

ESTUDO EXPERIMENTAL SOBRE A POSSIBILIDADE DE PREVENÇÃO DA MALÁRIA PÓS-TRANSFUSIONAL, ATRAVÉS DO USO DA VIOLETA DE GENCIANA

Vicente Amato Neto*
Eunice José de Sant'Ana*
Pedro Luiz Silva Pinto*
Antonio Augusto Baillot Moreira*
Maria Irma Seixas Duarte**
Rubens Campos**

AMATO NETO, V. et al. Estudo experimental sobre a possibilidade de prevenção da malária pós-transfusional, através do uso da violeta de genciana. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 21:497-500, 1987.

RESUMO: Levando em conta a comprovada ação preventiva da violeta de genciana quanto à transmissão da doença de Chagas, por transfusão de sangue e, também, possível idêntica eficácia a respeito da toxoplasmose, foi empreendida investigação para verificar se esse corante tem, da mesma forma, a capacidade de evitar a malária decorrente de hemoterapia. Foi investigada a infecção de camundongos pelo *Plasmodium berghei*. Usando parasitemia, mortalidade e alterações histopatológicas como parâmetros, verificou-se que a violeta de genciana, adicionada ao sangue, nas concentrações de 1/1.000 e 1/4.000, opõe-se efetivamente à ação infectante do protozoário, após permanência em geladeira (4°C) durante 24 horas. Conclui-se que se abre nova perspectiva quanto à profilaxia da malária induzida, em serviços de hemoterapia.

UNITERMOS: Malária, prevenção e controle. Violeta de genciana, farmacodinâmica. *Plasmodium berghei*, efeitos de drogas. Camundongos, parasitologia. Transfusão de sangue, efeitos adversos.

INTRODUÇÃO

Várias infecções são transmissíveis por meio da transfusão de sangue. Entre elas, algumas, mais comumente, têm merecido considerações e preocupações, como a doença de Chagas, as hepatites por vírus B e não A-não B, a malária, a sífilis e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

Diante dessa realidade, torna-se imperioso adotar medidas preventivas, a fim de permitir conveniente proteção dos receptores beneficiáveis da hemoterapia.

Para evitar a infecção transfusional, diferentes condutas são recomendadas e incluem providências que variam com o atendimento de pessoas em regiões onde há endemicidade ou não. Elas levam em conta informações sobre malária anterior ou exposição à parasitose, execução de prova sorológica de imunofluores-

cência indireta e, até mesmo, tratamento específico de doador e receptor. É lógico, entretanto, cogitar de aproveitamento do sangue, sempre que necessário e possível, respeitando o valor que ele encerra.

A violeta de genciana, conforme está categoricamente demonstrado, evita a veiculação transfusional da infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi*, sem determinar inconvenientes distúrbios nos enfermos tratados através de sangue ao qual ela foi adicionada^{1,2,3,4,6}. Convém ainda aduzir que esse corante, experimentalmente, em camundongos, revelou-se apto a coibir a aquisição da toxoplasmose por hemoterapia⁵. Diante dessa dupla capacidade, sentimos-nos estimulados a verificar se o agente profilático em tela pode opor-se à idêntica propagação da malária, também importante no contexto dos percalços atribuíveis ao uso de sangue e derivados como recursos úteis na

* Laboratório de Investigação Médica-Parasitologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo — Av. Dr. Arnaldo, 455 — 01246 — São Paulo, SP — Brasil.

** Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo — Av. Dr. Arnaldo, 455 — 01246 — São Paulo, SP — Brasil.

prática médica cotidiana. É evidente que múltipla atividade de uma mesma providência condiciona desejáveis benefícios operacionais, materiais e assistenciais.

MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento estipulado baseou-se na infecção de camundongos (Balb-C) pelo *Plasmodium berghei*. Empregamos animais fêmeas, pesando entre 25 a 30 g e procedentes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Inoculamos, pela via intraperitoneal, sangue de camundongos, com anticoagulante ("Liquemine, Roche") e contendo o hematocrito; completamos com solução fisiológica estéril o volume de 0,5 ml injetado. Compusemos os sete grupos adiante especificados, por vezes tendo havido adição da violeta de genciana, sempre observando as recomendações estabelecidas para Serviços de Hemoterapia e as metodologias adotadas nas investigações experimentais anteriormente publicadas, atinentes à profilaxia da doença de Chagas e da toxoplasmose^{1,2,3,4,5,6}.

Grupo I: 13 animais; inoculação de sangue com aproximadamente 5×10^5 plasmódios e violeta de genciana a 1/1.000; conservação em geladeira, à temperatura de 4°C, durante 24 h.

Grupo II: 13 animais; inoculação de sangue com aproximadamente 5×10^5 plasmódios e violeta de genciana a 1/4.000; conservação em geladeira, à temperatura de 4°C, durante 24 h.

