



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

**INVESTIGAÇÃO DA PREVALÊNCIA DA AMEBÍASE EM
ESCOLARES DO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ – MA**

MARCIA GUELMA SANTOS BELFORT

Belém - Pará

2012

MARCIA GUELMA SANTOS BELFORT

**INVESTIGAÇÃO DA PREVALÊNCIA DA AMEBÍASE EM ESCOLARES
DO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ – MA**

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

Orientadora: Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa.

Belém – Pará

2012

**Dados Internacionais de Catalogação -na- Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

Belfort, Marcia Guelma Santos.

Investigação da prevalência da amebíase em escolares do município de Imperatriz-MA / Marcia Guelma Santos Belfort; orientadora, Edna Aoba Yassui Ishihawa. – 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. Amebíase – Imperatriz (MA). 2. Reação em cadeia da polimerase. I. Ishikawa, Edna Aoba Yassui, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.9353098121



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

MARCIA GUELMA SANTOS BELFORT

INVESTIGAÇÃO DA PREVALÊNCIA DA AMEBÍASE EM ESCOLARES
DO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ – MA

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

Aprovada em: _____

Conceito: _____.

Profa. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa.
Orientadora

Profa. Dra. Tereza Cristina de O. Corvelo

Profa. Dra. Luisa Carício Martins

Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma

À Deus pela força e a dádiva do aprendizado;
À minha Orientadora;
Aos Professores;
Aos colegas de curso.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força recebida e capacitação para o desempenho do trabalho, e por ser um Deus querido que realiza os sonhos de seus amados.

À minha família abençoada, representada por meu esposo Antônio Belfort pelo amor e paciência, apoio dispensado , às minhas filhas Esther Hadassa e Ruth Gabrielle por serem minha motivação e alento nos momentos difíceis , seus sorrisos e pureza são preciosos pra mim.

Aos meus pais Gildásio dos Santos e Maria Alice por serem meus alicerces de vida. À Coordenadora do Curso de Enfermagem Haigle por trazer com ousadia e perseverança o Curso do mestrado da UFPA em convênio com a FACIMP.

Aos colegas Farmacêuticos Milena, Alda , Edem, Lúcio, Franciara que foram guerreiros e determinados , exemplos de perseverança . Ao meu amigo Prof. Guilherme Carvalho pela ajuda no transporte das amostras para Belém. Às alunas do curso de Biologia e Química da UEMA Sara, Leanne e Estelita que somaram com esse projeto para a sua realização, dando exemplo de superação e amizade, meu muito obrigado.

As alunas Raquel, Carla Cristina e Vanessa pelo apoio e compreensão, amizade e solidariedade, vocês são especiais para mim. Não poderia deixar de agradecer as alunas do Curso de Farmácia Carla Bianka, Poliana e Uádila que somaram doando coletores para o projeto. À minha admirável orientadora Prof^a Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa por sua integridade, competência com a qual me direcionou para a elaboração desse trabalho, mesmo à distância desenvolveu sua orientação com clareza e prontidão.

Agradeço a doação das amostras de cultura das Entamoebas que foram gentilmente cedidas pelo Dr. Evander Batista do Departamento de Parasitologia do NMT-UFPA.

A todos os professores da UFPA que ministraram disciplinas em nosso curso, obrigada pela disposição.

Ao querido Prof^o Ayres, exemplo gigante de entusiasmo e paixão pelo o que faz, querido tu és verdadeiramente um milagre de Deus!

“Combati o bom combate, cheguei ao fim do
caminho e mantive a minha fé.”

(1ª epístola a Timóteo. 4:7)

RESUMO

A amebíase é uma infecção causada pela *Entamoeba histolytica* e considerada uma importante causa de morbi-mortalidade no mundo. Estudos relatam uma prevalência elevada da amebíase em regiões tropicais, principalmente em comunidades que vivem em precárias condições sanitárias. O estudo epidemiológico da amebíase tem sido reavaliado desde que a *E. histolytica*, forma patogênica, foi distinta da *E. dispar*, forma não patogênica. O objetivo desta pesquisa foi estimar a prevalência de *E. histolytica* na população de escolares da rede municipal da cidade de Imperatriz (MA). Realizou-se um estudo de corte transversal que envolveu 405 escolares. As amostras foram analisadas através de exame parasitológico, pelo método de sedimentação espontânea, para triagem das amostras positivas para o complexo *E. histolytica/E. dispar*. Os exames positivos para o complexo *E. histolytica/E. dispar* foram posteriormente submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) para diferenciação das espécies. Na PCR foi utilizado para amplificação inicial de um fragmento de 1076 pb, um conjunto de primers externo E1 e E2, seguida por uma PCR Multiplex usando os primers Eh-L/Eh-R e Ed-L/Ed-R para amplificação da *E. histolytica* e *E. dispar*, respectivamente. Não foi diagnosticado pela PCR amostras positivas para *E. histolytica*. A prevalência da *E. dispar* na população de escolares foi de 2,7% (11/405). A PCR se mostrou importante ferramenta para o diagnóstico diferencial das Entamoebas. Porém, estudos de prevalência da amebíase devem ser impulsionados em população com características diferenciadas, a fim de contribuir de forma efetiva para definir a situação epidemiológica desta infecção na cidade de Imperatriz.

Palavras-Chave: Prevalência, amebíase, Reação em Cadeia da Polimerase

ABSTRACT

Amoebiasis is an infection caused by *Entamoeba histolytica* and an important cause of morbidity and mortality worldwide. Studies have reported a high prevalence of amoebiasis in tropical regions, especially in communities living in poor sanitary conditions. The epidemiological study of amoebiasis has been reevaluated since *E. histolytica*, pathogenic form, was distinct from *E. dispar*, non-pathogenic form. The aim of this study was to estimate the prevalence of *E. histolytica* in the population of the municipal city Imperatriz (MA). We conducted a cross-sectional study involving 405 students. By the screening of the complex *E. histolytica* / *E. dispar* parasitological examination was performed using the sedimentation method. The positive samples for *E. histolytica*/ *E. dispar* complex were subjected to polymerase chain reaction (PCR) for species differentiation. For initial amplification by the PCR we used an outer primer set E1 and E2 that amplified a 1076 bp fragment and followed by a multiplex PCR using inner primer set Ed-L/Ed-R and Eh-L/Eh-R *E. histolytica* and *E. dispar* respectively. No sample showing positivity for *E. histolytica*. The prevalence of *E. dispar* in the population was 2.7% (11/405). The PCR proved an important tool for the differential diagnosis of Entamoebas. However, studies on the prevalence of amoebiasis should be conducted in a population with different characteristics, in order to contribute effectively to define the epidemiological situation of this infection in Imperatriz city.

Keywords: Prevalence, amoebiasis, Polymerase Chain Reaction

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	JUSTIFICATIVA	15
3	OBJETIVOS	16
3.1	OBJETIVO GERAL.....	16
3.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
4	REFERENCIAL TEÓRICO	17
4.1	ASPECTOS HISTÓRICOS E A CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA ENTAMOEBA	17
4.1.1	Complexo <i>E. histolytica</i>/ <i>E. dispar</i>	18
4.2	ASPECTOS BIOLÓGICOS E GENÉTICO	19
4.2.1	Morfologia	19
4.2.2	Ciclo biológico	21
4.2.3	Modo de transmissão	23
4.2.4	Estrutura genética	23
4.3	ASPECTOS PATOLÓGICOS E CLÍNICOS	24
4.3.1	Patogenia e virulência	24
4.3.2	Manifestação clínica	25
4.3.3	Tratamento	26
4.4	EPIDEMIOLOGIA	26
4.5	DIAGNÓSTICO	27
5	MATERIAL E MÉTODO	29
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	29
5.2	DESENHO DO ESTUDO	30
5.2.1	Público alvo	30
5.2.2	População em estudo	30
5.2.2.1	Critério de inclusão	30
5.2.3	Tipo de Amostragem	31
5.2.4	Seleção dos alunos	31
5.2.5	Tamanho da amostra	32
5.2.6	Variáveis analisadas	33
5.3	SISTEMATIZAÇÃO NO CAMPO	33
5.3.1	Aplicação do Formulário	34

5.4	ASPECTOS ÉTICOS	34
5.4.1	Procedimentos com os parasitados	34
5.5	DIAGNÓSTICO DO EXAME PARASITOLÓGICO	34
5.5.1	Coleta das amostras de fezes	34
5.6	DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	36
5.6.1	Extração de DNA do material fecal	36
5.6.2	Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	37
5.6.3	Eletroforese em Gel de agarose.....	38
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
6	RESULTADOS.....	39
6.1	CARACTERIZAÇÃO GERAL DA AMOSTRA.....	39
6.1.1	Condições sócio econômicas, ambientais e de higiene dos escolares.....	41
6.1.2	Prevalência da infecção pela <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> por PCR	43
7	DISCUSSÃO	46
8	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE	56
	ANEXO	59

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Cisto da <i>Entamoeba histolytica</i>	19
Figura 2	Ciclo evolutivo de <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	22
Figura 3	Fluxograma do tipo de amostragem	32
Figura 4	Fluxograma do processamento e armazenamento das amostras	35
Figura 5	Mapa da cidade de Imperatriz - Ma. Distribuição dos escolares analisados por bairro selecionado.....	39
Figura 6	Gel de agarose a 1% em TAE	44
Figura 7	Gel de agarose a 1% em TAE	44
Quadro 1	Variáveis sócio-demográficas/indicadores das condições de saneamento e de higiene	33
Quadro 2	Relação de amostras positivadas para <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> em escolares por escola e bairro analisados na cidade de Imperatriz – MA.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição de alunos da rede municipal da cidade de Imperatriz-MA, segundo idade e sexo	40
Tabela 2	Grau de parasitismo em alunos de escola da rede municipal da cidade de Imperatriz – MA	40
Tabela 3	Grau de parasitismo em alunos de escola da rede municipal da cidade de Imperatriz – MA, segundo idade	41
Tabela 4	Situação econômica dos escolares da rede municipal da cidade de Imperatriz – Ma.....	41
Tabela 5	Condições de moradia e sanitária dos escolares da rede municipal da cidade de Imperatriz – Ma.....	42
Tabela 6	Prevalência da <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> através da PCR de acordo com a faixa etária nos escolares da rede municipal da cidade de Imperatriz – Ma	43

INTRODUÇÃO

A amebíase é uma doença negligenciada que acomete cerca de 500 milhões de pessoas em todo o mundo, na maior parte dos países em desenvolvimento, onde as condições de higiene e a educação sanitária são consideradas deficientes. Em torno de 10% dos indivíduos infectados desenvolve a forma sintomática grave causando um sério problema de saúde pública. A amebíase é causada pelo protozoário *E. histolytica*, que pode se manifestar de forma assintomática ou sintomática e que em alguns casos pode ocorrer amebíase extra-intestinal.

Morfologicamente *E. histolytica* se assemelha a *E. dispar*. No Brasil, o número de indivíduos infectados ou com sintomatologia da doença, variando de região para região, no Sul e Sudeste do país, a prevalência varia de 2,5% a 11%, enquanto que na região amazônica atinge até 19%, e nas demais regiões fica em torno de 10%. O diagnóstico da infecção por ameba é feito na rotina através do exame microscópico direto, não permitindo desta forma diferenciar morfologicamente as espécies pertencentes ao complexo *E. histolytica/E. dispar*.

Com base nos diferentes estudos imunológicos avaliando os níveis de anticorpos por ELISA, RIFI e teste de aglutinação, e, também por métodos bioquímicos verificando os perfis isoenzimáticos e com a utilização de marcadores genéticos, vários pesquisadores e a OMS aceitaram a *E. dispar* como espécie diferente apesar de ainda se questionar quanto a patogenicidade de *E. dispar*.

O desenvolvimento de técnicas cada vez mais avançadas que permitem analisar o material genético do parasita, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que é capaz de amplificar um fragmento do DNA *in vitro* com ajuda de enzima termoestável, hoje tornou-se possível processar e distinguir as espécies em *E. histolytica* ou *E. dispar*, possibilitando conhecer a real situação da circulação desses parasitas entre a população de estudo.

2 JUSTIFICATIVA

A Prevalência das amebíases no município de Imperatriz–MA, ainda é desconhecida e o método de diagnóstico laboratorial utilizado na rotina não é diferente dos outros locais. Realiza-se o exame microscópico direto, não permitindo, dessa maneira, distinguir *E. histolytica* de *E. dispar*.

A amebíase é atualmente a segunda causa de mortalidade no mundo causada por protozoário, após a malária, estimando-se que afete aproximadamente 34-50 milhões de indivíduos e seja responsável por 100.000 mortes anualmente (DOGANCI et al., 2004). Entretanto o diagnóstico da amebíase tem sido tradicionalmente feito pela aplicação da coproscopia, que é incapaz de diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar*. A distinção entre as duas espécies vem sendo alvo de vários estudos, desde que Sargeant et al. (1978) demonstraram que a *Entamoeba* patogênica e não patogênica poderiam ser distinguidas individualmente usando a eletroforese isoenzimática (HUSTON e PETRI, 1999a; WALSH et al., 1988).

Estimar a verdadeira prevalência da amebíase não tem sido fácil, porque a maioria das pesquisas foi baseada no resultado da coproscopia, limitando o entendimento da magnitude e epidemiologia desta infecção (PETRI et al., 2000; TANYUKSEL e PETRI, 2003; WALSH, 1986). Isso implica considerar que os dados mais recentes da distribuição da *E. histolytica* no mundo são bem mais reduzidos (BLESSMANN et al., 2002).

