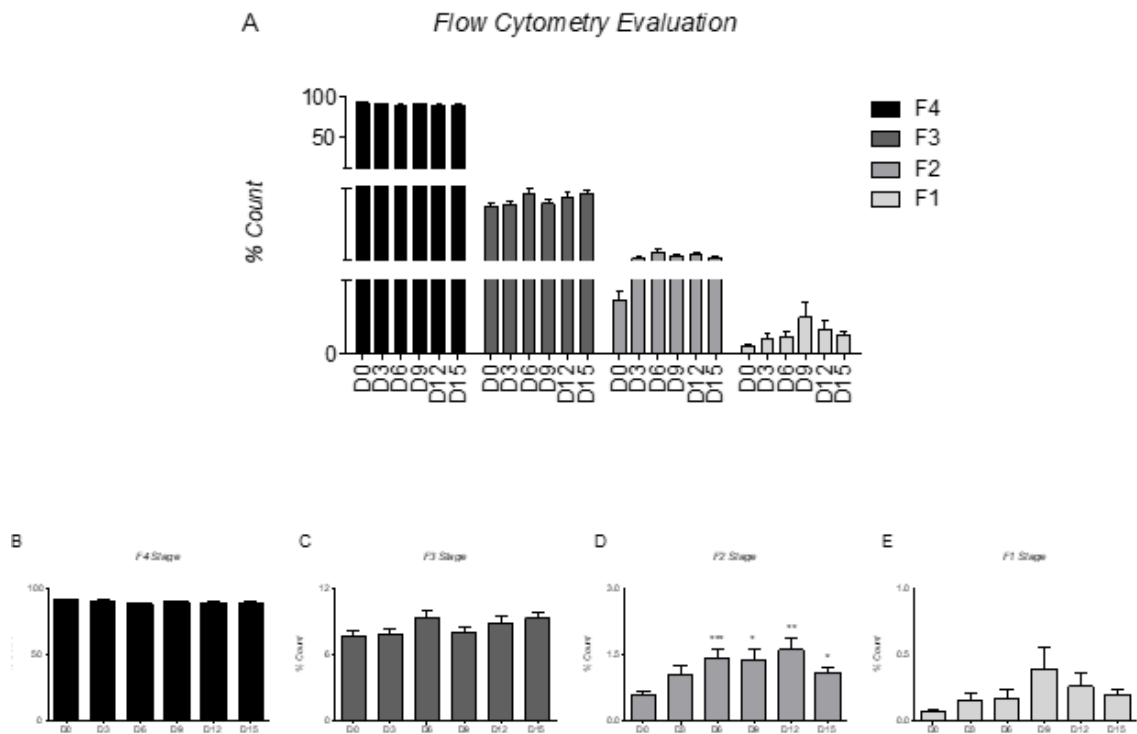




**Fig 3. Iron metabolism evaluation** Iron metabolism measured from samples taken from the D0 to D15. Grey area represents reference values for each marker. Values of  $p < 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.0001$  were considered significant in compared D0. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation A) Iron variation from baseline (D0) to 3, 6, 9, 12 and 15 days after blood donation. B) Ferritin variation from baseline (D0) to 3, 6, 9, 12 and 15 days after blood donation. C) Transferrin variation from baseline (D0) to 3, 6, 9, 12 and 15 days after blood donation. D) Transferrin Saturation variation from baseline (D0) to 3, 6, 9, 12 and 15 days after blood donation.



**Fig 4. Reticulocyte count by three different methods** Quantification of reticulocyte count in percentage from automatic count, manual count and flow cytometry from samples taken from the D0 to D15. Grey area represents reference values. Values of  $p < 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.0001$  were considered significant. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation A) Comparison between three different methods of reticulocyte count, from baseline (D0) to 3, 6, 9, 12 and 15 days after blood donation. B) Automatic count of reticulocyte variation from baseline (D0) to 3, 6, 9, 12 and 15 days after blood donation. C) Manual count of reticulocyte variation from baseline (D0) to 3, 6, 9, 12 and 15 days after blood donation. D) Flow cytometry of reticulocyte variation from baseline (D0) to 3, 6, 9, 12 and 15 days after blood donation.



