



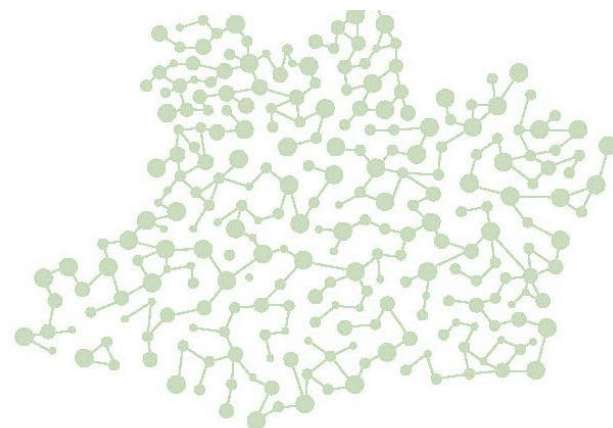
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS



**AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DA HEMOGLOBINA EM PACIENTES COM
PLASMODIUM VIVAX NA AMAZONIA OCIDENTAL BRASILEIRA**

LILYAN LISBÔA DE OLIVEIRA SARAIVA

**MANAUS
2020**



LILYAN LISBOA DE OLIVEIRA SARAIVA

**AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DA HEMOGLOBINA EM PACIENTES COM
PLASMODIUM VIVAX NA AMAZONIA OCIDENTAL BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas*.

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Gisely Cardoso de Melo**

Co-orientador: **Prof. Dr. Vanderson de Souza Sampaio**

**MANAUS
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

FOLHA DE JULGAMENTO**AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DA HEMOGLOBINA EM PACIENTES
COM *PLASMODIUM VIVAX* NA AMAZONIA OCIDENTAL
BRASILEIRA****LILYAN LISBOA DE OLIVEIRA SARAIVA**

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

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha filha, Lavínia Lisboa Saraiva, ao meu esposo, Ivan Saraiva, aos meus irmãos Heraldo Lisboa de Oliveira e Ceciani Lisboa de Oliveira, aos meus pais Lucrécia G. Pires Oliveira (in memoriam) e Antônio Lisboa de Oliveira (in memoriam), a minha sogra Libertalamar Bilhalva Saraiva e a minha avó Teresa de Carvalho R. Pires.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar meus passos, me mantendo firme e fortalecida.

A minha filha por ser a razão da minha existência e a alegria dos meus dias, foram anos de compreensão e desafios superados juntas.

Ao meu esposo, meu grande amor, minha motivação de lutar pelos meus sonhos, e que de forma próxima me auxiliou a cada dificuldade, compartilhando seu conhecimento de maneira tão preciosa.

A minha mãe (in memoriam) por ter sido o meu mais valioso exemplo de conduta na vida, por tanta dedicação ao longo da minha existência.

Ao meu pai (in memoriam) pelo amor e ensinamentos.

Aos meus irmãos que mesmo distantes fizeram presentes neste período, pelos conselhos e palavras otimistas.

A minha avó que com tanto carinho me ensinou muito quando eu ainda iniciava minha existência.

A minha sogra, pelos momentos de acolhida e os maravilhosos cafés.

A minha orientadora, Professora Dra. Gisely Cardoso de Melo, pelo apoio, direcionamento, sugestões e contínuo estímulo durante o mestrado.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Vanderson de Souza Sampaio, por sua ajuda e orientação e pelas correções criteriosas deste trabalho.

Ao Professor Dr. Wuelton Marcelo Monteiro, pela colaboração na elaboração e desenvolvimento da pesquisa.

A amiga Gabriela Rodrigues que tanto colaborou para as análises, sempre muito atenciosa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

Aos Professores Doutores que ministraram as disciplinas nos ensinando um pouco mais a cada dia.

Aos meus colegas que tanto colaboraram dividindo seus momentos e conhecimentos e incentivando sempre.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

O presente estudo contou com auxílio de uma bolsa de estudos ofertada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) junto ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Somado a isso, este trabalho também pode ser realizado com a utilização de dados secundários e de plataformas que o permitiram livre acesso, não sendo necessário a utilização de recursos a mais oriundos desta ou demais agências financiadoras. Quando necessário, os recursos utilizados foram do próprio autor.

EPÍGRAFE

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”
Isaac Newton

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa, causada pelo parasita do gênero *Plasmodium* e que acomete milhares de pessoas em todo o mundo. Uma das complicações clínicas encontradas pela doença é a queda nos níveis de hemoglobina, podendo provocar e agravar o quadro de anemia nos pacientes. Sua gravidade está associada, não somente à espécie *P. falciparum*, mas também à *P. vivax*. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a dinâmica da hemoglobina em pacientes com *P. vivax* na Amazônia Ocidental Brasileira. Trata-se de uma coorte prospectiva. Os resultados mostraram que a maioria dos indivíduos era do sexo masculino com 56%, a faixa etária mais frequente foi acima de 15 anos 49%. A prevalência total de malária (*P. vivax* e *P. falciparum*) foi de 9,9% com predomínio de malária por *P. vivax* 83%, enquanto a prevalência de anemia em malária (*P. vivax* + *P. falciparum*) foi de 3,6%. Foram observadas diferenças entre os casos de malária com e sem recorrência, principalmente nos níveis de hemoglobina abaixo de 12 g/dL ($p=0,0194$). Foi demonstrado que existe uma correlação negativa entre o número de episódios de malária e hemoglobina ($p=0,0050$). Entre os fatores clínicos, a associação da malária causada por *P. vivax* [-0,271 (IC 95%: -0,518; -0,024), $p=0,032$] e a parasitemia *P. vivax* [-0,00004 (IC 95%: -0,00007; -0,00000169), $p=0,038$] apresentaram correlação negativa à hemoglobina, enquanto a idade correlação positiva [0,021 (IC de 95%: 0,017; 0,026), $p=0,000$]. A concentração média de hemoglobina no episódio de malária foi de 12,0 (2.1,1.7) g/dL do que nos momentos antes e depois do evento. O estudo permitiu identificar relações significativas entre os casos de malária e os níveis de hemoglobina. Em geral, observou-se associação entre as menores taxas de hemoglobina e os casos positivos de malária e a recorrência da malária foi decisiva para a redução da hemoglobina.

Palavras-chave: Malária; Hemoglobina; *Plasmodium vivax*; Anemia; Prevalência.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease, caused by the parasite of the genus *Plasmodium* and which affects thousands of people worldwide. One of the clinical complications found by the disease is the drop in hemoglobin levels, which can cause and aggravate anemia in patients. Its severity is associated not only with the species *P. falciparum*, but also with *P. vivax*. The objective of this research was to evaluate hemoglobin dynamics in patients with *P. vivax* in the Western Brazilian Amazon. This is a prospective cohort. The results showed that the majority of individuals were male 56%, the most frequent age group was over 15 years old 49%. The total prevalence of malaria (*P. vivax* and *P.falciparum*) was 9,9% with a prevalence of malaria by *P.vivax* 83%, while the prevalence of anemia in malaria (*P. vivax* + *P.falciparum*) was 3,6%. Differences were observed between malaria cases with and without recurrence, especially in hemoglobin levels below 12 g / dL ($p = 0.0194$). It has been shown that there is a negative correlation between the number of episodes of malaria and hemoglobin ($p = 0.0050$). Among the clinical factors, the association of malaria caused by *P.vivax* [-0.271 (95% CI: -0.518; -0.024), $p = 0.032$] and the *P.vivax* parasitemia [-0.00004 (95% CI: - 0.00007; -0.00000169), $p = 0.038$] showed a negative correlation to hemoglobin, while age a positive correlation [0.021 (95% CI: 0.017; 0.026), $p = 0.000$]. The mean hemoglobin concentration in the malaria episode was 12.0 (2.1,1.7) g / dL than in the moments before and after the event. The study made it possible to identify significant relationships between malaria cases and hemoglobin levels. In general, an association was observed between lower hemoglobin rates and positive cases of malaria and the recurrence of malaria was decisive in reducing hemoglobin

Keywords: Malária; Hemoglobin; *Plasmodium vivax*; Anemia; Prevalence.

RESUMO LEIGO

A malária é uma doença que prejudica milhares de pessoas em todo mundo, além de causar várias complicações a malária pode diminuir a quantidade de hemoglobina no sangue ajudando a causar também anemia. Este trabalho foi realizado para verificar o quanto a malária pode ser responsável pela aumento da anemia em pessoas que tiveram malária durante os anos de 2008 e 2009 no município de Careiro, Estado do Amazonas, Brasil. Foram escolhidas 1087 pessoas que moravam nessa região do Careiro, 44 dessas pessoas tinham malária. Alguns cálculos foram feitos e descobriu que existiam pessoas com malária e também com anemia. Descobriu então que a maioria das pessoas desse estudo tinham mais que 15 anos e eram homens. Com o estudo foi possível identificar que quando a hemoglobina era mais baixa os casos eram positivos para malária e a quantidade de vezes que a pessoa teve a malária foi decisiva para a redução da hemoglobina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Epidemiologia da malária no mundo entre os anos de 2000 e 2017 (Adaptado de <i>World Malaria Report, WHO, Geneva;2018</i>).	02
Figura 2. Epidemiologia da malária nas Américas. Em destaque os países da Venezuela, Brasil, Peru e Nicarágua, que apresentaram aumento de casos entre 2010 e 2017 (Adaptado de <i>World Malaria Report, WHO, Geneva;2018</i>)	03
Figura 3. Ilustração do ciclo biológico do <i>plasmodium</i> (Adaptado de <i>Anatomy e Physiology, aces.201</i>	06

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Níveis de hemoglobina para diagnóstico e classificação da anemia (g/dL)... 09

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Mecanismos patogênicos da anemia à malária por *P.vivax* e por *P.falciparum*.

CD35 (receptor de complemento 1); CD55 (fator de aceleração de decaimento); DHL (lacto desidrogenase); α -HBDH (alfa – hidroxibutirato desidrogenase); RSP-2 (proteína 2 de superfícies do anel); RAP-2 (Proteína 2 associada a Roptria). (Adaptado de Douglas, 2012)

.....12

LISTA DE BREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. simium</i>	<i>Plasmodium simium</i>
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
LRA	Lesão Renal Aguda
WHO	World Health Organization
Hb	Hemoglobina
g/dL	Gramas por decilitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 MALÁRIA.....	1
1.2 <i>EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA.....</i>	<i>2</i>
1.3 <i>VETORES E AGENTES ETIOLÓGICOS.....</i>	<i>4</i>
1.4 <i>PATOGÊNESE, DIAGNÓSTICOS E AGRAVOS.....</i>	<i>7</i>
1.5 ANEMIA	8
1.6 ANEMIA NA MALÁRIA	9
1.6.1 <i>FISIOPATOGENIA DA ANEMIA DA MALÁRIA.</i>	<i>11</i>
1.6.2 <i>EPIDEMIOLOGIA DA ANEMIA DA MALÁRIA</i>	<i>13</i>
2 OBJETIVOS	15
2.1 <i>Objetivo geral.....</i>	<i>15</i>
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	<i>15</i>
3 PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	16
4 LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS.....	48
5 CONCLUSÃO.....	48
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
7 ANEXOS E APÊNDICES	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa aguda de grande importância no mundo, é classificada como uma das maiores endemias e que afeta cerca de meio milhão de vidas humanas a cada ano; dificulta assim o avanço de comunidades em países subdesenvolvidos (1). Acredita-se que a doença tenha surgido há milhões de anos na região da África e se espalhado pelas demais regiões tropicais e subtropicais do mundo, tornando-se uma epidemia global (2).

A doença pode evoluir rapidamente para um quadro grave, pois os parasitas chegam ao fígado onde se multiplicam. Já na corrente sanguínea, invadem as hemácias e iniciam o processo de destruição delas. A partir desse momento, ocorrem os primeiros sintomas (3).

A malária pode se agravar por diversos fatores entre eles alterações nos níveis de hemoglobina que pode evoluir à quadros de anemia. A anemia é considerada um problema de saúde pública de abrangência mundial e ocorre devido a redução nos níveis de hemoglobina, desencadeado pela carência de nutrientes, perda de sangue, diferentes doenças ou condições adquiridas ou hereditárias, acometendo indivíduos de todos os grupos etários e socioeconômicos (4,5). Resumidamente, a relação entre malária e anemia ocorre pelo fato de que os parasitas da malária destroem as hemácias, conduzindo a quadros evolutivos de anemia (6).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

Em 2019, ocorreram 229 milhões de casos e 409 mil mortes pela malária em todo o mundo, com a maioria dos casos se concentraram na região africana (93%) (7). Os países da Europa, América do Norte, Norte da Ásia e Oceania não apresentaram casos de malária entre os anos 2000 e 2017, corroborando com o fato de que a pobreza é um dos principais agravantes para proliferação da malária (Figura 1) (5).