Devido a importância do conhecimento da infecção por este parasito, este estudo propõe estimar a prevalência da amebíase em escolares da rede municipal localizada no centro e na periferia de Imperatriz, utilizando tanto o método de diagnóstico tradicional, como também a técnica da PCR com o objetivo de conhecer a real situação da circulação do parasito entre os indivíduos.

Espera-se que os resultados contribuam para um melhor conhecimento epidemiológico da amebíase na cidade Imperatriz–MA, e que possa fortalecer as ações sanitárias futuras no município.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência da *E. histolytica* e *E. dispar* na população de escolares das escolas públicas municipais da cidade de Imperatriz – MA, pela Reação em Cadeia da Polimerase.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estimar a prevalência da *E. histolytica* e *E. dispar* em escolares usuários do sistema público municipal da cidade de Imperatriz - MA;

Indicar o perfil socioeconômico e as condições sanitárias em que vivem os escolares examinados;

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 ASPECTOS HISTÓRICOS E A CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA ENTAMOEBA

Lösch, médico Russo de São Petersburgo, em 1875 observou a presença de parasito nas fezes de um indivíduo com disenteria recidivante, que considerou como agente causador da doença e a nomeou como *Amoeba coli*, (LÖSCH, 1875 apud JACKSON, 1998). Anos mais tarde, em 1886, Kartullis descreveu a ocorrência da ameba em 150 pacientes com disenteria, nos quais demonstrou a presença do parasita em sua forma vegetativa e atribuiu-as como causa da “disenteria tropical” e do “abcesso tropical do fígado” (KARTULLIS, 1886 apud CUNHA; FERRARI, 1994).

Em 1903, Schaudin demonstrou através de seus estudos a existência de dois tipos de ameba infectando o homem, uma patogênica e outra não, denominando a forma não patogênica de *Entamoeba coli* e a patogênica de *Entamoeba histolytica*, devido à extraordinária capacidade deste parasito em lisar tecidos (SHAUDINN 1903 apud JACKSON, 1998).

Na tentativa de explicar o comportamento patogênico de *E. histolytica*, várias teorias foram postuladas como a **teoria unicista** proposta por Dobell em 1919, que sugeria sendo a *E. histolytica* uma única espécie não patogênica, mas que poderia tornar-se virulenta influenciada pela flora bacteriana intestinal ou outros fatores ambientais ainda desconhecidos, causando lesões nos tecidos. No entanto, a **teoria dualista**, proposta por Brumpt em 1925, definiu a existência de duas espécies morfológicamente semelhantes, uma patogênica, *E. dysenteriae* (*E. histolytica*), capaz de produzir doença, e uma não patogênica (*E. dispar*) que viveria no intestino como comensal. Como não existiam meios de distinguir os dois organismos, as idéias de Brumpt tiveram pouca aceitação. Em 1961, Hoare propõe uma nova teoria, a **Teoria pluralista** que diz existir cepas de *E. histolytica* com diferentes graus de virulência, causando desde infecções assintomáticas até formas graves da doença. Entretanto, não explica o fato da amebíase invasiva ser mais frequente em países de clima tropical do que naqueles de clima temperado ou frio (SARGEAUNT E WILLIAMS, 1979; DIAMOND E CLARK, 1993).

A maioria das espécies do gênero *Entamoeba* vive no intestino grosso do homem e, segundo o Comitê de Sistemática da Sociedade Internacional de Protozoologia, o parasita é taxonomicamente classificada como pertencente ao Filo Sarcocystophora; Subfilo

Sarcodina; Superclasse Rhizopoda; Classe Loboza; Ordem Aemoebida; Família Entamoebida; Gênero *Entamoeba* (NEVES, 2008).

4.1.1 Complexo *E. histolytica*/*E. dispar*

Somente a partir da década de 70 a proposta apresentada por Brumpt em 1925 passaram a ser aceitas quando várias pesquisas nas áreas bioquímicas e biologia molecular foram realizadas, dando lhes suporte. Os estudos comparativos entre as espécies *E. histolytica* e *E. dispar* demonstraram diferenças significativas em vários aspectos (DIAMOND, L.S., CLARK, 1993).

Blanc e Sargeant (1991) realizaram a análise do perfil de isoenzimático e apresentaram que a hexoquinase era um marcador de patogenicidade, mostrando diversidade entre as espécies patogênica e não patogênica, porém os experimentos realizados com algumas cepas cultivadas em meio poliaxênico, originalmente consideradas não patogênica, apresentaram um perfil de isoenzimas idênticos às cepas patogênicas quando foram cultivadas em meio axênico, gerando controvérsias em torno do perfil enzimático.

Outros estudos foram utilizados na tentativa de demonstrar a existência de diferenças entre as duas espécies morfologicamente idênticas, como a análise de DNA genômico realizada por Diamond e Clark (1993), que demonstram uma diferença de 2,2% entre as seqüências de genes do rRNA desse protozoários, a aderência de *E. histolytica* a eritrócitos humanos, através de uma lectina de 260 kDa presente na sua membrana plasmática que reconhece os resíduos de galactose e de N-acetil-galactosamina, o efeito citopático observado “*in vitro*” demonstrando que o trofozoíto de *E. dispar* possui uma capacidade restrita de destruir a monocamada do que o trofozoíto de *E. histolytica*, além de *E. dispar* apresentar limitações na capacidade de aglutinação perante a concanavalina A e na resistência a lise pelo sistema complemento (REY, 2008).

Durante décadas, diferentes estudos imunológicas, bioquímicos e genéticos foram conduzidos levando vários pesquisadores e a OMS a acatarem a **Teoria dualista** (DIAMOND & CLARK, 1993; OMS, 1997). Diante das evidências, a literatura tem sido unânime quanto a aceitação da *E. histolytica* e *E. dispar* como espécies diferentes, entretanto, ainda pairam dúvidas no que diz respeito a patogenicidade de *E. dispar*.

4.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS E GENÉTICO

4.2.1 Morfologia

As amebas em geral se distinguem umas das outras pelo tamanho do trofozoíto e do cisto, pela estrutura e pelo número dos núcleos nos cistos, pelo número e formas das inclusões citoplasmáticas (vacúolos nos trofozoítos e corpos cromatóides nos cistos). Deve-se atentar, no entanto, que a distinção entre as espécies é difícil, pois nenhuma delas se diferencia facilmente das demais, principalmente nos trofozoítos a fresco (REY, 2008).

Nas últimas três décadas, as pesquisas apresentaram a existência de duas espécies de amebas morfologicamente idênticas por microscopia ótica, *Entamoeba histolytica*, considerada a espécie patogênica e *Entamoeba dispar* como a não patogênica (DIAMOND & CLARK, 1993). Ambas sobrevivem no intestino humano apresentando duas formas morfológicas bem definidas, a primeira, cisto ou forma de resistência, e a segunda, trofozoíto ou forma vegetativa (NEVES, 2008).

A forma cística ou de resistência, observadas em fezes sólidas ou pastosas do hospedeiro, apresenta estrutura esférica com cerca de 10 a 16 μm de diâmetro, contendo de um a quatro núcleos. A parede é rígida e resistente em virtude da presença de quitina, um polímero de N-acetyl-D-glicosamina e glicoproteínas. No interior da forma cística, observa-se a presença de vacúolos de glicogênio e de corpos cromatóides, que se apresentam em forma de bastonetes com ponta arredondada (Ver figura 1):



Figura 1: Cisto do *E. histolytica/ E. dispar*.
Fonte: Google/imagens / 2012.

Durante o processo de amadurecimento dos cistos, os corpos cromatóides e os vacúolos tendem a desaparecer. Esses corpos cromatóides são estruturas ribossomais que estão envolvidos com a síntese de proteínas (MARTINEZ-PALOMO, 1989; SILVA, 2006).

Os trofozoítos apresentam formas e tamanhos variados, medindo entre 10 e 60 μm . Apresentam forma amebóide, núcleo com cariossoma central e cromatina periférica distribuídos regularmente na membrana nuclear. Esta cromatina é responsável por grande parte da síntese e acúmulo de RNAr, sendo equivalente ao nucléolo (CORDEIRO E MACEDO, 2007).

Em condições adversas, os trofozoítos transformam-se em cistos mononucleados que sofrem divisões nucleares transformando-se em estruturas tetranucleados, cistos maduros, sendo eliminados com as fezes normais ou formados. Normalmente, os indivíduos infectados excretam 45 milhões de cistos por dia. Em caso de infecção por cepa patogênica, os trofozoítos tendem a invadir a mucosa intestinal, multiplicar-se no interior das úlceras e, pela circulação sanguínea, são capazes de alcançar outros órgãos, causando amebíase extra-intestinal, onde não formam cistos e são hematófagos (REY, 2008; NEVES, 2008).

Em relação a *E. histolytica*, esta espécie apresenta trofozoítos com tamanho variando de 20 a 40 μm de diâmetro, podendo chegar até 60 μm em lesões invasivas. O parasito apresenta um único núcleo, podendo exibir com maior frequência a presença de hemácias e com menor frequência leucócitos e bactérias. Possui ainda ribossomos arranjados em hélice formando agregados em barras alongadas com pontas arredondadas, denominados como corpos cromatóides. O protozoário não apresenta mitocôndria, retículo endoplasmático rugoso ou complexo de Golgi, centríolos e microtúbulos, que são organelas diferenciadas e encontradas nas células eucariontes. O núcleo apresenta cromatina periférica com cariossoma esférico, 0,5 μm de diâmetro, normalmente localizado em posição central (CORDEIRO & MACEDO, 2007; NEVES, 2008).

Pela microscopia eletrônica de varredura, é possível observar os pseudópodos, que são projeções citoplasmáticas responsáveis pela movimentação e alimentação do parasito. Uma característica importante é a grande quantidade de vesículas e vacúolos de diferentes tamanhos encontrados no citoplasma, que são responsáveis pela produção e armazenamento da grande quantidade de enzimas capazes de fagocitar e destruir tecidos (SILVA, 2006).

4.2.2 Ciclo biológico

As amebas intestinais possuem um ciclo biológico relativamente simples. Além da forma cística e trofozoítica, são também observados durante o ciclo outras formas evolutivas, o pré-cisto e o metacisto (Figura2). (REY, 2008).

Após a infecção pela forma cística, através de alimentos ou líquidos contaminados, os cistos passam pelo tubo digestivo atingindo o intestino delgado, onde ocorre o processo de desencistamento quando os trofozoítos são liberados e migram para o intestino grosso, se estabelecem alimentando-se de bactérias e restos celulares, crescem e se multiplicam por divisão binária e estes, posteriormente, sofrem o processo de encistamento, originando novos cistos que são eliminados nas fezes (CORDEIRO & MACEDO, 2007, NEVES, 2008).

Na forma não invasiva os trofozoítos permanecem confinados no lúmen intestinal dos portadores assintomáticos, que eliminam os cistos em suas fezes. Na forma invasiva, os trofozoítos invadem a mucosa intestinal multiplicando-se ativamente no interior das úlceras, e através da corrente sanguínea atingem outros órgãos como fígado, pulmão e encéfalo, causando doença extra-intestinal. Durante a formação de cistos, os trofozoítos reduzem seu metabolismo e começam a sintetizar a parede cística. Aparecem no citoplasma inclusões especiais como os corpos cromatóides e os vacúolos de glicogênio. O núcleo sofre divisões múltiplas, podendo dar origem a até quatro novos núcleos, assim voltando a formar cistos, capazes de resistir às condições do meio ambiente externo e assegurar a propagação (ESPINOSA-CANTELLANO & MARTINEZ-PALOMO, 2000).