**Fig 5. Reticulocyte stage differentiation** Total Reticulocyte population divided according to its maturation stage, where CD71<sup>neg</sup> (F4), CD71<sup>low</sup> (F3), CD71<sup>med</sup> (F2) and CD71<sup>high</sup> (F1). Values of  $p < 0.05$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.0001$  were considered significant. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. A) Comparison between different subsets of reticulocyte population in samples from participants, from baseline (D0) to 3, 6, 9, 12 and 15 days after blood donation. B) F4 reticulocyte subset population variation from baseline (D0) to 3, 6, 9, 12 and 15 days after blood donation. C) F3 reticulocyte subset population variation from baseline (D0) to 3, 6, 9, 12 and 15 days after blood donation. D) F2 reticulocyte subset population variation from baseline (D0) to 3, 6, 9, 12 and 15 days after blood donation. E) F1 reticulocyte subset population variation from baseline (D0) to 3, 6, 9, 12 and 15 days after blood donation.

**Table 1.** Donation and demographic characteristics of the study population.

Characteristics	N = 30
Age (years, mean $\pm$ SD)	27 $\pm$ 8
Gender (male/female)	15/15

<b>First blood donation</b> (yes/no)	15/15
<b>Donation within 6 months</b> (yes/no)	6/9
<b>Number of donation</b> (mean $\pm$ SD)	7 $\pm$ 11
<b>Previous diseases</b> (yes/no)	2/28

**Table 2.** C-reactive protein and hematimetric parameters in blood donors during study follow-up.

Variables	Ref. Values	D0	D3	D6	D9	D12	D15
<b>CRP*</b> (mean $\pm$ SD)	$\leq$ 10 mg/L	2.2 $\pm$ 2.8	2.2 $\pm$ 2.7	2.0 $\pm$ 2.3	2.4 $\pm$ 3.2	1.9 $\pm$ 1.8	2.0 $\pm$ 2.1
<b>RBC</b> (mean $\pm$ SD)	4.2 - 6.1 /mm <sup>3</sup>	4.9 $\pm$ 0.5	4.5 $\pm$ 0.6	4.5 $\pm$ 0.5	4.5 $\pm$ 0.6	4.6 $\pm$ 0.5	4.6 $\pm$ 0.5
<b>CHT</b> (mean $\pm$ SD)	37 - 52%	41.8 $\pm$ 4.2	38.4 $\pm$ 4.6	38.44 $\pm$ 4.0	38.6 $\pm$ 4.8	39.5 $\pm$ 4.4	39.2 $\pm$ 4.4
<b>HGB</b> (mean $\pm$ SD)	12 - 18 g/dL	14.0 $\pm$ 1.5	13.2 $\pm$ 2.1	12.8 $\pm$ 1.4	12.8 $\pm$ 1.7	13.2 $\pm$ 1.6	13.1 $\pm$ 1.5
<b>MCV</b> (mean $\pm$ SD)	80 - 99 fL	84.8 $\pm$ 5.0	84.9 $\pm$ 5.2	85.58 $\pm$ 5.2	85.6 $\pm$ 5.3	85.8 $\pm$ 5.1	85.9 $\pm$ 5.4
<b>MCH</b> (mean $\pm$ SD)	27 - 31 pg	28.4 $\pm$ 1.8	28.6 $\pm$ 1.8	28.53 $\pm$ 1.8	28.3 $\pm$ 2.2	28.5 $\pm$ 1.9	28.6 $\pm$ 2.0
<b>MCHC</b> (mean $\pm$ SD)	33 - 37 g/L	33.4 $\pm$ 0.8	33.7 $\pm$ 0.5	33.4 $\pm$ 1.0	33.1 $\pm$ 1.4	33.2 $\pm$ 1.0	33.4 $\pm$ 0.8
<b>RDW</b> (mean $\pm$ SD)	11.5 – 14.5	14.0 $\pm$ 0.7	14.1 $\pm$ 0.8	14.3 $\pm$ 0.9	14.5 $\pm$ 0.7	14.4 $\pm$ 0.8	14.4 $\pm$ 0.8
<b>CHr</b> (mean $\pm$ SD)	25 – 30 pg	30.0 $\pm$ 2.1	30.4 $\pm$ 1.9	30.2 $\pm$ 2.1	29.9 $\pm$ 2.2	29.6 $\pm$ 2.1	29.5 $\pm$ 2.5

