



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

CARLOS RODRIGO SOUZA DO MONTE

**ESTADO NUTRICIONAL NA MALÁRIA: INFLUÊNCIA NOS  
ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DE PACIENTES  
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Plasmodium vivax***

BELÉM  
2015

CARLOS RODRIGO SOUZA DO MONTE

**ESTADO NUTRICIONAL NA MALÁRIA: INFLUÊNCIA NOS ASPECTOS  
CLÍNICOS E LABORATORIAIS DE PACIENTES NATURALMENTE INFECTADOS  
POR *Plasmodium vivax***

Dissertação apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof. Dra. Rosana Maria Feio Libonati

Co orientadora: Dra. Ana Maria Revorêdo da Silva Ventura

BELÉM  
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Monte, Carlos Rodrigo Souza do, 1990-

Estado nutricional na malária: influência nos aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes naturalmente infectados por plasmodium vivax / Carlos Rodrigo Souza do Monte. - 2015.

Orientadora: Rosana Maria Feio Libonati;  
Coorientadora: Ana Maria Revorêdo da Silva Ventura.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2015.

1. Malária. 2. Plasmodium vivax. 3. Obesidade. I. Título.

CDD 22. ed. 614.532

---

CARLOS RODRIGO SOUZA DO MONTE

**ESTADO NUTRICIONAL NA MALÁRIA: INFLUÊNCIA NOS ASPECTOS  
CLÍNICOS E LABORATORIAIS DE PACIENTES NATURALMENTE INFECTADOS  
POR *Plasmodium vivax***

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Aprovado em: 10/11/15

Conceito: Aprovado

**Banca Examinadora**

---

Profa. Dra. Rosana Maria Feio Libonati  
*Orientadora – NMT/UFPA*

---

Profa. Dra. Ana Maria Revorêdo da Silva Ventura  
*Co orientadora – IEC*

---

Profa. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa  
*Membro – NMT/UFPA*

---

Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado  
*Membro – IEC*

---

Profa. Dra. Tânia do Socorro Souza Chaves  
*Membro – IEC*

---

Profa. Dra. Luisa Caricio Martins  
*Suplente – NMT/UFPA*

*Dedico este trabalho ao meu avô José Oliveira de Souza (em memória) por me fazer acreditar nos sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará (UFPA) e ao Núcleo de Medicina Tropical pela oferta do curso de pós-graduação.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais na pessoa do Dr. Givago Sousa, da secretária Socorro Cardoso e de todos os docentes.

Ao Instituto Evandro Chagas pelo financiamento e estrutura disponibilizada, sendo esta a condição *sine qua non* para realização deste trabalho.

À FAPESPA pela bolsa de estudos durante o período do curso.

À Secretaria de Saúde de Anajás, em nome do Secretário Raimundo Corpes, e a Secretaria de Saúde de Itaituba, em nome da Secretária Cleocir Aguiar, pela receptividade e pelo apoio nas viagens de campo.

À Dra. Rosana Libonati por todo ensinamento, pela enorme paciência e por acreditar que este trabalho seria possível dando-me esta oportunidade de ser seu orientando e aprendiz.

À Dra Ana Maria Ventura por desde o aceite do estágio, sempre ter se dedicado a me ensinar com sua toda minuciosidade linguística, intelectual e moral.

Aos técnicos do Laboratório de Ensaio Clínicos em Malária, Rogério Brandão, Darci Silva, Agostinho Fernandes, Luiz Vitorino, Benedito Santos, Luiz Lobo, Maria Miriam e Sônia Rodrigues pelo apoio laboratorial nas viagens de campo e nas dependências do IEC.

Ao Laboratório de Patologia do IEC em nome do Sr. Manoel Gomes pelo apoio na realização dos exames hematológicos e bioquímicos.

À Dra. Maristela Cunha pelo apoio na realização dos exames imunológicos.

Ao Dr. Ricardo Machado, Dra Tânia Chaves e a Esp. Rafaela Ferreira pela parceria estabelecida durante este período e pelo apoio nas análises clínicas e laboratoriais.

Aos meus pais, Srs Carlos e Solange Monte pela infinita compreensão, incentivo e conselhos durante toda minha vida. Obrigado por serem meus maiores tesouros.

Sinto-me abençoado por ser seu filho.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho. Em tempo, peço desculpas caso eu tenha esquecido de mencionar algum nome.

*“Before DDT, malariologists were trained as problem solvers, after DDT malariologists were trained as solution implementers”.*

(José Antonio Najera)

## RESUMO

A malária é considerada pela Organização Mundial de Saúde um problema global de saúde pública. No Brasil, a maioria dos casos ocorre por *P. vivax*. Esse estudo objetivou avaliar a influência da obesidade nos marcadores inflamatórios, bioquímicos, hematológicos, parasitológicos e manifestações sintomatológicas em pacientes com malária *vivax*. Participaram 78 pacientes (37 eutróficos, 25 sobrepeso e 14 obesos) com diagnóstico de malária por *P. vivax* de população residente de área hiperendêmica no Estado do Pará. O estado nutricional não apresentou influência na carga parasitária nesta população infectada por *P. vivax*, embora tenha sido observada tendência a parasitemia mais elevadas nos obesos. A frequência das manifestações clínicas, tais como calafrio, cefaleia, tríade malárica (febre, calafrio e cefaleia), mialgia, tosse e diarreia e o escore clínico, foram mais altos nos obesos em comparação aos eutróficos. Pacientes obesos apresentaram elevado nível de leucócitos totais, neutrófilos, monócitos, triglicérides, colesterol total, VLDL, AST e ALT em comparação aos eutróficos. Os níveis séricos das citocinas moduladoras da inflamação TNF- $\alpha$  e IL-10 não diferiram entre os grupos nutricionais, entretanto houve uma correlação negativa entre o TNF- $\alpha$  e a circunferência abdominal. O nível sérico de citocinas moduladoras da inflamação (TNF- $\alpha$  e IL-10) influenciaram a parasitemia, perfil hematológico, perfil bioquímico e o escore clínico de indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax*. O estado nutricional influenciou a resposta imune na infecção pelo *P. vivax*, sendo um importante determinante de risco neste estudo. Embasado nessas considerações, outras pesquisas são necessárias para o melhor entendimento da doença nesse contexto.

**Palavras-chaves:** Malária, *Plasmodium vivax*, Estado nutricional, Obesidade.



## ABSTRACT

Malaria is considered by the World Health Organization a global public health problem. In Brazil, most cases occur by *P. vivax*. This study aimed to evaluate the influence of obesity on inflammatory markers, biochemical, hematological, parasitological profiles and clinical manifestations in vivax malaria patients at Pará State. Seventy-eight (37 eutrophic, 25 overweight and 14 obese) patients positive to *P. vivax* were included. Chills, headache, malaria triad (fever, chills and headache), myalgia, cough and diarrhea were more frequent, whereas the clinical score were higher in obese compared to normal weight patients. Obese patients had a higher level of count of total leukocytes, neutrophils, monocytes, triglycerides, total cholesterol, VLDL, AST, ALT compared to lean patients. Parasitaemia was similar among nutritional status, although was observed trend to higher parasitaemia (> 5.000 parasites/ $\mu$ L) in obese patients. Serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-10 did not differ among nutritional groups, though there was a negative correlation between TNF- $\alpha$  and waist circumference. Among overweight and obese was observed a positive correlation between IL-10 and parasitemia, neutrophils, urea and a negative correlation with red blood cells, lymphocytes, platelets. Throughout, TNF- $\alpha$  was correlated negatively with the clinical score. Nutritional status influences immune response against the infection and it has been an important risk factor in this findings. However, further studies are required to understand the malaria in this context.

**Keywords:** Malaria, *Plasmodium vivax*, Nutritional status, Obesity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição dos casos de malária no Brasil em 2014.	Pág. 14
Figura 2	Modelos hipotéticos de como a inflamação é iniciada e desenvolvida na obesidade.	Pág. 20
Figura 3	Fluxograma de seleção dos participantes do estudo.	Pág. 24
Figura 4	Associação entre o escore clínico e os estados nutricionais.	Pág. 37
Figura 5	Associação entre o escore clínico e os estados nutricionais de acordo com a história passada e faixa de parasitemia.	Pág. 38
Figura 6	Correlação das citocinas com os parâmetros hematológicos, bioquímicos, parasitológicos, antropométricos e clínicos.	Pág. 44
Figura 7	Correlação das citocinas com os parâmetros hematológicos, bioquímicos, parasitológicos, antropométricos e clínicos nos pacientes acima do peso (sobrepeso e obesos).	Pág. 45

## LISTA DE TABELAS

Quadro 1	Síntese dos critérios de inclusão e exclusão para o estudo.	Pág. 23
Quadro 2	Valores de referência dos parâmetros hematológicos.	Pág. 26
Quadro 3	Valores de referência dos parâmetros bioquímicos.	Pág. 27
Quadro 4	Distribuição dos sinais e sintomas e o escore clínico adotado na pesquisa.	Pág. 30
Quadro 5	Valores de referência dos parâmetros antropométricos.	Pág. 31
Tabela 1	Distribuição dos dados demográficos, epidemiológicos e antropométricos de acordo com o estado nutricional, 2015.	Pág. 34
Tabela 2	Distribuição dos dados parasitológicos de acordo com o estado nutricional, 2015.	Pág. 35
Tabela 3	Distribuição das frequências dos sinais e sintomas de acordo com o estado nutricional, 2015.	Pág. 36
Tabela 4	Distribuição dos dados hematológicos de acordo com o estado nutricional, 2015.	Pág. 39
Tabela 5	Distribuição das frequências das alterações hematológicas de acordo com o estado nutricional, 2015.	Pág. 40
Tabela 6	Distribuição dos dados bioquímicos de acordo com o estado nutricional, 2015.	Pág. 41
Tabela 7	Distribuição das frequências das alterações bioquímicas de acordo com o estado nutricional, 2015.	Pág. 42
Tabela 8	Distribuição dos dados imunológicos de acordo com o estado nutricional, 2015.	Pág. 43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA	Circunferência Abdominal
GE	Gota Espessa
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corpórea
IPA	Índice Parasitário Anual
LECEM	Laboratório de Ensaios Clínicos em Malária
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparim</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
Sivep	Sistema de Vigilância Epidemiológica da Malária
TGF	Fator Inibidor de Crescimento
TNF	Fator de Necrose Tumoral
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
2.1	MALÁRIA .....	14
2.1.1	<b>Epidemiologia</b> .....	14
2.1.2	<b>Modo de transmissão e ciclo biológico</b> .....	15
2.1.3	<b>Quadro clínico</b> .....	16
2.2	ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE NA MALÁRIA .....	17
2.2.1	<b>Participação das citocinas na malária</b> .....	18
2.3	IMUNOMETABOLISMO: INTERSECÇÃO ENTRE ESTADO NUTRICIONAL E SISTEMA IMUNE .....	19
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	21
3.1	GERAL .....	21
3.2	ESPECÍFICOS .....	21
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	22
4.2	PROCEDIMENTOS DA PESQUISA .....	23
4.3	DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO .....	25
4.4	EXAMES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS .....	26
4.5	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DAS CITOCINAS .....	27
4.5.1	<b>TNF-<math>\alpha</math></b> .....	28
4.5.2	<b>IL-10</b> .....	28
4.6	AVALIAÇÃO CLÍNICA .....	29
4.6.1	<b>Escore clínico</b> .....	30

4.6.2	<b>Antropometria</b> .....	31
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO .....	33
5.2	DADOS PARASITOLÓGICOS .....	34
5.3	DADOS CLÍNICOS .....	35
5.4	DADOS HEMATOLÓGICOS .....	38
5.5	DADOS BIOQUÍMICOS .....	40
5.6	DADOS IMUNOLÓGICOS .....	42
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
6.1	ASSOCIAÇÃO ENTRE O ESTADO NUTRICIONAL E A DENSIDADE PARASITÁRIA E A INTENSIDADE DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	46
6.2	ASSOCIAÇÃO ENTRE O ESTADO NUTRICIONAL E O PERFIL HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO .....	48
6.3	ASSOCIAÇÃO ENTRE O ESTADO NUTRICIONAL E O NÍVEL SÉRICO DE CITOCINAS TNF- $\alpha$ e IL-10 .....	49
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>61</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>63</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é considerada pela Organização Mundial de Saúde um problema global de saúde pública. Trata-se de uma doença tropical causada pelos parasitos do gênero *Plasmodium* que apresenta ampla distribuição geográfica com a mais alta taxa de morbimortalidade no mundo. Atualmente, bilhões de pessoas no mundo vivem em áreas de transmissão e, portanto, expostas ao risco de contrair a doença (WHO, 2014). Das espécies que infectam o homem, destacam-se, no Brasil, o *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* (BRASIL, 2015).

Apesar da malária causada por *P. vivax* ser a principal espécie encontrada nas Américas e na Ásia e dos avanços no entendimento da biologia do parasito a partir do sequenciamento do seu genoma (CARLTON *et al.*, 2008), esta morbidade ainda recebe pouca atenção da comunidade científica sendo classificada por vezes como doença negligenciada, principalmente por esta espécie ser menos virulenta que o *P. falciparum* e também devido às dificuldades de sua manutenção em cultivo contínuo, o que limita determinadas análises (MUELLER *et al.*, 2009; WHITE *et al.*, 2014).

Diante disso, no curso da erradicação dessa doença, torna-se de grande importância melhor compreender os complexos mecanismos envolvidos na patogenia da malária. Nesse contexto, estudos envolvendo a interação entre o desenvolvimento e evolução da infecção causada pelo *P. vivax* e o estado nutricional do hospedeiro vertebrado, considerando a ligação fisiopatológica entre a obesidade e a inflamação, podem contribuir com o entendimento desses mecanismos, bem como com estabelecimento de estratégias de controle e eliminação da doença.

No presente trabalho, investigou-se a influência do estado nutricional sobre os parâmetros clínicos e laboratoriais na malária por *P. vivax*. Mais especificamente avaliar, pela primeira vez, a influência da obesidade nos marcadores inflamatórios, bioquímicos, hematológicos e manifestações sintomatológicas em uma população residente de área hiperendêmica no Estado do Pará com malária clínica.

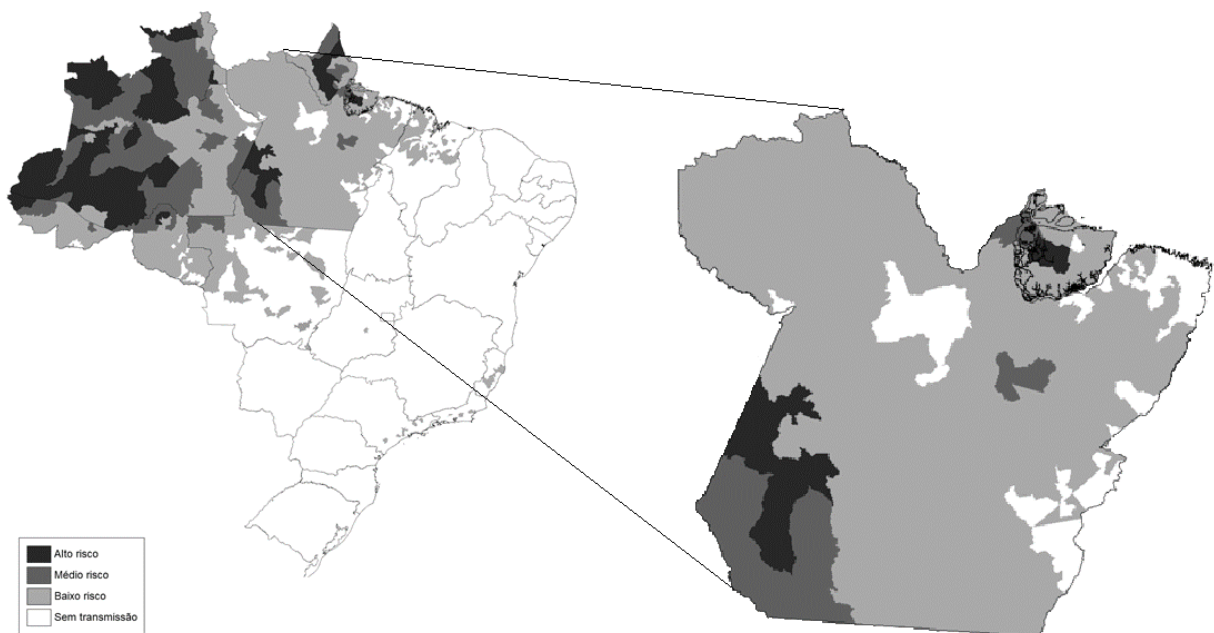
## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 MALÁRIA

#### 2.1.2 Epidemiologia

Em 2013, a malária foi responsável pela morte de mais de 584.000 pessoas. Aproximadamente 90% dos óbitos ocorrem na África, destes 78% em crianças menores de cinco anos de idade. Além do continente africano, a doença está distribuída na América Latina, Sudeste Asiático e Oceania, ocorrendo em 97 países onde habitam 3,2 bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco de desenvolver a doença, representando aproximadamente 50% da população mundial (WHO, 2014).