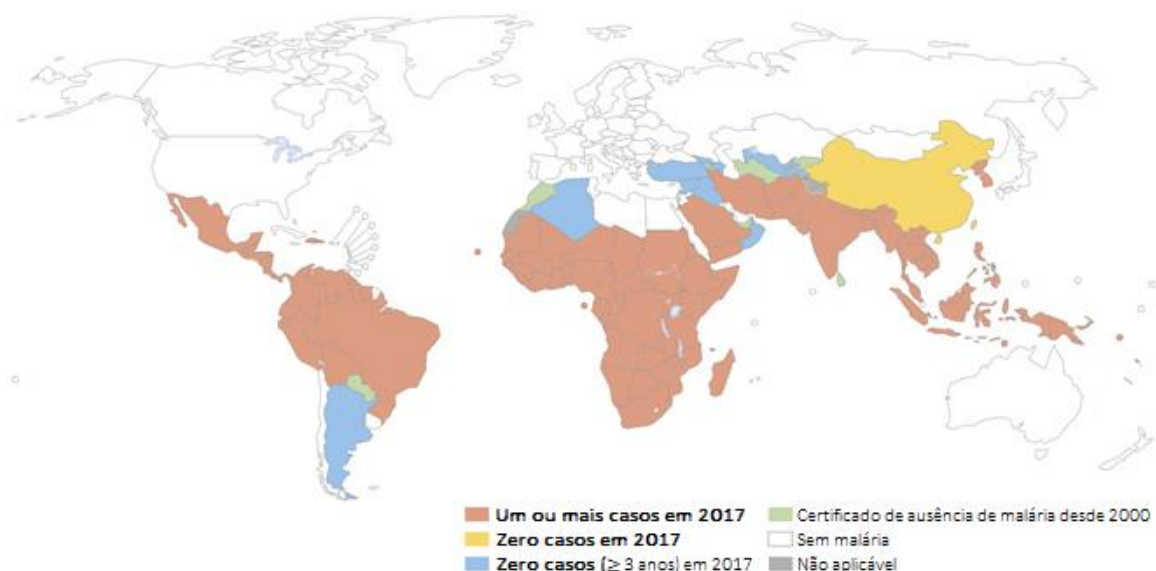


Figura 1 Epidemiologia da malária no mundo entre os anos de 2000 e 2017 (Adaptado de World Malaria Report, WHO, Geneva;2018) (5)

Na América do Sul, a Venezuela apresentou a maior carga da doença e com maior contribuição para o aumento de casos nos demais países americanos no ano de 2017, em decorrência da migração da população (Figura 2). O Brasil apresenta o segundo lugar de ocorrência de casos de malária, cerca de 300 mil por ano, seguido do Peru e Nicarágua (5).



Figura 2. Epidemiologia da malária nas Américas. Em destaque os países da Venezuela, Brasil, Peru e Nicarágua, que apresentaram aumento de casos entre 2010 e 2017 (Adaptado de World Malaria Report, WHO, Geneva;2018) (5).

Em 2019, no Brasil, foram notificados 157.454 casos de malária, 99,9 % ocorreram na região amazônica, que engloba os estados do Amazonas, Acre, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Para, Rondônia, Roraima e Tocantins. A maioria dos casos são causados pelo *P.vivax* 89,3% e o restante pelo *P.falciparum* 10,7%. A região amazônica possui condições propícias para a sobrevivência do vetor e condições socioeconômicas e ambientais que favorecem a transmissão da malária. Dos casos ocorridos nessa região, cerca de 80% se concentraram em 41 municípios, sendo 16 municípios pertencentes ao Amazonas. Manaus ocupou o terceiro lugar entre os municípios prioritários para malária, com cerca de 6.532 casos autóctones, ficando atrás apenas de Barcelos (8.794) e São Gabriel da Cachoeira (8,605) casos. (Boletim Epidemiológico-Ministerio da saúde NOV 2020) (8).

1.3 VETORES E AGENTES ETIOLÓGICOS

A transmissão da malária ocorre através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*, infectadas com o protozoário *Plasmodium* (9). No entanto, em menor ocorrência pode acontecer através de transfusões sanguíneas ou material perfuro cortante (10).

Atualmente há seis espécies de protozoários da malária que parasitam o ser humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. simium* (11), e somente o *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* são detectados no Brasil, sendo o *P. vivax* com maior ocorrência na região. Após infectar o hospedeiro, a maior parte dos *Plasmódios* passam pelo processo de reprodução assexuada, enquanto a outra proporção se diferencia em gametócitos maduros; constituindo estágios sexuais da malária. Atenta-se para o fato de que apenas nesse estágio os gametócitos tornam-se infecciosos ao mosquito e, também, que o transporte de gametócitos depende tanto de fatores individuais do hospedeiro e do parasita como do local e/ou da região da transmissão (12,13,14).

As formas mais graves da doença geralmente ocorre pela infecção do *P. falciparum*, uma vez que estes parasitas adentram as hemácias independente da fase evolutiva. Como apresenta o maior grau de virulência, é o causador da maior parte dos casos de morbidade e mortalidade ao redor do mundo, totalizando cerca de 91% dos casos de malária. Outra característica é o curto período de incubação (~ 6 dias) e a ocorrência de malária grave, com paroxismo de 24 horas, acompanhada de crises diárias (5,15). Acreditava-se que as formas menos graves da malária estavam associadas aos *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, por não

apresentarem as formas agudas da doença e também por não ultrapassarem 10% dos casos no mundo. O *P.vivax* e o *P.ovale* invadem apenas hemácias imaturas e o período de incubação é entre 8 a 15 dias, com crises de paroxismo em média a cada 48 horas (5,15).

Atualmente, constatou-se que a malária relacionada ao *P.vivax* também pode estar associada a casos graves da doença, como anemia grave, lesão pulmonar aguda (LPA), dificuldade respiratória, lesão renal aguda (LRA), disfunção em múltiplos órgãos, coinfeção bacteriana e bacteremia, complicações neurológicas, ruptura esplênica e infarto entre outras complicações (16,17). Um relato de caso demonstrou que um jovem infectado por *P.vivax*, internado com doença febril aguda, diminuição da produção de urina, anemia, trombocitopenia, icterícia e aumento da lactato desidrogenase sérica, apresentou apenas resposta parcial aos medicamentos antimaláricos, sendo readmitido com pioras dos parâmetros renais, resultando em diálise e, posteriormente, a transplante renal (18). Em outro caso, um paciente de 30 anos coinfectado por *P.falciparum* e *P.vivax* apresentou laceração esplênica com hemoperitônio moderado (19).

Recentemente, um estudo observacional de base populacional realizado em Cruzeiro do Sul, Brasil, entre 2006 e 2014, verificou o impacto da malária na gravidez, e se observou que 63,9% das gestantes infectadas por *P.vivax* apresentaram recém-nascidos à termo com baixo peso ao nascer (20). Já um estudo com 219 crianças entre 2 e 7 anos no município de Manaus, Brasil, verificou que 46% das crianças apresentaram pelo menos um episódio de malária, dessas 89% demonstraram baixo nível de desenvolvimento cognitivo, mostrando que a malária por *P.vivax* foi determinante para este diagnóstico (21).

A eliminação do *P. vivax* representa um desafio comparado ao *P. falciparum*, pela presença de hipnozoítos (forma dormente encontrada no fígado), permanecendo portadores e transmissores da malária (22,23). Isto ocorre durante o repasto sanguíneo quando os mosquitos ingerem gametócitos do *Plasmodium*, e assim adquirem a forma infecciosa (esporozoíto) dentro de suas glândulas salivares, permanecendo infecciosos por aproximadamente 1 a 2 meses. Através da picada do mosquito infectado ocorre a inoculação do parasita no sangue do hospedeiro vertebrado e inicia-se a fase esquizogônica, onde em um curto período de tempo os esporozoítos invadem as células do fígado, ocasionando um ciclo complexo. Este ciclo se divide em duas fases, sendo a primeira a hepática (esquizogonia pré-eritrocítica) e a segunda a eritrocítica (esquizogonia eritrocítica). Já no interior dos hepatócitos, os trofozoítos iniciam sua divisão intracelular assexuada, onde ao final desta fase milhares de merozoítos são liberados pelo hepatócito infectado (Figura 3). Após esta liberação, no caso do *P. vivax*, alguns esporozoítos podem apresentar estágio de dormência, quando então passam a ser chamados de hipnozoítos; podendo permanecer latentes por meses ou anos e quando reativados podem levar a recaídas da doença (24,25).

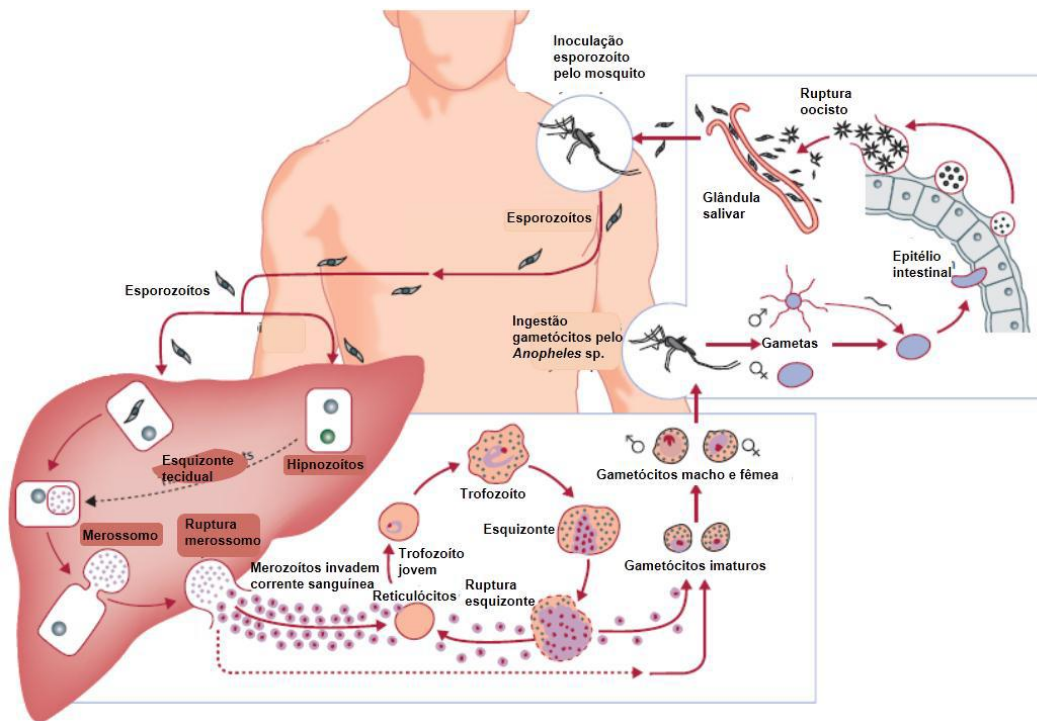


Figura 3. Ilustração do ciclo biológico do plasmódio. (Adaptado de Mueller, 2009) (26).

1.4 SINTOMAS E AGRAVOS

O quadro clínico da malária pode ser caracterizado por febre, sudorese, calafrios, cefaleia, tremores, vômitos, cansaço e complicações respiratórias. O paciente pode apresentar anemia e astenia, tornando-se apático e indisposto, podendo ocorrer esplenomegalia e muitas vezes hepatomegalia (3,27).

Diversos fatores podem influenciar na forma clínica da doença como endemicidade, imunidade, carga parasitária, taxa de multiplicação, variação antigênica e polimorfismo, tanto do hospedeiro (humano) quanto do parasita (28).

Portanto em hospedeiros mais vulneráveis, como gestantes e crianças

pequenas, as formas graves da doença são mais frequentes, assim como nos primoinfectados (29). Aspectos clínicos e as alterações laboratoriais sofrem grandes variações em casos de malária grave, com impactos negativos da doença, assim como maior frequência do acometimento do sistema nervoso central, anemia com maior gravidade, insuficiência renal, disfunção pulmonar, choque, coagulação intravascular disseminada, hipoglicemia, acidose metabólica e disfunção hepática (30,31). Dentre as alterações ocasionadas pela malária, os níveis de hemoglobina despertam interesse pois podem apontar aos quadros de anemia apresentados pelos indivíduos acometidos pela doença.

1.5 ANEMIA

A anemia é um dos importantes indicadores da saúde e está associada aos distúrbios nutricionais do indivíduo. É definida pela redução do número de hemácias, ou seja, quando o número de hemácias ou sua capacidade de transportar oxigênio se tornam insuficientes para suprir às necessidades fisiológicas do ser humano (9).

Embora a causa mais comum de anemia em todo o mundo esteja relacionada a deficiência nutricional, existem outros mecanismos que provocam a anemia e que são relevantes para a interpretação da mesma, assim como o aumento da perda de hemácias, a redução da produção de glóbulos vermelhos normais, o aumento da destruição de glóbulos vermelhos (hemólise) e o aumento fisiológico da demanda de glóbulos vermelhos e ferro. Estes mecanismos ocorrem por deficiências nutricionais agudas e crônicas relacionadas ao ferro, folato, vitamina B12 e vitamina

A, por inflamação, infecções parasitárias como a malária, doenças hereditárias ou adquiridas que comprometam a síntese de hemoglobina e a produção e/ou sobrevivência de hemácias (5).

De acordo com a *World Health Organization* (WHO) o diagnóstico da anemia se baseia nos níveis de hemoglobina, variando conforme a idade, sexo e período gestacional (32,33) (Tabela 1). Exames laboratoriais associados ao diagnóstico clínico podem melhorar a interpretação do quadro anêmico. O hemograma é o exame mais comum e pode determinar as dosagens de hemoglobina (Hb).

Tabela 01. Níveis de hemoglobina para diagnóstico e classificação da anemia (g/dL).

População	Ausência	Grau da anemia		
	anemia	Leve	Moderada	Grave
6 a 59 meses de idade	11,0 ou >	10,0 a 10,9	7,0 a 9,9	< que 7,0
5 a 11 anos de idade	11,5 ou >	11,0 a 11,4	8,0 a 10,9	< que 8,0
12 a 14 anos de idade	12,0 ou >	11,0 a 11,9	8,0 a 10,9	< que 8,0
Mulheres (≥15 anos)	12,0 ou >	11,0 a 11,9	8,0 a 10,9	< que 8,0
Gestantes	11,0 ou >	10,0 a 10,9	7,0 a 9,9	< que 7,0
Homens (≥15 anos)	13,0 ou >	11,0 a 12,9	8,0 a 10,9	< que 8,0

Fonte: Adaptado de WHO, 2018 (34).