\***CRP**: C-Reactive Protein; **RBC**: Red blood cells; **CHT**: Concentration Hematocrit; **HGB**: Hemoglobin; **MCV**: Mean Corpuscular Volume; **MCH**: Mean Corpuscular Hemoglobin; **MCHC**: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; **RDW**: Red Cell Distribution Width; **CHr**: Reticulocyte Hemoglobin Content.

#### **4. LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

O presente estudo apresentou algumas limitações como i) tamanho amostral ii) não enriquecimento de amostras sanguíneas de reticulócitos para comparar com as de sangue total iii) não realização de cultura in vitro de *P. vivax* com amostras de sangue de indivíduos pós-doação para avaliar o potencial desses reticulócitos como fonte para esses ensaios.

#### **5. PERSPECTIVAS FUTURAS**

A necessidade da padronização de um modelo de cultura para crescimento de *P. vivax* e ampliar maior conhecimento sobre seu ciclo biológico reforça a urgência para futuros passos para eliminação e erradicação do parasito. No presente trabalho foi visto uma possível alternativa de uma fonte de reticulócitos para essa cultura. Entretanto é necessário realizar teste desta fonte em um ensaio in vitro de manutenção do *P. vivax*, para, desta forma, confirmar o potencial desta fonte para auxílio em padronizar de uma cultura de longo prazo.

## 6. CONCLUSÃO

A conscientização da necessidade de maior conhecimento sobre ciclo biológico de *P. vivax* para campanha de eliminação da malária, assim, estão sendo feitos maiores esforços em relação a esse gap de conhecimento. No presente estudo, foi possível concluir:

- Foi observado uma queda significativa, porém, dentro dos limites, nos valores iniciais e pós-doação de ferro e saturação de transferrina;
- Houve um aumento de reticulócitos nos três métodos em análise, alcançando o pico em 9 dias após doação de sangue;
- A cinética reticulocitária foi parecida para todos os métodos analisados, incluindo na análise por estágios, com o aumento das formas mais imaturas seguindo pico da população em geral;
- Não houve diferença significativa na cinética dos estágios de reticulócitos quando comparado entre novos doadores e doadores de repetição ou entre sexos.

Deste modo, foi possível demonstrar como doação de sangue tem impacto nos parâmetros hematimétricos e nas concentrações dos componentes do metabolismo de ferro. Em adição, nós demonstramos que ocorre uma queda nestes componentes após duas semanas da doação de sangue e o pico na produção de reticulócitos ocorre no nono dia pós-doação, inclusive de frações imaturas. Assim, é sugerido maiores estudos para validar nossos resultados e avaliar a aplicabilidade desta fonte nova de reticulócitos para ensaios de cultura in vitro para *Plasmodium vivax*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors* [Internet]. 2010;3(1):5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205846> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2825508>
2. Neghina R, Neghina AM, Marincu I, Iacobiciu I. Malaria, a journey in time: In search of the lost myths and forgotten stories. *Am J Med Sci* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2010;340(6):492–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3181e7fe6c>
3. Rodrigues PT, Valdivia HO, De Oliveira TC, Alves JMP, Duarte AMRC, Cerutti-Junior C, et al. Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–13.
4. Hempelmann E, Krafts K. Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria. *Malar J* [Internet]. Malaria Journal; 2013;12(232):1–13. Available from: Malaria Journal
5. Loy D, Liua W, Lia Y, Learna G, Plenderleithc L, Sundararamana S, et al. Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Int J Parasitol*. 2017;47(2–3):87–97.
6. Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária [Internet]. 2005 [cited 2017 Jan 1]. Available from: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/malaria\\_diag\\_manual\\_final.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/malaria_diag_manual_final.pdf)
7. Health Organization W. World Malaria Report 2017 [Internet]. World Malaria Report 2017. 2017. 196 p. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf;jsessionid=EE8E1E165348AAE355D12011C4787C80?sequence=1>
8. Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IRF, Johnston GL, et al. A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malar J*. 2011;10:1–16.
9. Gething PW, Elyazar IRF, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, Guerra CA, et al. A Long Neglected World Malaria Map: *Plasmodium vivax* Endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(9).
10. Pan American Health Organization, Report. Report on the situation of Malaria