Nas Américas, a malária ocorre em 21 países com 25 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco de transmissão, sendo registrados 427.000 casos em 2013. Destes, três países concentraram 72% dos casos, a saber: Brasil 42%, Venezuela 18% e Colômbia 12% (WHO, 2014). Deve-se atentar a representatividade no registro dos casos da doença entre os países que compreendem a região Amazônica. Tal fato é observado no Brasil, onde aproximadamente 99% dos casos de malária se concentraram nesta região – Figura 1 (BRASIL, 2015).



**Figura 1:** Distribuição dos casos de malária no Brasil em 2014.

Fonte: Adaptado de Brasil/Sivep-Malária/SVS/MS, 2015.



No Brasil, a maioria dos casos ocorre por *P. vivax* (aproximadamente 85%), uma pequena parte por *P. falciparum* (15%) e uma minoria (menos de 1%) por infecções mistas (WHO, 2014). Dentre os Estados da Região Amazônica, o Pará em 2014 registrou 11.131 casos de malária correspondendo aproximadamente 15% dos casos do país e uma Incidência Parasitária Anual (IPA) de 1,8 casos por 1000 habitantes, classificando-o atualmente, como baixo risco da população adoecer de malária, o que representa uma redução de aproximadamente 56% quando comparado ao mesmo período de 2013 e 86% quando comparado a 2012. Nos últimos 10 anos, os casos de malária *vivax* representaram em média 79% do total registrado no Estado (BRASIL, 2015).

### 2.1.2 Modo de transmissão e ciclo biológico

A principal transmissão da malária é por via vetorial, pela picada dos mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. A principal espécie no Brasil é o *Anopheles darlingi*. Os parasitos dessa protozoose são microrganismos eucarióticos unicelulares que pertencem ao gênero *Plasmodium*. São reconhecidas mais de 120 espécies desse gênero que podem infectar aves, répteis, roedores e primatas, porém, cinco espécies são infectantes ao homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e, mais recentemente, *Plasmodium knowlesi* (WHO, 2014).

O ciclo de vida do plasmódio inicia-se quando parasitos na forma de esporozoítos acumulados nas glândulas salivares do inseto vetor são inoculados na pele do ser humano pela picada. Os esporozoítos atingem o fígado e invadem os hepatócitos e multiplicam-se dando origem a milhares de merozoítos, os quais são liberados dos hepatócitos e caem na circulação sanguínea, invadindo as hemácias (*P. vivax* invade preferencialmente reticulócitos) e dando início à segunda fase do ciclo, chamada de esquizogonia sanguínea. A principal característica biológica do *P. vivax* é a presença de hipnozoítos hepáticos (formas em estado de latência) que são responsáveis pelas frequentes recaídas após períodos de incubação (MUELLER *et al.*, 2009; WHITE *et al.*, 2014).

Os merozoítos formados na fase sanguínea rompem a hemácia e invadem outras, sofrendo vários ciclos de multiplicação eritrocitária. Alguns merozoítos

diferenciam-se em microgametas (gametas masculinos) e macrogametas (gametas femininos) após vários ciclos eritrocitários. Numa nova picada, os gametas serão ingeridos pelo mosquito irão fecundar-se dando origem às formas de esporozoítos que irão continuar o ciclo (MUELLER *et al.*, 2009; WHITE *et al.*, 2014).

### 2.1.3 Quadro clínico

Clinicamente, a malária *vivax* é classificada em três categorias denominadas: malária assintomática, malária não-complicada e malária grave. Essas diversas formas de apresentação clínica são determinadas pela complexa interação entre o hospedeiro, o parasito e o ambiente (MILLER *et al.*, 2013).

As manifestações clínicas na malária são de caráter sistêmico em que a febre constitui o principal sinal ou sintoma, presente em quase todos os pacientes. A febre costuma ser elevada, precedida de calafrio e seguida de sudorese e sem periodicidade (exceto se houver sincronismo na ruptura de eritrócitos parasitados) Quando a febre se acompanha de cefaleia (dor de cabeça) e calafrio, denomina-se de tríade malárica. Mal estar, artralgia (dor nas articulações), mialgia (dor muscular), lombalgia (dor nas costas), manifestações respiratórias (tosse e sensação de falta de ar), gastrointestinais (dor abdominal, náuseas, vômitos e diarreia) podem também ocorrer (ANSTEY *et al.*, 2012; PRADHAN; GHOSH, 2013).

A anemia na malária *vivax* pode ser de intensidade leve, moderada ou grave, por influência combinada de vários fatores como o grau de parasitemia, resposta imunológica do hospedeiro, intervalo de tempo decorrido entre os primeiros sintomas e o diagnóstico e condições pré-existentes determinantes de anemia, particularmente parasitose intestinal e hemoglobinopatias (VENTURA, 2010).

Frequentemente a malária causada por *P. vivax* é classicamente descrita como uma doença benigna, com baixos níveis de mortalidade e morbidade. Porém, estudos recentes tem descrito casos clínicos graves (malária grave) e até mesmo mortes associados à infecção pelo *P. vivax* na Papua Nova Guiné (GENTON *et al.*, 2008), Indonésia (TJITRA *et al.*, 2008), Índia (SINGH *et al.*, 2011) e no Brasil (ANDRADE *et al.*, 2010; ALEXANDRE *et al.*, 2010).

## 2.2 ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE NA MALÁRIA

A resposta imune inata é essencial para limitar a fase inicial de replicação dos plasmódios até que o hospedeiro desenvolva uma resposta imune adaptativa capaz de eliminar a infecção. A imunidade inata na malária compreende a participação das moléculas do sistema complemento, ativação de macrófagos, células NK e NKT. Em síntese, suas funções são: moléculas do sistema complemento causam a lise direta do parasito, os macrófagos fagocitam os parasitos livres e os eritrócitos parasitados, e os linfócitos NK e NKT induzem a lise das células parasitadas. Além destas, as células dendríticas iniciam a resposta imune adaptativa (STANISIC *et al.*, 2013).

Dessa maneira, a ativação da imunidade inata é um passo crucial no desenvolvimento da imunidade adquirida contra os antígenos específicos pela ativação de uma cascata de reações intracelulares que promoverão a síntese de citocinas que são fundamentais para atrair outras células, gerar a resposta inflamatória, permitir o desenvolvimento da resposta imune adaptativa eficiente e, com todos estes elementos, eliminar o microrganismo invasor (ARANCIBIA *et al.*, 2007).

A imunidade protetora é gradualmente adquirida pela exposição natural de indivíduos residentes de área endêmica, mas é rapidamente perdida no momento em que a exposição do indivíduo ao parasito deixa de existir, indicando que a memória imunológica provocada pela malária é de curta duração e o paciente infectado deve estar continuamente exposto ao parasito (KEEGAN; DUSHOFF, 2013). Desse modo, residentes de áreas hiperendêmicas quando infectados desenvolvem baixas parasitemias e uma infecção assintomática (GAZZINELLI *et al.*, 2014).

A resposta inflamatória que o plasmódio induz no hospedeiro é um fator crítico para a patologia da malária. A inflamação pode ser sistematicamente controlada por diversos sinais bioquímicos, onde um importante mediador desses sinais são as citocinas (CHEN; LIU, 2009).

As citocinas promovem modulações durante a infecção pelo *Plasmodium spp* que podem resultar na modificação dos componentes celulares e bioquímicos do sangue, melhorando ou agravando o quadro clínico do paciente. As citocinas

apresentam a capacidade de controlar o crescimento do parasito, bem como, podem promover dano tecidual (KABYEMELA *et al.*, 2013).

### 2.2.1 Participação das citocinas na malária

Na malária ocorre ativação tanto de células CD4+ Th1 quanto de células CD4+ Th2, sendo necessário para a proteção do paciente um equilíbrio entre as citocinas produzidas por ambos os perfis celulares (MBUGI *et al.*, 2010). Nesse sentido, o *P. vivax* induz uma maior produção de citocinas em relação ao *P. falciparum* mesmo com biomassa parasitária semelhante (ANSTEY *et al.*, 2012).

O ciclo eritrocítico e a consequente destruição dos eritrócitos e liberação de seus metabólitos estimulam a produção do fator de necrose tumoral (do inglês, TNF- $\alpha$ ) e outras citocinas, tais como IL-6, IL-1 e IFN- $\gamma$  (STANISIC *et al.*, 2013). O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória normalmente presente na resposta à patógenos intracelulares. Os eritrócitos parasitados por plasmódios induzem a produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$  pelos monócitos, macrófagos e linfócitos e está relacionada com a patogênese da infecção (HAFALLA *et al.*, 2011). Existe uma correlação entre a gravidade da doença e níveis circulantes de citocinas, principalmente TNF- $\alpha$ , que está correlacionada com surtos de febre da doença. Além disso, a produção de óxido nítrico (NO) na cascata de sinalização de TNF- $\alpha$  pode gerar sintomas encontrados na malária grave como: hipotensão, acidose láctica, hipoglicemia e coma (MENDIS; CARTER, 1992). Mais recentemente, o estudo encontrou uma tendência linear entre aumento dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  com a gravidade da malária na infecção por *P. vivax* na Região Amazônica brasileira (ANDRADE *et al.*, 2010).

Por outro lado, citocinas antiinflamatórias, como a IL-10 e o TGF- $\beta$ , nas fases iniciais da infecção correlacionam-se com as elevadas parasitemias, porém em fases tardias da infecção parecem prevenir sintomas mais graves (WALTHER *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2014).

Em síntese, na ligação entre as respostas imune inata e adaptativa contra o parasito no estágio sanguíneo as células dendríticas (CDs) reconhecem eritrócitos parasitados via receptores de reconhecimento de padrões como os receptores Toll-

like (do inglês, TLRs), resultando na maturação, secreção de IL-12 e apresentação do antígeno para as células T CD4+, bem como para as células T CD8+. A IL-12 e o contato com eritrócitos infectados facilitam a ativação de células NK que são importantes para a produção precoce de IFN- $\gamma$  e promoção da resposta imune humoral e adaptativa via subclasses de anticorpos. A produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK, células T CD8+ e células T CD4+ diferenciadas induzem a produção de citocinas e quimiocinas pelas células apresentadoras de antígenos responsáveis pela maturação das CDs e ativação de macrófagos resultando na fagocitose e destruição do parasito via produção de óxido nítrico e oxigênio reativo. Células T CD4+ podem também produzir IL-10 que podem induzir a apoptose das CDs. Quando ativado, os macrófagos podem também participar da apresentação de antígenos parasitários. A IL-2 produzida pelas células T CD4+ ativadas estimulam a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK (STANISIC *et al.*, 2013).

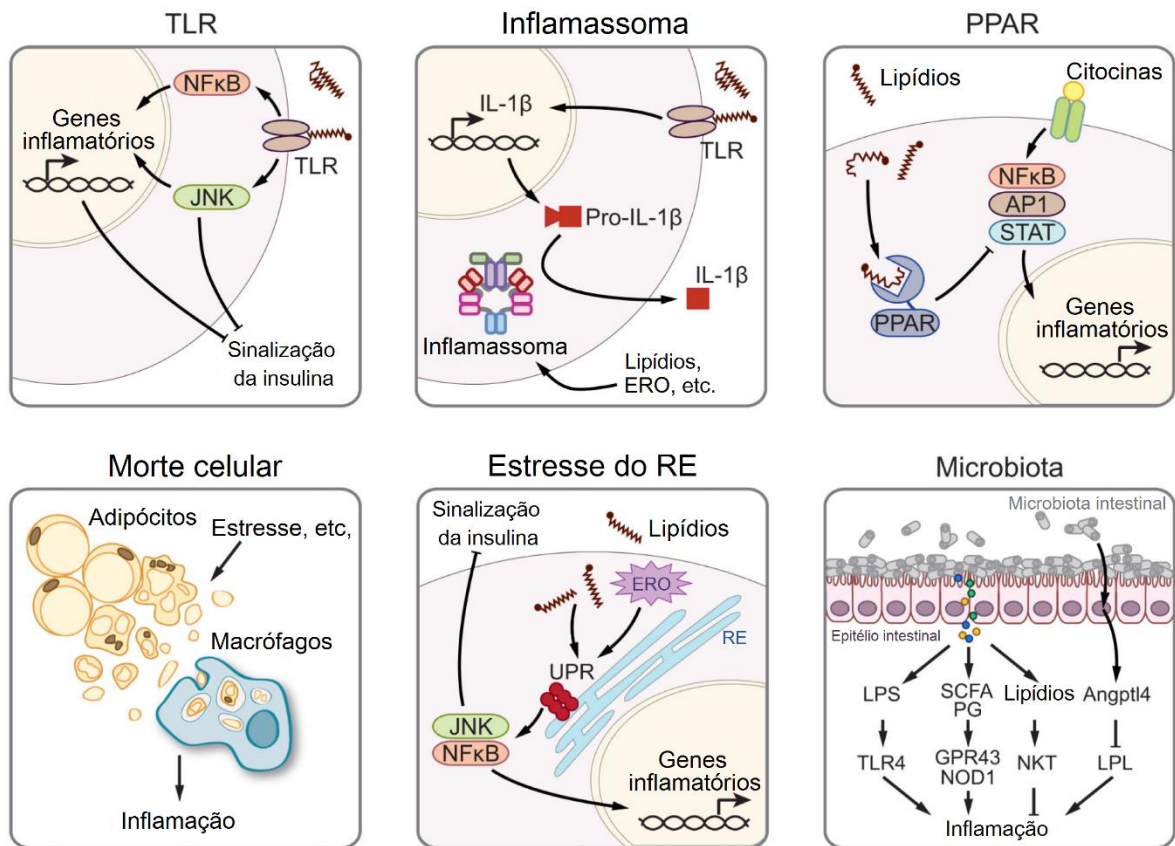
### 2.3 IMUNOMETABOLISMO: INTERSECÇÃO ENTRE ESTADO NUTRICIONAL E SISTEMA IMUNE

Atualmente, o tecido adiposo pode ser definido como um órgão participante do sistema imune. Especificamente, o desenvolvimento do excesso do tecido adiposo está fortemente associado com o desenvolvimento de inflamação crônica causada pela infiltração de células imunes ativadas e superprodução de citocinas pró inflamatórias. Dessa maneira, a obesidade está relacionada ao aumento exacerbado da massa dos depósitos de gordura e aumento na expressão gênica e protéica de citocinas pró-inflamatórias, o que influencia a resposta imune inata e adaptativa, relacionando-a à inflamação (EXLEY *et al.*, 2014).

Esta resposta inflamatória pode ser potencializada pelo acúmulo de macrófagos inflamatórios M1 ao redor dos adipócitos que produzem citocinas pró inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , contribuindo diretamente para uma inflamação local e sistêmica, além da resistência à insulina (HAN; LEVINGS, 2013). Estudo recente observou um aumento da expressão dos TLR-2 e TLR-4 proporcionalmente ao aumento índice de massa corpórea (IMC) em um grupo de pacientes com peso normal, sobrepeso e obesos. Estes achados apontaram uma superexpressão de

citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, conforme o aumento do IMC (AHMAD *et al.*, 2012).

Em síntese, vários mecanismos tem sido propostos para explicar o efeitos dos lipídios na inflamação, incluindo receptores da imunidade inata (TLR), inflamassomas, receptores nucleares (PPAR), morte celular, estresse de retículo endoplasmático e microbiota intestinal – Figura 2 (SUN *et al.*, 2012).



**Figura 2:** Modelos hipotéticos de como a inflamação é iniciada e desenvolvida na obesidade.

Fonte: Adaptado de Sun *et al.*, 2012.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL:

- Investigar a influência do estado nutricional (obeso, sobrepeso e eutrófico) nos aspectos clínicos e laboratoriais em pacientes naturalmente infectados por *P. vivax* no Estado do Pará.