1.6 ANEMIA NA MALÁRIA

A anemia está entre as principais alterações clínico-patológicas encontradas na malária e ocorre em decorrência da destruição ou captação dos eritrócitos,

deseritropoiese e perda sanguínea relacionada a coagulopatia (35,36,37). Em estudo realizado com amostras de 16 países africanos durante os anos de 2015 e 2017 identificou que em crianças menores de 5 anos a prevalência de anemia associada a malária, foi de 79%, sendo 21 % para a anemia leve, 50% para moderada e 8% para grave (5).

A invasão do *P.vivax* ocorre apenas em hemácias jovens, enquanto o *P.falciparum* não há preferência pelo tipo de hemácias. Esta é uma das razões para que o maior número de casos graves de malária estejam associados ao *P.falciparum*, porém vem se tornando frequente o número de relatos de casos de malária grave associado ao *P.vivax* (38,39).

O diagnóstico de anemia da malária se baseia na concentração de hemoglobina independentemente da quantidade de parasitemia. A parasitemia pode ser considerada como um indicador fraco da gravidade da doença, no entanto, quando a sua quantidade está em níveis elevados, pode causar lise maciça e eliminação de eritrócitos, acarretando em anemia profunda (40,41).

Um estudo comparando indivíduos com maior e menor exposição à malária verificou que a recuperação da hemoglobina foi relacionada à Hb basal. Os indivíduos imunes à malária infectados com *P. vivax* tinham concentrações de Hb persistentemente mais baixas em comparação com indivíduos com menor exposição à malária (42).

1.6.1 FISIOPATOGENIA DA ANEMIA DA MALÁRIA.

O desenvolvimento da anemia na malária possui mecanismos não totalmente esclarecidos, em decorrência da complexidade e multifatorialidade desses eventos. No entanto, sabe-se que em relação a redução dos níveis de hemoglobina no indivíduo acometido pelo *P.vivax* e *P.falciparum*, alguns fatores como idade, esplenomegalia, infecção crônica, recrudescência e novos episódios da doença estão sendo considerados como risco para agravamento da anemia (43).

Sabe-se que em relação a anemia por malária, é possível que ocorra perda de hemácias e/ou que a produção destas seja comprometida. Para infecção por *P.vivax* ocorre a perda de maior número de hemácias não infectadas, sendo 34 hemácias perdidas para cada hemácia infectada (43). Em casos de malária por *P.vivax* ocorre redução dos reticulócitos nos primeiros 10 dias após infecção, assim como ruptura de hemácias não infectadas, o que demonstra maior fragilidade no processo de hemólise intravascular. Quanto a hemólise extra vascular, na infecção por *P.vivax*, ocorre fagocitose de hemácias infectadas e não-infectadas no baço e medula óssea (44). Os processos de fagocitose dos eritroblastos, utilização prejudicada de ferro e efeito tóxico dos produtos do parasita em progenitores, entre eles eritroblastos, ocorrem em ambas as infecções, por *P.vivax* e por *P.falciparum*. Ainda para o *P.vivax* observa-se que entre 8 de 9 adultos com infecção aguda a proporção de eritroblastos se mantém normal ou aumentada, em mecanismos celulares relacionados a insuficiência da medula óssea. Já para o *P.falciparum* ocorre o processo inverso (Quadro 1).

Quadro 1. Mecanismos patogênicos da anemia associada à malária por *P. vivax* e por *P. falciparum*. CD35 (receptor de complemento 1); CD55 (fator de aceleração de decaimento); DHL (lactato desidrogenase); α -HBDH (alfa-hidroxiacetato desidrogenase); RSP-2 (proteína 2 de superfície do anel); RAP-2 (Proteína 2 associada a Roptria) (Adaptado de Douglas, 2012) (43).

FATORES DE RISCO PARA ANEMIA OU REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA	
<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
Idade jovem, esplenomegalia, infecção crônica, novo episódio	Idade jovem, esplenomegalia, infecção crônica, recrudescência
DADOS CHAVE SOBRE OS PROCESSOS PRINCIPAIS	
Perda de hemácia	
34 hemáceas não-infectadas perdidas para cada 1 hemácia infectada no sangue periférico	8 hemáceas não-infectadas perdidas para cada 1 hemácia infectada no sangue periférico
Produção comprometida de hemácia	
Reticulócito baixo durante os primeiros 10 dias, depois aumento adequado durante 3-6 semanas	Reticulócito baixo mas não suficiente para o nível de anemia
MARCADORES E MECANISMOS CELULARES IDENTIFICADOS OU SUSPEITOS	
Hemólise intravascular - Ruptura da hemácia no sangue antes de ser fagocitada	
Ruptura de esquizontes circulantes incluindo parasitas ancorados em reticulócitos. Hemólise intravascular devido a ruptura de menor esquizontes em <i>Pv</i> que em <i>Pf</i> pois a parasitemia é menor em <i>Pv</i> .	Haptoglobina e hemopexina baixas DHL e α -HBDH altas
Ruptura de hemácias não infectadas	Ruptura de esquizontes sequestrados
Hemólise extravascular - Hemácia fagocitada como célula	
Fagocitose de hemácias infectadas e não-infectadas no baço e medula óssea	Anexina V e neopterinina altas CD35 e CD55 baixos
	Fagocitose in vitro das hemácias não-infectadas
Estresse oxidativo na hemácia não-infectada e infectada	Acúmulo e fagocitose de hemácias infectadas e não-infectadas no baço e medula óssea
Aumento da fragilidade osmótica e formação do corpo de Heinz de hemácias não-infectadas	Retenção mecânica de hemácias não-infectadas no baço devido redução da capacidade de deformação
	Retenção mecânica de anéis no baço devido redução da capacidade de deformação. Fagocitose e opsonização de hemácias não-infectadas coberta com RSP-2/RAP-2, complemento, imunoglobulinas ou baixos níveis de CD55
	Estresse oxidativo na hemácia não-infectada e infectada
Diseritropoiese - Progenitoras proliferam, mas não saem da medula óssea	
0,23-15,1% dos eritroblastos com anormalidades nucleares acentuadas em 6 de 9 adultos com infecção aguda	Anormalidades nucleares dos eritroblastos, mais frequentes em crianças com infecção
Fagocitose dos eritroblastos	Fagocitose dos eritroblastos
Efeito tóxico dos produtos do parasita (ex.hemozoína) em progenitores (incluindo eritroblastos)	Ativação do macrófago por citocinas ou produtos do parasita aumentam a fagocitose dos progenitores (incluindo os eritroblastos) apesar dos níveis de citocinas estarem geralmente menores na anemia grave da malária que na malária cerebral ou não-complicadas.
	Efeito tóxico dos produtos do parasita (ex. hemozoína) em progenitores (incluindo eritroblastos)
	RAP-2 na superfície dos eritroblastos e fagocitose in vitro
Utilização de ferro prejudicada	Utilização de ferro prejudicada
Insuficiência da medula óssea - Progenitores não proliferam suficientemente	
Celularidade diminuída no estágio agudo em 3/11 adultos	Resposta inapropriada da medula óssea a níveis apropriados de eritropoietina em crianças, embora possivelmente não em adultos
Observações raras de eritroblastos parasitados	
Sem dados em crianças ou anemia grave. Proporção de eritroblastos normal ou aumentada em 8 de 9 adultos com infecção aguda	

1.6.2 EPIDEMIOLOGIA DA ANEMIA DA MALÁRIA

As relações entre a anemia e a malária vem sendo observadas em grupos diversificados, principalmente em locais de alta endemicidade para malária, como continente africano, sul asiático e americano (7). Um estudo realizado no Gana, identificou que o risco para apresentar anemia foi de 16,5% para *P.falciparum* e que o risco é maior em indivíduos mais jovens e do sexo masculino (45). Outro estudo em Papua, Indonésia, verificou a doença estava intimamente relacionada aos casos de anemia (46). No Paquistão, verificou que a anemia foi frequente em pacientes do sexo feminino alterações mais frequentes foram a anemia e trombocitopenia (47).

No Brasil, em uma revisão sistemática, foi concluído que a anemia esteve presente em todas as faixas etárias, sendo as crianças e gestantes os grupos mais vulneráveis (48). No município de Mâncio Lima, Acre, a prevalência de anemia foi maior para faixa etária de indivíduos com 6 meses até 5 anos (49). Em Belém, Pará, observaram que fatores que contribuíram para o agravamento da anemia, foram o parasitismo por ancilostomídeos e o intervalo de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico da malária (50). Em Manaus, um estudo identificou que pacientes infectados com *P. falciparum* apresentaram concentrações de Hb (10,5 g/dL) do que infectados por *P.vivax* (12,4 g/dL) (51). Em estudo realizado em Manaus, com crianças, a anemia esteve associada com parasitemia (52).

Dentre as complicações da doença, a anemia vem despertando interesse entre pesquisadores devido sua complexidade em relação aos agentes etiopatogênicos. No Brasil, ainda há escassez de estudos que abordem a relação entre anemia e malária, isso pode ser porque a região apresenta maior prevalência

do *P.vivax*. Já em regiões onde o *P.falciparum* predomina, ocorre maior número de casos graves, com maior frequência de mortes e, conseqüentemente, maior número de estudos deste tipo. Baseado nesses motivos, julga-se oportuno estudar aspectos relacionados a alterações nos níveis de hemoglobina assim como presença de anemia em populações com malária por *P.vivax*, procedentes de regiões endêmicas, considerando que a compreensão da correlação entre malária e os níveis de hemoglobina colaboram para estratégias de tratamentos efetivos, assim como medidas de controle da doença, de forma que seja possível evitar complicações que resultem em quadros de anemia e/ou agravos da malária resultando em maior número de mortes relacionadas à doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a dinâmica da hemoglobina em pacientes com *P. vivax* na Amazônia Ocidental Brasileira.

2.2 Objetivos específicos

- Estimar a prevalência de anemia em cada tempo e em todo período;
- Estudar a associação entre a malária por *P.vivax* e os fatores demográficos e clínicos à variação dos níveis de hemoglobina;
- Avaliar a associação entre as variações da hemoglobina e as recorrências de malária.

3 PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

ARTIGO

Hemoglobin dynamics in an endemic area for *Plasmodium vivax* in the Brazilian Amazon

Hemoglobin dynamics for *Plasmodium vivax*

Keywords: *Plasmodium vivax*. hemoglobin dynamic. Brazilian Amazon.

Lilyan Lisbôa de Oliveira Saraiva^{1,2}

Email: lilyanlisboa@gmail.com

Sheila Vitor da Silva³

Email: sheilavitorr@gmail.com

Ivan Saraiva⁴

Email: ivansaraiva@gmail.com

Maria Gabriela de Almeida Rodrigues^{1,2}

Email: rodriguesgabriela016@gmail.com

Wuelton Marcelo Monteiro^{1,2}

Email: wueltonmm@gmail.com

Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda^{1,2,5}

Email: marcuslacerda.br@gmail.com

Vanderson de Souza Sampaio^{2,6}

Email: vandersons@gmail.com

Gisely Cardoso de Melo^{1,2,*}

Email: cardosogisely@gmail.com

- 1 Universidade do Estado do Amazonas, EUA, Manaus, Amazonas, Brazil,
- 2 Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, FMT-HVD, Manaus, Amazonas, Brazil,
- 3 Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil,
- 4 Sistema de Proteção da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil,
- 5 Instituto Leônidas e Maria Deane / Fiocruz Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil,
- 6 Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.

* Corresponding author: Gisely Cardoso de Melo

E-mail: cardosogisely@gmail.com

Abstract

Background: Currently, malaria remains a disease that occurs in various regions of the world and can cause several problems. Anemia is among the clinical complications of malaria, with hemoglobin levels often being affected. In this study, hemoglobin dynamics was evaluated in a population in the Western Brazilian Amazon region, where *Plasmodium. vivax* is predominant. **Methods:** A prospective cohort was established in a settlement area in Brazilian Amazon region for 18 months. During this period both active (four cross-sectional surveys each 6 months) and passive case detection (in-between periods) were carried out. Hemoglobin levels were checked and recorded. Hemoglobin variations were performed using Cumulative Frequency Distribution (CDF) and hemoglobin level were assessed before, during and after the malaria episode. Recurrence was assessed using frequency distributions and association between the number of malaria episodes and hemoglobin levels. The analysis of the time until the event was performed using the Kaplan-Meier with Log-rank to compare the accumulated proportion of recurrence between groups with and without malaria. The association between demographic and clinical factors with mean hemoglobin, univariate and multivariate linear regression was used. The data were analyzed using Stata 13 software. **Results:** The results showed that the majority of individuals were male 56%, the most frequent age group comprised between 15 and 35 years old 28.4%. The total prevalence of malaria (*P.vivax* and *P.falciparum*) was 9.9% with a predominance of malaria by *P.vivax* 83% while the prevalence of anemia in malaria (*P. vivax* + *P.falciparum*) was 3.6%. Differences were observed between malaria cases with and

without recurrence, mainly in hemoglobin levels below 12 g / dL ($p = 0.0194$). The number of recurrence episodes proved to be decisive for the reduction of hemoglobin levels. It has been shown that there is a negative association between the number of episodes of malaria and hemoglobin ($p = 0.0050$). Among the clinical factors, the most related association resulting from malaria caused by *P.vivax* [-0.398 (95% CI: -0.622; -0.173), $p < 0.001$], *P.vivax* parasitemia [-0.00006 (95% CI: - 0.00008; - 0.00002), $p < 0.001$] were negatively related to hemoglobin, while age was positively related [0.022 (95% CI: 0.018; 0.027), $p = 0.000$]. The mean hemoglobin concentration in the malaria episode was lower (12.0 g/dL) than the times before and after the event. **Conclusion:** The study made it possible to identify significant relationships between malaria cases and hemoglobin levels. In general, an association was observed between the lowest hemoglobin rates and positive cases of malaria and the recurrence of malaria was relevant for the reduction of hemoglobin.