- in the Americas. 2017.
11. Almeida ACG, Kuehn A, Castro AJM, Vitor-Silva S, Figueiredo EFG, Brasil LW, et al. High proportions of asymptomatic and submicroscopic *Plasmodium vivax* infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. *Parasites and Vectors*. *Parasites & Vectors*; 2018;11(1):1–13.
  12. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2012 e 2013. *Bol Epidemiol*. 2015;46(43):1–5.
  13. Guimarães A, Tarragô AM, Garcia NP, Paulo J, Pimentel D, Neves LL, et al. Influência da infecção por *Plasmodium vivax* nos marcadores hematológicos e hepáticos em pacientes de um município da Região Amazônica brasileira patients from a city of the Brazilian Amazon Region. 2017;55(92):13–21.
  14. Siqueira AM, Lacerda MVG, Magalhães BML, Mourão MPG, Melo GC, Alexandre MAA, et al. Characterization of *Plasmodium vivax*-associated admissions to reference hospitals in Brazil and India. *BMC Med*. 2015;13(1).
  15. Vitor-Silva S, Siqueira AM, De Souza Sampaio V, Guinovart C, Reyes-Lecca RC, De Melo GC, et al. Declining malaria transmission in rural Amazon: Changing epidemiology and challenges to achieve elimination. *Malar J*. *BioMed Central*; 2016;15(1):1–14.
  16. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, Van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. *Malaria*. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:1–24.
  17. Feachem RG a, Group ME. *Shrinking the Malaria Map: A Guide on Malaria Elimination for Policy Makers* [Internet]. The Global Health Group; 2009. 72 p. Available from: <http://www.malariaeliminationgroup.org/publications/shrinking-malaria-map-guide-malaria-elimination-policy-makers>
  18. Russell BM, Cooke BM. The Rheopathobiology of *Plasmodium vivax* and Other Important Primate Malaria Parasites. *Trends Parasitol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;33(4):321–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.009>
  19. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;9(9):555–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)
  20. Baird JK. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol*. 2007;23(11):533–9.



21. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: Neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(SUPPL. 6):79–87.
22. Carlton JM, Sina BJ, Adams JH. Why is plasmodium vivax a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(6):3–6.
23. Lacerda MVG, Fragoso SCP, Alecrim MGC, Alexandre MAA, Magalhães BML, Siqueira AM, et al. Postmortem Characterization of Patients With Clinical Diagnosis of Plasmodium vivax Malaria: To What Extent Does This Parasite Kill? *Clin Infect Dis* [Internet]. 2012;55(8):e67–74. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cis615>
24. Elizalde-Torrent A, Val F, Azevedo ICC, Monteiro WM, Ferreira LCL, Fernández-Becerra C, et al. Sudden spleen rupture in a Plasmodium vivax-infected patient undergoing malaria treatment. *Malar J* [Internet]. *BioMed Central*; 2018;17(1):1–5. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2228-2>
25. Costa FTM, Lopes SCP, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, et al. On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: Perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol* [Internet]. Australian Society for Parasitology Inc.; 2012;42(12):1099–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.08.007>
26. Lança EFC, Magalhães BML, Vitor-Silva S, Siqueira AM, Benzecry SG, Alexandre MAA, et al. Risk factors and characterization of plasmodium vivax-associated admissions to pediatric intensive care units in the brazilian amazon. *PLoS One.* 2012;7(4).
27. Cotter C, Sturrock HJW, Hsiang MS, Liu J, Phillips AA, Hwang J, et al. The changing epidemiology of malaria elimination: New strategies for new challenges. *Lancet* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;382(9895):900–11. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60310-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60310-4)
28. Price RN, Douglas NM, Anstey NM. New developments in Plasmodium vivax malaria: Severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis.* 2009;22(5):430–5.
29. Anstey NM, Douglas NM, Poespoprodjo JR PR. Plasmodium vivax: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Adv Parasitol.* 2012;80:151–201.
30. De Lacerda MVG, Zackiewicz C, Alecrim WD, Alecrim MDGC. The neglected