#### 3.2 ESPECÍFICOS:

- Avaliar associação entre o estado nutricional e a densidade parasitária e a intensidade das manifestações clínicas em pacientes infectados por *P. vivax*;

- Avaliar associação entre o estado nutricional e o perfil hematológico e bioquímico em pacientes infectados por *P. vivax*;

- Avaliar associação entre o estado nutricional e o nível sérico de citocinas moduladoras da inflamação (TNF- $\alpha$  e IL-10) em pacientes infectados por *P. vivax*;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo transversal-analítico para avaliar a influência do estado nutricional nos aspectos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais (parasitológico, hematológico, bioquímico e imunológicos) de pacientes com malária por *P. vivax*. As coletas de dados e amostras sanguíneas foram realizadas no Laboratório de Ensaios Clínicos em Malária do Instituto Evandro Chagas (LECEM/IEC), em Ananindeua, no Posto de Notificação de Malária na cidade de Anajás e no Posto de Notificação de Malária em Itaituba, localizados no Estado do Pará, no período de janeiro a junho de 2015.

O LECEM/IEC realiza o diagnóstico e tratamento de malária em indivíduos com quadro febril suspeito da doença, procedentes de várias localidades do Estado do Pará, de Estados da Região Amazônica e mesmo de outros países. Neste serviço público de saúde no ano de 2014 foram examinadas 976 lâminas de pacientes com suspeita de malária. O resultado foi positivo em 24 lâminas, das quais em 79,2% foi diagnosticado o *P. vivax*.

O município de Anajás, localizado no arquipélago do Marajó, registra um dos altos índices de malária no Estado do Pará. Tem uma população estimada de 26.547 habitantes e entre os anos de 2012, 2013 e 2014, registrou uma Incidência Parasitária Anual (IPA) de 765, 199 e 71,6 casos por 1.000 habitantes, respectivamente (BRASIL, 2015).

O município de Itaituba, localizado no noroeste do Estado do Pará, tem uma população estimada de 98.363 habitantes e entre os anos de 2012, 2013 e 2014, registrou uma Incidência Parasitária Anual (IPA) de 145, 111 e 50 casos por 1.000 habitantes, respectivamente (BRASIL, 2015).

No ano de 2014, esses dois municípios concentraram aproximadamente 60% do total de casos de malária e 56% dos casos de malária por *P. vivax* registrados no Estado. Logo, embora em queda no número de casos observada nos últimos anos, essas duas localidades ainda são classificadas como alto risco de sua população adoecer por malária. Além disso, há a necessidade de estudos direcionados para essas áreas, pois são ferramentas importantes no estabelecimento de estratégias de controle para a doença.



## 4.2 PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Este estudo representa um objetivo específico do projeto “Estudo da associação do polimorfismo no gene do receptor *toll-like 4* em relação ao espectro clínico, laboratorial e nutricional de pacientes com malária por *Plasmodium vivax*”, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical (CEP/NMT) da Universidade Federal do Pará sob o número 4599/2015 (ANEXO A).

Para o projeto supracitado, calculou-se o tamanho da casuística com base nos resultados de Leoratti e colaboradores (2008), utilizando-se a fórmula para estudo de prevalência:  $N = Z^2 \times P \times Q / E^2$ , sendo  $Z$  o nível de confiança de 95% (1,96);  $P$  a prevalência estimada de 5% (0,05);  $Q$  igual a 1- $P$  (0,95); e  $E$  a precisão desejada de 0,06.

Inicialmente foram eleitos pelos critérios de inclusão (Quadro 1) 80 pacientes, dos quais foram excluídos dois, onde em um deles houve perda do material sanguíneo a qual impossibilitou a realização dos exames laboratoriais e o outro caso por suspeita de gravidez.

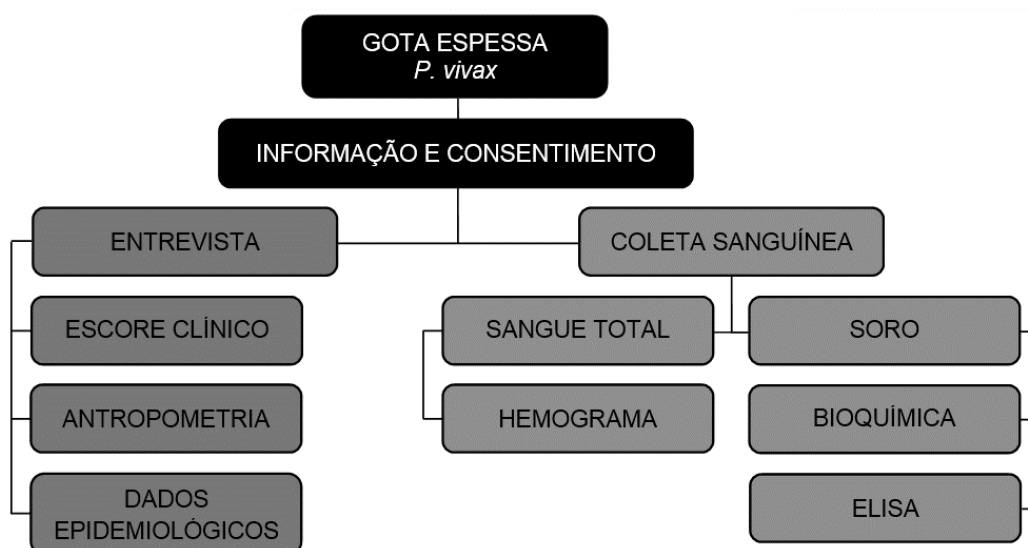
**Quadro 1:** Síntese dos critérios de inclusão e exclusão para o estudo.

Critérios	
Inclusão	Exclusão
Pacientes com diagnóstico positivo para <i>P. vivax</i> ; Indivíduos com idade entre 18 e 59 anos de ambos os sexos.	Pacientes com infecção por <i>P. falciparum</i> ou <i>P. malariae</i> ; Em uso de anti inflamatório não-hormonal, corticosteroides; Grávidas ou em período de amamentação.

O estudo foi composto por 78 pacientes com exame microscópico positivo para *P. vivax* por demanda espontânea no LECEM/IEC (n = 8; 10,3%), em Anajás (n = 8; 10,3%) e em Itaituba (n = 62; 79,5%). Esta diferença no número de casos deu-se à mudança no padrão de endemicidade da malária no Estado e aos aspectos logísticos e financeiros disponíveis para a realização desta pesquisa. É importante ressaltar que os casos diagnosticados em Anajás e Itaituba foram autóctones e

aqueles atendidos no LECEM/IEC foram alóctones em viajantes com locais prováveis de infecção em Itaituba (n = 6; 75%) e Calçoene/AP (n = 2; 25%).

Os pacientes foram avaliados clínica e laboratorialmente em D0 (data do diagnóstico e primeiro dia de tratamento), realizando entrevista (escore clínico, antropometria e dados epidemiológicos) e exames complementares (hemograma, bioquímica e ensaio imunoenzimático de citocinas) (Figura 3). Na ocasião, os objetivos da pesquisa foram explicados em linguagem clara e os que concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).



**Figura 3:** Fluxograma de seleção dos participantes do estudo.

O sangue foi colhido por venopunção periférica, com agulha e seringa descartáveis ou por aspiração a vácuo em tubos BD Vacutainer® (BD Biosciences, CA, EUA). Para a realização do hemograma foram coletados aproximadamente 4 mL de sangue em tubos com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Para a realização dos testes sorológicos foram coletados aproximadamente 8 mL de sangue em tubos a vácuo sem anticoagulante com gel separador, sendo submetidos a centrifugação, separação e armazenamento de alíquotas de soro em microtubos de 1,5 mL congeladas a -20°C.

### 4.3 DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO

O diagnóstico microscópico foi realizado pela pesquisa quantitativa de plasmódio pelo método da Gota Espessa (GE) seguindo as etapas de coleta de sangue, preparo da GE, corada pelo método de Walker (BRASIL, 2009), seguindo as etapas de desemoglobinização pela solução hipotônica de azul de metileno fosfatado e coloração pela solução alcoólica de Giemsa, descritas a seguir.

#### Etapa 1: Coleta de sangue

- 1) Realizar assepsia da face lateral do dedo com algodão embebido em álcool a 70%;
- 2) Limpar o local da punção com algodão seco, para retirada do álcool;
- 3) Fazer uma punção digital, com auxílio de uma lanceta descartável. Desprezar a primeira gota de sangue e aproveitar a gota seguinte;
- 4) Secar a lâmina;

#### Etapa 2: Coloração da gota espessa

- 1) Aplicar a solução de azul de metileno fosfatado (mistura de azul de metileno fosfatado 1 g – azul de metileno 1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3 g – em 250 mL de água destilada) sobre a GE de sangue por 2 segundos;
- 2) Enxaguar com água tamponada sem jato forte;
- 3) Colocar a lâmina com o lado da GE voltado para a superfície da placa de coloração;
- 4) Preparar a solução de Giemsa (Giemsa 0,75g, glicerol 35 mL e  $\text{CH}_3\text{OH}$  65 mL) na proporção de uma gota de corante para 1 mL de água tamponada (mistura de sais fosfatados 1 g –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6 g – em 1.000 mL de água destilada). Homogeneizar;
- 5) Aplicar esta solução na placa côncava de coloração, sob a lâmina invertida;
- 6) Corar por 10 minutos;
- 7) Enxaguar com água tamponada sem jato forte;
- 8) Secar a lâmina.

Na leitura da lâmina em microscópio óptico com auxílio da objetiva de 100x foram percorridos 100 campos microscópicos (correspondente a 0,2  $\mu\text{L}$  de sangue). Em síntese, determinou-se a parasitemia pela seguinte fórmula: *Parasitemia* ( $\mu\text{L}$ ) =

*Parasitos por campo x 100 x 5*. O valor da mediana global da densidade parasitária foi usado como “ponto de corte” para a classificação como baixa e alta parasitemia.

#### 4.4 EXAMES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Para avaliação dos parâmetros hematológicos foram realizados hemogramas no Laboratório de Hematologia do IEC em um contador automático Pentra 120-Retic® (ABX Diagnostics, França) e no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Municipal de Itaituba em um contador automático SDH-20® (Labtest, Brasil), conforme instruções do fabricante. No hemograma foram obtidos os seguintes parâmetros: contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina, determinação do hematócrito, contagem total de leucócitos, contagem diferencial dos leucócitos e contagem total de plaquetas (Quadro 2).

**Quadro 2:** Valores de referência dos parâmetros hematológicos.

<b>Parâmetros hematológicos</b>	<b>Valores de referência</b>
Eritrócitos	Homem: 4,50 a 6,5 x 10 <sup>6</sup> /μL Mulher: 3,9 a 5,6 x 10 <sup>6</sup> /μL
Hemoglobina	Homem: ≥ 13,0 g/dL Mulher: ≥ 12,0 g/dL
Hematócrito	Homem: 38 a 50 % Mulher: 36 a 47 %
Leucócitos	4 a 10 x 10 <sup>3</sup> /μL
Linfócitos	1 a 3,8 x 10 <sup>3</sup> /μL
Neutrófilos	1,5 a 6,8 x 10 <sup>3</sup> /μL
Monócitos	200 a 800/μL
Eosinófilos	40 a 400/μL
Plaquetas	150 a 400 x 10 <sup>3</sup> /μL

Fonte: Fabricantes dos equipamentos.

Para avaliação dos parâmetros bioquímicos foram dosados triglicérides, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa

densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), bilirrubinas totais, ureia, creatinina, do soro no Laboratório de Bioquímica do IEC em um auto analisador bioquímico Cobas Integra 400® (Roche, Alemanha), conforme instruções do fabricante.

**Quadro 3:** Valores de referência dos parâmetros bioquímicos.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores de referência</b>
Triglicérides	< 150 mg/dL Elevado: > 200 mg/dL
Colesterol total	< 200 mg/dL Elevado: > 240 mg/dL
Colesterol HDL	Desejável: > 45 mg/dL
Colesterol LDL	< 129 mg/dL Elevado: > 160 mg/dL
Colesterol VLDL	< 40 mg/dL
AST	Homem: ≤ 40 U/L Mulher: ≤ 32 U/L
ALT	Homem: ≤ 41 U/L Mulher: ≤ 33 U/L
Bilirrubina total	≤ 1 mg/dL
Ureia	10 a 49 mg/dL
Creatinina	0,64 a 1,40 mg/dL

Fonte: Fabricantes dos equipamentos.

#### 4.5 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DAS CITOCINAS

Na dosagem sérica das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 foi utilizado o kit BD OptEIA™ (BD Biosciences, USA) de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de captura usando pares de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina fornecidos

pelo teste. Todos os testes foram realizados no Laboratório de Imunologia da UFPA conforme instruções do fabricante descritas a seguir.

#### 4.5.1 TNF- $\alpha$

- 1) Sensibilizar a placa de ELISA (BD Falcon™, BD Biosciences, USA) com 100  $\mu$ L/poço do anticorpo de captura diluído 1:250 em tampão carbonato a 0,1 M (NaHCO<sub>3</sub> 7,13 g e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,59 g para 1 L para pH 9,5 com NaOH 10N) pH 9,5 para a detecção da citocina TNF- $\alpha$ . Cobrir e incubar a 4°C por 16 horas;
- 2) Lavar a placa, após a incubação, por 3 vezes com PBS (NaCl 80 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,6 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g e KCl 2g para 10 L) pH 7 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 3) Bloquear a placa com 200  $\mu$ L/poço com PBS contendo 10% de soro bovino fetal (Gibco®, Brasil), pH 7. Incubar por 1 hora em temperatura ambiente;
- 4) Lavar a placa, após a incubação, por 3 vezes com PBS pH 7 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 5) Preparar a diluição padrão e as diluições amostrais no diluente que acompanha o kit, seguindo indicações do fabricante de modo a obter a curva padrão;
- 6) Adicionar 100  $\mu$ L/poço das diluições amostrais (curva padrão) e do soro dos pacientes. Incubar por 2 horas em temperatura ambiente;
- 7) Lavar a placa, após a incubação, por 5 vezes com PBS pH 7 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 8) Adicionar 100  $\mu$ L/poço do material de detecção (anticorpo monoclonal biotilado anti-TNF humano + conjugado estreptovidina-peroxidase, SAV-HRP). Incubar por 1 hora em temperatura ambiente;
- 9) Lavar a placa, após a incubação, por 7 vezes com PBS pH 7 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 10) Adicionar 100  $\mu$ L/poço solução de substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, TMB) (BD OptEIA™, USA). Incubar por 30 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz;
- 11) Adicionar 50  $\mu$ L/poço de HCl 2 M;
- 12) Proceder a leitura da placa.

#### 4.5.2 IL-10

- 1) Sensibilizar a placa de ELISA (BD Falcon™, BD Biosciences, USA) com 100  $\mu$ L/poço do anticorpo de captura diluído 1:250 tampão carbonato a 0,1 M (NaHCO<sub>3</sub> 7,13 g e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,59 g para 1 L para pH 9,5 com NaOH 10N) pH 9,5 para a detecção da citocina IL-10. Cobrir e incubar a 4°C por 16 horas;
- 2) Lavar a placa, após a incubação, por 3 vezes com PBS (NaCl 80 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,6 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g e KCl 2g para 10 L) pH 7 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);

- 3) Bloquear a placa com 200  $\mu$ L/poço com PBS contendo 10% de soro bovino fetal (Gibco®, Brasil), pH 7. Incubar por 1 hora em temperatura ambiente;
- 4) Lavar a placa, após a incubação, por 3 vezes com PBS pH 7 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 5) Preparar a diluição padrão e as diluições amostrais no diluente que acompanha o kit, seguindo indicações do fabricante de modo a obter a curva padrão;
- 6) Adicionar 100  $\mu$ L/poço das diluições amostrais (curva padrão) e do soro dos pacientes. Incubar por 2 horas em temperatura ambiente;
- 7) Lavar a placa, após a incubação, por 5 vezes com PBS pH 7 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 8) Adicionar 100  $\mu$ L/poço do material de detecção (anticorpo monoclonal biotilado anti-IL 10 humano + conjugado estreptavidina-peroxidase, SAV-HRP). Incubar por 1 hora em temperatura ambiente;
- 9) Lavar a placa, após a incubação, por 7 vezes com PBS pH 7 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T20);
- 10) Adicionar 100  $\mu$ L/poço solução de substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, TMB) (BD OptEIA™, USA). Incubar por 30 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz;
- 11) Adicionar 50  $\mu$ L/poço de HCl 2 M;
- 12) Proceder a leitura da placa.