Introduction

Malaria remains a major public health problem in many countries. In 2018, there were 228 million cases of malaria worldwide, especially in the African Region (93%) with an estimated 405,000 deaths, with children under 5 being the most vulnerable group [1].

In relation to Plasmodium species, *P. vivax* has a greater geographical distribution. About 53% of cases are concentrated in Southeast Asia, with approximately 47% of these occurring in India. In the Americas, *P. vivax* represents 75% of malaria cases and in Brazil 70% [1].

The clinical manifestations of malaria have been associated with several factors: demographic characteristics [2], malaria endemicity [3], nutritional status and immunity to malaria [4]. Previously, *P. vivax* malaria was considered a non-fatal infection. This perception, however, has changed because recent studies have shown that *P. vivax* is associated with severe manifestations similar to those found in *P. falciparum* infection [2,5,6].

However, anemia is a common and often severe consequence of vivax malaria. Among the main factors for the occurrence of anemia in malaria, the splenic removal of red blood cells, acute hemolytic anemia (AHA), bone marrow suppression and dyserythropoiesis have been studied [7-9]. Studies showed that the use of an early antimalarial treatment causes the hemoglobin drop process to be interrupted, favoring the individual's hematological recovery [10-13].

Data on hemoglobin dynamics and cases of anemia related to *P. vivax* malaria in Latin America are still poorly explored, especially in the Amazon region

[14]. In this context, this research aims to assess the dynamics of hemoglobin in patients with *P. vivax* in the Western Brazilian Amazon.

Methods

Study Site

The site study was Municipality of Careiro, Amazonas State. (Western Brazilian Amazon) (03°06' S; 60°01' W). The municipality is connected with the capital of the state, Manaus, through a federal road (112 km of distance) (Figure 1). According Brazilian Institute of Geography and Statistics the population is approximately 37.869 inhabitants and demographic density of 5.37 inhabitants/km² [15]. Two rural communities were chosen, the Community of Panelão and Castanho Sítio with a total population of 702 persons (census performed immediately before the beginning of the study), where are considered co-endemic by *P. vivax* malaria [16]. The major economic activities are family farming, hunting and fishing. Drinking water comes from rainwater reservoirs or creeks.

Study design

A prospective cohort study was conducted for 18 months. Before the start of the study, a preliminary census was carried out (2 months earlier) and, at this point, this community was informed about the study and invited to participate. The study participants were monitored by means of cross-sectional surveys (every 6 months) and passive case detection at health posts throughout the study period. Because it is a region where the climate interferes with the population's survival activities, there

is a significant movement of the population, during the period of flooding of the rivers, they migrate to other areas, returning to the community in the periods of low river.

Active follow-up

Four cross-sections were performed at an interval of 6 months. In each visit, there included clinical history, physical exams and blood sample collection (thick blood smear) was used for *Plasmodium* infection detection. All information was recorded in the standardized forms. A second blood sample was sent for further analysis in Manaus. Blood slides were read at the health post within 24 h and patients with a positive thick blood smear detected were treated by the study team and/or referred to the local hospital.

Passive case detection

Blood was collected to prepare two slides from all patients presenting symptoms compatible with malaria, for individuals assisted at the diagnosis and treatment units or at the home visits. One smear was read immediately used to identify the presence of *Plasmodium*. If the slide was positive anti-malarial treatment was provided by the health worker to the patient. The second slide was reviewed by two microscopists to confirm diagnosis and determine the density of parasites. The standardized forms were included demographic data, clinical characteristics of the patient and parasitemia results.

Malaria diagnosis and definitions

For all thick blood smears were prepared by Walker technique [17] and analyzed by a local microscopist and reviewed by an experienced microscopist, who confirmed diagnosis. Parasitological results were confirmed by RT-PCR [17-19]. Anemia was defined as classified by, Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity, WHO [20].

Hemoglobin Concentration

Hemoglobin concentration was measured in venous blood obtained by digital puncture, using a laptop (HemoCue® photometer, Anglholm, Sweden) at the beginning, during and at the end of the follow-up.

Statistical Analysis

The analysis was performed using the Stata 13 (Statistics Software, version SE13). To understand the dynamics of hemoglobin, samples with *P. vivax* malaria were selected during active monitoring and passive detection of cases. To assess association between area, sex, age range and temperature with hemoglobin variations Cumulative Frequency Distributions (CDF) was used. Hemoglobin dynamics were assessed by repeated measures ANOVA, where the hemoglobin was observed before, during and after malaria episodes. The analysis of time until the event was performed using the Kaplan-Meier with Log-rank to compare the accumulated proportion of recurrence between groups with and without anemia. CDF's were also used to assess the distribution of groups with and without recurrence of malaria. The analysis of association of demographic and clinical factors with mean hemoglobin was performed by univariate and multivariate linear

regression only for those patients that had a complete follow-up from the first cross-section.

Ethics approval

Human surveys were approved by the National Ethics Review Committee (protocol number 15197/2008. Informed consent was obtained from each participant. Patients diagnosed with malaria were treated according to the Brazilian Ministry of Health guidelines.

Results

Study population

The census showed 702 people living in the study area. Considering the four cross sections, 1,087 individuals were tested for malaria by optical microscopy and evaluated for the presence of anemia. The distribution of patients among the cross-sections was as follows: the first included (August 2008; T0) 635 people, the second (February 2009; T6) 588 people, the third (August 2009; T12) 611 people, and the fourth (February 2010; T18) 649 people. Between the first (T0) and the second (T6) cross section, 133 people were included in the study and 175 left because they were not at the time of the visit or because they moved or died. From the second (third) to the third (fourth) cross section 140 (127) people entered the study and 117 (89) left (Figure 2). Only 214 subjects were present in the records of the four cross-sections.

Most of the participants included in the study, were people who lived in the community of Panelão (57%), men (56%); and the most frequent age group were people aged 15 or over (61%) (Table 1).

Malaria and anemia prevalence

The total prevalence of malaria (*P. vivax* + *P. falciparum*) was 10,33% in all cross sections (T0, T6, T12, and T18) and *P. vivax* was predominant with 86%. For T0, the prevalence of malaria (*P. vivax* + *P. falciparum*) was 6.9% (46/635), while for *P. vivax* was 5.8% (37/635). In T6, for *P. vivax* the prevalence was 1.4% (9/588), in T12 was 0.3% (2/611) and in T18 was 1.4% (5/649). No *P. falciparum* cases were identified in T12 and T18.

The prevalence of anemia in malaria (*P. vivax* + *P. falciparum*) was 3.6% (T0 + T6 + T12 + T18). For individuals with *P. vivax* the prevalence of anemia at T0 was 1.6% (13/635), at T6 was 0.6% (5/588), 0.1% (1/611) at T12 and 0.6% (5/649) at T18 (Figure 3B). For *P. falciparum* the prevalence of anemia occurred in T0 with 0.5% (4/635) and in T6 with 0.1% (1/588).

Association Analysis

In univariate regression, malaria caused by *P. vivax* [Coef.: -0.398 (95% CI: -0.622; -0.173), $p < 0.001$], *P. vivax* parasitemia [Coef.: -0.00006 (95% CI: -0.00008; -0.00002), $p < 0.001$] were negatively related to hemoglobin, while age was positively related [Coef.: 0.022 (95% CI: 0.018; 0.027), $p = 0.000$]. However, the recurrence was not significantly ($p = 0.525$).

For multivariate regression, presence of *P. vivax* malaria [Coef.: -0.271 (95% CI: -0.518; -0.024), $p = 0.032$] and parasitemia [Coef.: -0.00004 (95% CI: -0.00007; -0.00000196), $p = 0.038$]; were negatively related to hemoglobin while the age was positively related [Coef.: 0.021 (95% CI: 0.017; 0.026), $p = 0.000$].

Hemoglobin dynamics

Hemoglobin concentrations in the groups with and without malaria were not significant (Figure 4).

Hemoglobin dynamics was assessed from the hemoglobin levels observed before the malaria episode (T-1, T-2 and T-3), during (TM) and after (T + 1, T + 2 and T + 3) in 216 patients (active + passive detection). A significant difference was observed between the groups ($p < 0.0001$) (Figure 5). The average hemoglobin concentration in the TM was 12.0 (2.1, 1.7) g/dL. The lowest hemoglobin levels occurred in TM (5.7 g/dL), followed by T-1 (6.0 g/dL), T+1 (6.6 g/dL), T+3 (7.1 g/dL), T+2 (7.7 g/dL), T-3 (8.3 g/dL), T-2 (8.4 g/dL) while the highest hemoglobin level occurred in T-1 (17.9 g/dL), followed by T-2 (17.6 g/dL), TM (16.8 g/dL), T+2 (16.5 g/dL), T-3 (15.3 g/dL) and T+3 (14.9 g/dL) .

A significant difference between recurrence and hemoglobin levels below to 12 g/dL was observed ($p=0.0194$) (Figure 6). A negative association between the number of malaria episodes and hemoglobin ($p=0.0050$) was also detected (Figure 7). No significant difference was observed between groups with or without anemia and time until recurrence (Log-rank=0.0; $p=0.9503$) (Figure 8).

Discussion

Malaria vivax is one of the public health problems in the Amazon [21,22], and anemia is among the complications [23,24]. Recent studies have shown that there is a strong relationship between malaria events and hemoglobin levels [25,26]. However, the majority refer to *P. falciparum* malaria infections [27-29], and few in an endemic region in the Brazilian Amazon [24,26,30].

In this study, a low prevalence of malaria-related anemia and the influence of the parasite species in this limited number of cases could not be determined. The frequency of malaria-related anemia was less than previously found [14,31,32]. Nevertheless, due to immediate diagnosis and treatment, there was insufficient opportunity to observe more patients with malaria anemia. This study was able to understand the dynamic of hemoglobin in an endemic region in the Brazilian Amazon. The results showed that in the rural region of the Amazon there was a greater number of malaria caused by *P. vivax* and the majority of the population composed of male adults. In addition, *vivax* malaria has been shown to be associated with lower hemoglobin levels. Other studies have found that malaria of any species is associated with the risk of anemia [24,28,31,33-35].

Furthermore, this research observed that hemoglobin levels were lower in positive cases of malaria and are associated with parasitemia. For *P. falciparum*, several studies have observed an association between parasitemia and lower hemoglobin [27,29,35], but for *P. vivax*, studies are less frequent [34,36]. A study in the same endemic area with individuals between 18 and 45 years old, found that hemoglobin levels were related to parasitemia [34]. In addition, was observed

significant association between administration of antimalarial drugs and hemoglobin levels. Studies have shown that administration of antimalarials at the onset of the disease reduces hemoglobin levels [12,29,37].

An association between age and hemoglobin was observed. Other study found that *P. vivax* contributed to reductions of the hemoglobin concentrations and risk of anemia [28]. A cross-sectional study in Acrelandia, Western Brazilian Amazon, demonstrated that child age < 24 months was positively associated with anemia [38].

In general, area, sex, and age distributions were not significantly related with hemoglobin levels. However, hemoglobin rates may also vary according to gender and temperature [1,39,40].

This study showed that hemoglobin decreased in malaria episodes followed consistent with previous studies of *vivax* malaria [10,41]. During the malaria episode, hemoglobin was lower than at other follow-up times, as malaria can contribute to lowering these levels [10-13]. Besides, it was observed that a hemoglobin <12 g/dL was more frequent in the group of individuals with malaria recurrence. Other studies demonstrated that repeated malarial infections affect the blood profiles to a very great extent and recurrent *P. vivax* patients are prone to develop anemia in due course of the infection [26]. In Brazil, day 3 and day 7, hemoglobin levels were significantly lower in patients presenting chloroquine resistance [42].

However, important limitations to our study need to be mentioned. Other potential causes of anemia were not evaluated, such as iron deficiency which could have some influence on the study outcome and doses of antimalarials were not

recorded. Additionally, no data were available on some important confounders, especially helminthic infections, nutritional status and haemoglobinopathies.

To conclude, vivax malaria, parasitemia, age and recurrence were associated with hemoglobin average. Findings showed here represent an important contribution to the knowledge of the malaria epidemiology and anemia by *P. vivax* and could be useful to assist on the development and implementation of strategies to control and eliminate this infection in the region. However, further studies are needed to assess whether antimalarials can impact hemoglobin levels and how long it takes for hemoglobin to recover with comprise pragmatic intervention trials and investigation of other diseases that may influence hemoglobin.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The research was approved by the National Ethics Review Committee (CONEP – protocol number 15197/2008) and the Ethics Committee of the Hospital Clinic, Barcelona, Spain. A free and informed consent form was read and signed by all participants. All individuals diagnosed with malaria at the time of the survey receive assistance and appropriate treatment. In complication case, patients were referred to the Careiro Hospital.

Availability of data and materials

The datasets during and/or analyzed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Research Support Foundation of Amazonas (FAPEAM) supported this study. MVGL are level 1 fellows from CNPq and WMM are level 2 from CNPq. LLOS have fellowships from CNPq.