- Plasmodium vivax*: Are researchers from endemic areas really concerned about new treatment options? [1]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(4):489–90.
31. Russell B, Suwanarusk R, Costa FTM, Chu CS, Rijken MJ, Sriprawat K, et al. A reliable ex vivo invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax* Methods Twenty milliliters of cord blood were collected on lithium heparin from. 2015;118(13):74–82.
  32. Mayor A, Alano P. Bone marrow reticulocytes: a *Plasmodium vivax* affair? *Blood*. 2015;125(8):1203–2015.
  33. Aguilar R, Magallon-Tejada A, Achtman AH, Moraleda C, Joice R, Cisteró P, et al. Molecular evidence for the localization of *plasmodium falciparum* immature gametocytes in bone marrow. *Blood*. 2014;123(7):959–66.
  34. Baro B, Deroost K, Raiol T, Brito M, Almeida ACG, de Menezes-Neto A, et al. *Plasmodium vivax* gametocytes in the bone marrow of an acute malaria patient and changes in the erythroid miRNA profile. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(4):6–13.
  35. Obaldia N, Meibalan E, Sa JM, Ma S, Clark MA, Mejia P, et al. Bone Marrow Is a Major Parasite Reservoir in *Plasmodium vivax* Infection. *MBio* [Internet]. 2018;9(3):e00625-18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29739900> <http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.00625-18>
  36. Malleret B, Li A, Zhang R, Tan KSW, Suwanarusk R, Claser C, et al. Regular Article *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of. *Red Cells*. 2015;125(8):1314–25.
  37. Thomson-luque R, Wang C, Ntumngia FB, Xu S, Szekeres K, Conway A, et al. *Blood Cells , Molecules and Diseases* In-depth phenotypic characterization of reticulocyte maturation using mass cytometry. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. Elsevier; 2018;72(July):22–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2018.06.004>
  38. ERB W. Entwicklungsgeschichte der rothen blutkörperchen. *Virchows Arch*. 1865;34:138.
  39. Simionatto M. Estudo comparativo de métodos de contagem de reticulócitos para controle de qualidade. 2009;116.
  40. Piva E, Brugnara C, Spolaore F, Plebani M. Clinical Utility of Reticulocyte

- Parameters. Clin Lab Med [Internet]. Elsevier Inc; 2015;35(1):133–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cl.2014.10.004>
41. Heilmeyer L WR. No Title Reifungsstadien an Überlebenden Reticulozyten In Vitro und ihre Bedeutung für die Schaetzung der täglichen Haemoglobin-Produktion In Vivo. Ztschr klin Med. 1932;131:361–79.
  42. Ney P. Normal and disordered reticulocyte maturation. Curr Opin Hematol [Internet]. 2011;18(3):152–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3157046/pdf/nihms313345.pdf>
  43. Malleret B, Xu F, Mohandas N, Suwanarusk R, Chu C, Leite JA, et al. Significant Biochemical, Biophysical and Metabolic Diversity in Circulating Human Cord Blood Reticulocytes. PLoS One. 2013;8(10).
  44. Samsel L, McCoy P. Imaging Flow Cytometry for the Study of Erythroid Cell Biology and Pathology. J Immunol Methods. 2015;423:52–9.
  45. Udomsangpetch R, Kaneko O, Chotivanich K, Sattabongkot J. Cultivation of Plasmodium vivax. Trends Parasitol. 2008;24(2):85–8.
  46. Thomson-Luque R, Shaw Saliba K, Kocken CHM, Pasini EM. A Continuous, Long-Term Plasmodium vivax In Vitro Blood-Stage Culture: What Are We Missing? Trends Parasitol [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;33(12):921–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.07.001>
  47. Cho JS, Russell B, Kosasaivee V, Zhang R, Colin Y, Bertrand O, et al. Unambiguous determination of Plasmodium vivax reticulocyte invasion by flow cytometry. Int J Parasitol [Internet]. Australian Society for Parasitology Inc.; 2016;46(1):31–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.08.003>
  48. Kono M, Kondo T, Takagi Y, Wada A, Fujimoto K. Morphological definition of CD71 positive reticulocytes by various staining techniques and electron microscopy compared to reticulocytes detected by an automated hematology analyzer. Clin Chim Acta [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;404(2):105–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2009.03.017>
  49. Golenda CF, Li J, Rosenberg R. Continuous in vitro propagation of the malaria parasite Plasmodium vivax. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1997;94(13):6786–91. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21236&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