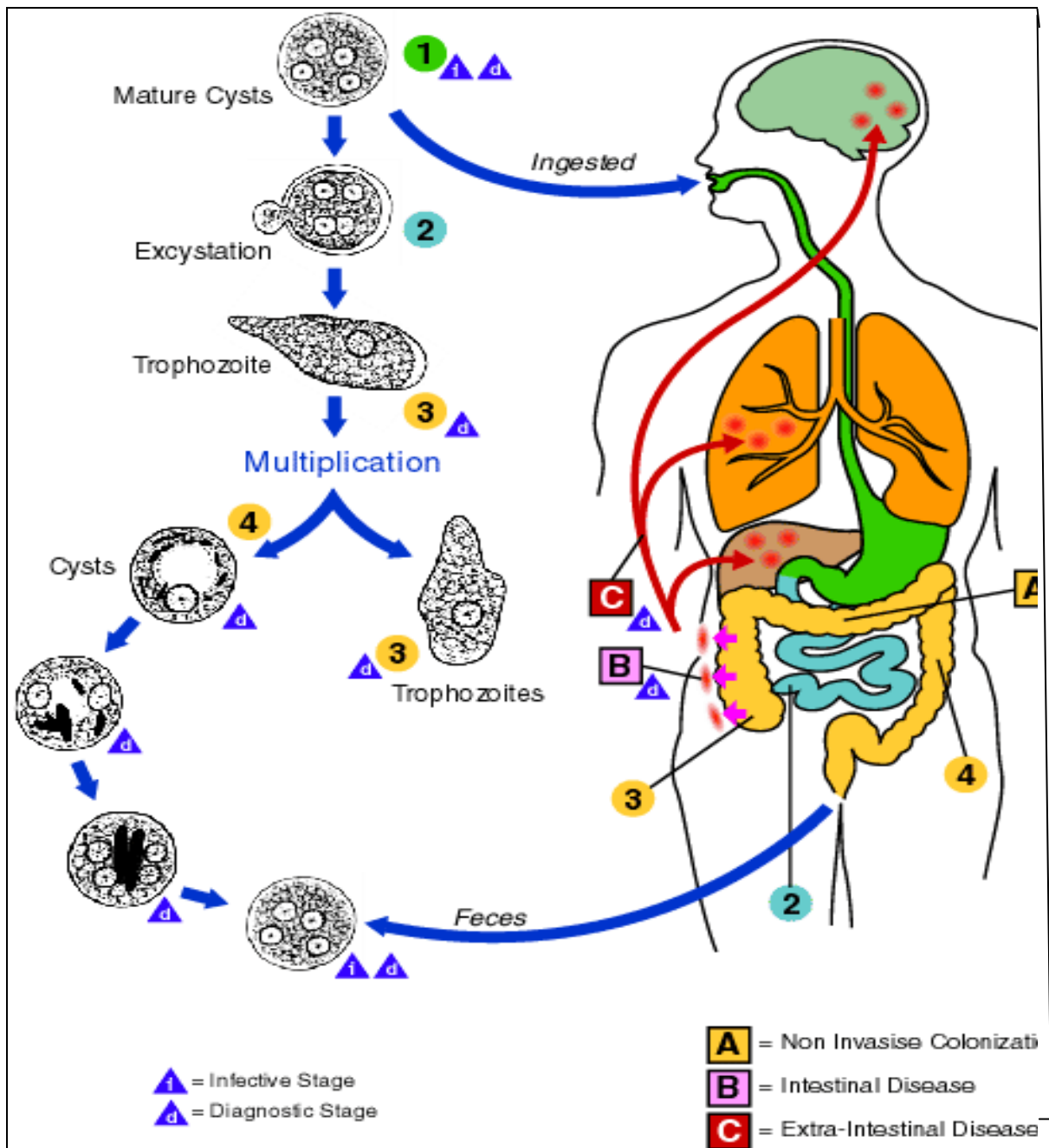


Figura 2: Ciclo evolutivo de *E. histolytica*

Fonte: www.germology.com/Amebiasis_LifeCycle.gif

4.2.3 Modo de transmissão

O homem normalmente se infecta ingerindo a forma cística madura presentes em alimentos e líquidos contaminados ou por qualquer outro tipo de contato fecal-oral (NEVES, 2008)

A transmissão pode ser de maneira direta pelo contato pessoa-pessoa, como observado na transmissão intrafamiliar (SPENCER et al., 1977; BRAGA et al., 2001; ZAKI et al., 2003) e em hospitais de doentes mentais, asilos e presídios onde as condições de higiene são precárias. De maneira indireta, a transmissão pode ser através de vetores mecânicos que podem transportar cistos viáveis ou contaminar alimentos com seus perdigotos ou fezes (RODRIGUEZ, 1985; FERREIRA e ÁVILA, 1996).

Em grupos familiares, o parasito é considerado altamente infectivo, pois há relatos de que um único membro infectado dentro de uma família é considerado importante fator de risco na transmissão (BRAGA et al., 2001).

Os cistos podem permanecer viáveis em ambiente úmido e temperado em média por 12 dias. Podem durar de 9 a 30 dias em material fecal a uma temperatura de 25°C, e em alimentos até 15 dias (RODRIGUEZ, 1985).

Os trofozoítas não são considerados importantes na transmissão por não resistirem ao pH ácido do estômago (REED & RAVDIN, 1995) e resistirem apenas alguns minutos fora do organismo (TANYUKSEL & PETRI, 2003).

4.2.4 Estrutura genética

E. histolytica possui genoma com 23.751.788 pb de comprimento com cerca de 9.938 genes que ocupam 49% do genoma do parasito, com tamanho médio de 1,17 kb (LOFTUS et al., 2005). É um organismo poliplóide com cariótipo 4n ou mais, apresentando um baixo conteúdo GC de 22,4% e composto por cromossomos lineares e pequenas moléculas de DNA circular (BHATTACHARYA et al., 2000).

Existem três tipos de RNAr: 25S, 17S e 5S. O processamento do RNAr 25S origina as subunidades 16S e 5.8S. Dois tipos de RNA polimerases dependente de DNA estão presentes (RNA polimerase I e II) (ALBACH, 1989).

Os genes são separados por pequenas regiões intergênicas menores que 100 kb. Os íntrons são pequenos, com tamanhos entre 45 a 128 pares de bases (pb), tendo em média 65 pb de comprimento. A comparação entre as sequências de nucleotídios das duas espécies e

destas com outros organismos demonstrou uma pequena distância evolutiva entre as mesmas. Com base em seu estudo, estes autores reforçaram o status de espécies diferentes (ORTNER et al. 1997).

4.3 ASPECTOS PATOLÓGICOS E CLÍNICOS

4.3.1 Patogenia e virulência

A patogenia da amebíase está relacionada com a capacidade de síntese e secreção de moléculas responsáveis pela virulência dos trofozoítos e há três mecanismos principais envolvidos: morte contato-dependente, lise osmótica da célula alvo e clivagem de barreiras físicas do hospedeiro. Uma das características de patogenicidade da *E. histolytica* é a morte contato-dependente das células hospedeiras, onde o parasito é capaz de matar uma variedade de tipos de células (BURCHARD e BILKE, 1992; GUERRANT et al., 1981).

O contato inicial entre *E. histolytica*-célula hospedeira é mediado via lectina, localizado na superfície dos trofozoítos que reconhece oligossacarídeos N- e O-ligados presentes na superfície das células-alvo, principalmente galactose e *N*-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc) (CHADEE, et al., 1987; RAVDIN, et al., 1985).

Após o contato entre as moléculas de lectina e os glicoconjugados, ocorre uma mudança conformacional da subunidade maior da lectina, a ameba provoca a lise da célula alvo usando proteínas formadoras de poros, conhecidas como amebaporos e, possivelmente fosfolipases. Os amebaporos se inserem na camada de fosfolipídeos da célula hospedeira e são responsáveis por parte do efeito citolítico da *E. histolytica* por promover mudanças no balanço osmótico das células e cuja atividade depende do pH do meio. (LONG-KRUG et al., 1985; LEIPPE, 1997; LEIPPE et al., 2005).

Geralmente a morte celular ocorre dentro de 5-15 minutos e é seguida por fagocitose. Além dessa função, as lectinas são capazes de proteger os trofozoítos do ataque do sistema complemento, pois parecem possuir similaridade funcional com a proteína regulatória do complemento, a CD59, a qual se liga às subunidades C8 e C9 do complexo C5b-9 (ROLLINS et al., 1991).

As enzimas proteolíticas como cisteína-proteinases são encontradas nos lisados de *E. histolytica* e parecem ser responsáveis pelo processo de invasão, sendo consideradas o fator mais importante de virulência deste protozoário (QUE e REED, 2000). Estas enzimas limitam a resposta imune do hospedeiro, provavelmente devido a sua capacidade em degradar IgG,

clivar o fator de complemento C3 em C3a e C3b e degradar IgA, C3a e C5a (QUE & REED, 1997). (SANTOS e SOARES, 2008).

A virulência e a patogenicidade de cepas de *E. histolytica* pode ser determinada fazendo-se inoculação de trofozoítas em animais de experimentação. A virulência, definida como o número mínimo de trofozoítas necessários para produzir abscesso em fígado de hamster, pode ser medida pelo tamanho e tipo de abscesso (OROZCO et al., 1983). Enquanto que a patogenicidade pode ser determinada pela capacidade do parasito em produzir o abscesso (DIAMOND et al., 1974). Cepas patogênicas mostram diferentes graus de virulência. Embora isolados axênicos de *E. dispar* sejam capazes de induzir resposta inflamatória local quando inoculados em fígado de hamster são considerados não patogênicos por não produzirem lesões necróticas (ESPINOSA-CASTELLANO et al., 1997).

4.3.2 Manifestação clínica

Após a infecção pelo parasita, o período de incubação pode variar consideravelmente de um indivíduo para outro, de uma semana a aproximadamente 3 meses. Segundo Walsh (1986), um em cada dez infectados com *E. histolytica* não desenvolve sintomatologia. Mas, também pode ocorrer casos, como observado por Haque et al. (2002) em que crianças infectadas com *E. histolytica* assintomáticas desenvolveram manifestação clínica dentro de 2 meses, das quais 10% apresentaram diarreia e 4% manifestaram colite amebiana.

Os quadros sintomáticos estão relacionados à forma invasiva da doença e a infecção varia de formas leves a graves, podendo levar o indivíduo à morte. Dependendo da localização onde o parasita se alberga pode causar a amebíase intestinal ou amebíase extra-intestinal. Na amebíase intestinal invasiva são observadas ulcerações nodulares ou irregulares no cólon (especialmente no ceco), região sigmóide e reto (ESPINOSA-CANTELLANO & MARTÍNEZ-PALOMO, 2000), podendo apresentar duas formas sintomáticas de importância clínica conhecidas como colite não disentérica (ulceração e inflamação do cólon) e colite amebiana disentérica. Na amebíase extra-intestinal são observados necrose coliquativa do fígado, amebíase pleuropulmonar e amebíase cutânea (NEVES, 2008; REY 2008)

4.3.3 Tratamento

Embora os métodos parasitológicos permitam a identificação de *E. histolytica*/ *E. dispar*, a diferenciação entre estas duas espécies é recomendada pela WHO/PAHO/UNESCO (1997), pois o tratamento só deverá ser adotado apenas na presença de *E. histolytica*.

Por mais de meio século a emetina foi empregada no tratamento da amebíase, porém, atualmente o seu uso deve ser empregada associada com outras drogas para maior eficácia (REY, 2008).

Com o surgimento das novas categorias de drogas que vem sendo empregadas para atuar em diferentes tipos de infecções (invasiva e não-invasiva), as drogas nitroimidazólicas, incluindo Nitazoxanida, Paromomicina e Niridazol são potenciais no tratamento de infecções por protozoários. Nos casos de infecções não-invasivas podem ser empregada a paromomicina e para os casos das infecções invasivas, os nitroimidazóis, particularmente metronidazol, são o esteio da terapia para amebíase invasiva (BLESSMANN E TANNICH , 2002; HAQUE ET AL., 2003).

4.4 EPIDEMIOLOGIA

A amebíase apresenta ampla distribuição geográfica com alta prevalência nos países das zonas tropicais e subtropicais da África, Ásia, Europa e Américas do Norte e do Sul, onde a população é carente e as condições de higiene e a educação sanitária são consideradas deficientes (WHO/PAHO/UNESCO, 1997). Em países desenvolvidos, onde a transmissão oral-fecal é pouco frequente, a amebíase é mais comumente observada pela crescente migração de pessoas oriunda de países subdesenvolvidos, favorecendo assim a disseminação do parasito por todo o mundo (HAQUE et al., 2003).

Não se conhece a verdadeira freqüência da amebíase no mundo, mas estima-se que existam cerca de 500 milhões de pessoas no mundo infectadas com *E. histolytica*, destes, aproximadamente 40-50 milhões são casos de amebíase invasiva e abscessos no fígado (NEVES, 2000). Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS, mais de 100 mil indivíduos morrem anualmente vitimados pela doença, sendo considerada a segunda principal causa de morte por infecção provocada por protozoário parasito (WHO, 1997).

O parasito compromete indivíduos de todas as faixas etárias e níveis sociais, porém há maior freqüência de amebíase hepática na faixa etária de 30-50 anos, e em homens numa proporção de 4:1 em relação as mulheres (GAYTAN, 1987).

Nas Américas, o México é o país com maior número de casos de amebíase (BRANDT & TAMAYO, 1976). A incidência é de 1.000 casos para cada 100.000 habitantes, o que representa cerca de 1 milhão de casos anuais. O abscesso cerebral é mais raro e parece ser mais comum em crianças do que em adultos (CARRADA-BRAVO, 1989). No verão a incidência da doença é duas vezes maior que no inverno (GARCIA-MANZO et al., 1997).

No Brasil, vários inquéritos epidemiológicos têm sido realizados para se estimar a incidência e a prevalência da amebíase. A doença apresenta grande diversidade no número de indivíduos infectados ou com sintomatologia da doença, variando de região para região. No Sul e Sudeste do país, a prevalência varia de 2,5% a 11%, na região amazônica atinge até 19%, e nas demais regiões fica em torno de 10% (NEVES, 2000).

4.5 DIAGNÓSTICO

A sintomatologia da amebíase é comum a várias doenças intestinais, tornando difícil de ser feito o diagnóstico clínico. No caso de abscesso hepático, além da dor, febre e esplenomegalia, pode-se fazer o diagnóstico através de raios-x, cintilografia, ultrassonografia e tomografia computadorizada. O fato dos sintomas não serem específicos normalmente são confundidos com infecções bacterianas como a shigelose (*S. dysenteriae* e *S. flexneri*) ou com outras disenterias causadas por *Salmonella*, *Campylobacter* ou *Escherichia coli* (VALENZUELA et al, 2009; XIMÉNEZ et al., 2010)

Um dos sintomas mais frequentes na amebíase intestinal é a colite amebiana aguda, na qual o indivíduo apresenta intensas dores abdominais e as fezes contêm muito muco e sangue, geralmente permanecendo nesse estado por um ou dois dias. Podem ocorrer náuseas e vômitos, mal-estar e cefaléia. Com isto os indivíduos infectados apresentam múltiplas evacuações mucóides e de pequeno volume, podendo-se observar diarréia aquosa profusa com presença de sangue, dor abdominal, perda de peso, anorexia e febre em 40% dos casos. (VALENZUELA et al, 2009)

O diagnóstico laboratorial de rotina da infecção por *E. histolytica/E. dispar* da amebíase intestinal é feito a partir do encontro de cistos nas fezes por microscopia ótica, Entretanto, pela incapacidade de diferenciar morfologicamente as espécies pertencentes ao complexo *E. histolytica/E. dispar*, o diagnóstico é presuntivo invalidando a sua utilização em estudos epidemiológicos específicos. A pesquisa de trofozoítos ocorre somente em condições disentéricas (SANTOS E SOARES, 2008)

Com a aceitação de que a *E. histolytica* é uma espécie distinta de *E. dispar*, houve a necessidade do emprego de técnicas alternativas para confirmação da infecção, que foram criadas a partir das diferenças biológicas, imunológicas e genômicas entre estas espécies. (OKAZAKI et al, 1988).

Isolamento do parasito e a realização de testes com isoenzimas apresentam altos custos e tornam estas técnicas impraticáveis no diagnóstico de rotina da amebíase. A detecção de anticorpos por meio de técnicas de ELISA, hemaglutinação indireta, contra-imunoelectroforese, testes de difusão em gel, fixação do complemento, RIFI auxilia no diagnóstico da infecção causada pela *E. histolytica*, entretanto, não distinguem as infecções recentes das anteriores devido à persistência de anticorpos circulantes.

Com o conhecimento de diferenças genéticas entre as cepas de *E. histolytica* e *E. dispar* foi possível desenvolver técnicas mais sensíveis para diagnóstico diferencial das duas espécies. Inicialmente, sondas foram construídas para os testes de hibridização, específicas para zimodemas patogênicos e não patogênicos, respectivamente. Estudos utilizando a análise dos Polimorfismos de Comprimentos de Fragmentos de Restrição (RFLP) mostrou-se importante na diferenciação das duas espécies e os resultados obtidos foram comparáveis aos da análise isoenzimática e de outras técnicas de biologia molecular (TANNICH & BURCHARD, 1991).

Posteriormente, foi desenvolvido a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando dois pares de oligonucleotídeos específicos para as sequências repetitivas de 145 pb e 133 pb, nested-PCR-multiplex para SSU-RNAr que detecta simultaneamente as duas espécies Romero et al., (1992) e Acuña-Soto et al. (1993). O PCR possui vantagens na rotina laboratorial tanto na detecção quanto na diferenciação das espécies pertencentes ao complexo *E. histolytica* / *E. dispar*, além da capacidade de detectar infecções mistas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O município de Imperatriz se localiza no Estado do Maranhão e é considerado a segunda cidade mais populosa, possui cerca de 247.553 habitantes e uma área de 1.367,901 km², sendo 15.480 km² de zona urbana. A cidade de Imperatriz localiza-se a margem direita do rio Tocantins, e é atravessada pela Rodovia Belém-Brasília, situando-se na divisa com o estado do Tocantins. Imperatriz é considerada o maior entroncamento comercial, energético e econômico do estado e o segundo maior centro populacional, econômico, político e cultural do Maranhão. Imperatriz possui uma intensa atividade extrativista, principalmente na reserva do Ciriaco.

Para dar suporte logístico a todas essas atividades, Imperatriz assume postura de capital local, pois através do Complexo atacadista do Mercadinho e do Centro Varejista do Calçadão, a produção do sul do Maranhão, norte do Tocantins e leste do Pará é escoada. Para tanto Imperatriz conta com a Rodovia BR-010 (Belém-Brasília), com um dos maiores rios do país, o Rio Tocantins e com a Ferrovia Norte-Sul e a Estrada de Ferro Carajás. Além disso, por Imperatriz passam as principais linhas de transmissão de energia elétrica do Maranhão e de outros estados. Possui o município o segundo maior PIB do Maranhão e 217º do Brasil com PIB de R\$ 2.000.735,00 milhões, superada apenas pela capital São Luís.

A população do município de Imperatriz, de acordo com o último censo realizado pelo IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, divulgado em 1º de dezembro de 2010, apresenta os seguintes dados:

- População masculina: 119.230 habitantes equivalente a 48,16%,
- População feminina: 128.323 habitantes equivalente a 51,84%,
- Zona urbana: 234.671 habitantes equivalente a 94,80%,
- Zona rural: 12.882 habitantes equivalente a 5,20%,
- Total da população do município: 247.553 habitantes.

Em relação ao clima, oeste maranhense, onde Imperatriz está inserida, está dentro da área de atuação do clima tropical subúmido com médias pluviométricas e térmicas altas. As chuvas distribuídas nos primeiros meses do ano, mas o estado não sofre com períodos de seca. Há somente duas estações bem definidas na cidade, inverno ou estação das chuvas (novembro a março) e verão ou estação da seca (abril a outubro). Os meses em que o frio

predomina novembro a abril (época que começa a chover), e o calor, de abril a outubro. A temperatura média no município oscila entre 20° e 38°, com picos de mais de 40° graus em dias mais quentes. Com sensações térmicas que chegam a 44° mesmo no inverno e chega a bater os 50° no verão. A média pluviométrica do município é de 1.400mm anuais.

Socialmente, Imperatriz possui o segundo melhor IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) do Maranhão. É notável, nos últimos 30 anos, um crescimento desordenado da periferia com aumento substancial do número de invasões e favelas (popularmente as vilas), culminando com uma forte especulação imobiliária o que cria vazios de urbanização dentro do perímetro urbano. No município, o abastecimento de água potável e esgotamento estão sob a responsabilidade da Companhia de Água e Esgoto do Estado do Maranhão - CAEMA. O percentual da população atendida pelo serviço é de 90%, sendo que os povoados e o Conjunto Habitacional Nova Vitória, são abastecidos por poços artesianos.

5.2 DESENHO DO ESTUDO

No presente estudo foi realizado um inquérito epidemiológico pontual do tipo corte transversal, utilizando amostragem proporcional em múltiplos estágios, sendo o comportamento das amostras equivalente ao da população. O inquérito foi realizado no período de Fevereiro de 2012 a maio de 2012.

5.2.1 Público alvo

A população-alvo escolhida foi alunos de escolas municipais da cidade de Imperatriz, na faixa etária de 5 a 15 anos de idade de ambos os sexos. Em Imperatriz, segundo o censo da Secretaria Municipal de Educação e Esporte de Imperatriz (SMEEI), foram listadas 60 escolas municipais com 41.929 alunos matriculados, sendo 21.457 alunos na faixa etária de 5 a 15 anos de idade do ensino fundamental da rede pública municipal.

5.2.2 População em estudo

5.2.2.1 Critério de inclusão

Para participação no presente estudo os critérios de inclusão adotados foram: alunos que estudaram no período da manhã na escola com faixa etária de 5 a 15 anos de idade

que apresentaram assinatura dos responsáveis do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (APÊNDICE A), responderam o formulário (APÊNDICE B) e fizeram a entrega das amostras na data prevista.

5.2.3 Tipo de Amostragem

O método de amostragem dos estudantes foi equiprobabilística em múltiplos estágios, cujas etapas são descritas abaixo:

ETAPA 1 - Estratificação por área administrativa: foi estabelecida uma estratificação das escolas em três áreas: Polo 2 (com sete escolas), Polo 7 (com cinco escolas) e o Polo 9 (com seis escolas), de acordo com a divisão utilizada pela secretaria de educação do Município. Nesta etapa foi feita uma partilha proporcional, ou seja, o número de alunos de cada área presente na amostra era proporcional ao total do número de alunos existente naquela área, na mesma faixa etária.

ETAPA 2 - Estratificação pelo tamanho da escola: em cada polo foram considerados dois estratos: um correspondente às escolas com menos de 200 alunos e outro correspondente às escolas com mais de 200 alunos, com idade menor que 15 anos. A utilização desta divisão considerou a possibilidade de que os alunos que frequentassem as escolas maiores poderiam apresentar características diferentes daqueles que frequentavam as escolas menores.

5.2.4 Seleção dos alunos

Foi executado um sorteio das escolas em cada estrato, escolas menores que 200 alunos (Pólo 2 e Pólo 7) e escolas maiores que 200 alunos (Pólo 9), um sorteio das escolas foi executado aumentando assim a probabilidade proporcional ao número de alunos na faixa etária até 15 anos. Foram sorteadas três escolas para cada divisão. Nas escolas selecionadas foram incluídas todas as salas de aula que tinham alunos com idade de 5 a 15 anos, que estudassem no período da manhã. Participaram da pesquisa todos os alunos que trouxeram as amostras, nos quais os responsáveis tenham assinado o TCLE e responderem o formulário.

5.2.5 Tamanho da amostra

Para a determinação do número de alunos a serem avaliados foram utilizados os seguintes parâmetros: 20% de erro aceitável, intervalo de confiança de 95% e 11% de frequência esperada para o complexo *E. Histolytica* / *E. dispar*. Esta frequência foi estimada por Vianna (2006) que analisaram amostras fecais provenientes de laboratórios de Análises Clínicas da região da grande Belo Horizonte, Manaus-AM (Fundação de hematologia e hemoterapia do Amazonas-AM, Belém-PA (Instituto Evandro Chagas) e Córrego dos Prazeres - MG. O tamanho da amostra foi estimado em 582 alunos, divididos proporcionalmente em três núcleos, conforme Figura 3.

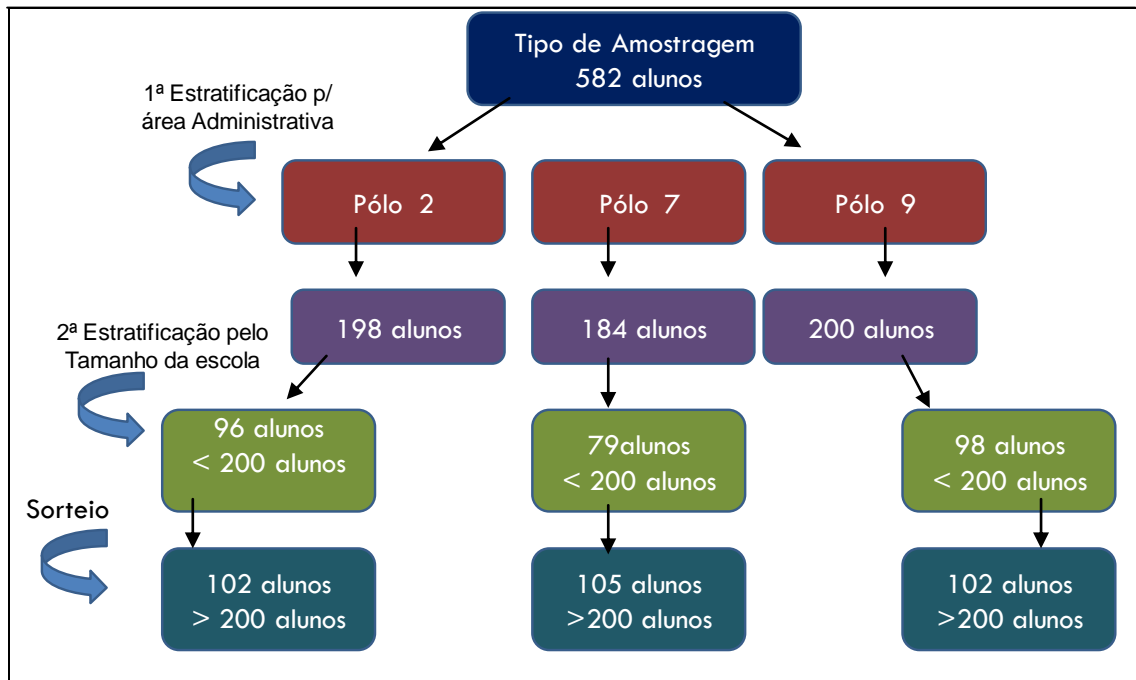


Figura 3: Fluxograma do tipo de amostragem.

5.2.6 Variáveis analisadas

Foram analisadas as variáveis sócio-demográficas sexo, idade, renda mensal, indicadores das condições de saneamento e de higiene. A partir dessas análises foi aplicado um questionário aos responsáveis dos alunos, que foram definidas e categorizadas como mostra o quadro abaixo.

Quadro 1: Variáveis sócio-demográficas/indicadores das condições de saneamento e de higiene.

Variável	Definição	Categorização
Sexo		Masculino / Feminino
Idade	Em anos completos	5-7 8-11 12-15
Fonte de água para beber	Origem da água de beber da casa	Rede Pública: Sim / Não
Água encanada	Domicílio servido de água proveniente de uma rede geral de abastecimento, no domicílio	Sim / Não
Destino dos dejetos	Local onde segue o material de esgoto e sanitário da casa	Fossa / a céu aberto
Sanitário	Se tiver privada em casa	Sim / Não
Tipo de parede	Estilo das paredes da casa	Tijolo / Taipa / Lona e/ou Papelão

5.3 SISTEMATIZAÇÃO NO CAMPO

As etapas para a concretização das atividades de campo obedecerão a ordem abaixo:

1. Autorização para execução da pesquisa pela Coordenação da Secretaria Municipal de Educação (ANEXO A);
2. Reunião com a direção das escolas sorteadas;
3. Explicação sobre a pesquisa nas salas de aula selecionadas e em reunião com os responsáveis;
4. Obtenção da permissão por escrito dos responsáveis pelos alunos;
5. Garantia aos responsáveis, na declaração de consentimento, da privacidade das respostas ao formulário e dos resultados laboratoriais;
6. Aplicação do formulário aos responsáveis pelos alunos.