Authors' contribution

GCM VSS WMM, designed the study design. LLOS IS, organization and cleaning of the database. LLOS MGAR, data analysis. LLOS IS contributed to the writing of the manuscript. LLOS wrote the first draft of the article. GCM VSS WMM critical review of the final manuscript.

Acknowledgements

For Fundação de Medicina Tropical – Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT_HVD), for the space granted and CNPQ for the scholarship made available.

References

1. WHO. World malaria report 2019. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2019. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme>
2. Barcus MJ, Basri H, Picarima H, Manyakori C, Elyazar I, Bangs MJ, Maguire JD, Baird JK. Demographic Risk Factors for Severe and Fatal *vivax* and *falciparum* Malaria Among Hospital Admissions in Northeastern Indonesian Papua. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77:984-91.
3. Rodriguez MAJ, Sanchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M. Is Anemia in *Plasmodium vivax* Malaria More Frequent and Severe than in *Plasmodium falciparum* ? *Am J Med.* 2006;119:9-10.
4. Benzecry SG, Alexandre MA, Silva SV, Salinas JL, Melo GC, Marinho HA, Paes AT, Siqueira AM, Monteiro WM, Lacerda MVG, Leite HP. Micronutrient Deficiencies and *Plasmodium vivax* Malaria among Children in the Brazilian Amazon. *PLoS.* 2016;1–13.
5. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The Neglected Burden of *Plasmodium vivax* Malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64:97-106.
6. Rodriguez MAJ, Benítez JA, Arria M. Malaria Mortality in Venezuela : Focus on Deaths due to *Plasmodium vivax* in Children. *Journal of Tropical Pediatrics.* 2007;54:94-101.
7. Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 2000;13:277–99.

8. Looareesuwan S, Davis TME, Pukrittayakamee S, Supanaranond W, Desakorn V, Silamut K, Krishna S, Boonamrung S, White NJ. Erythrocyte survival in severe *falciparum* malaria. *Acta Tropica*. 1991;48:263–70.
9. Phillips RE, Looareesuwan S, Warrell DA, Lee SH, Karbwang J, Warrell MJ, White NJ, Swasdichais C, Weatherall DJ. The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated *falciparum* malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. *Q J Med*. 1986;58:305-23.
10. Price RICN, Simpson JA, Nosten F, Luxemburger C, Hikirjaroen L, Kuile FT, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ. Factors Contributing to Anemia After Uncomplicated *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65:614-22.
11. Mayxay M, Khanthavong M, Lindega N, Keola S, Barends M, Pongvongsa T, Yapom R, Annerberg A, Phompida S, Phetsouvanh R, White NJ, Newton PN. Randomized Comparison of Chloroquine plus Sulfadoxine-Pyrimethamine versus Artesunate plus Mefloquine versus Artemether-Lumefantrine in the Treatment of Uncomplicated *Falciparum* Malaria in the Lao People's Democratic Republic. *Clin Infect Dis*. 2004;39:1139–47.
12. Ratcliff A, Siswanto H, Kenangalem E, Maristela R, Wuwung RM, Laihad F, Ebsworth EP, Anstey NM, Tjitra E, Price RN. Two fixed-dose artemisinin combinations for drug-resistant *falciparum* and *vivax* malaria in Papua , Indonesia : an open-label randomised comparison. *Lancet*. 2007;369:757-65.
13. Leslie T, Safi MH, Klinkenberg E, Rowland M. Sulfadoxine-Pyrimethamine, Chlorproguanil-Dapsone, or Chloroquine for the Treatment of *Plasmodium*

- vivax* Malaria in Afghanistan and Pakistan A Randomized Controlled Trial. JAMA 2007;297:2201–9.
14. Quintero JP, Siqueira AM, Tobón A, Blair S, Moreno A, Herrera AM, Lacerda MVG, Valencia SH. Malaria-related anaemia : a Latin American perspective. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:91–104.
 15. IBGE. Censo Demográfico 2010. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2010.
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010>.
 16. Silva SV, Siqueira AM, Sampaio VS, Guinovart C, Lecca RCR, Melo GC, Monteiro WM, Portillo HÁ, Alonso P, Bassat Q, Lacerda MVG. Declining malaria transmission in rural Amazon : changing epidemiology and challenges to achieve elimination. Malar J. 2016;1–14.
 17. Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner M, Thomson JRB, Peterson LR, Kaul KL. Real-Time PCR for Detection and Identification of *Plasmodium* spp. J Clin Microbiol. 2005;43:2435–40.
 18. Murphy SC, Prentice JL, Williamson K, Wallis CK, Fang FC, Fried M, Pinzon C, Wang R, Talley AK, Kappe SHI, Duffy PE, Cookson BT. Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR for Monitoring of Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Infections in Malaria Human Challenge Trials. Am J Trop Med Hyg. 2012;86:383–94.
 19. WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System.

Geneva, World Health Organization, 2011.
 (<http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>, accessed [17/05/2020]).

20. Herrera MA, Perez ML, Medina L, Moreno A, Gutierrez JB, Herrera S. Clinical profile of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in low and unstable malaria transmission settings of Colombia. *Malar J.* 2015;14:1–11.
21. Ferreira JO, Lacerda MVG, Brasil PS, Ladislau JLB, Tauil PL, Ribeiro CTD. Malaria in Brazil : an overview Review. *Malar J.* 2010;1–15.
22. Sampaio VS, Siqueira AM, Alecrim MGC, Mourão MPG, Marchesini PB, Albuquerque BC, Nascimento J, Figueira EAG, Alecrim WD, Monteiro WM, Lacerda MVG. Malaria in the State of Amazonas : a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. *Rev Soc Bra Med Trop.* 2015;48:4–11.
23. Cardoso MA, Scopel KKG, Muniz PT, Villamor E, Ferreira MU. Underlying Factors Associated with Anemia in Amazonian Children : A Population-Based , Cross - Sectional Study. 2012;7(5).
24. Arruda EF, Araujo FM, Guimarães MGS, Nogueira R, Ramalho AA, Nunes MS. Association between malaria and anemia in an urban area with *Plasmodium* transmission: Mâncio Lima, Acre State, Brazil. *Cad Saúde Pública.* 2016;32(9).
25. Taylor WRJ, Widjaja H, Basri H, Tjitra E, Ohrt C, Taufik T, Baso S, Hoffman SL, Richie TL. Haemoglobin dynamics in Papuan and non-Papuan adults in

- northeast Papua , Indonesia , with acute , uncomplicated *vivax* or *falciparum* malaria. Malar J. 2013;12: 2-9.
26. Marques MM, Costa MRF, Santana FS, Vieira JLF, Nascimento MTS, Brasil LW, Nogueira F, Silveira H, Lecca RCR, Monteiro WM, Lacerda MVG, Alecrim MGC. *Plasmodium vivax* Chloroquine Resistance and Anemia in the Western Brazilian Amazon. Journals ASM org. 2014;58:342-47.
 27. Caicedo O, Ramirez O, Mourão MPG, Ziadec J, Perez P, Santos JB, Quinones F, Alecrim MGC, Herrera MA, Lacerda MVG, Herrera S. Comparative Hematologic Analysis of Uncomplicated Malaria in Uniquely Different Regions of Unstable Transmission in Brazil and Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2009;80:146–51.
 28. Mcelroy PD, Kuile FOT, Lal AA, Bloland PB, Hawley WA, Oloo AJ, Monto AS, Meshnick SR, Nahlen BL. Effect of *Plasmodium falciparum* Parasitemia Density on Hemoglobin Concentrations Among Full-Term, Normal Birth Weight Children in Western Kenya, IV. The Asembo bay Cohort Project. Am J Trop Med Hyg. 2000;62:504–12.
 29. Zwang J, Alessandro UD, Ndiaye J, Djimdé AA, Dorsey G. Haemoglobin changes and risk of anaemia following treatment for uncomplicated *falciparum* malaria in sub-Saharan Africa. BMC Infect Dis. 2017;1–10.
 30. Menezes CB, Bardají A, Campos GS, Fernandes S, Hanson K, Espinosa FEM, Menendez C, Sicuri E. Costs Associated with Malaria in Pregnancy in the Brazilian Amazon , a Low Endemic Area Where *Plasmodium vivax*

Predominates. PLoS Negl Trop Dis. 2016;1–19.

31. Burdam FH, Hakimi M, Thio F, Kenangalem E, Indrawanti R, Noviyanti R, Trianty L, Marfurt J, Handayuni I, Soenarto Y, Douglas NM, Anstey NM, Price RN, Poespoprodjo JR. Asymptomatic *Vivax* and *Falciparum* Parasitaemia with Helminth Co-Infection : Major Risk Factors for Anaemia in Early Life. PLoS Negl Trop Dis. 2016;1–15.
32. Punmath K, Dayanand KK, Chandrashekar VN, Achur RN. Clinical features and haematological parameters among malaria patients in Mangaluru city area in the southwestern coastal region of India. Parasitol Res. 2019.
33. Totino PRR, Magalhães AD, Alves EB, Costa MRF, Lacerda MVG, Ribeiro CTD, Cruz MFF. *Plasmodium falciparum*, but not *P.vivax*, can induce erythrocytic apoptosis. Parasit Vectors. 2014;7:484.
34. Kenangalem E, Karyana M, Burdarm L, Yeung S, Simpson JA, Tjitra E, Anstey NM, Poespoprodjo JR, Price RN, Douglas NM. *Plasmodium vivax* infection : a major determinant of severe anaemia in infancy. Malar J. 2016;15:1–10.
35. Scheu K, Adegnikaa AA, Addo MM, Ansong D, Cramer JP, Furst S, Kremsner PG, Kurth F, Jacobs T, May J, Ramharter M, Sylverken J, Vinnemeier CD, Agbenyega T, Rolling T. Determinants of post-malarial anemia in African children treated with parenteral artesunate. Scientific Reports, natureresearch. 2019;9:1–8.
36. Scopel KKG, Fontes CJF, Ferreira MU, Braga EM. *Plasmodium falciparum*: IgG subclass antibody response to merozoite surface protein-1 among

Amazonian gold miners, in relation to infection status and disease expression. *Exp. Parasitol.* 2012;109:124-134.

37. Duarte EC, Pang Lw, Ribeiro LC, Fontes CJF. Ciation of Subtherapeutic Dosages of a Standard Drug Regimen With Failures in Preventing Relapses of *vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65(5):471-6.
38. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL, Menendez C, Fleming A, Alonso P. Malaria-related Anaemia. *Parasitol Today.* 2000;4758(00).
39. Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Michael J. Severe Malarial Anemia : Innate Immunity and Pathogenesis. *Int J Biol Sci.* 2011;7:1427-1442.
40. Poravuth Y, Socheat D, Rueangweerayut R, Uthaisin C, Phyo AP, Valecha N, Rao BHK, Tjitra E, Purnamas A, Fuhrer IB, Duparc S, Shin CS, Fleckenstein L. Pyronaridine-Artesunate versus Chloroquine in Patients with Acute *Plasmodium vivax* Malaria : A Randomized, Double-Blind, Non-Inferiority Trial. *PLoS.* 2011;6.
41. Pukrittayakamee S, Imwong M, Chotivanich K, Singhasivanon P, Day NPJ, White NJ. A Comparison of Two Short-Course Primaquine Regimens for the Treatment and Radical Cure of *Plasmodium vivax* Malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82:542–7.
42. Selvam R, Baskaran G. Hematological Impeirments in Recurrent *Plasmodium vivax* Infected Patients. *Jpm Med Sci Biol.* 1996;49:151-65.

TABLES

Table 1. Epidemiological characteristics of the people who participated in the cross sections in Careiro municipality, Amazonas State.

Area of occurrence	Results (%)
Panelão	710 (57.6)
Castanho Sítio	522 (42.4)
Sexo	
Male	700 (56.8)
Female	532 (43.2)
Age (years)	
n < 5	168 (13.6)
5-12	213 (17.3)
12-15	107 (8.7)
15-35	350 (28.4)
35-55	254 (20.6)

Table 2- Univariable and multivariable analyses of hemoglobin mean according to malaria status.