50. Banton. Human Peripheral Reticulocyte Isolation and Exosome Release in Vitro. Emory University; 2017.

## 8. ANEXOS E APÊNDICES

### 8.1 Procedimento operacional Padrão (POP) – Coleta de Sangue Venoso



<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)</b>
<b>Coleta de Sangue Venoso</b>
<b>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - PPGMT</b>
<b>Elaborado por: José Carlos de Matos Areosa Alves</b>
<b>Revisado e aprovador por: Allyson Guimarães da Costa</b>

Conceito: Ato em que se é retirado uma pequena quantidade de sangue, por punção em veia periférica, para subsequente análise laboratorial.

Objetivo: Padronizar procedimentos para coleta de sangue venoso, desta forma, melhorando a qualidade das amostras que serão realizadas durante pesquisa.

Público alvo: Bioquímico, Biomédico e Técnicos de laboratório.

Finalidade: Adquirir material biológico (sangue total ou plasma) a ser utilizado na investigação da pesquisa e do estado de saúde do paciente.

Material/equipamento:

- Gaze ou algodão hidrófilo;
- Álcool etílico 70%;
- Caneta esferográfica;
- Estante para tubos;
- Recipiente adequado para descarte de material perfurocortante;
- Garrote;
- Seringas;
- Escalpe (opcional);
- Curativos;
- Tubo de coleta;
- Luvas descartáveis;
- Máscaras descartáveis;
- Touca.

Procedimento:

- Paramentação do responsável pelo procedimento;
- Separar materiais que serão utilizados;
- Identificar tubo de coleta com nome do paciente, dia e hora da coleta;
- Orientar paciente (e acompanhante, caso houver) sobre como será procedimento;

- Ajustar o paciente na posição correta, com braço estendido, com um apoio embaixo do mesmo;
- Realizar a higienização das mãos com álcool etílico 70%;
- Utilizar garrote acima da veia a ser puncionada;
- Inspeccionar local a ser puncionado, dando preferência para coleta nas veias da área, respectivamente, na antecubital, antebraço, punho, dorso da mão, sempre apalpando a veia;
- Fazer antissepsia do local a ser puncionada seguindo o mesmo sentido, utilizando gaze ou algodão;
- Conectar agulha na seringa, sem retirar a capa protetora. Movimentar êmbolo para retirar o ar;
- Realizar a punção no local, puxando êmbolo devagar, evitando hemólise das hemácias;
- Homogeneizar suavemente os tubos, por inversão, cada tubo, os mantando, em seguida, na posição vertical;
- Solicitar ao paciente, após término da coleta, comprimir local da punção até término do sangramento;
- Encapar a agulha, na capa protetora, sem utilizar as mãos, e, em seguida, a descartar coletor de material perfurocortante, enquanto as luvas, seringa, algodão irão ao descarte no lixo biológico;
- Encaminhar a amostra para processamento no laboratório.