5.3.1 Aplicação do Formulário

Um formulário foi utilizado como instrumento para obter as informações das variáveis pesquisadas. A aplicação do mesmo foi feito pela investigadora e três estagiários, após treinamento através de um modelo piloto.

5.4 ASPECTOS ÉTICOS

Os responsáveis pelos menores de idade foram esclarecidos quanto à pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Pará – (CEP-UFGA), conforme parecer N° 045 / 2011 - NMT / UFGA (ANEXO B)

5.4.1 Procedimentos com os parasitados

Todos aqueles que apresentaram exame positivo, durante o estudo, foram encaminhados pela pesquisadora ao Posto de Saúde do seu bairro. A prescrição e o acompanhamento clínico foram realizados pelo responsável Enfermeiro ou Médico da Atenção Básica na qual a criança estava cadastrada a fim de receberem tratamento específico.

5.5 DIAGNÓSTICO DO EXAME PARASITOLÓGICO

5.5.1 Coleta das amostras de fezes

As amostras coletadas, uma por aluno, foram entregues pelo responsável pelo menor e acondicionadas em uma caixa de isopor grande com gelo seco e transportadas para o Laboratório da Farmácia Escola da Faculdade de Imperatriz – FACIMP para processamento imediato pelo método de sedimentação espontânea (HOFFMANN et al., 1934). Para tal, 5 g de fezes sem conservante foi diluída em água destilada com auxílio de palito de picolé, em seguida a suspensão de fezes era filtrada em cálice de sedimentação de 200mL com peneira e gaze estéril dobradas em quatro vezes. O volume do cálice era completado com água destilada e deixado em repouso por 2 a 24 horas (REY, 2005).

O diagnóstico foi realizado após a leitura das Lâminas em duplicata pela equipe do Laboratório: a pesquisadora e dois profissionais da área para aumentar a sensibilidade da

pesquisa. , a análise dos parasitos foi realizado em microscópio óptico (100x e 400x) e classificadas de acordo com o resultado do diagnóstico parasitológico como positivas ou negativas para o Complexo *E. histolytica/ E. dispar*. Parte do material fecal foi acondicionado em tubos de ensaio com capacidade para 15mL e colocados em estantes e mantidos aproximadamente a -20°C , para posterior envio até o Laboratório do Núcleo de Medicina Tropical no Setor de Biologia Molecular para análise pelo PCR, conforme Figura 4.

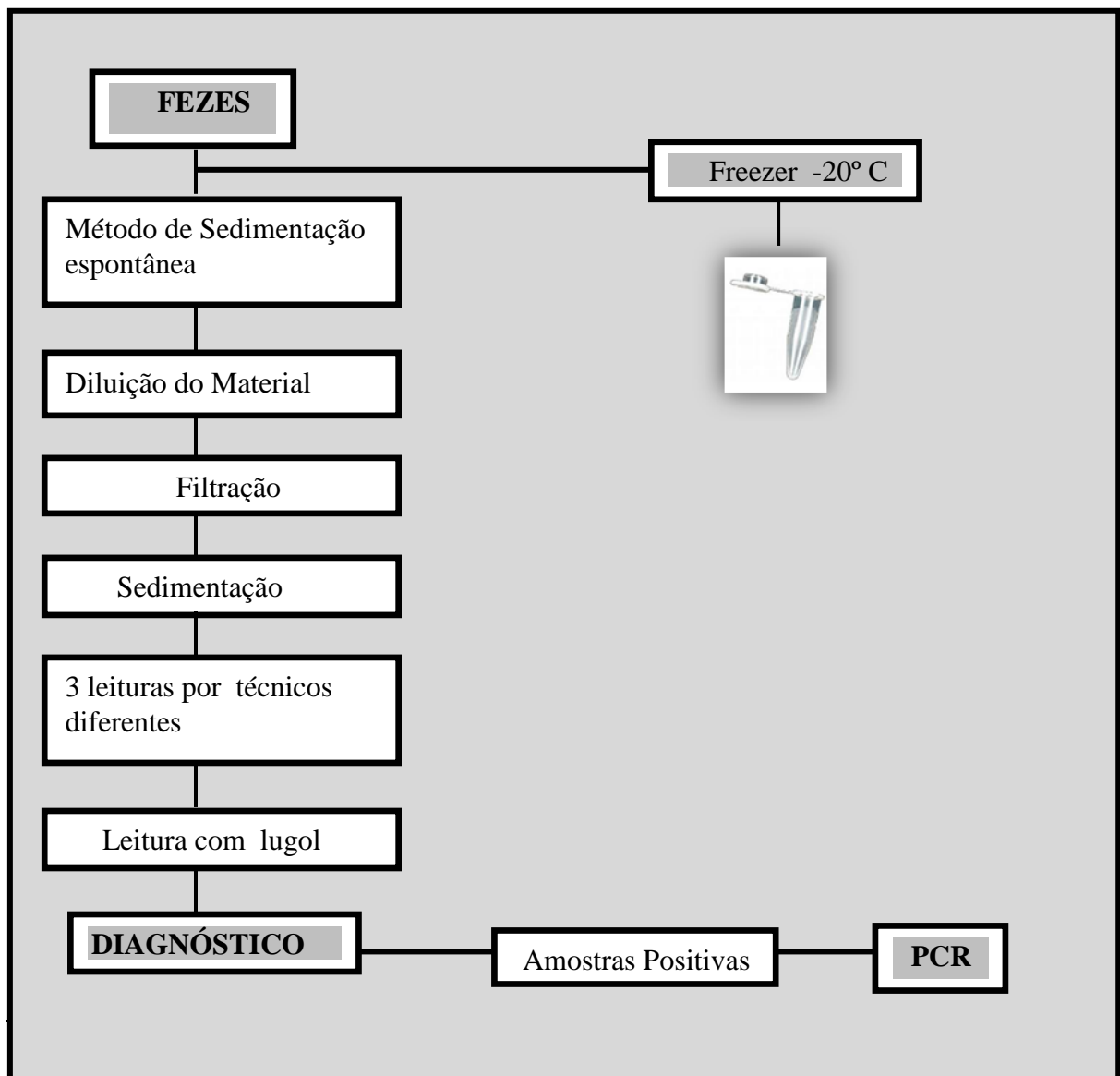


Figura 4: Fluxograma do processamento e armazenagem das amostras.

5.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

5.6.1 Extração de DNA do material fecal

A extração de DNA foi feita a partir de 150 µL de sedimento fecal, em um tubo eppendorf de 2,0 mL. Adicionou-se 1 ml de TE, homogeneizou-se e manteve-se em repouso em TA por 5 minutos. Posteriormente foram centrifugados a 5.000 rpm por 5 minutos. O sedimento da última lavagem foi suspenso com 500 µL de solução de lise, adicionou-se 50 µL de solução de SDS, homogeneizou-se por batidas leves. Aqueceu-se por 15 minutos a 65°C. Colocou-se no gelo por 5 minutos. Adicionou-se 160 µL de 8M de KOAc, e agitou-se no vortex e imediatamente foi colocado no gelo por 30 minutos, para liberar as proteínas. Centrifugou-se por 2 minutos a 14.000 rpm em microcentrífuga (Sanyo) e logo após transferiu-se o sobrenadante para outro tubo. Adicionou-se 500 µL de 6M de Tiocianato de Guanidina. E logo após foi homogeneizado e deixado em repouso por 5 minutos em TA. Foi preparado uma minicoluna (Promega) com microtúbulo de 2 µL e seringa de 5 mL.

Retirou-se o embolo da seringa, e colocou a mistura de Tiocianato de Guanidina, filtrou-se, a fim de capturar o DNA. Colocou-se 2mL de isopropanol na seringa e filtrou-se. Retirou-se a seringa e centrifugou-se a minicoluna a 10.000 rpm por 1 minuto. Transferiu-se microcoluna para um novo tubo de 1,5 mL. Adicionou-se 50 µL de TE preaquecido (60°C), a fim de dilatar a malha para o DNA passar mais rápido. Centrifugou-se a minicoluna a 10.000 rpm por 1 minuto, posteriormente adicionou-se 120 µL de isopropanol e homogeneizou-se. Iniciou-se a reextração. Manteve-se por -20°C por 30 minutos. Logo após, centrifugou-se a 14.000 rpm por 2 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 120 µL de etanol a 75%, para retirar o excesso de isopropanol. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 2 minutos. O etanol foi retirado cuidadosamente. Foi feita a secagem do material em estufa a 37°C por 10 minutos. Re-hidratou-se ou redissolveu-se o DNA em TE (20 µL), em seguida vortex. Em seguida manteve-se por 30 minutos a 37°C. Foi mantido a -20 °C até o momento do uso.

5.6.2 Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada conforme Paglia & Visca (2004) com algumas alterações. Para a amplificação inicial de um fragmento de 1076 pb do gene SSU rRNA de *Entamoeba* foi utilizado um conjunto de primers externo E1 (5`-TGC TGT GAT TAA AAC GCT-3`) e E2 (5`-TTA ACT ATT TCA ATC TCG G - 3`). Seguida por uma PCR Multiplex adicional para diferenciar as duas espécies, usando os primers internos : Eh-L/Eh-R (5`- ACA TTT TGA AGA CTT TAT GTA AGT A-3` / 5`- CAG ATC TAG AAA CAA TGC TTC TCT- 3`) para *E.histolytica*, amplificando um fragmento de 427 pb, e Ed-L/Ed-R (5`- GTT AGT TAT CTA ATT TCG ATT AGA A- 3` / 5` -ACA CCA CTT ACT ATC CCT ACC - 3`) para *E.dispar*, obtendo-se um fragmento de 195 pb . Para PCR foi realizado uma mistura de 50 µL de reação, que incluiu 10x PCR buffer [200mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl], 2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 25 pmol de cada iniciador, 0,7U Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2 µL de DNA extraído.

Em um termociclador (biocicler) programado, a reação foi incubada a uma temperatura inicial de 95°C por 3 minutos; seguida de 40 ciclos(desnaturação) nas seguintes temperaturas: 94°C por 50 s, 50°C por 90 s e 72°C por 2 minutos . Após os 40 ciclos, a etapa de extensão da molécula foi a 72°C por 7 minutos. Uma alíquota de 5 µL da primeira PCR foi utilizada como molde para reações de PCR Multiplex. Em uma reação foram utilizados os pares Eh-L e Eh-R e os pares Ed-L e Ed-R, utilizando as mesmas condições de reação e ciclos utilizados para E1 e E2, alterando apenas a temperatura de ligação de 50°C para 58°C.

Foi realizada a técnica de PCR utilizando um par de marcadores para amplificar um fragmento de 1.076 pares de bases do gene da SSU do rRNA de ambas as espécies, *E. histolytica* e *E. dispar*, utilizando os iniciadores E1 (5-TGC TGT GAT TAA AAC GCT-3) e E2 (5-TTA ACT ATT TCA ATC TCG G-3). Para diferenciar as espécies foram utilizados um segundo PCR utilizando pares de iniciadores Eh-L (5-ACA TTT TGA AGA CTT TAT GTA AGT A-3) e Eh-R (5-CAG ATC TAG AAA CAA TGC TTC TCT-3) para *E.histolytica* , produzindo um fragmento de 427 pares de bases e Ed-L (5_-GTT AGT TAT CTA ATT TCG ATT AGA A-3) e Ed-R (5-ACA CCA CTT ACT ATC CCT ACC-3_) for *E.dispar* , produzindo um fragmento de 195 pares de bases. Como controles positivo para *E. histolytica* e *E. dispar* foi utilizado DNA extraído de parasitas provenientes de cultura padrão axênica para ambas espécies.

5.6.3 Eletroforese em Gel de agarose

O produto de PCR foi aplicado em gel de agarose a 1% em tampão TAE (89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3) com 2 microlitros da solução de azul de bromofenol, sendo submetida a 100 Volts e 50 mA por 1 hora. O fragmento amplificado de DNA foi corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL e as bandas foram visualizadas em transluminador UV. As imagens foram capturadas e fotodocumentadas pelo equipamento Vilber Loumart.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram processados no programa de estatística Bioestat versão 5.0 (2010). A significância estatística da associação da infecção pela *E. histolytica* foi avaliada pelo *Qui-quadrado*, com um intervalo de confiança (IC) de 95%, com o valor de *p* igual ou menor que 0,05. Foi aplicado o teste de Fisher, quando o número de casos era menor do que cinco. Foi aplicado o *Qui-quadrado* para comparar proporções e médias em relação à idade, estratificada em faixas etárias.

Tabela 1: Distribuição de alunos da rede municipal da cidade de Imperatriz - MA, segundo idade e sexo.

Faixa etária (anos)	SEXO		Total
	Masculino	Feminino	
5-7	23 (5,70%)	34 (8,30%)	57 (14,00%)
8-11	98 (24,19%)	91 (22,40%)	189 (46,70%)
12-15	77 (19,00%)	82 (20,20%)	159 (39,30%)
Total	198 (49,00%)	207 (51,00%)	405 (100,0%)

$$\chi^2 = 5,68$$

$$p = 0,0585$$

Um total de 45.7% (185/405) dos escolares estavam parasitados por pelo menos uma espécie de protozoário e/ou helmintos ($p < 0,05$).

A Tabela 2 mostra o grau de parasitismo em alunos de escola da rede municipal da cidade de Imperatriz - MA.

Tabela 2: Grau de parasitismo em alunos de escola da rede municipal da cidade de Imperatriz - MA.

	TIPO DE PARASITISMO		
	Masculino	Feminino	Total
Monoparasitismo	77 (19,01%)	70 (17,29%)	147 (36,3%)
Biparasitismo	15 (3,70%)	15 (3,70%)	30 (7,40%)
Poliparasitismo	6 (1,48%)	2 (0,49%)	8 (1,97%)

Tabela 3: Grau de parasitismo em alunos de escola da rede municipal da cidade de Imperatriz - MA, segundo idade.

PARASITISMO			
Faixa etária (anos)	Monoparasitismo	Biparasitismo	Poliparasitismo
5-7	36 (8,89%)	13 (3,20%)	3 (0,74%)
8-11	89 (21,9%)	12 (2,97%)	5 (1,23%)
12-15	22 (5,43%)	5 (1,23%)	0 (0,00%)
Total	147 (36,3%)	30 (7,40%)	8 (1,97%)

6.1.1 Condições sócio econômicas, ambientais e de higiene dos escolares

A situação econômica dos escolares foi investigada através da renda familiar onde 26,18%(106/405) era abaixo de um salário mínimo,46,6%(189 /405) um salário mínimo, 27,16%(110/405) tinham renda de acima de um salário mínimo. As condições de saneamento e habitação foram referidos que a maioria das residências dos alunos era abastecida com água encanada (93,09%), tinham água tratada para beber (77,29%), e 91,11% (369/405) possuíam fossa em suas residências. Quando foi perguntado quanto aos hábitos de higiene dos escolares,os responsáveis relataram que 44,93% (187/405) andavam calçado, 81,98% (332/405) mantinham mãos e unhas limpas e cortadas, 77,53% (311 /405) lavavam as mãos antes de comer e depois de defecar e 87,90% (356 /405) protegiam os alimentos dos vetores.

Tabela 4: Situação econômica dos escolares da rede municipal da cidade de Imperatriz - Ma.

Situação sócio econômica (n=405)	n	Avaliados %
Renda familiar		
Abaixo de um salário	106	26,18%
Um salário	189	46,66%
Acima de um salário	110	27,16%

Tabela 5: Condições de moradia e sanitária dos escolares da rede municipal da cidade de Imperatriz - Ma.

Condições de Moradia (n=405)	N	Avaliados %
Tipo de moradia		
Construída*	361	89,13%
Madeira	32	7,90%
Taipa	12	2,97%
Tipo de Piso		
Cerâmica - cimento	347	85,68%
Chão batido	58	14,32%
Destino dos dejetos		
A céu aberto	36	8,88%
Fossa construída	308	76,04%
Fossa aberta	61	15,08%
Aspectos das ruas		
Calçado/asfalto	277	68,40%
Chão bruto	128	31,60%
Esgoto		
Canalizado	267	65,92%
Céu aberto	138	38,08%
Procedência do consumo da água		
Poço	21	5,18%
Encanada	377	93,09%
Riachos	5	1,23%
Mineral	2	0,50%
Qual o tratamento da água		
Cloro	71	17,53%
Filtro	215	53,09%
Ferve	27	6,67%
Não trata	92	22,71%

6.1.2 Prevalência da infecção pela *E. histolytica* e *E. dispar* por PCR

Das 11 amostras positivas à microscopia para o complexo *E.histolytica/E.dispar* submetidas à PCR, não houve positividade para espécie *E.histolytica* e 2,7%(11/405) foi positiva somente para *E.dispar*. Observou-se uma maior percentagem de infectados pela *E.dispar* no grupo de 8 a 11 anos (4%) (Tabela 7).

Tabela 6: Prevalência da *E. histolytica* e *E. dispar* através da PCR de acordo com a faixa etária nos escolares da rede municipal da cidade de Imperatriz - Ma.

Faixa etária (anos)	n	%	<u>Diagnóstico</u>	
			<u>PCR</u>	
			<i>E.h</i> *	<i>E.d</i> **
5-7	158	39,01%	0 (0,0%)	4 (2,5%)
8-11	171	42,22%	0 (0.0%)	7 (4,0%)
12-15	76	18,77%	0 (0.0%)	0 (0,0%)
Total	405	100,0%	0%	11 (2,7%)

*E.h - Infecção por *Entamoeba histolytica*

** E.d - Infecção por *Entamoeba díspar*.

A Figura 6 mostra a amplificação das amostras pela PCR com primers E1/E2, todos amplificaram em torno de 1.076pb e a figura 7 mostra a amplificação pela multiplex-PCR com primers Eh-R/Eh-L e Ed-R/Ed-L. A *E. dispar* amplifica um fragmento de 195 pb.

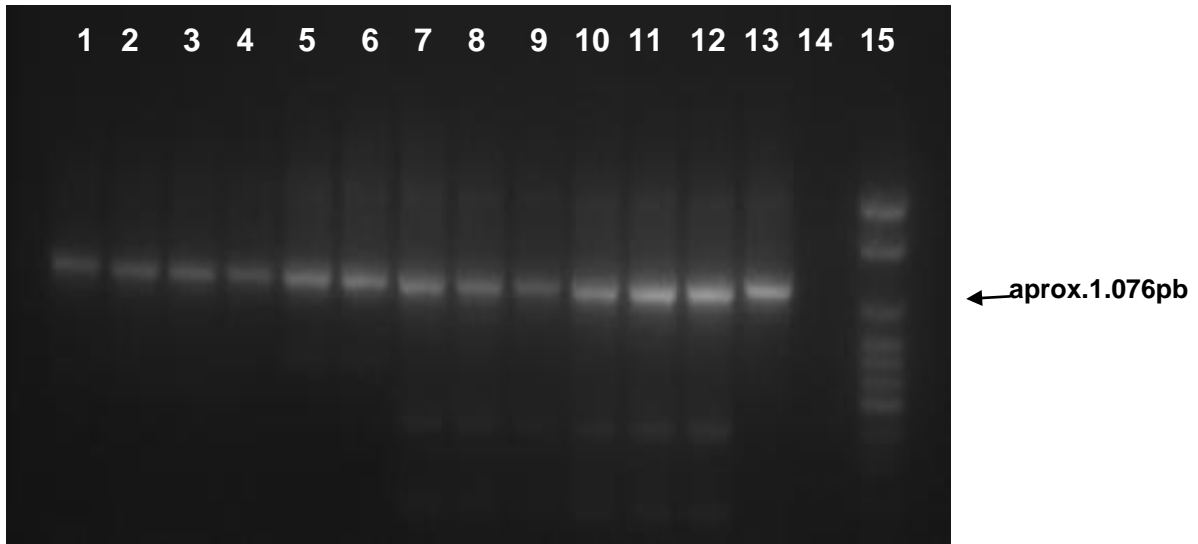


Figura 6: Gel de agarose a 1% em TAE. Posição 1-11: amostras; posição 12: *E. dispar*; posição 13: *E. histolytica*; posição 14: controle negativo; posição 15: marcador de peso molecular 100pb.

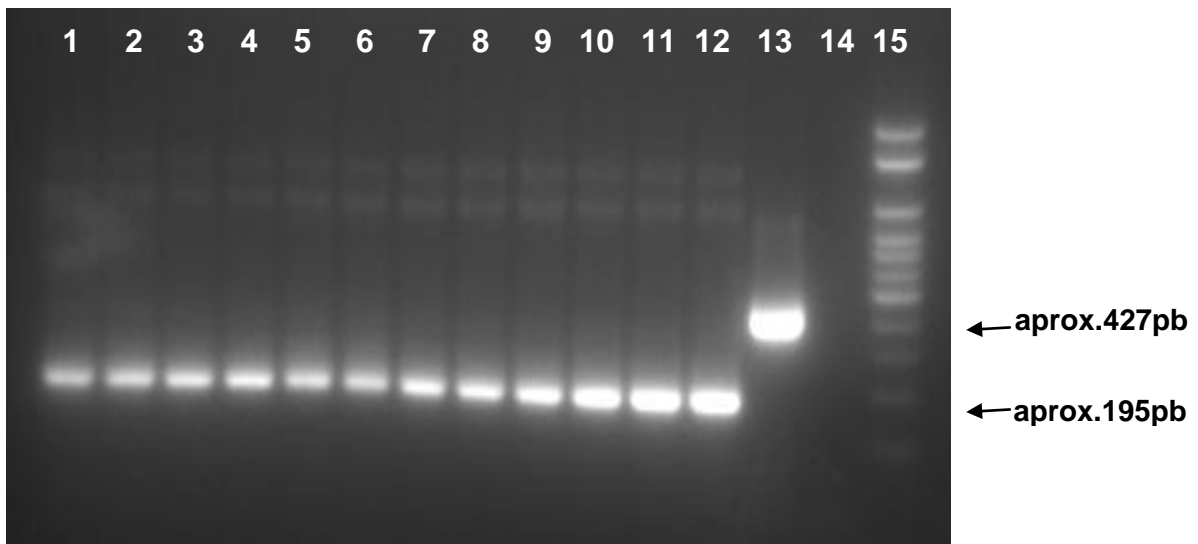


Figura 7: Gel de agarose a 1% em TAE. Posição 1-11: amostras; posição 12: *E. dispar*; posição 13: *E. histolytica*; posição 14: controle negativo; posição 15: marcador de peso molecular 100pb.

No quadro a seguir consegue-se verificar a relação das amostras positivadas para o complexo *E.histolytica* / *E.dispar* das escolas analisadas do município de Imperatriz - MA.

Quadro 2: Relação de amostras positivadas para *E.histolytica* e *E.dispar* em escolares por escola e bairro analisados na cidade de Imperatriz - MA.

Escola Machado de Assis (MA) – Bairro Vila Nova		
MA 43		<i>E. dispar</i>
MA 69		<i>E. dispar</i>
MA 83		<i>E. dispar</i>
MA 88		<i>E. dispar</i>
Escola Frei Monoel Procópio (FMP)- Beira Rio		
FMP 49		<i>E. dispar</i>
Escola Euclides da Cunha Lemos (EL) – Bairro São José		
EL 09		<i>E. díspar</i>
Escola Paulo Freire (PF) – Bairro Cafeteira		
PF 19		<i>E. díspar</i>
PF 21		<i>E. díspar</i>
PF 33		<i>E. díspar</i>
Escola Santa Maria (SM) – Bairro Nova Imperatriz		
SM 19		<i>E. díspar</i>
SM 29		<i>E. dispar</i>
Escola Giovani Zanni (GZ) – Bairro Bacuri		
Amostras negativas para o complexo <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i>		
Escola Renato Moreira (RM)- Bairro centro		
Amostras negativas para o complexo <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i>		
Escola Wady Fiquene (WF) – Nova Imperatriz		
Amostras negativas para o complexo <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i>		
Escola Costa e Silva(CS) – Nova Imperatriz		
Amostras negativas para o complexo <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i>		

7 DISCUSSÃO

A prevalência da amebíase no município de Imperatriz no estado do Maranhão até então era desconhecida, esse foi o primetiro estudo dirigido especificamente para verificação epidemiológica da amebíase no município maranhense. Para tanto foi utilizado a microscopia como triagem e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para determinar a forma específica das *Entamoebas histolytica* e *dispar*.

A prevalência de *E. histolytica* em alunos de escolas públicas da cidade de Imperatriz , foi de 0% (0/405), e *E. dispar* 2,7% (11/405) determinada pelo teste Multiplex PCR . O resultado do diagnóstico laboratorial foi entregue aos responsáveis pelos escolares após a confirmação da PCR. Segundo Tanyuksel e Petri (2003),a microscopia é incapaz de distinguir a *E. histolytica* da *E. dispar*, que são morfologicamente semelhantes. Há de se considerar, porém, que o emprego da microscopia das fezes, devido à sua praticidade e baixo custo, continua a desempenhar seu papel, no suporte para o diagnóstico de várias parasitoses.

O exame microscópico é a única ferramenta dos médicos para o diagnóstico da amebíase no município de Imperatriz. Isso implica em que todos os pacientes que apresentam o complexo *E.histolytica/E.dispar* são encaminhados para tratamento de amebíase, mesmo os assintomáticos. Para minimizar esse contexto foi feito uma triagem da seguinte forma: os escolares que apresentaram-se infectados por helminto e/ou protozoários patogênicos foram encaminhados ao posto de saúde mais próximo de sua casa para obterem tratamento específico sob orientação médica. Os escolares que apresentaram somente parasitos comensais, foram alertados quanto as noções de higiene e saúde.

A baixa prevalência de *E.dispar* 2,7% (11/405) e a ausência de positividade para *E.histoytica* no município de Imperatriz , contrastam com estudos feito por Braga et al. (2001) que analisaram amostras de fezes de 735 indivíduos na cidade de Fortaleza – CE. Os resultados encontrados por esses pesquisadores mostraram uma prevalência de *E. histolytica* de 14,9% e de 25,4% para *E. histolytica* / *E. dispar*. Já Gomes et al. (1997) realizou um estudo em 1.000 estudantes da cidade de Palmeira dos Índios, Alagoas e encontrou uma taxa de prevalência de 18,8%.A diferença marcante na prevalência entre estas pesquisas e o atual estudo realizado com 405 amostras de alunos de 09 escolas públicas de cidade de Imperatriz, se deu provavelmente pela aplicação do exame específico como também pelas condições ambientais específicas.

A ausência da infecção por *E.histolytica* pelo diagnóstico da PCR entre os 405 escolares pesquisados na cidade de Imperatriz, e a positividade de 11 amostras para *E.dispar*, corrobora com estudo realizado por Pinheiro et al. (2004) que analisou 1437 amostras de indivíduos residentes em municípios de Pernambuco observando a prevalência de *E. histolytica* / *E. dispar* de 4,1%, com grande chances de ser *E.dispar* e não detectaram a presença de *E. histolytica* pela aplicação do método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Concordamos com os autores quando é atribuída a presença da *E.dispar* a falta de saneamento básico e precárias condições de higiene.

A escolha da triagem utilizada para o diagnóstico das entamoebas ; a falha na análise microscópico ; a inespecificidade no método coprológico podem ter interferido nos resultados de prevalência para confirmar a infecção de *E. histolytica*/*E. dispar*. Uma escolha de um método que apresente maior segurança na investigação molecular pode ser uma tentativa corretiva nesse estudo. Talvez a utilização do teste imunoenzimático *ENZYMEBA*® não só para as amostras positivas à microscopia, mas também para todas as 405 amostras , a fim de evitar o viés da subjetividade microscópica , e assim venha corrigir a técnica utilizada pelo presente trabalho que utilizou a sedimentação espontânea como triagem . O teste de *ENZYMEBA*® consiste no ensaio imunoenzimático em fase sólida, para pesquisa de histolisina, uma protease excretada pela *E. histolytica*/*E. dispar* e permite detectar a infecção por uma ou ambas as espécies do complexo *E. histolytica*/*E. dispar*. Este teste apesar de não discriminar as duas espécies de ameba nas amostras positivas à microscopia pode servir como controle de qualidade do exame parasitológico, uma vez que confirma com precisão o exame microscópico e apresenta sensibilidade e especificidade maior que 90%, quando comparada a três exames coprológicos .Essa metodologia foi empregado em trabalhos realizados em colaboração pelo Dr. Luis Fonte do Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, segundo descrito na literatura (GALINDO *et al.*, 1998^a) .

Uma das limitações desse estudo da amebíase em Imperatriz , pode ter sido na excreção intermitente dos cistos. Particularmente nos indivíduos que são portadores assintomáticos ou que não têm colite disentérica, que excretam os cistos de forma intermitente. O exame de três amostras em dias separados aumenta a chance de identificação dos infectados em 60–80% (WALSH, 1986).

É importante salientar que os alunos selecionados para o estudo da prevalência de *E. histolytica* na cidade de Imperatriz(MA) eram assintomáticos e com aparências saudáveis. A OMS (WHO,1997), esclarece que nos pacientes sintomáticos, não se deve assumir a *E. histolytica* como sendo a causa dos sintomas, por isto, outras explicações precisam ser

consideradas. Nos indivíduos assintomáticos o tratamento não é apropriado, a menos que existam razões para suspeitar de infecção pela *E. histolytica*, por exemplo, títulos altos de anticorpos específicos, história de contato com amebíase invasiva ou um surto de amebíase. Schnack et al. (2003) detectou uma alta prevalência de *E. histolytica*, 56,4% em criança com menos de 5 anos que apresentavam diarreia na cidade de Criciúma (SC). Os estudos de Haque et al. (2003) também evidenciaram isto, entretanto, na análise da amostra dos indivíduos em relação à presença de *E. histolytica* demonstrou que 25% dos indivíduos infectados pela *E. histolytica* residiam próximos e tinham contatos diários, o que pode sugerir a possibilidade de transmissão entre os mesmos. Um estudo na cidade de Imperatriz, em população sintomática trabalhando com faixas etárias mais amplas, possivelmente poderá demonstrar se ocorreu uma subestimativa da doença no município e para isto se faz necessário empregar métodos possíveis que permitam confiabilidade para o diagnóstico da infecção pela *E. histolytica*.

Entre as amostras analisadas na microscopia constatou-se que 185 escolares encontravam-se infectados por algum tipo de helminto ou protozoário como o *Trichuris trichiura* 6,17% (25/405), *Ancilostomídeos* 7,1%(29/405) e *Ascaris lumbricoides* 24% (98/405) entre outros. O protozoário mais prevalente foi a *Entamoeba coli* 23% (95/405). Os resultados do estudo dos 405 estudantes de escolas municipais, na faixa etária de 5 a 15 anos de idade cidade de Imperatriz (MA), assemelham-se com estudo feito por Santos et al. (2001), que estudou 454 alunos de 6-10 anos de escolas públicas da cidade de Maceió, e identificou como parasitos mais frequentes: *Ascaris lumbricoides* (22%), *Giardia lamblia* (9,9%), *Trichuris trichiura* (6,7%), *Ancilostomídeos* e a infecção pela *E. coli* foi a de maior prevalência entre os protozoário.

A análise das amostras dos escolares quanto a presença dos protozoários *E. dispar* e *E. coli* pela microscopia, demonstrou que 3 infectados pela *E. dispar* eram irmãos e 7 dos escolares infectados pela *E. coli* estudavam na mesma sala de aula e residiam em bairro de periferia aonde as ruas são de chão bruto e não há rede de esgoto, o que pode sugerir a transmissão entre eles, com o meio ambiente ou no próprio convívio familiar.

Dos parasitas intestinais diagnosticados na microscopia, das 185 amostras positivas para helminto e ou protozoário, 1% (2/185) das amostras positivas para *E. dispar* apresentavam coinfeção com *Giardia sp*; 3,2%(6/185) com *E. coli* e 0,5% (1/185) com *Hymenolepis nana*. A ausência ou insuficiência de condições ideais de saneamento básico e precárias práticas de higiene pessoal e doméstica pode justificar a presença de coinfeção nos escolares, pois a faixa etária que mais evidenciou a infecção foi de 5 a 7 anos de idade. Devido à escola ser um dos primeiros ambientes externos ao doméstico que a criança

frequente, acaba se tornando um potencial ambiente de contaminação, quando os usuários não apresentam conhecimento ou a mínima preocupação de higiene.

A prevalência da *E. dispar* 2,7%(11/405) observada na cidade de Imperatriz é consistente com estudos feitos por Evangelopoulos et al. (2001), no primeiro estudo realizado na Grécia após definição da *E. histolytica* como duas espécies. O autores avaliaram 322 indivíduos e revelaram pela PCR 26 amostras positivas para *E. dispar*. Esta prevalência foi atribuída às precárias condições de moradia e higiene. O mesmo se observou no estudo em Imperatriz e estudavam em escolas situadas nos bairros periféricos: Cafeteira e Vila Nova, ambos com maior número de alunos infectados por *E. dispar* e com vários problemas de infraestrutura ,como ruas sem pavimentação e em algumas áreas sem sistema de esgoto. Concluiu-se que a transmissão e a prevalência de parasitos s não patogênicos, em especial a *E. dispar*, foi associado com o padrão de vida.

Apesar do município de Imperatriz possuir o segundo melhor IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) do Maranhão, IDH - 0,722, é notável, nos últimos 30 anos, um crescimento desordenado da periferia com aumento substancial do número de invasões e favelas (popularmente as vilas), culminando com uma forte especulação imobiliária o que cria vazios de urbanização dentro do perímetro urbano. Esse fato pode explicar o grau de parasitismo evidenciado pelo estudo na cidade de Imperatriz que apresentou 36,30% de monoparasitismo, 7,4% de biparasitismo e 1,9% de poliparasitismo e quanto ao tipo de parasitismo com realção a faixa etária prevaleceu o monoparasitismo 89% nas faixa etárias de 8 a 11,em seguida o biparasitismo 3,20% nas faixas etárias de 5 a 7 e enfim o poliparasitismo 1,23%. Os resultados em Imperatriz se contrastam com os achados de (Silva, 2012), em análise de 205 amostras de escolares entre 5 a 12 anos de idade, quanto ao tipo de parasitismo, relatou que 17 (19,54%) havia poliparasitismo sendo que 15 (17,24%) eram de biparasitismo e 2 (2,30%) de triparasitismo e ainda em seu estudo observou que as crianças de 7 anos de idade estavam mais infectadas que as outras faixas etárias.A discordância entre os estudos pode está relacionado com as condições sanitárias específicas a cada população. Outra hipótese é as informações obtidas pelo formulário que não condiz com os achados das parasitoses , o que pode-se suspeitar é de que pode ter havido uma subafirmação das enquetes quanto as condições higênico-sanitárias.

Relacionando a faixa etária dos escolares e a prevalência para *E. dispar* pela PCR na cidade de Imperatriz, verificou-se que os escolares infectados que tinham de 5 a 7 apresentaram-se 2,5% (4) e de 8 a 11 anos foram 4% (7) e que após 12 anos não foi evidenciado nenhum caso de infecção por *E. dispar*. No entanto, na literatura existem relatos

controversos que correlacionam prevalência e a faixa etária. Póvoa et al., 2000 e Rivero et al., 2009 relatam igualmente que o risco de transmissão independe da idade. Kobayashi et al., 1995 encontrou maior número de casos de infecção por entamoebas em pacientes acima de 16 anos, contrastando com os achados no estudo em Imperatriz (MA) que indicaram ausência de *E. dispar* ou *E. histolytica* a partir dos 12 anos. Por sua vez, Rivera et al., 1996 nas Filipinas, trabalhou com faixas etárias mais amplas e observou maior prevalência de amebíase na faixa etária de 5-14 anos com redução da prevalência coincidindo com o aumento da idade. Sem dúvidas, concordamos com esses autores que essa redução da prevalência é devido a diminuição da exposição às fontes de infecção na fase adulta, associado ao conhecimento acerca das formas de transmissão e maiores cuidados com a higiene.

No município de Imperatriz (MA) o diagnóstico da amebíase intestinal é feito tradicionalmente por pesquisa do parasito nas fezes. A PCR é uma técnica que apresenta maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico da amebíase em relação à microscopia (Katzwinkel-Wladarsch et al., 1994) e capaz de identificar infecções mistas, realçando sua importância em inquéritos epidemiológicos (HUSTON et al., 1999). Porém, se trata de uma técnica cara e a maioria dos laboratórios do município de Imperatriz não tem infraestrutura para o seu uso. A utilização da PCR no Brasil está em sua fase inicial e restrito para laboratórios de pesquisas em grandes cidades.

Mediante os resultados deste estudo constatou-se que a *E. histolytica* não foi prevalente na população estudada, porém novos estudos epidemiológicos devem ser realizados em faixas etárias mais amplas e entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos, a fim de ampliar a avaliação epidemiológica da amebíase no município.

8 CONCLUSÃO

- A *E. histolytica* não foi encontrada na população de alunos assintomáticos pesquisados, demonstrando que este parasita deve apresentar baixa circulação nos bairros.
- A prevalência da *E. dispar* foi de 2,7% (11/405) e pode estar relacionado com as condições de higiene dos escolares e a situação sanitária do ambiente;
- Quanto a situação econômica e sanitária dos escolares obteve uma subestimativa quanto a situação sanitária real dos bairros do município e também há discordância quanto as informações dadas pelos responsáveis dos alunos e a prevalência de outros helmintos e protozoários;
- A situação higiênico-sanitárias da população estudada sofreu incoerência com os dados de prevalência parasitológica estudada que foi de 45,7% dos 405 das amostras analisadas;
- A PCR foi uma ferramenta importante no diagnóstico diferencial das duas espécies de Entamoebas.

REFERÊNCIAS

- ACA, I.S.; KOBAYASHI, S.; CARVALHO, L.B.JR.; TATENO, S. & TAKEUCHI, T. **Prevalence and pathogenicity of Entamoeba histolytica in three different regions of Pernambuco, Northeast Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1993.
- ACKERS, J. P. **The diagnostic implications of the separation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar.** *J Biosci*, v. 27, n. 6, suppl. 3, 2002.
- ALBACH, R.A. Nucleic acids of Entamoeba histolytica. **Journal of Protozoology**, 36:197-205, 1989.
- ALI, K.I.; SOLAYMANI-MOHAMMADY, S.; AKHTER, J.; ROY, S.; GORRINI, A.; PARKER, S.; HAQUE, R.; PETRI, W.A., JR.; CLARK, G. **Tissue invasion by Entamoeba histolytica: evidence of genetic selection and/or DNA reorganization events in organ tropism.** *PloS. Negl. Trop. Dis.* 2008.
- BHATTACHARYA, A.; SATISH, S.; BAGCHI, A.; BHATTACHARYA, S. The genome of Entamoeba histolytica. **International Journal of Parasitology**, 30:401-10, 2000.
- BLESSAMAN, J.; VAN, L.P.; NU, P.A.T.; THI, H.D.; MULLER-MYHSOK, B.; BUSS, H; TANNICH, E. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in Central Vietnam. **American Journal Tropical and Medicine Hygiene**, 66(5), 578-583, 2002.
- BRAGA, L.L.; GOMES, M.L.; SILVA, M.W.; FAÇANHA, F.E.; FIÚZA, L.; MANN, B.J. **Household epidemiology of Entamoeba histolytica infection in an urban community in Northeastern, Brazil.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2001a.
- BRAGA, L.L.; MENDONÇA, Y.; PAIVA, C.A.; SALES, A.; CAVALCANTE, A.L.; MANN, B.J. **Seropositivity for and intestinal colonization with Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in individual in northeastern Brazil.** *Journal of Clinical Microbiology*, 1998.
- BURCHARD, G.D.; BILKE, R. Adherence of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* strains to neutrophils. **Parasitol. Res.** v.78, 146–153, 1992.
- CHAVES, A. C. P.; SEIXAS FILHO, J. T.; DANTAS, M. M. L. **Revisão do mecanismo fisiopatológico da amebíase.** Rio de Janeiro: Rev. Augustus, vol. 14, n. 29, fevereiro de 2010.
- CORDEIRO, T.G.P.; MACEDO, H. W. **Amebíase.** Rio de Janeiro: UFF, Revista Departamento de Patologia, Vol. 36, maio-ago, 2007.
- COSTA AO.; GOMES MA.; ROCHA AO.; SILVA EF. **Pathogenicity of Entamoeba dispar under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent E. histolytica.** São Paulo, *Rev Inst Med Trop.*, 2006.

DANTAS, E.; ROCHA, L.C.; ODA, W.Y. **Aspectos sociais associados as parasitoses intestinais em alunos e funcionários de uma escola de um bairro da Redenção, Manaus.** Manaus: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1999.

DIAMOND, L.S. ; CLARK, C.G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walder, 1911) Separating it from *Entamoeba* *dispar* Brumpt, 1925. **JEuk Microbiol**, v. 40, p. 340-344, 1993.

ESPINOSA-CANTELLANO, M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. **Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease.** Clin Microbiol Rev, 2000.

GOMES, M.A.; SILVA, E.F.; MACEDO, A.M.; VAGO, A.R.; MELO, M.N. **LSSPPCR for characterization of strains of Entamoeba histolytica isolated in Brazil.** Parasitology, 1997.

GOSH, S.; FRISARDI, M.; RAMÍREZ-AVILA, L.; DESCOTEAUX, S.; STURM-RAMÍREZ, K.; NEWTON-SANCHEZ, O.A.; SANTOS-PRECIADO, J.I.; GANGULY, C.; LOHIA, A.; REED, S.; SAMUELSON, J. **Molecular epidemiology of Entamoeba spp. Evidence of a bottleneck (demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites.** J. Clin. Microbiol., 2000.

HAQUE, R.; HUSTON, C.D.; HUGHES, M.; HOUPPT, E.; PETRI, W. A. **Amebiasis.** N Engl. J. Med., 2003.

JACKSON, T.F.H.G.; SUPARSAD, S. Zymodeme stability of the *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. **Archives of Medical Research** (Supplement), 28:304-305, 1997.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** São Paulo: Ed. Atheneu, 2008.

OKAZAKI, M.; MIRANDA, P.; NETO, J.; DIEGUES, V.; ALVES, J.; CAUAS, M.; TANABE, M.; KOBAYASHI, S.; TATENNO, S. & TAKEUCHI, T. **Parasitological and serological studies on amoebiasis and other intestinal parasitic infections in Recife and its suburban area, Northeast Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1988.

PINHEIRO, S. M. B. **Determinação da prevalência e variabilidade genética de Entamoeba histolytica e Entamoeba dispar em habitantes de Pernambuco.** Recife: UFPE, 2003.

QUE, X.; KIM, S.; SAJID, M.; ECKMANN, L.; DINARELLO, C.A.; MCKERROW, J.H.; REED, S.L. A surface amebic cystein proteinase inactivates interleukin- 18. **Infection and Immunity**, 71:1274-1280, 2003.

QUE, X.; REED, S.L. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. **Parasitology Today**, 13:190-194, 1997.

RAMOS, F.; GARCÍA, G.; VALADEZ, A.; MORÁN, P.; GONZÁLEZ, E.; GÓMEZ, A.; MELENDRO, E.I.; VALENZUELA, O.; XIMÉNEZ, C. **E. dispar strain: Analysis of polymorphism as a tool for study of geographic distribution.** Mol. Biochem. Parasitol. 2005.

RAVDIN, J.I.; JACKSON, T.F.H.G.; PETRI JR.; W.A.; MURPHY, C.F.; UNGAR, B.L.P.; GATHIRAM, V.; SKILOGIANNIS, J.; SIMJEE, A. E. Association of 136 serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. **The Journal of Infectious Diseases**, 162:768-772, 1990.

REED, S.L.; BOUVIER, J.; POLLACK, A.S.; ENGEL, J.C.; BROWN, M.; HIRATA, K.; QUE, X.; EAKIN, A.; HAGBLOM, P.; GILLIN, F.D.; MCKERROW, J.H. Cloning of a virulence factor of *Entamoeba histolytica* pathogenic strains posses a unique cysteine proetinase gene. **Journal of Clinical Investigation**, 91:1532-1540, 1993.

REY, L. Amebíase. In: Parasitologia Médica. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2008, p. 156-181.

RODRIGUES, L.C.S. **Estudo morfológico e ultraestrutural de cepas brasileiras patogênicas e não patogênica de *Entamoeba histolytica***. Dissertação (Mestrado em Biofísica) - Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

ROY, S.; KABIR, M.; MONDAL, D.; ALI, I.B.K.M.; PETRI JR., W.A.; HAQUE, R. **Real time –PCR A ssay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection**. J.Clin. Microbiol., v.43, n.5, 2005.

SANTOS, F. L. N.; SOARES, N. M. **Mecanismos fisiopatogênicos e diagnóstico laboratorial da infecção causada pela *Entamoeba histolytica***. Rio de Janeiro: J. Bras. Patol. Med. Lab., vol.44, n°4, Ago. 2008.

SANTOS, R. V. **Discriminação da infecção causada pela *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) e *Entamoeba dispar* (Brumpt, 1925) em escolares da rede pública da cidade de Maceió - AL**. Maceió: UFAL, 2010.

SARGEAUNT, P.G.; WILLIAMS, J.E. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 73:225-227, 1979.

SARGEAUNT, P.G.; WILLIAMS, J.E.; GREENE, J.D. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme eletrophoresis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 72:519-521, 1978.

SCHNACK, F.J.; FONTANA, L.M.; BARBOSA, P.R.; SILVA, L.S.; BAILLARGEON, C.M.; BARICHELLO, T.; PÓVOA, M.M.; CAVASINI, C.E.; MACHADO, R.L. **Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants (< 5 years old) in a population sample in Greater Metropolitan Criciuma, Santa Catarina State, Brazil**. Cadernos de Saúde Pública, 2003.

SILVA, M.C.S.; MALHEIRO, D.M.L.; ESTEVES, P.; PÓVOA, M.M. **Prevalência da amebíase por anticorpos IgG através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em uma amostra da população de Belém (PA)**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1999.

TROLL, H.; MARTI, H.; WEISS, N. **Simple Differential Detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Fresh Stool Specimens by Sodium Acetate-Acetic Acid-Formalin Concentration and PCR.** Journal of Clinical microbiology, July 1997.

VALENZUELA, O.; MORÁN, P.; RAMOS, F.; CARDOZA, J.I.; GARCÍA, G.; VALADEZ, A.; ROJAS, L.; GARIBAY, A.; GONZÁLEZ, E.; XIMÉNEZ, C. **SHORT Two different chitinase genotypes in a patient with an amebic liver abscess: a case report.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 2009.

VIANNA, E. N. **Avaliação da técnica de PCR no diagnóstico diferencial entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* em amostras fecais provenientes de pacientes brasileiros.** Dissertação. Belo Horizonte: UFMG, 2006.

XIMÉNEZ, C. CERRITOS, R.; ROJAS, L.; DOLABELLA, S. MORÁN, P.; SHIBAYAMA, M.; GONZÁLEZ, E.; VALADEZ, A.; HERNÁNDEZ, E.; VALENZUELA, O.; LIMÓN, A.; PARTIDA, O.; SILVA, E. **Human Amebiasis: Breaking the Paradigm?** Int. J. Environ. Res. Public Health, 2010.

WHO/PAHO/UNESCO Report. **A consultation with experts on amoebiasis.** Mexico City, Mexico, 1997.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly Epidemiological Record.** Geneva, nº 14, 1997.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: Investigação da prevalência da amebíase em escolares do município de Imperatriz – Ma

Pesquisador responsável: Marcia Guelma Santos Belfort

Eu, abaixo assinado, responsável pelo menor

concordo que o mesmo participe desta pesquisa sobre a presença de ameba nas crianças das escolas públicas e da cidade de Imperatriz. Sei que a razão deste estudo é saber se existe ameba nas fezes das crianças e/ou adolescentes da nossa cidade. Fui esclarecido sobre as perguntas que serão feitas através de um questionário, como também sobre a coleta de fezes para realização de exames no laboratório. Estou ciente de que serão doados os potes para coleta das fezes e que não terei nenhuma despesa com os exames a serem realizados. Fui informado dos benefícios que esta pesquisa poderá trazer. Admito que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas pelo médico responsável por esta pesquisa. Fui informado também que quando os resultados desta pesquisa forem apresentados, não serão revelados dados que possam identificar minha criança e/ou adolescente. Sei que tenho a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo para minha criança e/ou adolescente. Visto que nada tenho contra a pesquisa, concordo em assinar o presente termo de consentimento,

Imperatriz (Ma), ____/____/____

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador

APÊNDICE B – FORMULÁRIO UTILIZADO NA PESQUISA**1° - Dados pessoais:**

Paciente: _____

Sexo: _____ Idade: _____

Bairro: _____

2° Renda familiar: Abaixo de um salário Um salário Acima de um salário**3° Hábitos, Higiene e Alimentação:**

a – Tem hábito de andar calçado?

 Sempre As vezes Nunca

b – As mãos e unhas estão sempre limpas e cortadas?

 Sim Não

c – Tem o hábito de lavar as mãos antes de comer qualquer alimento e após defecar?

 Sim Não

d – Os alimentos estão sempre protegidos dos insetos (moscas, baratas, etc.)?

 Sim Não**4° Controle de Identificação:**

a – Controle de Parasitas:

 Mensal Semestral Anual Não tem controle

b – Como é feito o controle?

 Com análise Por intuição As duas formas

c – Como elimina os parasitas?

 Com receita médica Direto na farmácia Remédio caseiro

d – Uso de Antiparasitários:

 Metronidazol Tinidazol Pantoprazol Mebendazol**5° Condições de moradia:**

a – Tipo de casa:

 Construída Madeira Taipa

b – Tipo de piso:

 Chão batido Cimento/ Cerâmica

c – Aspecto das ruas:

 Calçado/ Asfaltado Chão bruto**6° Saneamento Básico:**

a – Esgoto:

 Esgoto Canalizado Esgoto a Céu Aberto

b – Qual o destino dos dejetos façais?

- Lançamento na rua ou rio Lançamento em Fossa
- c – Fossa:
- Fechada/ Construída Aberta
- d – Qual a precedência da água para o seu consumo?
- Poço Encanada Riachos Mineral
- e – Qual o tratamento da água?
- Cloro Filtro Ferve Não trata

**ANEXO A – DECLARAÇÃO DA SECRETARIA DE MUNICIPAL
DE EDUCAÇÃO, ESPORTE E LAZER/SEMED.**



**ESTADO DO MARANHÃO
PREFEITURA MUNICIPAL DE IMPERATRIZ
SECRETARIA MUNICIPAL DE EDUCAÇÃO, ESPORTE E LAZER**

DECLARAÇÃO

Declaramos que a Secretaria Municipal de Educação, Esporte e Lazer/SEMED, através do seu Secretário o Sr. Zesiel Ribeiro da Silva, tomou conhecimento do projeto intitulado “Estudo da prevalência do Complexo *E. histolytica*/*E. dispar* em alunos matriculados em escolas públicas na Cidade de Imperatriz-MA, pelo Método da Reação em Cadeia da Polimerase-PCR” que será desenvolvido pela pesquisadora Márcia Guelma Santos Belfort, Farmacêutica/Professora da Faculdade de Imperatriz (FACIMP), durante sua dissertação de mestrado. A Secretaria Municipal de Educação, Esporte e Lazer/SEMED, manifesta concordância em participar como instituição colaboradora após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA.

A instituição deve ser mencionada em todas as publicações geradas pelo referido projeto.

Imperatriz-MA, 09 de junho de 2011.


Marciana da Silva
Subsecretária Mut. de Educação
Port. 183/2009 Matrícula: 34079-1



Rua Simplicio Moreira, 1478 – Centro, Imperatriz – MA – CEP 65.901-490
<http://www.imperatriz.ma.gov.br> - E-mail: educacaoitiz@hotmail.com



**ANEXO B – PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA
ENVOLVENDO SERES HUMANOS**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** Nº 045/2011-CEP-NMT/UFPA
2. **Projeto de Pesquisa:** ESTUDO DA PREVALÊNCIA DO COMPLEXO E *HISTOLYTICA/E.DISPAR* EM ALUNOS MATRICULADOS EM ESCOLAS PÚBLICAS NA CIDADE DE IMPERATRIZ – MA PELO MÉTODO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR.
3. **Pesquisador responsável:** MÁRCIA GUELMA SANTOS BELFORT
4. **Instituição / Unidade:** FACIMP/NMT
5. **Data de Entrada:** 16 /08/2011.
6. **Data do Parecer:** 20/09/2011

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela durante a reunião realizada no dia 27/09/2011. Considerando que foram atendidas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS, manifestou-se pela aprovação do parecer do relator.

Parecer: **APROVADO**

Belém, 27 de setembro de 2011

Profa. Dra. Hellen Thais Fuzii
Coordenadora do CEP-NMT/UFPA.

Hellen Thais Fuzii
Coordenadora do Comitê de Ética