Variables	Univariable				Multivariable			
	Coefficient	P	[IC 95%]		Coefficient	P	[IC 95%]	
Parasitemia of <i>P. vivax</i>	-0.00006	0.001	-0.00008	-0.00002	-0.00004	0.038	-0.00007	-0.00000195
Malaria for <i>P. vivax</i>	-0.398	0.001	-0.622	-0.173	-0.271	0.032	-0.518	-0.024
Age, Mean (DP)	0.022	0.000	0.018	0.027	0.021	0.000	0.017	0.026

FIGURES

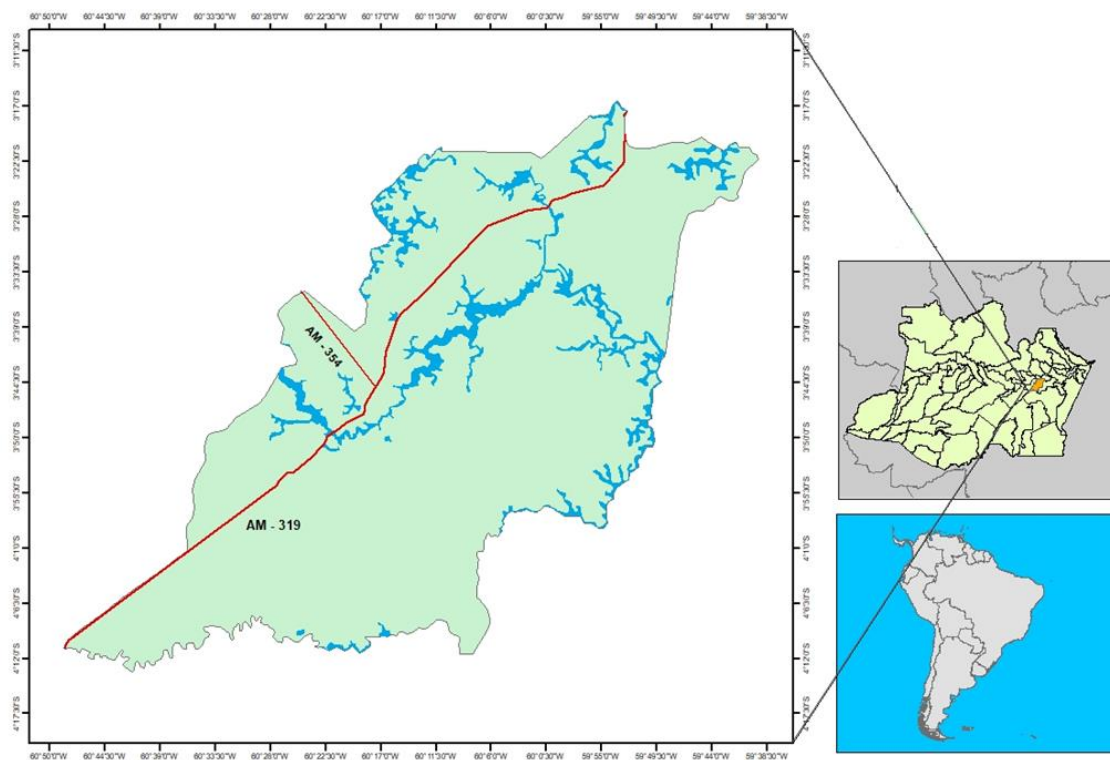


Figure 1. Study Area in Municipality of Careiro, Amazonas, Brazil. Red lines identify roads where communities live. Red lines highway, blue hydrography, and green city of Careiro.

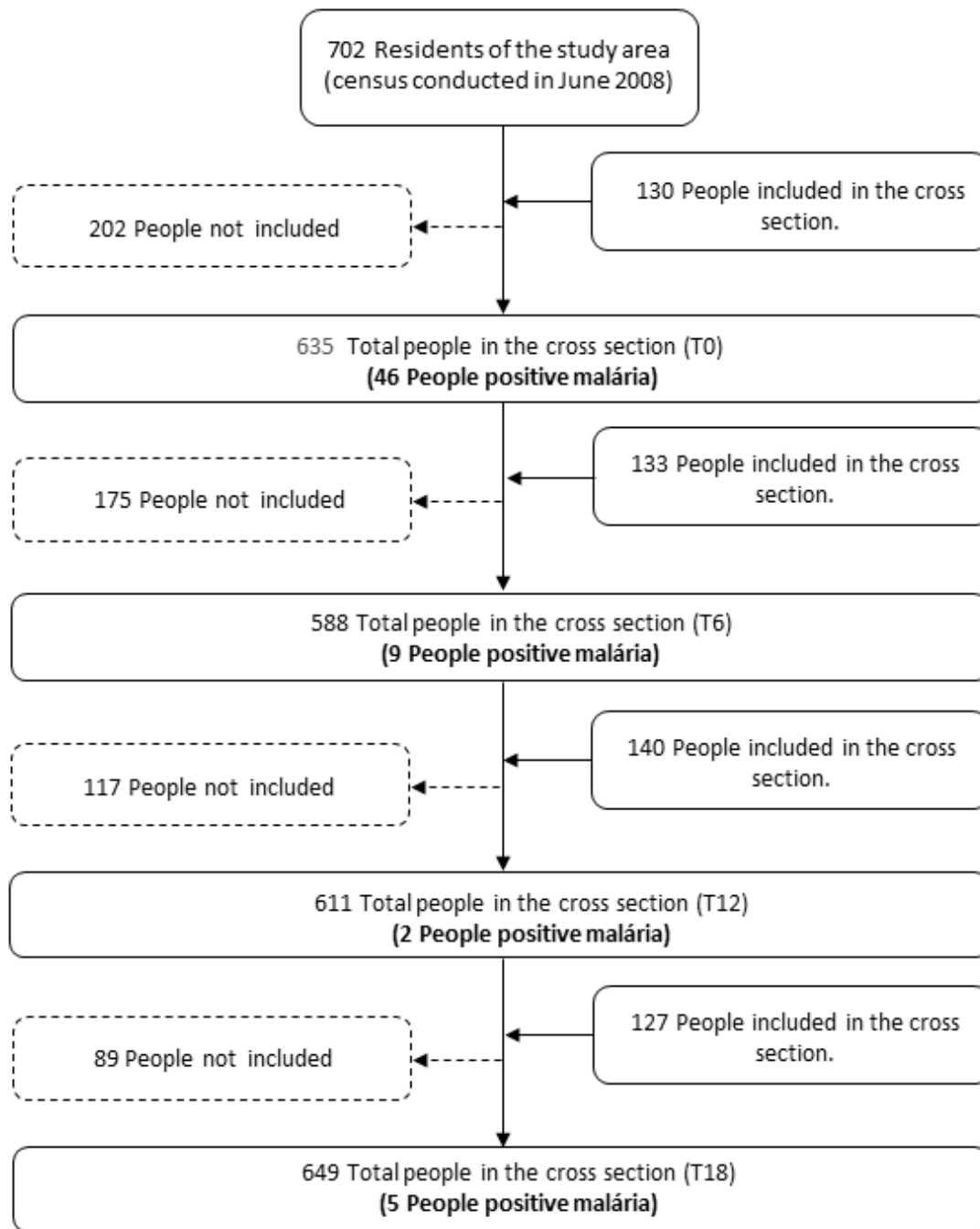


Figure 2. Flow chart of inclusion along the prospective cohort. T0 initial study time. T6 six months after the start of the study. T12 twelve months after the start of the study. T18 eighteen months after beginning the study.

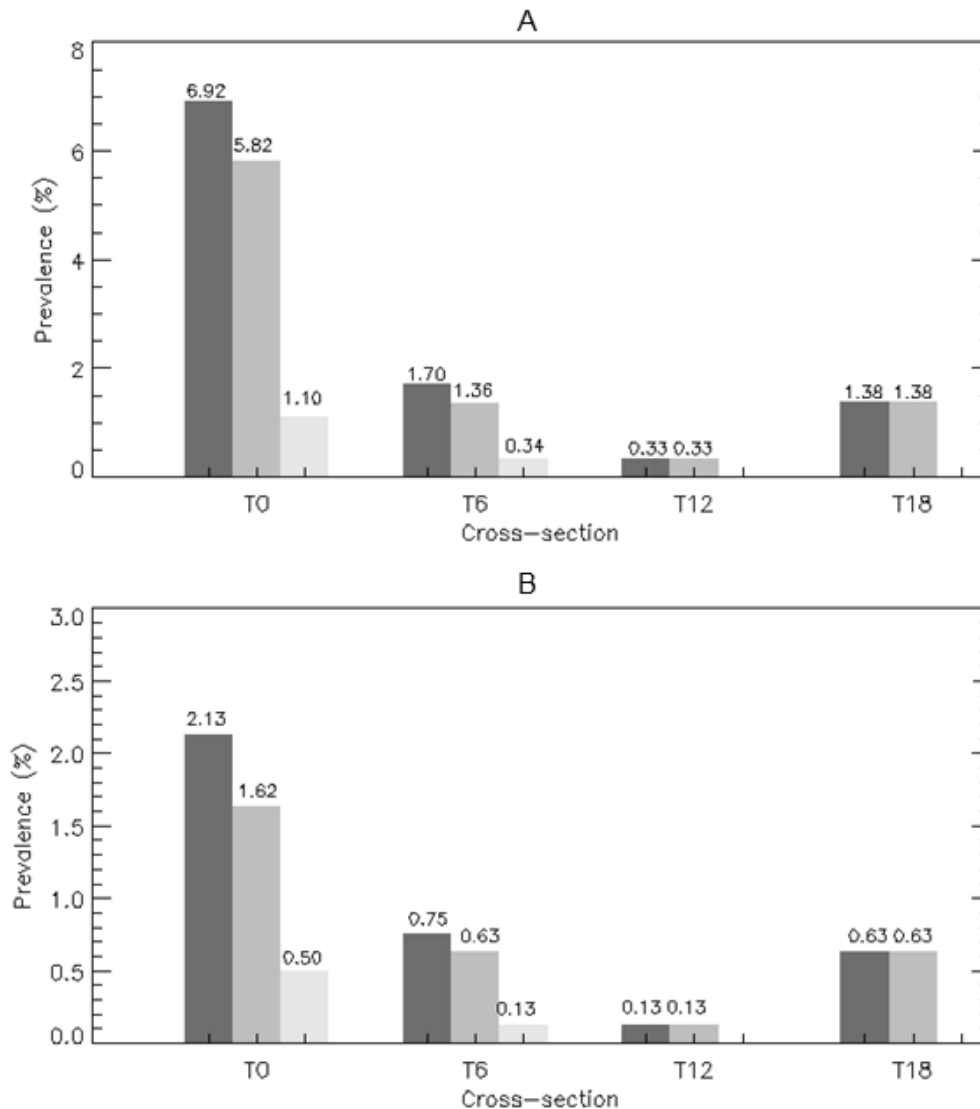


Figure 3. Prevalence of malaria by species and anemia in four cross-sectional surveys performed in the study by active case detection. A. Prevalence of malaria by species in four cross-sectional surveys performed in the study by active case detection. B. Prevalence of anemia in four cross-sectional surveys performed in the study by active case detection. Dark gray bar is total malaria cases. Gray bar is *Plasmodium vivax*. Light gray bar is *Plasmodium falciparum*.

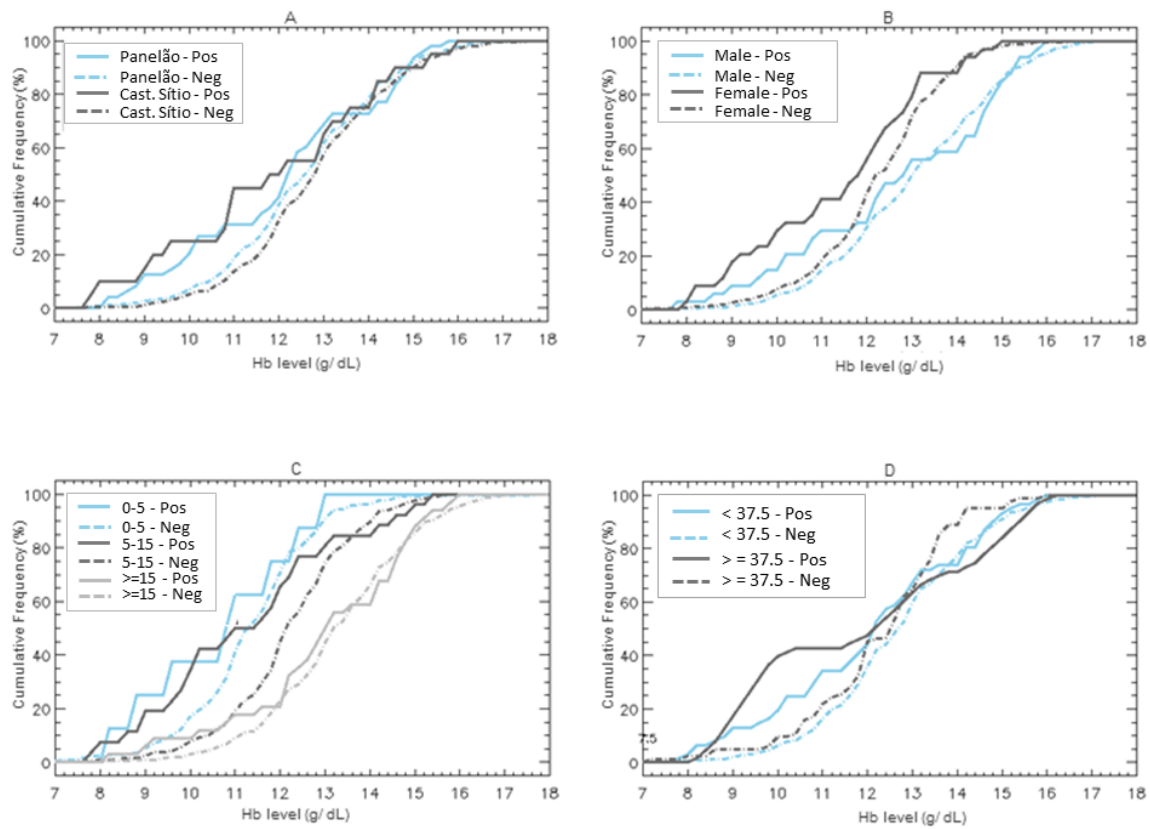


Figure 4. Cumulative frequency distribution of hemoglobin levels in cases with and without malaria in active monitoring. A. Area. B. Gender. C. Age. D. Temperature.