## 8.2 Procedimento operacional Padrão (POP) – Contagem manual de reticulócitos



<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)</b>
<b>Contagem de reticulócitos</b>
<b>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - PPGMT</b>
<b>Elaborado por: José Carlos de Matos Areosa Alves</b>
<b>Revisado e aprovador por: Allyson Guimarães da Costa</b>

**Conceito:** Ato em que se é feito a contagem, em amostra de sangue corada, de reticulócitos, células imaturas finais no processo de maturação dos eritrócitos e os únicos eritrócitos imaturos presentes normalmente no sangue periférico. São liberados da medula óssea e circulam no sangue periférico por 24 horas, quando completam sua maturação.

**Objetivo:** Estimar quantidade de reticulócitos presentes em amostra sanguínea proveniente de um paciente.

**Público alvo:** Bioquímico, Biomédico e Técnicos de laboratório.

**Finalidade:** Adquirir material biológico (sangue total ou plasma) a ser utilizado na investigação da pesquisa e do estado de saúde do paciente.

**Material/equipamento:**

- Microscópio óptico com objetiva óptica de 100x;
- Óleo mineral;
- Lâmina para microscopia;
- Solução a 1% de azul cresil brilhante (BCB) em solução fisiológica (NaCl a 0,85%) com 0,4% de citrato de sódio.
- Banho-maria ou estufa à 36,5°C ou 37°C;
- Tubo de microcentrífuga de 1.5mL;
- Equipamentos de Proteção Individual (EPI);
- Pipetas e ponteiras com capacidade para 100µL.

**Procedimento:**

- Adicionar azul de cresil brilhante e amostra de sangue total em tubo de 1.5mL na razão 1:1 (Ex. 100µL de sangue e 100µL de azul de cresil);
- Homogeneizar com auxílio da ponteira;
- Incubar o tubo contendo a mistura em banho-maria ou estufa a à 36,5°C ou 37°C por 20 minutos;

- Misturar a amostra gentilmente e preparar um esfregaço delgado com auxílio de uma segunda lâmina.
- Secar a lâmina a temperatura ambiente por pelo menos 5 minutos.
- Contar o número de reticulócitos em local da lâmina onde as células não se sobrepõem, sendo geralmente a cauda do esfregaço o melhor local para contagem.
- A determinação dos reticulócitos é realizada mediante uma relação com 1000 hemácias, sendo o número aleatório de campos contados dependerá do número de hemácias apresentado pelo paciente. O resultado será liberado em percentual.
- Exemplo:

Foram contados quatro campos aleatórios, cada campo contendo aproximadamente 250 hemácias:

- 1) Campo 1.....2 Reticulócitos;
- 2) Campo 2 .....3 Reticulócitos;
- 3) Campo 3.....3 Reticulócitos;
- 4) Campo 4.....5 Reticulócitos;

Total: 13 reticulócitos para 1000 hemácias.

- Resultado: expressar os resultados em porcentagem. Dividindo-se por 10 o número de reticulócitos contados em 1000 hemácias, obtém-se o percentual de reticulócitos.

Seguindo o exemplo acima:

$$\text{Reticulócitos} = 13/10 = 1,3\%$$



### 8.3 Procedimento operacional Padrão (POP) – Citometria de Fluxo



<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)</b>	
<b>Citometria de Fluxo</b>	
<b>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - PPGMT</b>	
<b>Elaborado por: José Carlos de Matos Areosa Alves</b>	
<b>Revisado e aprovador por: Allyson Guimarães da Costa</b>	

#### 1. MARCAÇÃO DE SUPERFÍCIE

1.1 Identificar e distribuir os reagentes nos tubos de citometria de acordo com a quantidade abaixo:

<b>TUBO</b>	<b>REAGENTES</b>	<b>QUANTIDADE</b>
AMOSTRA	CD 71 PE	2 uL
	CD 235a APC	2 uL
	Tiazole Orange FITC	1 mL
CN	Sangue Total	10 uL
	Solução de Soro Fisiológico 0,9%	1 ml