Grupo III: dez animais; inoculação de sangue com aproximadamente 5×10^5 plasmódios; conservação em geladeira, à temperatura de 4°C, durante 24 h.

Grupo IV: nove animais; inoculação de sangue com aproximadamente 5×10^5 plasmódios; sem violeta de genciana e conservação em geladeira.

Grupo V: cinco animais; inoculação de sangue sem plasmódios e com violeta de genciana a 1/1.000; conservação em geladeira, à temperatura de 4°C, durante 24 h.

Grupo VI: quatro animais; inoculação de sangue sem plasmódios e com violeta de genciana a 1/4.000; conservação em geladeira, à temperatura de 4°C, durante 24 h.

Grupo VII: cinco animais; inoculação de sangue sem plasmódios e violeta de genciana; conservação em geladeira, à temperatura de 4°C, durante 24 h.

A cepa de *P. berghei* da qual valemo-nos no estudo é a mantida no Laboratório de Investigação Médica-Parasitologia do Hospital

das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A violeta de genciana foi-nos fornecida pela Divisão de Farmácia do Hospital das Clínicas (procedência alemã; adquirida da firma "Labormax"; violeta de genciana, 0,5 g — solução de glicose a 5%, em água destilada q.s.p. 100 ml).

Decorridos 45 dias, matamos os camundongos remanescentes, dos diversos grupos. Os III e IV ficaram subdivididos em dois lotes, com cinco e quatro animais, respectivamente, para permitir sacrifício dos componentes com parasitemia de mais ou menos 10% ou observação até a morte e feitura da avaliação histopatológica.

Para avaliar o desempenho do corante estabelecemos os seguintes parâmetros: determinação da parasitemia sanguínea, em dias alternados, após coloração pelo método de Giemsa; registro da mortalidade; exame histopatológico de fragmentos de cérebro, fígado e pulmão, depois de processamento pela técnica da hematoxilina-eosina.

RESULTADOS

As parasitemias afiguraram-se crescentes nos animais que formavam os Grupos III e IV e chegaram a mais ou menos 10% oito dias depois da inoculação, quando sacrificamos os já mencionados; nos demais, comprovamos aumentos progressivos até a morte. Em clara contraposição, não existiram naqueles dos Grupos I e II.

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentadas nossas verificações fundamentais acerca da mortalidade e das alterações histopatológicas.

O que se passou quanto aos Grupos III e IV, ou seja, morte de todos os camundongos entre o 15.º e o 28.º dias posteriores à infecção, deixa patente diferentes comportamentos, em confronto com os outros.

Também quando apreciadas as alterações histopatológicas, percebemos importantes diversidades, em termos de intensidade e frequência, estando novamente implicados os roedores dos Grupos III e IV.

É imperioso esclarecer que nas condições, não totalmente adequadas em que trabalhamos, é esperado o óbito de animais, sem nexos com a experimentação, com a ocorrência de certos erros nas análises praticadas. Deixamos de examinar poucos camundongos que morreram, por não estarem eles em condição apropriada.

Anormalidades como Hiperplasia retículo-endotelial, infiltrado mononuclear portal ou

TABELA 1

Óbitos nos sete grupos estudados, distribuídos conforme a sobrevida em dias, e mortalidades observadas no final do estudo.

Grupo	Número de animais de cada grupo	Número de óbitos, conforme a sobrevida, em dias, após a inoculação												Mortalidade até 45 dias (%)	
		1.º	2.º	4.º	5.º	8.º	11.º	15.º	20.º	21.º	26.º	28.º	36.º		43.º
I	13		2			1	1							1	38,4
II	13			1	1					1				1	30,7
III	10(5)*									1	2	2			100
IV	9(5)*							1	4						100
V	5														0
VI	4	1													25
VII	5														0

* Mantidos somente cinco para observação da mortalidade espontânea; os demais foram sacrificados, para avaliação histopatológica.

TABELA 2

Alterações histopatológicas observadas em fígado, pulmões e cérebro, nos sete grupos estudados.

Alterações encontradas	Grupos						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Fígado							
Hiperplasia retículo-endo-telial	(+)80	(+)100	(+++)80	(++)100	(+)20		
Infiltrado mononuclear portal	(++)5	(+)50	(++)80	(++)100			
Esteatose em hepatócitos	(+)5		(+)5				
Necrose de hepatócitos	(+)5	(+)5		(+)50			
Infiltrado mononuclear intralobular	(+)20	(++)80	(+++)100	(+)100			
Metaplasia mielóide		(+)5	(+++)80	(++)5			
Pigmento malárico	(+)5	(+)5	(+++)80	(+++)100			
Pulmões							
Infiltrado mononuclear em brônquios	(+)5				(+)80	(+)20	
Infiltrado polimorfonuclear em brônquios							
Pigmento malárico			(+++)20	(+++)20			
Edema de septos				(++)20			
Infiltrado mononuclear em septos		(+)50	(++)50	(++)50			(+)20
Luzes alveolares							
Cérebro							

(+), (++) ou (+++): intensidade das alterações; os números correspondem, aproximadamente, a porcentagens, em relação aos animais examinados.

intralobular, esteatose em hepatócitos e até outras, existentes moderadamente no fígado, podem ter decorrido de elementos inoculados, tais como sangue e parasitas. Até o encontro de pequena quantidade de pigmento malárico, é explicável dessa forma, acreditamos.

DISCUSSÃO

As parasitemias deixaram patente a eficácia da violeta de genciana, pois nos animais dos Grupos I e II mantiveram-se sistematicamente ausentes, em evidente contraste com o verificado nos dos Grupos III e IV, que a tinham até a morte. O número de hematozoários aumentou progressivamente no sangue dos camundongos dos Grupos III e IV e, no oitavo dia pós-inoculação, atingiu cerca de 10%; aí, sacrificamos cinco e, nos demais, a parasitemia foi aumentando, com subsequente óbito espontâneo.

Quando consideramos a mortalidade percebemos como fato mais marcante a ocorrência desse evento, sem que tenha havido sacrifício intencional, em 100% dos animais, na fase

que se situou entre 15 e 28 dias após a contaminação com o protozoário. O que houve nos Grupos V, VI e VII, sem a participação do *P. berghei*, patenteia as ações protetoras da violeta de genciana e infectante do hematozoário, apuradas nos Grupos I, II, III e IV.

Valorizados os três parâmetros básicos que escolhemos, constituídos por parasitemia, mortalidade e deduções histopatológicas, assim como a estrutura global da pesquisa que convençionamos, surge como dedução viável a comprovação de que a violeta de genciana adicionada ao sangue, nas concentrações de 1/1.000 e 1/4.000, após permanência em geladeira (4°C) durante 24 h, opõe-se à infecção experimental de camundongos pelo *P. berghei*. Interpretando o que houve nos grupos organizados, apuramos que esse posicionamento é judicioso, abrindo perspectivas com sentido prático, referente à proposição de novos estudos, tendentes a procurar saber se o corante, de fato, pode ser útil em Serviços de Hemoterapia, prevenindo a malária humana pós-transfusional.

AMATO NETO, V. et al. [Experimental assay of the possible use of gentian violet in the prevention of post-transfusion malaria]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 21:497-500, 1987.

ABSTRACT: Considering that gentian violet is effective in the prevention of transfusion-acquired Chagas' disease and possibly toxoplasmosis, it is decided to carry out an experimental assay on the activity of this dye in the prevention of post-transfusion malaria. Mice infected with *Plasmodium berghei* were studied with regard to parasitemia, mortality and histopathologic changes. Gentian violet added to blood in 1/1.000 and 1/4.000 concentrations turned out to be effective in abolishing infectivity after storage for 24 hours at 4°C. Thus is opened up a new prospect in the prophylaxis of post-transfusion malaria.

UNITERMS: Malaria, prevention and control. Gentian violet, pharmacodynamics. *Plasmodium berghei*, drug effects. Mice, parasitology. Blood transfusion, adverse effects.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NUSSENZWEIG, V.; AMATO NETO, V.; MELLONE, O. Novos dados sobre o emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue. *Hospital*, Rio de Janeiro, 55:183-7, 1959.
2. NUSSENZWEIG, V.; BIANCALANA, A.; AMATO NETO, V.; SONNTAG, R.; FREITAS, J. L. P.; KLOETZEL, J. Ação da violeta de genciana sobre o *T. cruzi* "in vitro": sua importância na esterilização do sangue destinado à transfusão. [Nota prévia]. *Rev. paul. Med.*, 42:57-8, 1953.
3. NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S.; FREITAS, J. L. P.; AMATO NETO, V.; BIANCALANA, A.; KLOETZEL, J. Ação de agentes físicos e químicos sobre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro". *Hospital*, Rio de Janeiro, 45:589-99, 1954.
4. NUSSENZWEIG, V.; SONNTAG, R.; BIANCALANA, A.; FREITAS, J. L. P.; AMATO NETO, V.; KLOETZEL, J. Ação de corantes tri-fenil-metânicos sobre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro". Emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. *Hospital*, Rio de Janeiro, 44:731-44, 1953.
5. PINTO, P. L. S.; AMATO NETO, V.; DUARTE, M. I. S.; COTRIM, J. X.; MOREIRA, A. A. B.; SANT'ANA, E. J.; CAMPOS, R. Estudo experimental sobre possível atividade da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da toxoplasmose por transfusão de sangue. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 27: 89-94, 1985.
6. SOUZA, H. M. Estudo do metabolismo e viabilidade do sangue fresco e preservado tratado pela violeta de genciana. São Paulo, 1985. [Tese de Doutorado — Escola Paulista de Medicina].

Recebido para publicação em: 15/4/1987
Reapresentado em: 16/9/1987

Aprovado para publicação em: 17/9/1987