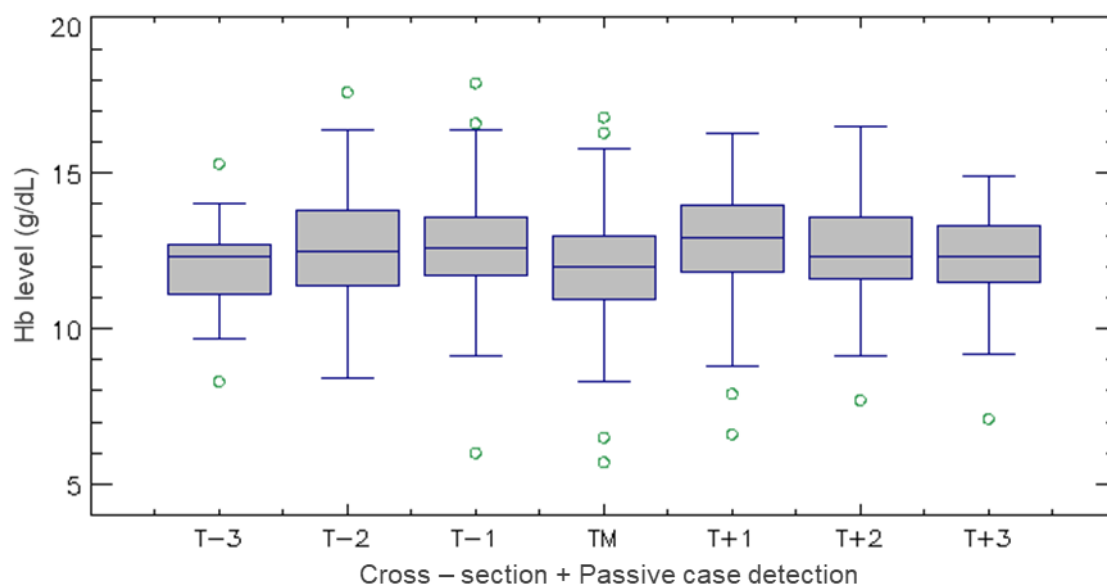


Figure 5. Boxplot of hemoglobin levels in malaria cases through active and passive monitoring. T-3,T-2,T-1, hemoglobin measurements before malaria; TM, malaria episode; T+1,T+2, T+3, hemoglobin measurements after malaria episode.

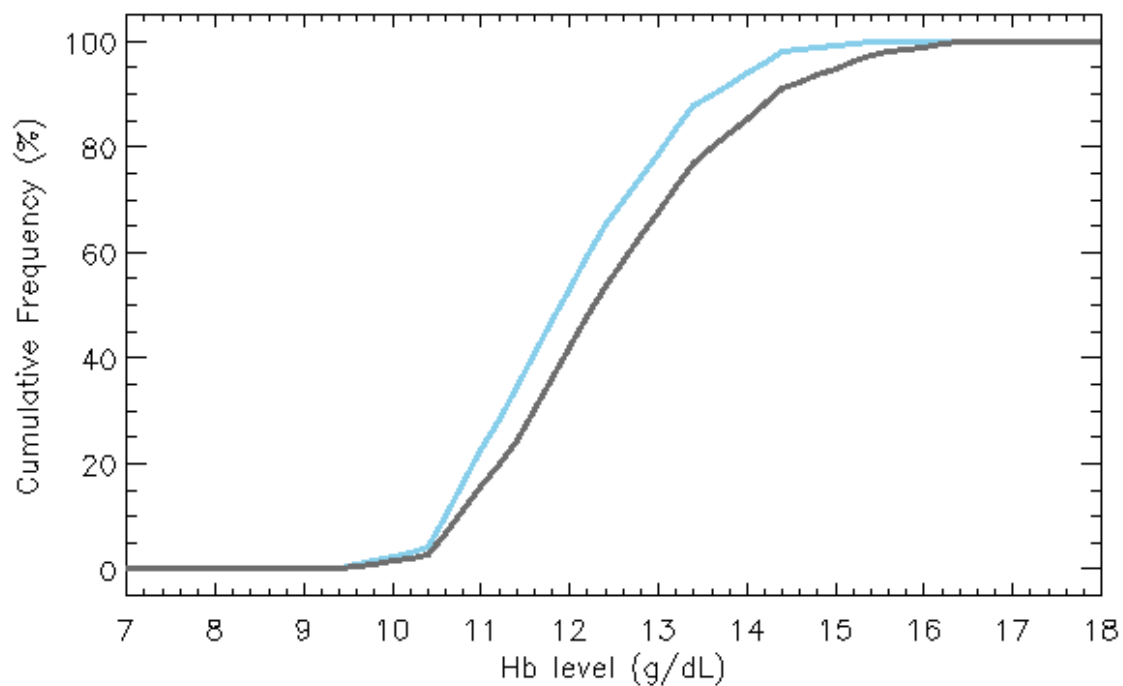


Figure 6. Cumulative frequency distribution levels in recurrent and non-recurrent cases of malaria. Blue line show recurrence cases. Black line show no recurrence cases.

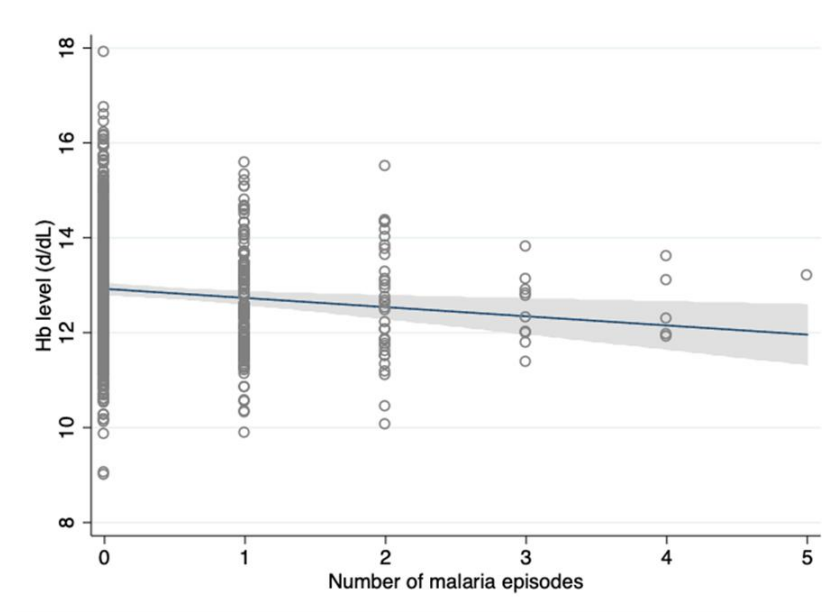


Figure 7. Relationship between the number of malaria episodes and hemoglobin levels.

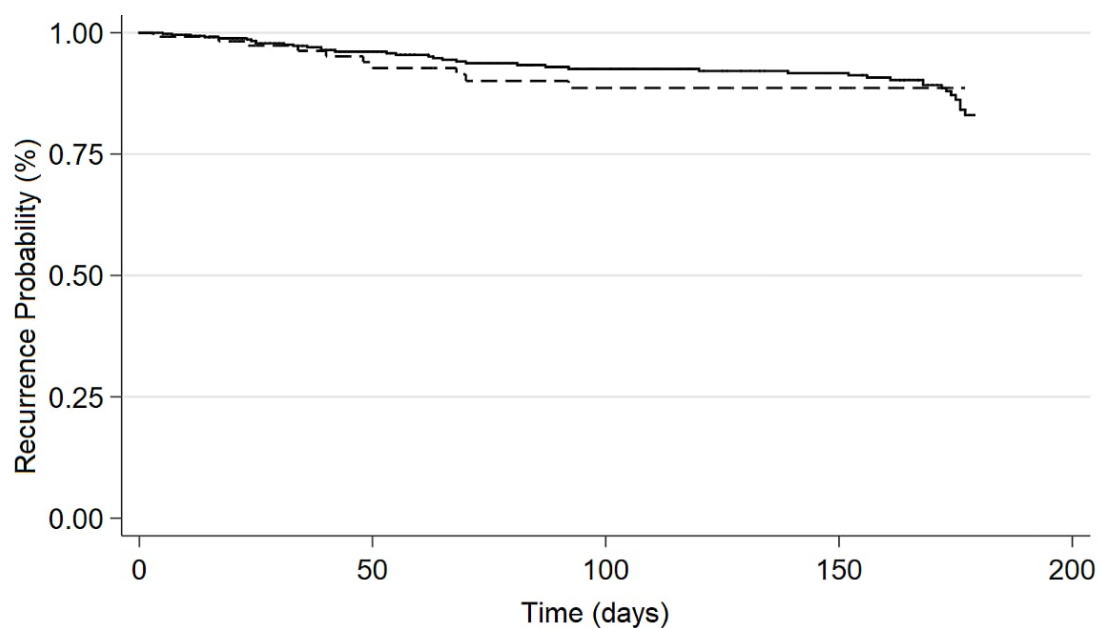


Figure 8. Kaplan-Meier curve for recurrence time for hemoglobin levels below and above 12 g/dL. Blue line recurrence cases, black line cases no recurrence. Black hemoglobin line less than 12g/dL, black dashed line hemoglobin greater than 12g/dL. Log-rank=0.000; p=0.9503.

4 LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Não foram avaliadas outras causas de anemia, como deficiência de ferro, de ácido fólico que poderia influenciar no resultado do estudo. Além disso, as doses de antimaláricos não foram registradas e não haviam dados disponíveis sobre alguns fatores de confusão importantes, especialmente infecções helmínticas, estado nutricional e hemoglobinopatias.

5 CONCLUSÃO

- Houve baixa prevalência de anemia relacionada à malária.
- A malária vivax esteve associada a níveis mais baixos de hemoglobina.
- Os níveis de hemoglobina foram menores nos casos positivos de malária e estão associados à parasitemia.
- Houve associação significativa entre a administração de antimaláricos e os níveis de hemoglobina.
- A hemoglobina diminuiu em episódios recorrentes de malária.
- Observou-se que hemoglobina <12 g / dL foi mais frequente no grupo de indivíduos com recidiva da malária.

Os resultados aqui apresentados representam uma importante contribuição para o conhecimento da epidemiologia da malária e anemia *P.vivax*. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar se os antimaláricos podem impactar os níveis de hemoglobina e quanto tempo leva para a hemoglobina se recuperar com ensaios pragmáticos de intervenção e investigação de outras doenças que podem influenciar a hemoglobina.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. For the treatment of malaria. 3° edição. Geneva: WHO; 2015.
2. Cox FEG. History of Human Parasitology. Clinical Microbiology Reviews. 2002; 15(4):595-612.
3. Brasil. Guia Prático de Tratamento da malária no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília/DF: Ministério da Saúde; 2010.
4. Bueno MB, Selem SSC, Arêas JAG, Fisberg RM. Prevalence and associated factors for anemia among children of public day-care centers in the city. Rev Bras Epidemiol. 2007; 9(4):462-70.
5. World Health Organization. World malaria report. Geneva: WHO; 2018.
6. Evans KJ, Hansen DS, Rooijen NV, Lynn A. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. Blood Journal. 2006; 107.
7. Coura J, Suarez MM, Ladeia AS. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101(3):229-237.
8. Brasil. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília/DF: Ministério da Saúde; 2020; 118.
9. Brasil. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília/DF: Ministério da Saúde; 2019; 50(12).
10. Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. Vox Sanguinis. 2006; 90(2):77-84.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de imunização e Doenças Transmissíveis. Guia de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.
12. Nacher M, Carrara VI, Ashley E, McGready R, Hutagalung R, Nguen JV, Thwai KL, Looareesuwan S, Nosten F. Seasonal variation in hyperparasitaemia and gametocyte carriage in patients with *Plasmodium falciparum* malaria on the Thai—Burmese border. Elsevier. 2004; 98:322-328.
13. Aregawi M, Cibulskis RE, Otten M, Williams R. Relatório mundial da malária. 2009; Disponível em: who.int/malaria/world_malaria_repo.
14. Kochar DK, Das A, Kochar SK, Saxena V, Sirohi P, Garg S, Kochar A, Khatri MP, Gupta V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. Am J Trop Med Hyg. 2009; 80(2):194-198.
15. Mito LD, Galhardi CF, Amarante MK. Parasitological and immunological aspects of malaria. Biosaúde. 2012; 14(1) 42–55.
16. Baird JK. Evidência e implicações da mortalidade associada à malária aguda por *Plasmodium vivax*. Clin Microbiol Ver. 2013; 26:36-57.