1.2 Adicionar 10 uL de sangue periférico em cada tubo e vortexar

1.3 Incubar por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz

1.4 Vortexar e realizar leitura

## 8.4 Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PERFIL DE RETICULÓCITOS CIRCULANTES PÓS-DOAÇÃO DE SANGUE COMO POSSÍVEL FONTE DE CULTURA PARA P. vivax

**Pesquisador:** José Carlos de Matos Areosa Alves

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 00545018.2.0000.0009

**Instituição Proponente:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 29 de Novembro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Elisa Brosina de Leon**  
**(Coordenador(a))**

## 8.5 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**Perfil de reticulócitos circulantes pós-doação de sangue como possível fonte de cultura para *P. vivax***

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) estão realizando um estudo com o objetivo estudar novas meios para que possam ajudar no cultivo de malária vivax em laboratório. A malária vivax é a principal forma de malária na região amazônica e o entendimento sobre a doença é dificultada por seu crescimento em laboratório ser muito complicado, o que impede maiores descobertas para enfrentar o parasita.

Os pesquisadores querem saber se doadores de sangue podem servir como uma fonte de crescimento de malária vivax em laboratório. Este estudo será realizado com pessoas que sejam aptas para doação de sangue e não tenham nenhuma doença recorrente no HEMOAM. Para isso, é preciso que, além da doação de sangue, seja feito a retirada de amostra de sangue do participante 5 vezes, a cada 3 dias, por duas semanas, para realizar exames que permitam verificar algumas informações sobre células do sangue. Por isso convidamos você para participar deste estudo.

Se você aceitar participar do estudo, precisaremos retirar amostras de sangue da sua veia para fazer exames de monitoramento.

#### DESENHO DO ESTUDO



Aplicação de Termo de Consentimento



Monitoramento do paciente durante o tratamento



Contribuição para o estudo

Todo o procedimento de coleta será feito por uma pessoa da nossa equipe treinada para isso, com total higiene. A coleta de sangue na veia, podendo ocorrer um desconforto e dor no momento da picada da agulha, podendo se formar uma mancha vermelha/roxa (hematoma) que some após alguns dias. A quantidade de sangue a ser coletada será cerca de 10 mL (uma colher de sopa), a cada 3 dias, após doação de sangue, pelo período de 2 semanas, totalizando 5 coletas, não representando risco para a saúde. O risco de infecção no local é pequeno, pois os procedimentos serão feitos com higiene.

Assim que o sangue for coletado, ele será guardado com um código, sem colocar o seu nome. Seu nome nunca será usado em público, somente os pesquisadores envolvidos no estudo terão acesso aos seus dados e resultados dos exames. O restante do sangue que não for utilizado no estudo será jogado fora da maneira correta para não poluir o meio ambiente nem contaminar as pessoas.

O principal benefício em participar desse estudo é o recebimento de mais informações sobre a malária e sobre a possível chance de realizar estudos mais aprofundados sobre a malária vivax. Entretanto, você não receberá nenhum incentivo financeiro. Se tiver algum prejuízo em participar desta pesquisa, converse com um de nossos pesquisadores para que ele possa lhe ajudar. Você poderá se

retirar do estudo em qualquer momento, sem qualquer prejuízo. Você não terá nenhum custo e não receberá qualquer vantagem financeira ao participar deste estudo.

Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um de nossos pesquisadores para que eles possam tirar sua dúvida, na Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas), na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro ou nos seguintes telefones:

José Carlos Areosa	(92) 98812-1313 (qualquer dia e horário)
Dr. Allyson Guimarães da Costa	(92) 98153-5233

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas também poderá tirar dúvidas ou receber qualquer reclamação a respeito desta pesquisa, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas, na Av. Av. Constantino Nery, 4397). Este TCLE foi elaborado em duas vias iguais: uma via ficará com o pesquisador e outra via com você .

Eu \_\_\_\_\_, entendi tudo sobre o estudo **“Perfil de reticulócitos circulantes pós-doação de sangue como possível fonte de cultura para *P. vivax*”** e aceito participar do estudo.

Polegar direito



Consentimento (Assinatura): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: ( ) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_