Todas as dosagens foram realizadas em duplicata e a média dos dois valores de densidade óptica (DO) foi utilizada para as análises. A DO foi determinada em um leitor de placas de ELISA (BioTek®, USA) em comprimento de onda de 450 nm ( $DO_{450}$ ). Para determinar a concentração sérica em pg/mL das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10, curvas padrão foram estabelecidas utilizando-se citocinas recombinantes nas concentrações que variaram de 7,8 a 500 pg/mL, obtidas por diluição seriada em PBS-SBF 10%.

#### 4.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A entrevista foi realizada com apoio da equipe médica do LECEM/IEC através do preenchimento de um protocolo contendo dados de identificação, tempo da doença atual, intensidade dos sinais e sintomas, histórico progressivo da doença, obtidas dos pacientes (APÊNDICE A).

#### 4.6.1 Escore clínico

O escore mensurou a intensidade e a presença das manifestações clínicas. Os sinais e sintomas elencados (febre, calafrio, cefaleia, artralgia, mialgia, astenia, lombalgia, dor abdominal, tosse, dispneia, diarreia e vômitos) informados pelos pacientes foram graduados de 0 a 3 de acordo com a intensidade, o qual gerou um somatório variável de 0 a 36 pontos. Outros sinais e sintomas (palidez, colúria, oligúria) foram pontuados de 0 a 1 de acordo com a presença ou ausência, sendo obtida uma soma variável de 0 a 3 pontos. Esses pontos foram somados e geraram um escore clínico para cada paciente de 0 a 39 pontos (Quadro 4). Vale ressaltar que a palidez foi determinada pela inspeção mucocutânea.

**Quadro 4:** Distribuição dos sinais e sintomas e o escore clínico adotado na pesquisa.

Sintoma / Sinal	Escore clínico
Febre	
Calafrio	
Cefaleia	(0) Ausente
Artralgia	(1) Leve (Incomoda pouco)
Lombalgia	(2) Moderado (Incomoda, limita minhas atividades em parte)
Astenia	
Mialgia	(3) Intenso (Incomoda muito, não consigo realizar minhas atividades)
Dor abdominal	
Tosse	
Dispneia	
Diarreia	(0) Ausente
Náuseas/Vômitos	(1) 1 episódio no dia
	(2) 2 a 3 episódios ao dia
	(3) 3 ou mais episódios ao dia
Palidez	(0) Ausente
Colúria	(1) Presente
Oligúria/Anúria	

Fonte: Adaptado da ficha padrão de atendimento do LECEM/IEC.



#### 4.6.2 Antropometria

Para a classificação do estado nutricional baseado na antropometria foi feita a mensuração do peso (em kg), da altura (em m) e da circunferência abdominal (em cm) de cada paciente. A mensuração do peso foi realizada com o paciente em roupas leves, os braços estendidos ao longo do corpo com os dois pés apoiados na superfície da balança antropométrica. A mensuração da altura foi realizada com o paciente em posição ereta, pés juntos, joelhos estendidos, braço ao longo do corpo e com o olhar para o horizonte. A mensuração da circunferência abdominal (CA) foi realizada com fita métrica no ponto médio entre a crista ilíaca e o rebordo costal, com o paciente em pé com os braços estendidos ao longo do corpo e na fase de expiração da respiração.

A obesidade foi definida usando os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2000) de acordo com o Índice de Massa Corpórea (IMC) calculado dividindo-se o peso (kg) pela altura ao quadrado ( $m^2$ ). Os valores da CA foram utilizados para avaliação da adiposidade central. Os parâmetros antropométricos e sua classificação são mostradas no Quadro 5.

**Quadro 5:** Valores de referência dos parâmetros antropométricos.

Variáveis	Valores de referência
IMC	Eutrofia: 18,5 a 24,9 $kg/m^2$ Sobrepeso: 25 a 29,9 $kg/m^2$ Obesidade: $>30 kg/m^2$
Circunferência abdominal	Homem: $> 102$ cm Mulher: $> 88$ cm

Fonte: WHO, 2000.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na avaliação dos resultados através do *software* Bioestat 5.3 foram utilizados procedimentos estatísticos descritivos (média, mediana, desvio padrão, intervalo interquartil) e/ou analíticos, adotando-se 5% como nível de significância. Para

seleção do teste estatístico realizou-se o teste Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição de normalidade das variáveis. Testes paramétricos foram empregados para os dados com distribuição normal. Por outro lado, testes não paramétricos foram empregados se os dados estavam dispostos de modo assimétrico.

Para a análise da variação entre os três grupos nutricionais foram utilizados os testes *Kruskall-Wallis* (ou teste H), para variáveis não paramétricas, ou ANOVA para as paramétricas. Para a análise de variação entre dois grupos nutricionais foram utilizados os testes *Mann-Whitney* para as variáveis não-paramétricas, ou teste t-Student para as paramétricas ou teste G.

Para a análise de tendência positiva ou negativa foi utilizado o teste Qui-quadrado de tendência. Para a análise de associação entre duas variáveis não-paramétricas foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Para a análise de associação entre duas variáveis paramétricas foi utilizado o teste de correlação de Pearson.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

A Tabela 1 apresenta a distribuição dos dados demográficos, epidemiológicos e antropométricos dos participantes da pesquisa. De modo geral, observou-se o predomínio do sexo masculino ( $n = 50$ ; 64,1%) e o valor de mediana de 28 anos (23 a 36 anos). O número de dias com sintomas de malária registrou valor de mediana de 4 dias (2 a 6 dias). Os indivíduos com episódio anterior da doença, sem especificação da espécie de plasmódio, foram predominantes ( $n = 62$ ; 79,5%). A partir da categorização dos pacientes por estado nutricional pelo valor do IMC foi verificada a maior frequência de indivíduos acima do peso ( $n = 41$ ; 52,6%). O estado eutrófico representou 47,4% ( $n = 37$ ), seguido do sobrepeso ( $n = 27$ ; 34,6%) e da obesidade ( $n = 14$ ; 18,0%).

Entre os grupos nutricionais, pacientes obesos apresentaram mais idade que os eutróficos e os sobrepeso (teste *Kruskal Wallis*:  $p = 0,016$ ), havendo uma correlação positiva entre o IMC e a idade (correlação de Spearman:  $r_s = 0,358$ ;  $p = 0,001$ ) (Tabela 1).

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre as médias do peso corporal (teste *Kruskal Wallis*:  $p < 0,001$ ), IMC e CA (teste ANOVA:  $p < 0,001$ , cada), estando esses valores aumentados em obesos. Além disso, houve correlação positiva entre o IMC e a CA (correlação de Spearman:  $r_s = 0,825$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tabela 1:** Distribuição dos dados demográficos, epidemiológicos e antropométricos de acordo com o estado nutricional, 2015.

	Geral (n = 78)	Estado nutricional			Valor de <i>p</i>
		Eutrofia (n = 37)	Sobrepeso (n = 27)	Obesidade (n = 14)	
<b>Demográficos</b>					
Sexo, n (%)					0,125 <sup>a</sup>
Masculino	50 (64)	26 (70)	16 (59)	8 (57)	
Feminino	28 (36)	11 (30)	11 (41)	6 (43)	
Idade (anos), mediana (IQ)	28 (23 – 36)	26 (22 – 34)	29 (26 – 37)	35 (30 – 41)	<b>0,016<sup>b</sup></b>
<b>Epidemiológicos</b>					
Tempo de doença (dias), mediana (IQ)	4 (2 – 6)	4 (2 – 12)	4 (3 – 4)	4 (3 – 9)	0,467 <sup>b</sup>
Histórico da doença, n (%)					<b>&lt; 0,001<sup>a</sup></b>
Primoinfecção	16 (21)	10 (27)	2 (7)	4 (29)	
Reinfecção	62 (79)	27 (73)	25 (93)	10 (71)	
<b>Antropométricos</b>					
Altura (m), média ± dp	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,905 <sup>c</sup>
Peso (kg), mediana (IQ)	68 (60 – 78)	60 (55 – 67)	72 (68 – 81)	85 (80 – 100)	<b>&lt; 0,001<sup>b</sup></b>
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), média ± dp	26 ± 4	22 ± 2	27 ± 1	32 ± 2	<b>&lt; 0,001<sup>c</sup></b>
CA (cm), média ± dp	87 ± 11	79 ± 7	91 ± 6	101 ± 8	<b>&lt; 0,001<sup>c</sup></b>

n = número de indivíduos; IQ = intervalo interquartil; dp = desvio padrão

<sup>a</sup> teste Qui-quadrado; <sup>b</sup> teste *Kruskal Wallis*; <sup>c</sup> teste ANOVA

## 5.2 DADOS PARASITOLÓGICOS

A densidade parasitária média foi de  $6.428 \pm 5.368$  parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue com variação de 65 a 60.000 p/ $\mu\text{L}$  (mediana de 5.000 p/ $\mu\text{L}$ ; IQ de 2.000 – 10.000 p/ $\mu\text{L}$ ). Dessa maneira, os pacientes foram classificados com alta parasitemia quando apresentaram  $\geq 5.000$  p/ $\mu\text{L}$  e baixa parasitemia quando apresentaram  $< 5.000$  p/ $\mu\text{L}$ .

Apesar dos estados nutricionais apresentarem valores similares de parasitemia (Tabela 2), observou-se uma tendência à maior frequência de alta parasitemia em obesos quando comparados aos sobrepesos e aos eutróficos (50% vs 44,4% vs 37,8%, respectivamente) (teste Qui-quadrado de tendência:  $p = 0,087$ ).

**Tabela 2:** Distribuição dos dados parasitológicos de acordo com o estado nutricional, 2015.

	Geral	Estado nutricional mediana (IQ)			Valor de $p$
		Eutrofia	Sobrepeso	Obesidade	
Parasitemia	5 (2 – 10)	4,5 (1,8 – 10)	5 (3,5 – 12,5)	5,3 (3 – 10)	0,495 <sup>a</sup>

Unidade: parasitos x  $10^3/\mu\text{L}$ .

<sup>a</sup> teste *Kruskal Wallis*;

Quando os pacientes foram categorizados de acordo com o histórico anterior de malária, houve correlação positiva entre a parasitemia e o IMC em indivíduos reinfectados (correlação de Spearman:  $r_s = 0,250$ ;  $p = 0,049$ ).

### 5.3 DADOS CLÍNICOS

Na distribuição dos sinais e sintomas entre os grupos nutricionais, a frequência de calafrio (teste Qui-quadrado de tendência:  $p = 0,024$ ;  $X^2 = 5,093$ ) de cefaleia ( $p = 0,044$ ;  $X^2 = 4,043$ ), da tríade malárica (febre + calafrio + cefaleia) ( $p < 0,001$ ;  $X^2 = 11,367$ ), de mialgia ( $p < 0,001$ ;  $X^2 = 27,702$ ), de tosse ( $p = 0,008$ ;  $X^2 = 7,013$ ) e de diarreia ( $p < 0,001$ ;  $X^2 = 12,056$ ) foi significativamente maior em obesos quando comparadas aos sobrepesos e eutróficos (Tabela 3). Além disso, houve uma tendência à maior frequência de artralgia ( $p = 0,084$ ;  $X^2 = 2,979$ ) em obesos, confirmada quando comparados os grupos extremos (teste G:  $p < 0,001$ ).

**Tabela 3:** Distribuição das frequências dos sinais e sintomas de acordo com o estado nutricional, 2015.

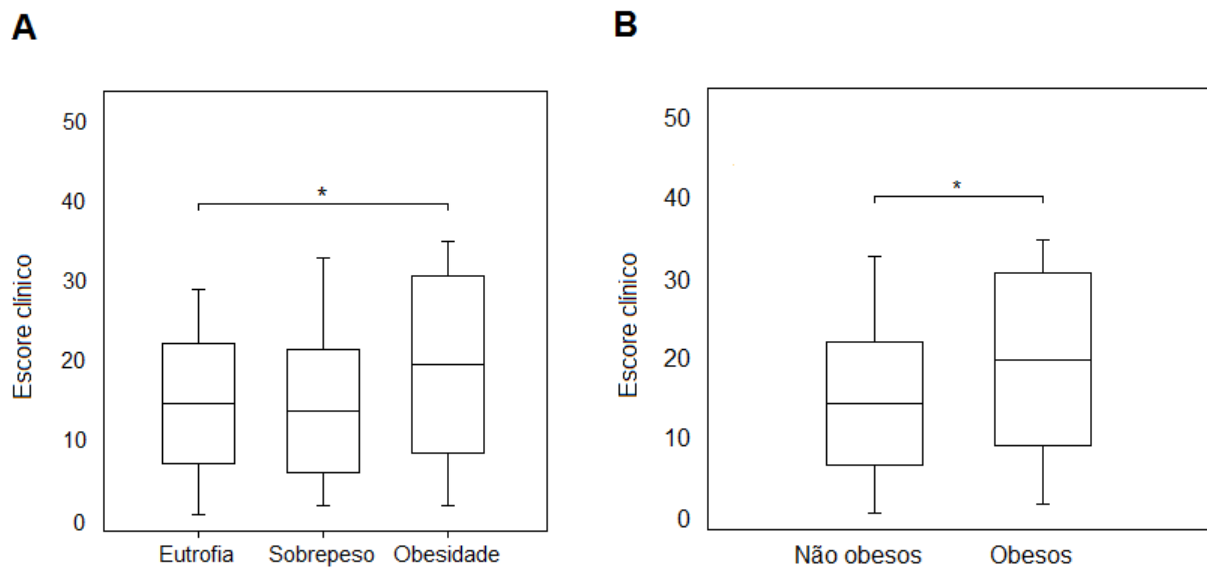
Sinais e sintomas	Geral	Estado nutricional			Valor de $p^a$
		n (%)			
		Eutrofia	Sobrepeso	Obesidade	
<b>Gerais</b>					
Febre	62 (80)	29 (78)	21 (78)	12 (86)	0,152
Calafrio	60 (77)	27 (73)	21 (78)	12 (86)	<b>0,024</b>
Cefaleia	70 (90)	34 (92)	22 (82)	14 (100)	<b>0,044</b>
Tríade <sup>1</sup>	55 (71)	24 (65)	19 (70)	12 (86)	<b>&lt;0,001</b>
Astenia	55 (71)	26 (70)	19 (70)	10 (71)	0,877
Palidez	25 (32)	16 (44)	3 (11)	6 (43)	0,884
<b>Locomotores</b>					
Mialgia	57 (73)	23 (62)	21 (78)	13 (93)	<b>&lt;0,001</b>
Lombalgia	67 (86)	30 (81)	25 (93)	12 (86)	0,298
Artralgia	60 (77)	28 (76)	20 (74)	12 (86)	0,084
<b>Urinários</b>					
Oligúria	16 (21)	12 (30)	1 (4)	3 (21)	0,100
Colúria	48 (62)	22 (60)	17 (63)	9 (64)	0,559
<b>Respiratórios</b>					
Tosse	26 (33)	12 (32)	7 (26)	7 (50)	<b>0,008</b>
Dispneia	35 (45)	18 (48)	11 (41)	6 (43)	0,393
<b>Gastrointestinais</b>					
Diarreia	14 (18)	6 (16)	3 (11)	5 (36)	<b>&lt;0,001</b>
Náusea/vômito	38 (49)	19 (51)	13 (48)	6 (43)	0,257
Dor abdominal	40 (51)	19 (51)	14 (52)	7 (50)	0,888

<sup>1</sup> febre, calafrio e cefaleia;

<sup>a</sup> teste Qui-quadrado de tendência

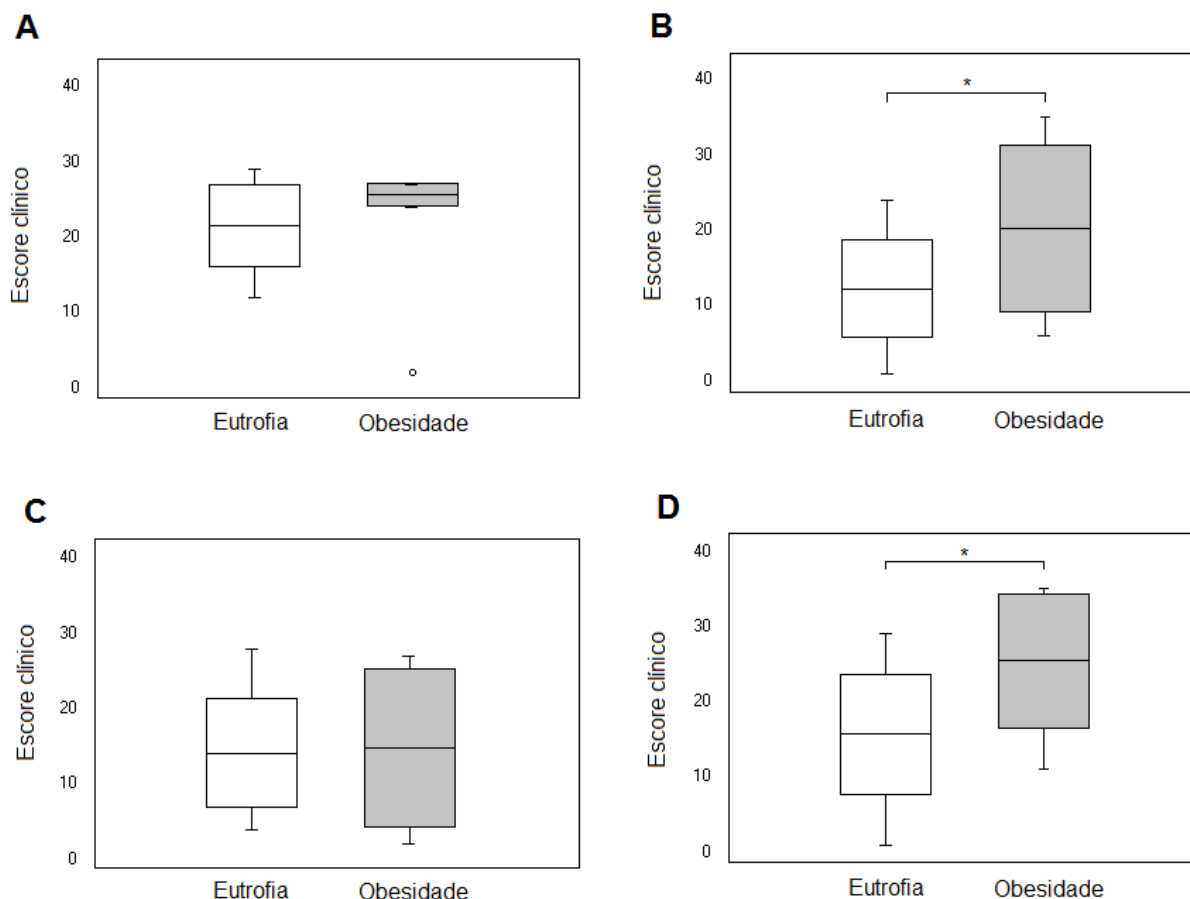
O escore clínico mensurou a intensidade e a presença das manifestações clínicas que apresentou valor médio global de  $15,6 \pm 8,6$  pontos. Entre os indivíduos eutróficos, o escore clínico variou de 1 a 29 com média de  $14,3 \pm 7,4$  pontos. Entre os com sobrepeso variou de 2 a 33 com média de  $14,5 \pm 8,3$  pontos. Entre os obesos o escore variou de 2 a 35 com média de  $20,1 \pm 10,8$  pontos.

Entre os valores do escore clínico dos grupos nutricionais demonstrou uma tendência à significância estatística entre as médias do escore clínico dos três grupos (teste ANOVA:  $p = 0,090$ ;  $F = 2,464$ ). Entretanto, a análise entre os grupos eutrofia e obesidade demonstrou que existe diferença estatisticamente significativa entre as médias do escore clínico dos dois grupos (teste t-Student:  $p = 0,047$ ;  $t = 2,036$ ) (Figura 4A). Tal informação apresentou maior significância estatística quando comparado os valores médios do escore entre não obesos (somatório dos eutróficos e sobrepesos) e obesos (teste t-Student:  $p = 0,029$ ;  $t = 4,982$ ) (Figura 4B).



**Figura 4:** Associação entre o escore clínico e os estados nutricionais. Diferença na média entre os grupos analisada pelo teste t-Student. Comparação entre: A) Os grupos nutricionais e B) Obesos e não obesos. \*  $p < 0,05$

Quando os pacientes foram categorizados de acordo com o histórico anterior de malária e com a faixa de carga parasitária, entre os reinfectados (Figura 5B) e entre os que apresentaram alta parasitemia (Figura 5D) foi observado um escore clínico mais alto em obesos quando comparados ao grupo eutrófico (teste t-Student:  $p = 0,009$  e  $p = 0,021$ , respectivamente).



**Figura 5:** Associação entre o escore clínico e os estados nutricionais de acordo com a história passada e faixa de parasitemia. Diferença na média entre os grupos analisada pelo teste *t*-Student. A) Primo infectados; B) Reinfectados; C) Baixa parasitemia; D) Alta parasitemia. \*  $p < 0,05$

#### 5.4 DADOS HEMATOLÓGICOS

Os exames hematológicos foram realizados para 70 (89,7%) pacientes recrutados no LECEM e em Itaituba. Destes, 32 (45,7%) foram classificados como eutróficos, 25 (35,7%) como sobrepeso e 13 (18,6%) como obesos.

Observou-se um aumento na contagem de leucócitos circulantes (teste *Kruskal Wallis*:  $p = 0,019$ ), bem como uma tendência ao aumento na contagem de neutrófilos ( $p = 0,081$ ) e monócitos (teste ANOVA:  $p = 0,089$ ) circulantes em obesos quando comparados aos sobrepesos e aos eutróficos (Tabela 4).



**Tabela 4:** Distribuição dos dados hematológicos de acordo com o estado nutricional, 2015.

Parâmetros Hematológicos	Geral (n = 70)	Estado nutricional			Valor de p
		Eutrofia (n = 32)	Sobrepeso (n = 25)	Obesidade (n = 13)	
Hemácias <sup>1</sup> (10 <sup>6</sup> /μL)	4,5 ± 0,7	4,6 ± 0,6	4,4 ± 0,7	4,6 ± 0,6	0,478 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g/dL)	13,4 ± 2	13,5 ± 2	13,2 ± 2,1	13,5 ± 1,6	0,794 <sup>a</sup>
Hematócrito (%)	40,1 ± 6	40,7 ± 6,3	39,3 ± 6,3	40,2 ± 4,9	0,674 <sup>a</sup>
Leucócitos totais (10 <sup>3</sup> /μL)	5 ± 1,8	4,6 ± 1,8	5,1 ± 1,9	5,9 ± 1,3	<b>0,019</b> <sup>a</sup>
Linfócitos (10 <sup>3</sup> /μL)	1,4 ± 0,6	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,6	1,5 ± 0,7	0,656 <sup>a</sup>
Neutrófilos (10 <sup>3</sup> /μL)	3,2 ± 1,6	3 ± 1,4	3,4 ± 1,8	3,8 ± 1,3	0,081 <sup>a</sup>
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μL)	109 ± 54	109 ± 53	103 ± 52	122 ± 63	0,616 <sup>a</sup>
Monócitos <sup>2</sup> (10 <sup>2</sup> /μL)	1,3 (0,8 – 1,9)	1,1 (0,7 – 1,9)	1,3 (0,8 – 1,9)	1,7 (1,2 – 5,7)	0,089 <sup>b</sup>
Eosinófilos (10 <sup>2</sup> /μL)	1,3 (0,8 – 2)	1,3 (0,7 – 1,7)	1,2 (0,8 – 1,7)	1,5 (1,1 – 2,8)	0,235 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> valores expressos em média ± dp (dados paramétricos); <sup>2</sup> valores expressos em mediana (IQ) (dados não-paramétricos);

<sup>a</sup> teste ANOVA; <sup>b</sup> teste *Kruskal Wallis*

Quando comparados os grupos extremos (eutróficos vs obesos) houve confirmação da tendência ao aumento na contagem de neutrófilos (teste t-Student:  $p = 0,021$ ) e de monócitos (teste *Mann-Whitney*:  $p = 0,032$ ) circulantes como mencionada anteriormente.

Na distribuição das alterações hematológicas a partir dos valores de referência houve uma tendência a maior frequência de monocitose (teste Qui-quadrado de tendência:  $p = 0,023$ ;  $X^2 = 5,195$ ) em obesos quando comparadas aos sobrepesos e eutróficos. Por outro lado foi observada uma tendência a maior frequência de leucocitopenia ( $p < 0,001$ ;  $X^2 = 37,670$ ), linfocitopenia ( $p = 0,040$ ;  $X^2 =$

4,222) e neutropenia ( $p = 0,013$ ;  $X^2 = 6,221$ ) em eutróficos (Tabela 5). Vale ressaltar que não foram encontrados casos de eosinofilia.

**Tabela 5:** Distribuição das frequências das alterações hematológicas de acordo com o estado nutricional, 2015.

Alterações Hematológicas	Geral (n = 70)	Estado nutricional n (%)			Valor de $p^a$
		Eutrofia (n = 32)	Sobrepeso (n = 25)	Obesidade (n = 13)	
Anemia	16 (23)	7 (22)	5 (20)	4 (31)	0,138
Leucocitopenia	24 (54)	15 (47)	8 (32)	1 (8)	<b>&lt;0,001</b>
Linfocitopenia	21 (41)	9 (28)	10 (40)	2 (15)	<b>0,040</b>
Neutropenia	5 (9)	3 (9)	3 (12)	0 (0)	<b>0,013</b>
Monocitose	7 (10)	2 (6)	1 (4)	4 (31)	<b>&lt;0,001</b>
Trombocitopenia	52 (74)	24 (75)	18 (72)	10 (77)	0,745

<sup>a</sup> teste Qui-quadrado de tendência

## 5.5 DADOS BIOQUÍMICOS

Os exames bioquímicos foram realizados para 76 (97,4%) pacientes dos pacientes recrutados nas três localidades. Destes, 35 (46,1%) foram classificados como eutróficos, 27 (35,5%) como sobrepeso e 14 (18,4%) como obesos.

Observou-se um aumento no nível de triglicérides (teste ANOVA:  $p = 0,014$ ), de VLDL ( $p = 0,029$ ) e de ALT (teste *Kruskal Wallis*:  $p = 0,029$ ), bem como uma tendência ao aumento nos níveis de AST (teste *Kruskal Wallis*:  $p = 0,055$ ) e colesterol total (teste ANOVA:  $p = 0,076$ ) em obesos quando comparados aos sobrepesos e aos eutróficos (Tabela 6).

**Tabela 6:** Distribuição dos dados bioquímicos de acordo com o estado nutricional, 2015.

Parâmetros Bioquímicos	Geral (n = 76)	Estado nutricional mediana (IQ)			Valor de <i>p</i>
		Eutrofia (n = 35)	Sobrepeso (n = 27)	Obesidade (n = 14)	
Ureia <sup>1</sup> (mg/dL)	28,2 ± 9,3	27,2 ± 9,4	29,1 ± 8,9	28,9 ± 10,1	0,691 <sup>a</sup>
Creatinina (mg/dL)	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,495 <sup>a</sup>
Triglicérides (mg/dL)	183 ± 100	148 ± 82	222 ± 111	193 ± 92	<b>0,014</b> <sup>a</sup>
Colesterol total (mg/dL)	125 ± 37	116 ± 33	129 ± 41	141 ± 35	0,076 <sup>a</sup>
VLDL (mg/dL)	36 ± 19	30 ± 16	42 ± 20	39 ± 18	<b>0,029</b> <sup>a</sup>
LDL (mg/dL)	64 ± 35	60 ± 27	64 ± 44	76 ± 36	0,380 <sup>a</sup>
HDL <sup>2</sup> (mg/dL)	10 (4 – 22)	16 (6 – 22)	6 (4 – 17)	9 (5 – 26)	0,161 <sup>b</sup>
AST (U/L)	20 (16 – 25)	18 (15 – 24)	22 (18 – 32)	22 (18 – 27)	0,055 <sup>b</sup>
ALT (U/L)	15 (10 – 24)	12 (9 – 20)	19 (12 – 34)	20 (13 – 34)	<b>0,029</b> <sup>b</sup>
BT (mg/dL)	0,8 (0,4 – 1,3)	0,8 (0,5 – 1,2)	0,8 (0,5 – 2,2)	0,6 (0,4 – 1,1)	0,265 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> valores expressos em média ± dp; <sup>2</sup> valores expressos em mediana (IQ)

<sup>a</sup> teste ANOVA; <sup>b</sup> teste *Kruskal Wallis*

Quando comparados os grupos extremos (eutróficos vs obesos) houve confirmação da tendência ao aumento nos níveis de colesterol total (teste t-Student:  $p = 0,023$ ) e de AST (teste *Mann-Whitney*:  $p = 0,024$ ) circulantes como mencionada anteriormente. Além disso, observou-se uma tendência a diminuição do colesterol HDL em obesos (teste *Mann-Whitney*:  $p = 0,078$ ) e uma correlação positiva entre os níveis de creatinina e a CA (correlação de Pearson:  $r = 0,330$ ;  $p = 0,006$ ).

Na distribuição das alterações bioquímicas a partir dos valores de referência houve uma tendência a maior frequência de hipertrigliceridemia (teste Qui-quadrado de tendência:  $p = 0,006$ ;  $X^2 = 7,587$ ), altos níveis de colesterol VLDL ( $p = 0,006$ ;  $X^2 = 7,636$ ), e de AST ( $p = 0,029$ ;  $X^2 = 4,742$ ) em obesos (Tabela 7).

**Tabela 7:** Distribuição das frequências das alterações bioquímicas de acordo com o estado nutricional, 2015.

Alterações Bioquímicas	Geral (n = 76)	Estado nutricional			Valor de $p^a$
		n (%)			
		Eutrofia (n = 35)	Sobrepeso (n = 27)	Obesidade (n = 14)	
Hipertrigliceridemia	27 (36)	8 (24)	13 (50)	6 (43)	<b>0,006</b>
HDL $\downarrow$	70 (95)	31 (91)	26 (100)	13 (93)	0,529
VLDL $\uparrow$	26 (36)	8 (24)	12 (48)	6 (43)	<b>0,006</b>
AST $\uparrow$	9 (12)	4 (11)	4 (15)	1 (7)	0,366
ALT $\uparrow$	13 (17)	3 (9)	7 (26)	3 (21)	<b>0,029</b>
Bilirrubina total $\uparrow$	30 (39)	14 (40)	12 (44)	4 (29)	0,108

<sup>a</sup> teste Qui-quadrado de tendência

$\uparrow$  nível elevado;  $\downarrow$  nível baixo

Vale ressaltar que não foram encontrados casos de hipercolesterolemia e de hipercreatininemia. Além disso, apenas dois pacientes apresentaram nível elevado de LDL (classificados como sobrepeso) e três apresentaram hiperuremia (um de cada grupo nutricional). Devido a isto, as análises estatísticas com essas variáveis não foram realizadas.

## 5.6 DADOS IMUNOLÓGICOS

A concentração média de TNF- $\alpha$  foi  $42,4 \pm 93,9$  pg/mL com variação de níveis indetectáveis a 444,5 pg/mL (mediana de 0 pg/mL; IQ de 0 a 18,58 pg/mL). A concentração média de IL-10 foi  $277,8 \pm 261,0$  pg/mL com variação de níveis indetectáveis a 683,1 pg/mL (mediana de 118,35 pg/mL; IQ de 46,58 a 573,38

pg/mL). Não foram observadas diferenças nas concentrações séricas dessas citocinas entre os grupos nutricionais (Tabela 8).

**Tabela 8:** Distribuição dos dados imunológicos de acordo com o estado nutricional, 2015.

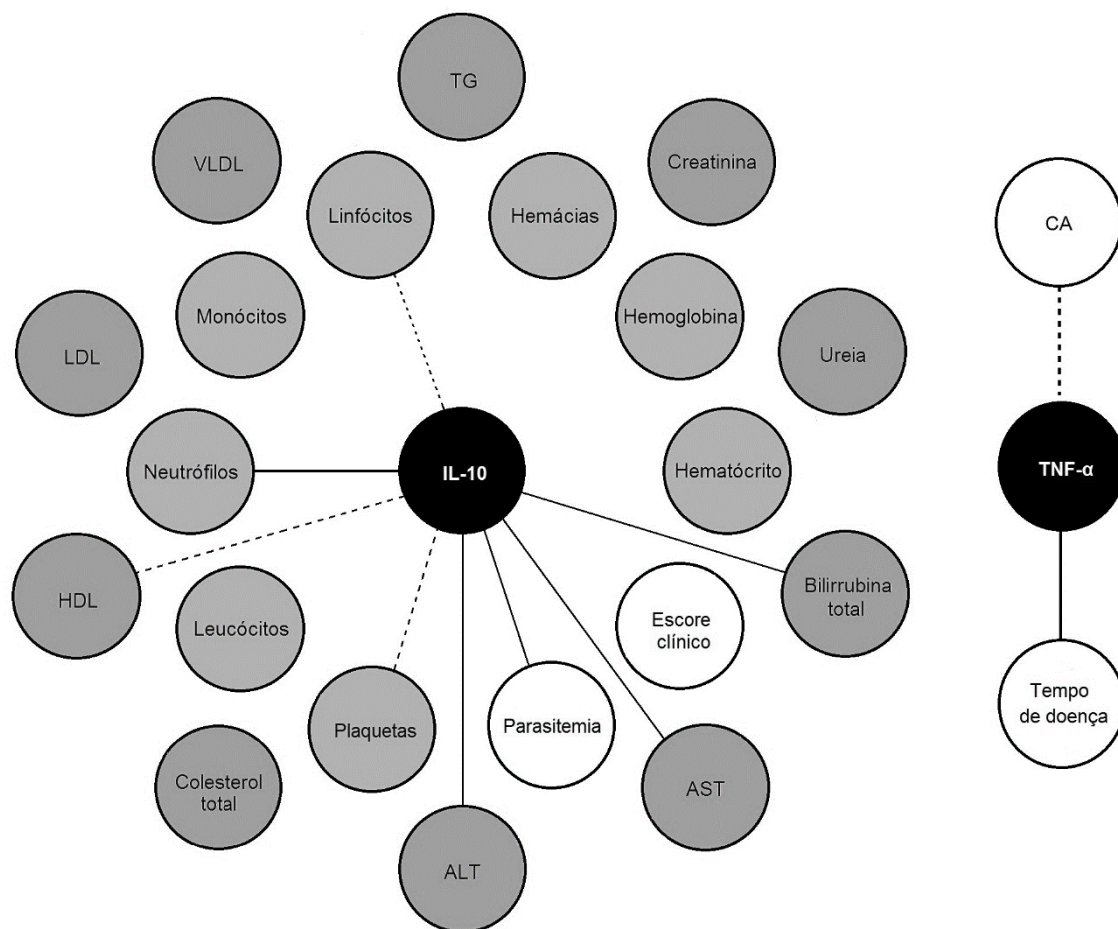
Citocinas	Total (n = 78)	Estado nutricional			Valor de <i>p</i>
		Eutrofia	Sobrepeso	Obesidade	
TNF- $\alpha$ (pg/mL), Mediana (IQ)	0 (0 – 18,6)	0 (1 – 24,5)	0 (0,7 – 36,6)	0 (9,6 – 9,6)	0,236 <sup>a</sup>
IL-10 (pg/mL), Média $\pm$ dp	277,8 $\pm$ 261	237,6 $\pm$ 246	342,7 $\pm$ 268,9	258,9 $\pm$ 278,4	0,273 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> teste *Kruskal-Wallis*; <sup>b</sup> teste ANOVA

Apesar de nenhuma associação ter sido encontrada entre o nível sérico dessas citocinas e o IMC, observou-se uma relação negativa entre o nível de TNF- $\alpha$  e a CA (correlação de Spearman:  $r_s = -0,257$   $p = 0,033$ ).

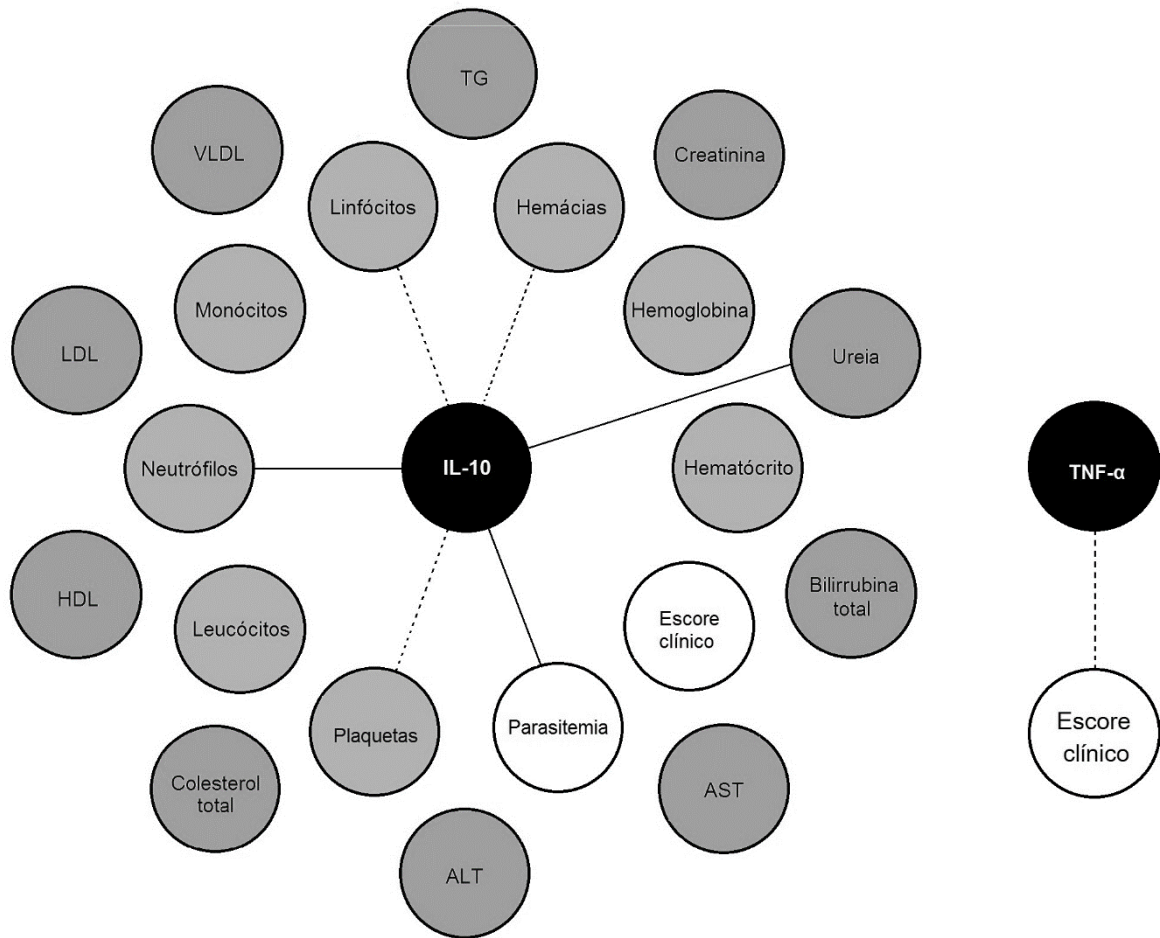
Na correlação entre os níveis séricos das citocinas com os parâmetros clínicos, parasitológicos, hematológicos e bioquímicos demonstrou associação positiva entre o nível de TNF- $\alpha$  com o tempo de doença (correlação de Spearman:  $r_s = 0,710$ ;  $p < 0,001$ ), bem como uma tendência à uma associação positiva com a contagem de linfócitos ( $r_s = 0,206$ ;  $p = 0,087$ ) e negativa com a idade ( $r_s = -0,214$ ;  $p = 0,060$ ).

O nível sérico de IL-10 foi associado positivamente com a contagem de neutrófilos (correlação de Pearson:  $r = 0,522$ ;  $p < 0,001$ ), com a densidade parasitária (correlação de Spearman:  $r_s = 0,538$ ;  $p < 0,001$ ), com o nível de BT ( $r_s = 0,657$ ;  $p < 0,001$ ), de ALT ( $r_s = 0,312$ ;  $p = 0,006$ ), de AST ( $r_s = 0,246$ ;  $p = 0,032$ ). Por outro lado, houve associação negativa dessa citocina com a contagem de linfócitos (correlação de Pearson:  $r = -0,606$ ;  $p < 0,001$ ), de plaquetas ( $r = -0,391$ ;  $p < 0,001$ ) e com a dosagem de HDL (correlação de Spearman:  $r_s = -0,277$ ;  $p = 0,017$ ) (Figura 6).



**Figura 6:** Correlação das citocinas com os parâmetros hematológicos, bioquímicos, parasitológicos, antropométricos e clínicos. As linhas contínuas indicam correlação positiva. As linhas tracejadas indicam correlação negativa.

Nos pacientes acima do peso (sobrepeso ou obesos), houve associação positiva do nível sérico de IL-10 com a parasitemia (correlação de Spearman:  $r_s = 0,582$ ;  $p < 0,001$ ), com a contagem de neutrófilos (correlação de Pearson:  $r = 0,467$ ;  $p = 0,003$ ) e com a concentração de ureia ( $r = 0,346$ ;  $p = 0,027$ ). Bem como houve relação negativa dessa citocina com a quantificação de hemácias (correlação de Pearson:  $r = -0,330$ ;  $p = 0,043$ ), com a contagem de linfócitos ( $r = -0,617$ ;  $p < 0,001$ ) e com a contagem de contagem de plaquetas (correlação de Pearson:  $r = -0,332$ ;  $p = 0,049$ ). Por outro lado, o nível sérico de TNF- $\alpha$  se relacionou negativamente com escore clínico (correlação de Spearman:  $r_s = -0,365$ ;  $p = 0,019$ ) desses pacientes (Figura 7).



**Figura 7:** Correlação das citocinas com os parâmetros hematológicos, bioquímicos, parasitológicos, antropométricos e clínicos nos pacientes acima do peso (sobrepeso e obesos). As linhas contínuas indicam correlação positiva. As linhas tracejadas indicam correlação negativa.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE O ESTADO NUTRICIONAL E A DENSIDADE PARASITÁRIA E A INTENSIDADE DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Neste estudo, encontrou-se valor médio de parasitemia de  $6.428 \pm 5.368$  parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue e mediana de 5.000 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue (IQ: 2.000 a 10.000 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue), resultado aproximado ao encontrado no estudo de Andrade e colaboradores (2010) que ao estudarem pacientes adultos com malária *vivax* em Buritis – Rondônia observaram uma mediana de parasitemia de 4.798 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue (IQ: 2.934 a 7.483 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue). Entretanto, estudo de Da Silva e colaboradores (2008) investigou a gravidade clínica da malária *vivax* em pacientes primoinfectados atendidos no LECEM/IEC, encontraram uma parasitemia média de  $9.255 \pm 1.009$  parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue.

Os pacientes obesos deste estudo apresentaram parasitemia mais alta, porém não significativa, além de uma tendência a faixa de alta parasitemia ( $\geq 5.000$  p/ $\mu\text{L}$ ) nos obesos. Comparativamente, os camundongos C57BL/6 obesos mutados para a leptina (*ob/ob*) infectados pelo *P. berghei* ANKA no estudo de Robert e colaboradores (2008), apresentaram parasitemia mais alta comparados aos camundongos controle heterozigoto (*ob/+*) com peso normal. Resultado corroborado pelo estudo de Lombard e colaboradores (1998) onde observaram que ratos Zucker obesos (*fa/fa*) infectados por *P. yoelli* apresentaram parasitemia quatro vezes mais elevada em comparação aos ratos controles heterozigotos (*fa/+*) com peso normal. Porém, em outro estudo com modelo murino realizado por estudo de Carvalho e colaboradores (2015), os camundongos C57BL/6 infectados por *P. berghei* ANKA com obesidade induzida por injeção subcutânea de glutamato monossódico (do inglês, MSG) foram mais eficazes na resposta à infecção por apresentarem parasitemia mais baixas que os camundongos com peso normal.

Em relação aos resultados relacionados as manifestações clínicas, os pacientes obesos com malária *vivax* apresentaram maior frequência de calafrio (86%), cefaleia (100%), tríade malárica (febre, calafrio e cefaleia, 86%), mialgia (93%), artralgia (86%), tosse (50%) e diarreia (36%) que os pacientes com peso normal. O escore clínico elaborado de acordo com a intensidade ou presença (Seção 4.6.1) dos sinais e sintomas (febre, calafrio, cefaleia, artralgia, mialgia,



astenia, lombalgia, dor abdominal, tosse, dispneia, diarreia, vômitos, palidez, colúria e oligúria) foi mais elevado em obesos ( $20,1 \pm 10,8$ ) em comparação aos eutróficos ( $14,3 \pm 7,4$ ).

De maneira indireta, o estudo de Ohnishi (2014) realizado com 247 pacientes atendidos no LECEM/IEC e em Goianésia do Pará investigou o comprometimento pulmonar na malária *vivax*, observou a frequência de 53% de tosse e 44% de dispneia no momento de admissão. A autora observou também que dos 18 casos apresentaram manifestação pulmonar evidenciada através de alterações no RX de tórax e 61% destes apresentaram IMC acima do normal (sobrepeso ou obesidade), onde 64% classificados como obesos.

Estudo de Robert e colaboradores (2008), evidenciaram a evolução ao óbito por malária cerebral no 6º dia após a infecção nos camundongos com peso normal (*ob/+*). Por outro lado, os camundongos obesos (*ob/ob*) não desenvolveram os sinais clínicos de malária cerebral, tais como mudanças de comportamento ou coma. Entretanto, morreram de anemia grave entre o 18º e o 25º dia após a infecção devido à alta parasitemia, o que sugeriu a resistência dos camundongos obesos infectados pelo *P. berghei* ANKA à forma cerebral da doença.

Em contraste, no estudo de Carvalho e colaboradores (2015), os camundongos com obesidade induzida (MSG) evoluíram ao óbito mais rapidamente, entre o 6º e o 7º dia após a infecção, em comparação aos camundongos com peso normal que morreram entre o 7º e o 11º dia após a infecção.

Vale ressaltar que o camundongo C57BL/6 é susceptível ao *P. berghei* ANKA e ao desenvolvimento da malária cerebral, além de representar o modelo de estudo para a malária por *P. falciparum*. Nesse modelo murinho, o desenvolvimento dos sintomas neurológicos ocorrem habitualmente entre o 6º e o 9º após a infecção (NEIL; HUNT, 1992). Nos trabalhos de Lombard e cols. (1998), Robert e cols. (2008) e Carvalho e cols. (2015) os modelos de obesidade murina são diferentes: o modelo de obesidade *ob/ob* tem reduzida sua capacidade de produzir leptina, por outro lado, o modelo de obesidade MGS induzido por dieta tem hiperleptinemia. Entretanto, esses são os únicos estudos com uma abordagem direta entre a infecção plasmodial e a obesidade, embora o autor do presente trabalho tenha consciência das

limitações em inferir esses resultados em modelos experimentais para seres humanos.

Em estudos com outras doenças infecciosas, os camundongos obesos são mais susceptíveis às infecções bacterianas e a pneumonia (MANCUSO, 2010). Nesse sentido, camundongos obesos (*ob/ob*) apresentaram dificuldade na eliminação bacteriana (*clearance*) quando infectados por *Klebsiella* (MANCUSO *et al.*, 2002). Bem como, camundongos com obesidade induzida por dieta apresentaram aumento na morbidade comparados aos camundongos com peso normal quando infectados pelo vírus da influenza (SMITH *et al.*, 2007).

A análise do oposto à obesidade por Ventura e colaboradores (1999) referiram o baixo peso (associado à desnutrição) como um fator de risco para as complicações clínicas em crianças e adolescentes com malária *vivax* no Pará. Do mesmo modo, Fillol e colaboradores (2009) identificaram o baixo peso em crianças infectadas pelo *P. falciparum* em Senegal como um fator de risco para a mortalidade e para a malária cerebral, provavelmente associada a inapropriada funcionalidade do sistema imune devido à redução de linfócitos T prejudicando a formação de anticorpos, do complemento e atrofia dos tecidos linfóides.

## 6.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE O ESTADO NUTRICIONAL E O PERFIL HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO

Nos pacientes obesos com malária *vivax* observou-se aumento na contagem de leucócitos totais, de neutrófilos e de monócitos, bem como uma diminuição na contagem de linfócitos, possivelmente associado ao aumento no número das células do sistema imune diretamente proporcional ao acúmulo de gordura corpórea em consequência a inflamação (CILDIR *et al.*, 2013; MRAZ; HALUZIK, 2014).

Nesta casuística, a contagem de hemácias e a concentração de hemoglobina não diferiu entre os grupos nutricionais, embora tenha sido observada por Ferreira e colaboradores (2013), uma correlação positiva entre o número de hemácias e hemoglobina com a CA em adolescentes obesos sem infecções patogênicas e/ou sem manifestações clínicas aparentes (saudáveis).

Embora a anemia tenha sido predominante nos obesos (31%), esta diferença não foi estatisticamente significativa em comparação aos eutróficos (22%) e dos sobrepesos (20%). Essa alteração hematológica na malária é consequência direta e indireta da infecção e destruição de eritrócitos, e por conseguinte diminuição da taxa de hemoglobina, pela ação do parasito. Como visto anteriormente, os pacientes obesos desta casuística tenderam a apresentar altas parasitemias o que levaria a uma alta destruição eritrocítica. Entretanto, essa manifestação clínica é multifatorial (LACERDA *et al.*, 2012).

Apesar de se ter observado elevados níveis de triglicérides, colesterol total e VLDL colesterol nos pacientes obesos neste estudo, o IMC está altamente associado a hipertrigliceridemia e a hipercolesterolemia (MIKKOKA *et al.*, 2007), logo, era esperado associação entre o IMC com o perfil lipídico desse grupo em comparação aos eutróficos e sobrepeso. De Loera-Rodriguez e colaboradores (2014) no México, encontraram níveis elevados de triglicérides e colesterol total em adultos obesos não-diabéticos sem infecções patogênicas e/ou sem manifestações clínicas aparentes (saudáveis) comparados a indivíduos com peso normal saudáveis.

O colesterol HDL é um composto essencial para o completo desenvolvimento do parasito da malária, independente da espécie, durante o ciclo eritrocítico (MOHANTY *et al.*, 1992). Dessa maneira, a tendência aos menores níveis de HDL nos pacientes acima do peso deste estudo, associaram-se ao aumento da carga parasitária.

### 6.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE O ESTADO NUTRICIONAL E O NÍVEL SÉRICO DE CITOCINAS TNF- $\alpha$ e IL-10

Surpreendentemente, neste estudo não se encontrou diferenças nas concentrações séricas das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 entre os grupos nutricionais, embora a literatura descreva que em indivíduos obesos sem infecções patogênicas e/ou sem manifestações clínicas aparentes (saudáveis) haja elevado nível de citocinas pró inflamatórias.

Nesse sentido, Ahmad e colaboradores (2012), investigaram a expressão de receptores ligados à resposta imune (TLR2 e TLR4) e encontraram forte associação positiva da expressão desses receptores e das citocinas pró inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  em células mononucleares de sangue periférico (do inglês, PBMCs) com o IMC, o que sugeriu a relação entre a modulação dos TLRs com a expressão de citocinas pró inflamatórias em indivíduos obesos. Da mesma maneira, De Loera-Rodriguez e colaboradores (2014) investigaram a concentração de citocinas pró inflamatórias em indivíduos não-diabéticos no México, encontraram níveis elevados de IL-6 e TNF- $\alpha$  em adultos obesos comparados a indivíduos com peso normal.

O estudo de Carvalho e colaboradores (2015) investigou a resposta imune pela dosagem de citocinas pró a antiinflamatórias no cérebro em um grupo de camundongos com obesidade induzida (MSG) infectados pelo *P. berghei* ANKA e encontraram aumento nos níveis de IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-10 nesse grupo em comparação com um grupo de camundongos obesos (MSG) não-infectados, com um grupo de camundongos com peso normal infectados e com um grupo de camundongos com peso normal não-infectados o que pode ter contribuído para a rápida evolução ao óbito.

Em sentido inverso, nesta casuística houve uma correlação negativa entre os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e a CA, a qual representa a obesidade central. A partir de então, sugeriu-se que durante o processo infeccioso gerado pelo *P. vivax* ocorra uma diminuição da concentração dessa citocina nos pacientes com obesidade visceral.

Hillenbrand e colaboradores (2010) estudaram o perfil de citocinas em um grupo de pacientes com choque séptico, em um grupo de obesos mórbidos sem infecções patogênicas e/ou sem manifestações clínicas aparentes (saudáveis) e em um grupo de doadores de sangue com peso normal, encontraram elevados níveis de TNF- $\alpha$  nos pacientes sépticos em comparação aos outros dois grupos.

Na malária, a resposta imune é complexa e vários aspectos ainda são pouco compreendidos. Na malária humana, a resposta imune adquirida naturalmente, pode resultar ou na eliminação do parasito ou em uma resposta persistente mediada por citocinas a qual leva a imunopatologia. Logo, os resultados da infecção depende da regulação recíproca das citocinas pró e anti-inflamatórias (MEDINA *et al.*, 2011).

Extrapolado da sepse, e partindo-se do princípio que a malária cursa com processos inflamatórios que envolvem citocinas pró e antiinflamatórias por mecanismos fisiopatológicos complexos, pode-se considerar a existência de uma “inibição transitória” da TNF- $\alpha$  durante a infecção por *P. vivax*, secundária a dois mecanismos, não excludentes: a) desequilíbrio na resposta imunológica Th1/Th2, com predomínio da resposta Th2; b) elevação dos níveis de cortisol em decorrência do estresse determinado pelo parasito.

A IL-10 participa da regulação da resposta inflamatória desencadeada por citocinas pró inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$ , como um *feedback* negativo pelo bloqueio da síntese destas citocinas e modulação a expressão de moléculas de MHC I e II e silenciamento da expressão gênica do NF- $\kappa$ B o que impede o desenvolvimento de respostas Th1 exacerbadas, envolvidas com a patogênese da doença (PUNSAWARD, 2013). Diversos estudos apontam para o nível sérico de IL-10 elevado na malária causada por *P. vivax* quando comparados aos indivíduos não infectados, provavelmente regulando a produção excessiva de citocinas Th1, especialmente o TNF- $\alpha$  (MEDINA *et al.*, 2011; FREITAS DO ROSARIO; LANGHORNE, 2012; COSTA *et al.* 2014).

Neste estudo encontrou-se associação positiva significativa entre o nível de IL-10 com a parasitemia e associação negativa, porém não significativa, entre o nível de TNF- $\alpha$  com a parasitemia em pacientes acima do peso (sobrepeso e obesos). Semelhante a correlação positiva entre IL-10 e a carga parasitária encontrada por Costa e colaboradores (2014) com pacientes adultos com malária vivax em Coari – Amazonas.

Nesse sentido, Ventura (2010) estudaram crianças e adolescentes com malária vivax no Pará, observou níveis de TNF- $\alpha$  baixos no momento da admissão seguida de elevação em D14, atingiram valores próximos ao do grupo controle sem malária. A autora observou também um comportamento inverso dos níveis de IL-10 (elevados em D0 e baixos em D14). O declínio gradual da IL-10 pode ser entendido como uma consequência natural de interrupção do estímulo que motivou a resposta Th2 nestes pacientes: a infecção malárica. Dados similares ao estudo de Ohnishi (2014) em adultos com malária *vivax* no Pará.

Hugosson e colaboradores (2004) reportaram que em pacientes infectados por *P. falciparum*, o alto nível de IL-10 se relacionou a gravidade da doença pela inibição dos mecanismos efetores de eliminação do parasito. Dessa maneira, especula-se este como um dos fatores responsáveis pelas manifestações clínicas mais intensas, a partir do elevado valor do escore clínico, nos pacientes obesos deste estudo por se considerar: 1) a correlação negativa entre o TNF- $\alpha$  e a obesidade central; 2) a correlação positiva entre a IL-10 e a parasitemia, relacionada à tendência a alta parasitemia nestes pacientes.

Por outro lado, é possível que os níveis de TNF- $\alpha$  estivessem relacionados ao cortisol plasmático, o qual possui ação antiinflamatória e imunossupressora, expressando a interrelação entre os sistemas imune e neuroendócrino. Na vigência de uma infecção, o organismo vivencia uma situação de estresse, o que leva à ativação do eixo HHA (hipotálamo-hipófise-adrenal), com liberação de hormônios, dentre os quais o cortisol, que além de suas funções endócrinas, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimula os linfócitos Th2 à produção de IL-4, IL-10 e IL-13 (ELENKOV *et al.*, 2004).

Libonati e colaboradores (2006), verificaram em pacientes da Região Amazônica infectados pelo *P. falciparum* que o cortisol, no momento do diagnóstico, se encontrava elevado, estando seu declínio associado à diminuição da parasitemia. Além disso, Adam e colaboradores (2007) encontraram correlação positiva entre o nível de cortisol e a densidade parasitária em mulheres grávidas com malária falciparum não-complicada no Sudão. Esses estudos colaboram com a compreensão do resultado de correlação negativa entre os níveis de TNF- $\alpha$  e a obesidade central desta casuística.

De modo geral, o estado nutricional tem um impacto na resposta imune frente às infecções, sendo um importante determinante de risco. Porém, a maioria dos estudos que envolveram os aspectos antropométricos e a malária, limitaram-se à análise do baixo peso e seu reflexo na incidência da doença (FERREIRA *et al.*, 2015). Neste sentido, frente a crescente expansão da obesidade no mundo, o campo da imunometabologia necessita de mais estudos que abordem a temática malária-obesidade.

Este estudo apresenta algumas limitações, tais como: 1) não participação de um grupo de indivíduos de diferentes grupos nutricionais sem malária; 2) não dosagem dos níveis hormonais (como por exemplo, cortisol, leptina e adiponectinas); 3) não seguimento dos pacientes para que pudéssemos mensurar os níveis de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-10) pós-tratamento antimalárico e assim, comparar com os resultados obtidos nesses indivíduos. Entretanto, embasado nessas considerações, pretende-se dar continuidade a essa pesquisa, bem como expandir as análises e instrumentos mais sensíveis empregados objetivando agregar aos resultados apresentados melhor entendimento da doença nesse contexto.

Apesar dessas limitações, este trabalho representa o primeiro estudo de associação entre o estado nutricional baseado na antropometria com ênfase na obesidade com os aspectos clínicos e laboratoriais na infecção pelo *P. vivax*. Como esses resultados são valiosos possuem uma aplicação prática a curto/médio prazo, por exemplo, como ferramenta para erradicação da doença que requer melhor entendimento da interação parasito-hospedeiro-ambiente.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O estado nutricional não apresentou influência na carga parasitária nesta população infectada por *P. vivax*, embora tenha sido observada tendência a parasitemias mais elevadas nos obesos;
- A frequência das manifestações clínicas apresentaram diferenças de acordo com o estado nutricional (obeso, sobrepeso e eutrófico);
- Pacientes obesos apresentaram escore clínico mais alto em comparação aos eutróficos;
- Pacientes obesos apresentaram variações no perfil hematológico e bioquímico na população estudada;
- O nível sérico de citocinas moduladoras da inflamação (TNF- $\alpha$  e IL-10) não diferiram entre os grupos nutricionais (obeso, sobrepeso e eutrófico), entretanto houve uma correlação negativa entre o TNF- $\alpha$  e a circunferência abdominal;
- O nível sérico de citocinas moduladoras da inflamação (TNF- $\alpha$  e IL-10) influenciaram a parasitemia, perfil hematológico, perfil bioquímico e o escore clínico de indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax*.



## REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ADAM I., et al. Cortisol and susceptibility to malaria in pregnant women in an area of unstable malaria transmission in eastern Sudan. **Int J Gynecol Obstet.** 2007; 98: 260-261.

AHMAD, R., et al. Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation. **J Inflamm** 2012; 9: 48-59.

ALEXANDRE, M.A., et al. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis.** 2010; 16: 1611-1614.

ANDRADE, B.B. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malar J.** 2010; 19:13-21.

ANSTEY N.M., et al. *Plasmodium vivax*: Clinical Spectrum, Risk Factors and Pathogenesis. **Advances in Parasitology** 2012; 80: 151-201.

ARANCIBIA, S.A., et al. Toll-like Receptors are key participants in innate immune responses. **Biol Res** 2007; 40(2): 97-112.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diagnóstico Laboratorial da Malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – 2 Ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica – Notificação de Casos de Malária. Relatórios. Resumo epidemiológico, Região Malária. Ministério da Saúde. DATASUS. Disponível em: [http://www.saude.gov.br/sivep\\_malaria](http://www.saude.gov.br/sivep_malaria); acessado em: 10 de agosto de 2015.

CARLTON J.M., et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nature** 2008, 455: 757-763.

CARVALHO R.V., et al. *Plasmodium berghei* ANKA infection results in exacerbated immune responses from C57BL/6 mice displaying hypothalamic obesity. **Cytokine** 2015; 75: 545-548.

CHEN J.; LIU XS. CD4+ T cells development and function of IL-10 IFN- $\alpha$ -secreting. **J Leukoc Biol** 2009; 86: 1-5.

CILDIR G, AKINCILAR SC, TERGAONKAR V. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. **Trends in Molecular Med** 2013, 19:487-500.

COSTA A.G., et al. The robust and modulated biomarker network elicited by the *Plasmodium vivax* infection is mainly mediated by the IL-6/IL-10 axis and is associated with the parasite load. **J Immunol Research** 2014.

DE LOERA-RODRIGUEZ C.O., et al. Over-expression of TLR4-CD14, pro-inflammatory cytokines, metabolic markers and NEFAs in obese non-diabetic Mexicans. **Journal of Inflammation** 2014, 11:39.

ELENKOV IJ. Glucocorticoids and the TH1/TH2 balance. **Ann NY Acad Sci.** 2004; 1024: 138-146.

EXLEY M.A., et al. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. **J Endocrinol** 2014, 223: 41-48.

FERREIRA E.D., et al. Association between anthropometry-based nutritional status and malaria: a systematic review of observational studies. **Malar J** 2015, 14: 346-369.

FERREIRA LC, SILVA HJ, PRADO WL. Relationship between lipid and hematological profiles with adiposity in obese adolescents. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2013, 35(3): 163-166.

FILLOL F., et al. Influence of wasting and stunting at the onset of the rainy season on subsequent malaria morbidity among rural preschool children in Senegal. **Am J Trop Med Hyg** 2009, 80: 202-208.

FREITAS DO ROSARIO AP; LANGHORNE J. T cell-derived IL-10 and its impact on the regulation host responses during malaria. **Int J Parasitol** 2012; 42(6): 549-555.

GENTON B., et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. **PLoS Med.** 2008, 5(6):e127.

HAFALLA, J.C. et al. Cell biology and immunology of malaria. **Immunol. Reviews** 2011; 240: 297-316.

HAN JM; LEVINGS MK. Immune Regulation in Obesity-Associated Adipose Inflammation. **The Journal of Immunology** 2013, 191: 527–532.

HILLENBRAND A., et al. Sepsis induced changes of adipokines and cytokines - septic patients compared to morbidly obese patients. **BMC Surgery** 2010 10:26.

HUGOSSON E., et al. Higher IL-10 levels are associated with less effective clearance of *Plasmodium falciparum* parasites. **Parasite Immunol** 2004; 26: 111-117.

KABYEMELA E., et al. Cytokine profiles at birth predict malaria severity during infancy. **PLoS One** 2013; 8(10): 1-8.

KEEGAN LT; DUSHOFF J. Population-level effects of clinical immunity to malaria. **BMC Infect Dis** 2013; 13(428): 1-11.

LACERDA MVG, et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of Brazilian literature. **Malar J** 2012, 11:12

LEORATTI F.M., et al. Variants in the toll-like receptor signaling pathway and clinical outcomes of malaria. **J Infect Dis** 2008; 198: 772–780.

LIBONATI R.M.F., et al. Some aspects of the behavior of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in patients with uncomplicated falciparum malaria: cortisol and dehydroepiandrosterone levels. **Acta Trop** 2006; 98: 270-276.

LOMBARD M.N., et al. Rodent *Plasmodium* development in livers of genetically obese rats (fa/fa). **Europ J Protist** 1998; 34:78-81.

MANCUSO P. Obesity and lung inflammation. **J Appl Physiol** 2010; 108: 722-728.

MANCUSO P., et al. Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. **J Immunol** 2002; 168: 4018-4024.

MBUGI E.V., et al. Effect of nutrient deficiencies on in vitro Th1 and Th2 cytokine response of peripheral blood mononuclear cells to *Plasmodium falciparum* infection. **Malar J** 2010; 9 (162): 1-14.

MEDINA T.S., et al. Increased interleukin-10 and interferon-gamma levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. **Malar J** 2011; 10: 264.

MENDIS, K.N.; CARTER, R. The role of cytokines in *Plasmodium vivax* malaria. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1992; 87(3): 51-55.

MIKKOKA I., et al. Metabolic syndrome in connection with BMI in young Finnish male adults. **Diab Res Clin Pract** 2007, 76(3): 404-409.

MILLER L.H., et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Med** 2013; 19: 156-167.

MOHANTY S, MISHRA SK, DAS BS et al. Altered plasma lipid pattern in falciparum malaria. **Am J Clin Nutri** 1996, 64: 94-100.

MRAZ M; HALUZIK M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **J Endocrinol** 2014, 222:3-17.

MUELLER I, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet Infect Dis** 2009, 9: 555-566.

NEIL ALL; HUNT NH. Pathology of fatal and resolving *Plasmodium berghei* cerebral malaria in mice. **Parasitology** 1992; 105: 165-175.

OHNISHI, MDO. **Comprometimento pulmonar na malária**: associação com fatores epidemiológicos, imunológicos e variantes do *Plasmodium vivax*. 2014. 147 f. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) – Universidade Federal do Pará, Pará.

PRADHAN V; GHOSH K. Immunological disturbances associated with malarial infection. **J Parasit Dis** 2013; 37(1): 11-15.

PUNSAWAD C. Effect of malaria components on blood mononuclear cells involved in immune response. **Asian Pac J Trop Biomed** 2013; 3(9): 751-756.

ROBERT V., et al. Malaria and obesity: obese mice are resistant to cerebral malaria. **Malar J.** 2008; 7:81-87.

SINGH H., et al. *Plasmodium vivax* malaria: Is it actually benign? **J Infect Public Health** 2011; 4: 91-95.

SMITH A.G., et al. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. **J Nutri** 2007; 137: 1236-1243.

STANISIC D.I., BARRY A.E., GOOD M.F. Escaping the immune system: How the malaria parasite makes vaccine development a challenge. **Trends in Parasitol** 2013; 29: 612-622.

SUN S., et al. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. **Ann Rev Nutr** 2012; 32: 261-286.

TJITRA E., et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. **PLoS Med.** 2008; 17;5(6):e128.

VENTURA A.M., et al. *Plasmodium vivax* malaria in children and adolescents – epidemiological, clinical and laboratory features. **J Pediatr** 1999, 75: 187-194.

VENTURA, AMRS. **Anemia da malária por *Plasmodium vivax***: estudo clínico e laboratorial em crianças e adolescentes. 2010. 157 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

WALTHER M, et al. Distinct Roles for FOXP3 + and FOXP3 – CD4 + T Cells in Regulating Cellular Immunity to Uncomplicated and Severe *Plasmodium falciparum* Malaria. **PLoS Pathog** 2009; 4(5): 1-14.

WHITE N.J. et al. Malaria. **Lancet** 2014; 383: 723–35.

WHO. World Health Organization. **Obesity: Preventing and managing the global epidemic**. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva; 2000.

WHO. World Health Organization. **World Malaria Report 2014**. Disponível em: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/wmr2014\\_no\\_profiles.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/wmr2014_no_profiles.pdf).

WHO. World Health Organization. **Guidelines for the treatment of malaria**. Geneva; 2015.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – PROTOCOLO DE ENTREVISTA

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE DO RECEPTOR *TOLL-LIKE 4* EM  
 RELAÇÃO AO ESPECTRO CLÍNICO, LABORATORIAL E NUTRICIONAL DE PACIENTES COM  
 MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*

#### FICHA CLINICA-EPIDEMIOLÓGICA

Dados Gerais	Data de notificação:			Investigador:			Nº:			
	Nome:						Data de nascimento:			
	Idade:		Sexo ( ) 1 – Masculino 2 – Feminino		Gestação ( ) 1 – Sim 2 – Não 3 – Não se aplica		Estado civil ( ) 1 – Casado/União estável 2 – Divorciado/Viúvo 3 – Solteiro		Raça/cor autodeclarada ( ) 1 – Branco 2 – Preta 3 – Amarela 4 – Parda 5 – Indígena 9 – Ignorado	
	Escolaridade ( ) 0 – Analfabeto 1 – EF incompleto 2 – EF completo 3 – EM incompleto 4 – EM completo 5 – ES incompleto 6 – ES completo				Ocupação nos últimos 20 dias ( ) 1 – Agropecuária 2 – Indústria 3 – Serviços domésticos 4 – Viajante 5 – Comércio 6 – Construção civil 7 – Saúde e serviços sociais 8 – Atividade mal definida 9 – Outros					
	Município provável de infecção:				Localidade:			Zona ( ) 1 – Urbana 2 – Periurbana 3 – Rural 9 – Ignorado		
	Renda familiar ( ) 1 – um salário 2 – mais de 1 até 3 3 – mais de 3 até 5 4 – mais de 5			Uso de medicamento nos últimos 7 dias ( ) 1 – Sim 2 – Não		Descrição do tipo e finalidade:				
	Passado de malária ( ) 1 – Primoinfectado 2 – Progresso		Tempo do último episódio:		Peso:		Altura:		Circunferência abdominal:	

Outros	Viajou ou pernitoou nos últimos 20 dias ( ) 1 – Sim 2 – Não			Motivo:			Local:		
	Tempo de permanência:		Febre no local ( ) 1 – Sim 2 – Não		Outra pessoa com febre ( ) 1 – Sim 2 – Não		Febre após retorno ( ) 1 – Sim 2 – Não		Quantos dias:
	Data do primeiro sintoma:			Sintoma inicial:			Caso autóctone do município de residência ( ) 1 – Sim 2 – Não 9 – Indeterminado		

Dados Clínicos	Sinais e Sintomas	Escore	Sinais e Sintomas	Escore
	Febre		Palidez palmar	
	Calafrio		Palidez conjuntiva	
	Cefaleia		Icterícia	
	Artralgia		Anorexia	
	Lombalgia		Colúria / Hematúria	
	Mialgia		Oligúria / Anúria	
	Astenia		Esplenomegalia	
	Dor abdominal		Hepatomegalia	
	Tosse		Insônia	
	Dispneia		Tonteira	
	Diarreia		Alteração de consciência	
	Náuseas / Vômitos			

A intensidade das manifestações clínicas deverá ser registrada conforme a convenção que se segue:

Sintoma / Sinal	Escore clínico
Febre Calafrio Cefaleia Artralgia Lombalgia Mialgia Astenia Dor abdominal Tosse Dispneia	(0) Ausente (1) Leve (Incomoda pouco) (2) Moderado (Incomoda, limita minhas atividades em parte) (3) Intenso (Incomoda muito, não consigo realizar minhas atividades)
Diarreia Náuseas/Vômitos	(0) Ausente (1) 1 episódio no dia (2) 2 a 3 episódios ao dia (3) 3 ou mais episódios ao dia
Palidez Anorexia Colúria/Hematuria Oligúria/Anúria Hepatomegalia Esplenomegalia	(0) Ausente (1) Presente



## ANEXOS

## ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

INSTITUTO EVANDRO  
CHAGAS/IEC/SVS/MS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE DO RECEPTOR TOLL-LIKE 4 EM RELAÇÃO AO ESPECTRO CLÍNICO, LABORATORIAL E NUTRICIONAL DE PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium vivax*

**Pesquisador:** Carlos Rodrigo Souza do Monte

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

**Versão:** 1

**CAAE:** 35142514.8.3001.0019

**Instituição Proponente:** Núcleo de Medicina Tropical-NMT/ Universidade Federal do Pará - UFPA

**Patrocinador Principal:** Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.219.346

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de estudo transversal-analítico para avaliar a influência do polimorfismo no gene do receptor tolllike 4 nos parâmetros clínicos, bioquímicos, imunológicos e nutricionais de pacientes com malária por *P. vivax*. O material biológico e os dados epidemiológicos, clínicos e antropométricos serão coletados no Laboratório de Ensaios Clínicos em Malária da Seção de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas (LECEM/SAPAR/IEC), em Ananindeua, no Posto de Notificação de Casos de Malária na cidade de Anajás e no Posto de Notificação de Casos de Malária em Itaituba, localizados no Estado do Pará, no período de junho de 2014 a março de 2015. Um grupo controle sem histórico de malária será utilizado para avaliar a frequência do polimorfismo na população.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Investigar a prevalência do polimorfismo no gene do TLR4 em pacientes infectados por *Plasmodium vivax* e sua associação ao espectro clínico, laboratorial e nutricional.

**Endereço:** Rodovia BR-316, Km 07, S/N

**Bairro:** Levlândia

**CEP:** 67.030-000

**UF:** PA

**Município:** ANANINDEUA

**Telefone:** (91)3214-2237

**Fax:** (91)3214-2233

**E-mail:** seac@iec.pa.gov.br

INSTITUTO EVANDRO  
CHAGAS/IEC/SVS/MS



Continuação do Parecer: 1.219.346

**Objetivos Secundários:**

- Estimar a frequência alélica e genotípica da variante no gene TLR4 D299G (Asp299Gly) em pacientes infectados por Plasmodium vivax e em grupo controle sem história pregressa de malária residente de região endêmica;
- Identificar associação entre a presença do polimorfismo no gene TLR4 D299G (Asp299Gly), a intensidade das manifestações clínicas e a parasitemia em pacientes infectados por Plasmodium vivax;
- Identificar associação entre a presença do polimorfismo no gene TLR4 D299G (Asp299Gly), o perfil bioquímico e o perfil hematológico em pacientes infectados por Plasmodium vivax;
- Identificar associação entre a presença do polimorfismo no gene TLR4 D299G (Asp299Gly) e a produção de citocinas moduladoras da inflamação (TNF- e IL-10) em pacientes infectados por Plasmodium vivax;
- Verificar a presença do polimorfismo no gene TLR4 D299G (Asp299Gly) em relação ao perfil nutricional (obeso, sobrepeso e eutrófico) e sua influência no espectro clínico e laboratorial em pacientes infectados por Plasmodium vivax;

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Lancetas estéreis para a coleta de sangue por punção da polpa digital serão utilizadas para obter as gotas de sangue dos participantes e não serão reutilizadas em outros pacientes. A coleta de sangue por punção digital fornece um volume de sangue suficiente para a avaliação proposta e não representa risco significativo para o paciente, embora possa causar algum desconforto. As vezes, um pequeno sangramento e/ou hematomas podem ocorrer. A equipe da avaliação também receberá treinamento para o uso de dispositivos de punção digital e coleta de sangue para minimizar o desconforto para o paciente.

**Benefícios:**

Esta avaliação não trará nenhum benefício direto para os voluntários do projeto e nenhum benefício direto para a comunidade, mas os resultados deste irão ajudar a melhorar as ferramentas moleculares para o diagnóstico da malária nas unidades de saúde e para uso em programas de controle da malária no futuro. Os resultados obtidos neste estudo poderão contribuir na identificação e participação efetiva de genes humanos na modulação da resposta imune, essenciais no estabelecimento de estratégias de imunização contra a doença. Especificamente, estes resultados poderão ainda contribuir na

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N  
 Bairro: Levilândia CEP: 67.030-000  
 UF: PA Município: ANANINDEUA  
 Telefone: (91)3214-2237 Fax: (91)3214-2233 E-mail: seac@iec.pa.gov.br

INSTITUTO EVANDRO  
CHAGAS/IEC/SVS/MS



Continuação do Parecer: 1.219.346

Identificação de polimorfismos em genes do hospedeiro que possam estar envolvidos na produção de citocinas e seus níveis e, portanto, acarretar em maior susceptibilidade e/ou resistência à malária.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa tem como objetivo identificar marcadores clínicos, laboratoriais e nutricionais em pacientes infectados por *Plasmodium vivax* que apresentam polimorfismo no gene do TLR4, o qual se desenvolverá com dois grupos de indivíduos estudados. O grupo 1 será composto por pessoas infectadas com malária e o grupo 2 será composto por pessoas que realizarem o exame para malária, mas que não apresentem a doença.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O presente estudo foi avaliado pelo CEP/NTM-UFPA, apresentando pendências que foram cumpridas e então obteve aprovação deste órgão.

A presente análise se deve ao fato do IEC ser co-participante da pesquisa.

Verificamos que o TCLE não atendia alguns itens que sabemos obrigatórios segundo a resolução CNS 466 de 2012, que foi respaldado pelo manual de orientação sobre pendências em protocolos. Assim é importante que o coordenador realize a inserção do item Garantias, que inclui ressarcimento, Assistência e Indenização.

O texto sobre a amostra não é claro quanto ao número de participantes. Setenta é o total geral? Se sim, qual é o número de participantes por município? Isto é importante porque os objetivos secundários referem-se a comparações da alteração com vários aspectos/fatores do participante da pesquisa. Se o número for total geral, será que todos os objetivos serão respondidos?

**Recomendações:**

Recomendamos que seja acrescentado:

1. Incluir no TCLE o item Garantia, que inclui ressarcimento, Assistência e Indenização.
2. Se possível, tornar claro se o número de 70 participantes é número amostral geral, ou se é de cada município. Se for geral, explicitar o número de participantes em cada município.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 466/12 Publicada no DOU nº 12, 13 de junho de 2013 – Seção 1 – Página 59 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N  
 Bairro: Levilândia CEP: 67.030-000  
 UF: PA Município: ANANINDEUA  
 Telefone: (91)3214-2237 Fax: (91)3214-2233 E-mail: seac@iec.pa.gov.br

INSTITUTO EVANDRO  
CHAGAS/IEC/SVS/MS



Continuação do Parecer: 1.219.348

Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme Res. CNS 466/12, a responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais da pesquisa. Nesse sentido, ressaltamos as seguintes atribuições do pesquisador:

- Apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou a CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa;
- Desenvolver o projeto conforme delineado;
- Elaborar e apresentar os relatórios parcial (is) e final;
- Apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- Manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda responsabilidade, por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa;
- Encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- Justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Declaração_LECEM.pdf	18/05/2014 16:07:56		Acelto
Outros	Declaração_LPBM.pdf	18/05/2014 16:11:34		Acelto
Outros	Declaração_LPIEM.pdf	18/05/2014 16:12:08		Acelto
Outros	Declaração_SAPAR.pdf	18/05/2014 16:12:56		Acelto
Outros	Declaração_SAPAT.pdf	18/05/2014 16:13:20		Acelto

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N  
 Bairro: Levilândia CEP: 67.030-000  
 UF: PA Município: ANANINDEUA  
 Telefone: (91)3214-2237 Fax: (91)3214-2233 E-mail: seac@iec.pa.gov.br

INSTITUTO EVANDRO  
CHAGAS/IEC/SVS/MS



Continuação do Parecer: 1.219.346

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaração_Vinculo_PesquisadorPrincipal.pdf	18/05/2014 16:14:30		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhado_Toll.pdf	18/05/2014 17:20:33		Acelto
Outros	Declaração_IEC.pdf	25/05/2014 17:32:23		Acelto
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	28/05/2014 00:05:34		Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_323585.pdf	28/05/2014 12:16:18		Acelto
Outros	Declaração_Itaituba.jpg	21/11/2014 13:29:57		Acelto
Outros	Declaração_Anaás.jpg	25/11/2014 00:26:03		Acelto
Outros	Declaração_Hemopa.pdf	19/12/2014 15:07:17		Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_323585.pdf	19/12/2014 15:15:41		Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_323585.pdf	21/01/2015 16:57:29		Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_323585.pdf	03/03/2015 13:34:26		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final.pdf	27/05/2015 17:16:43		Acelto
Outros	Carta ao CEP.docx	27/05/2015 17:33:19		Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_323585.pdf	27/05/2015 17:34:31		Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ANANINDEUA, 09 de Setembro de 2015

Assinado por:  
Edvaldo Carlos Brito Loureiro  
(Coordenador)

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N  
Bairro: Levilândia CEP: 67.030-000  
UF: PA Município: ANANINDEUA  
Telefone: (91)3214-2237 Fax: (91)3214-2233 E-mail: seac@iec.pa.gov.br