17. Price RN, Simpson JA, Nosten F, Luxemburger C, Hkirjaroen L, Kuile FT, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ. Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65(5):614-622.
18. Jhorawat R, Beniwal P, Malhotra V. *Plasmodium vivax* induced hemolytic uremic syndrome: An uncommon manifestation that leads to a grave complication and treated successfully with renal transplantation. *Trop Parasitol.* 2005; 5(2): 127-129.
19. Agarwal AA, Sonkar A, Kushwaha J, Gaurav K. Spontaneous splenic rupture presenting as haemoperitoneum: Coinfection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *BMJ Case Rep.* 2013.
20. Dombrowski JG, Souza RM, Silva NRM, Barateiro A, Epiphanyo S, Gonçalves LA, Marinho CRF. Malaria during pregnancy and newborn outcome in an unstable transmission area in Brazil: A population based record linkage study. *Plos One.* 2018; 13(6).
21. Tapajós R, Castro D, Melo G, Balogun S, James M, Pessoa R, Almeida A, Costa M, Pinto R, Albuquerque B, Monteiro W, Bragas J, Lacerda M, Mourão MP. Malaria impact on cognitive function of children in a peri-urban community in the Brazilian Amazon. *Malar J.* 2019; 18 (1):1–12.
22. Brasil. Guia de Vigilância em saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília/DF: Ministério da Saúde; 2017.
23. WHO_2014. Meeting Report. 2014;(March):1–33.
24. Mota MM, Rodriguez A. Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. *Bio Essays.* 2002; 24:149–56.
25. Brasil. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília/DF: Ministério da Saúde; 2005.
26. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, Portillo HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax* , a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect.* 2009; 9(9):555–66.
27. Botelho C, Barbosa LSG, Aquino JL, Silva MD, Meirelles SMP, Jardim JRB. Manifestações respiratórias na malária por *Plasmodium falciparum* e *vivax*. *Rev Inst Med Trop.* 1987;29(6):337-345.
28. Afrane YA, Zhou G, Githeko AK, Yan G. Clinical malaria case definition and malaria attributable fraction in the highlands of western Kenya. *Malar J.* 2014;13:405.
29. Mutis MCS, Espinosa FEM, Albuquerque BC. Malaria. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005; (1)833-58..
30. Akinosoglou K, Solomou EE, Gogos CA. Malaria : a haematological disease. *ISH Hematology.* 2012;17(2): 106-114.
31. Ventura_2010. Anemia da Malária por *Plasmodium vivax* : Estudo Clínico e Laboratorial em Crianças e Adolescentes Anemia da Malária por *Plasmodium vivax* : Estudo Clínico e Laboratorial em Crianças e Adolescentes. 2010;

32. Carvalho AGC, Lira PIC, Barros MFA, Aléssio MLM, Lima MC, Carbonneau MA, Berger J, Léger CL. Diagnosis of iron deficiency anemia in children of Northeast Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2010;44(3):513–9.
33. Faria G, Luz GS, Betin TA. Epidemiological aspect of notifications of malaria from 2012 to 2017 in the municipality Rondolandia-MT. *Rev Aten Sau*. 2019;17(60):83-90.
34. WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition information System. Geneva, World Health Organization, 2011(<http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>, accessed 16/11/2020). World malaria report. Geneva: WHO; 2018.
35. Pandey AV, Bablarwal VK, Okoyeh JN, Joshi RM, Puri SK, Singh RL, Chauhan VS. Hemozoin formation in malaria: a two-step process involving histidine-rich proteins and lipids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308(4):736–43.
36. Almeida PAM, Ciari C, Santos JLF, Siqueira AAF. Curva de hemoglobina em um grupo de gestantes normais. *Rev Saúde Publ*. 1973; 7:273-82.
37. Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nature Reviews*. 2009; 7:341-50.
38. Doolan DL, Um Y, Unal B, Sundares S, Hirst S, Valdez C, Randall A, Molina D, Freilich DA, Oloo JA, Blair PL, Aguiar JC, Baldi P, Davies DH, Felgner PL. *Proteomics*. 2008; 8, 4680–4694.
39. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah DA, Price RN. Multidrug resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria. *Plos Medicine*. 2008; 5(6):890-98.
40. Molyneux ME, Taylor TE, Wirima JJ, Borgstein A. Clinical Features and Prognostic Indicators in Paediatric Cerebral Malaria: A Study of 131 Comatose Malawian Children. *Quarterly Journal of Medicine*. 1989;(265):441–59.
41. Philips RE, Looareesuwan S, Warrell DA, Lee SH, Karbwang J, Warrell MJ, White NJ, Swasdichais C, Weatherall DJ. The Importance of Anaemia in Cerebral and Uncomplicated Falciparum Malaria: Role of Complications, Dyserythropoiesis and iron Sequestration. *Quarterly Journal of Medicine*. 2019; 58(227):305-323.
42. Taylor WRJ, Widjaja H, Basri H, Tjitra E, Ohrt C, Taufik T, et al. Haemoglobin dynamics in Papuan and non-Papuan adults in northeast Papua , Indonesia , with acute , uncomplicated vivax or falciparum malaria. 2013;1–9.
43. Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, Price RN. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malar Journal*. 2012;11:135.
44. Collins WE, Jeffery GM, Roberts JM. A retrospective examination of anemia during infection of humans with *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med*. 2003; 68:410-412.

45. Ronald LA, Kenny SL, Klinkenberg E, Akoto AO, Boakye I, Donnelly M. Malaria and anaemia among children in two communities of Kumasi, Ghana: a cross-sectional survey. *Malar J.* 2006;5:105.
46. Kenangalem E, Karyanas M, Burdarm L, Yeung S, Simpson JA, Tjitra E, Anstey NM, Poespoprodjo JR, Price RN, Douglas NM. *Plasmodium vivax* infection: a major determinant of severe anaemia in infancy. *Malar J.* 2016;15:321
47. Chanchi NK, Khan MH, Arain MA, Zubairi MBA, Raheem A, Khan MA. Hematological Profile and Gametocyte Carriage in Malaria Patients from Southern Pakistan. *Cureus.* 2019;11(3).
48. Lacerda MV, Mourão MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhães BM, Martinez-Espinosa FE, et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J.* 2012;11:1–18.
49. Arruda EF de, Araujo FM de, Guimarães MG da S, Nogueira R, Ramalho AA, Silva-Nunes M da. Associação entre malária e anemia em área urbana de transmissão do Plasmodium: Mâncio Lima, Acre, Brasil. *Cad Saude Publica.* 2016; 32(9).
50. Ventura_2010. Anemia da Malária por Plasmodium vivax : Estudo Clínico e Laboratorial em Crianças e Adolescentes Anemia da Malária por Plasmodium vivax : Estudo Clínico e Laboratorial em Crianças e Adolescentes. 2010;
51. Siqueira AM, Cavalcante JA, Vítor-Silva S, Reyes-Lecca RC, Alencar AC, Monteiro WM, et al. Influence of age on the haemoglobin concentration of malaria-infected patients in a reference centre in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(5):569–76.
52. Noronha E, Alecrim MGC, Romero GAS, Macedo V. Estudo clínico da malária falciparum em crianças em Manaus, AM, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000;33(2):185–90.

7 ANEXOS E APÊNDICES



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 109/2009

Registro CONEP: 15197 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0056.0.114.000-08

Processo nº 25000.218367/2008-74

Projeto de Pesquisa: "Epidemiologia da malária no município do Careiro/AM."

Pesquisador Responsável: Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda

Instituição: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/MT/AM

CEP de origem: CEP/FMT/AM

Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação Estrangeira

Patrocinador: Consórcio *Plasmodium vivax* (FMT/AM, Fundació Privada CELLEX e Centre de Recerca de Salut Internacional de Barcelona, Espanha (CRESIB)).

Sumário geral do protocolo

Conforme consta no projeto, na América Latina, como na maior parte da Ásia, *P. vivax* é a principal espécie responsável pela infecção da malária. No Brasil, há mais de uma década, *P. vivax* é a espécie predominante e apesar do elevado número de casos desta doença no país, alguns estudos foram realizados e, a maioria deles dedicados à resistência do parasito aos antimaláricos e somente alguns desses estudos concentraram-se em aspectos epidemiológicos. Outro aspecto considerado diz respeito ao controle da doença que tem servido para reduzir o número de mortes, mas o número total de casos ainda está aumentando, apesar dos programas de controle desenvolvidos pelo governo federal. Uma das razões para isso é provavelmente o fato do controle de uma espécie como *P. vivax* ser muito mais complicado do que o controle de *P. falciparum*, por causa do rápido desenvolvimento dos gametócitos na infecção do *P. vivax* e os dilemas da falta de outros medicamentos para tratar hipnozoítos. A presença de casos assintomáticos na população, também, foi descrito como um possível co-fator para a manutenção da doença.

Em 2006, três municípios (Manaus, Porto Velho e Cruzeiro do Sul) foram responsáveis pelo registro de 30% dos casos de malária no Brasil, o que aponta para uma distribuição heterogênea da doença. Em Manaus, 63.656 casos de malária (48.842 de *P. vivax*), foram notificados em 2005, caracterizando um grande surto de malária jamais visto na cidade. O problema está relacionado com a intensa migração de trabalhadores e suas famílias de municípios vizinhos, que são altamente endêmicos para malária, atraídos pela economia desta cidade e pelo distrito industrial (zona franca). Portanto, descrever as características das comunidades, incluindo os padrões de idade, a incidência e a sazonalidade, é necessário não só para uma melhor compreensão do problema e das possibilidades de controle, mas também para estabelecer uma base de dados para futuras intervenções, tais como ensaios com candidatos vacinais.

Considerando esse contexto, o projeto de pesquisa em tela tem por objetivo geral descrever a epidemiologia da malária em uma área endêmica nos arredores de Manaus, incluindo a incidência nas idades específicas e a sazonalidade. Dentre os objetivos específicos destacam-se: Estimar a prevalência total e específica por idade de infecção por *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae* e malária clínica nas localidades do P.A. Panelão e Castanho Sítio; Estimar as prevalências de deficiência de fator Duffy e de anemia e esplenomegalia entre as duas populações estudadas e estimar a incidência de malária clínica (total e específica por idade); descrever: a

Cont. Parecer CONEP 109/09

apresentação clínica da infecção por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* no P.A. Panelão e Castanho Sítio; a sazonalidade nas localidades de estudo; o uso de drogas antimaláricas e as medidas de controle utilizadas pela população das localidades de estudo e finalmente, descrever a apresentação clínica de pacientes com gota espessa negativa e PCR positiva e os principais vetores locais relacionados à transmissão de malária e as taxas de inoculação.

Trata-se de um estudo descritivo prospectivo, envolvendo toda a população das áreas selecionadas em um censo preliminar. Neste momento, as comunidades serão sensibilizadas, informadas sobre o estudo e convidadas a participar. Se aceitarem, de cada indivíduo da comunidade será solicitado assinatura do TCLE.

O acompanhamento dos sujeitos de pesquisa será feito por meio de corte transversal, através da busca passiva e detecção de casos pelos postos de saúde durante todo o estudo. Para a busca ativa os cortes transversais serão realizados a cada 06 meses (2 na época de maior pluviosidade e 2 na época de menor pluviosidade). Nas visitas serão realizadas a história clínica, o exame físico e a coleta de sangue. Uma amostra de sangue periférico do dedo (500 µL) será colhida para detecção da infecção pelo *Plasmodium* sp., dosagem de hemoglobina para realização da PCR e genotipagem de fator Duffy na FMT-AM. As PCR's serão também realizadas na FMT/AM. Uma amostra sangüínea será colhida em papel filtro denso sempre que uma lâmina for coletada. Posteriormente, o DNA será extraído a partir deste papel filtro, utilizando kits comercialmente disponíveis. A genotipagem das espécies e do fator Duffy será executada por PCR, de acordo com procedimentos operacionais padronizados. As informações serão registradas em formulários padronizados. No total, a equipe irá conduzir uma visita de recenseamento e de sensibilização, e 04 cortes transversais. O médico participante do estudo, também, vai realizar visitas mensais durante os 3 meses seguintes aos cortes transversais, a fim de detectar ativamente a ocorrência de sintomas possivelmente relacionados com a infecção malárica detectada apenas por PCR.

Durante os cortes transversais, será realizada coleta de anofelinos por uma equipe entomológica em pontos distintos das localidades estudadas. Taxas de inoculação serão calculadas com base no número de capturas realizadas em toda a noite. As amostras serão identificadas morfológicamente e os mosquitos serão testados por ELISA para detectar antígenos esporozoítos, utilizando anticorpos monoclonais específicos para *P. falciparum* e *P. vivax*.

Local de realização

A pesquisa será desenvolvida, no município do Careiro, mais precisamente nas localidades P.A. Panelão e Castanho Sítio, que contam com uma população estimada em 1.200 habitantes, as quais escolhidas com base na baixa migração dos seus habitantes e no perfil semelhante de transmissão da malária rural. O município tem uma média de 75% de malária causada por *P. vivax* relatados nos últimos 5 anos, o que é muito semelhante à percentagem de infecções por *P. vivax* relatadas em outras áreas da Amazônia Brasileira.

Apresentação do protocolo

O projeto encontra-se estruturado e fundamentado adequadamente aos fins propostos.

O desenho do estudo está bem delineado e detalhado.

A folha de rosto encontra-se preenchida e assinada.

O cronograma de execução prevê uma duração de três anos, mas não especifica a data de início.

O orçamento financeiro apresentado informa despesas no valor de € 85.668 (oitenta e cinco mil, seiscentos e sessenta e oito euros), a serem financiadas pela

Cont. Parecer CONEP 109/09

Fundació Privada CELLEX, através do Programa de Pesquisa em malária por Plasmodium vivax, coordenado pelo Centre de Recerca de Salut Internacional de Barcelona (CRESIB).

O currículo do pesquisador demonstra experiência profissional e produção científica na área da pesquisa proposta.

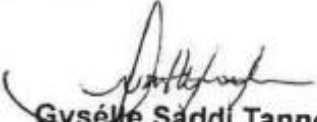
Encontram-se anexados ao projeto os seguintes documentos: carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da Investigação Científica da Clinic Barcelona; Cópia do termo de acordo celebrado entre CRESB e a FMT/AM para realização da pesquisa; fotocópia do Termo de Cooperação firmado entre a Prefeitura de Careiro e a FMT/AM para realização da pesquisa; cópia do Termo de Compromisso quanto ao cumprimento da Resolução CNS 196/96 assinado pelo Diretor do CRESIB e cópia do parecer do CEP de aprovação do projeto de pesquisa.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE está redigido em forma de convite à participação, com linguagem clara e objetiva e contém as informações essenciais sobre a pesquisa, garantindo uma decisão consciente dos sujeitos de pesquisa, conforme estabelece o item IV.1 da Resolução CNS 196/96

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: **Protocolo aprovado.**

Brasília, 06 de março de 2009.


Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS