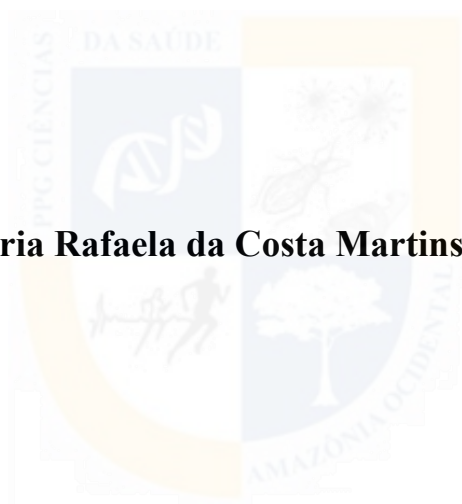




Universidade Federal do Acre
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Amazônia Ocidental

**Associação entre a Interleucina-10 e o parto prematuro na
malária gestacional por *Plasmodium vivax***

Maria Rafaela da Costa Martins



Rio Branco – Acre
2022

Associação entre a Interleucina-10 e o parto prematuro na malária gestacional por *Plasmodium vivax*

Maria Rafaela da Costa Martins



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Amazônia Ocidental como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Medeiros de Souza.

**Rio Branco – Acre
2022**



Universidade Federal do Acre
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Amazônia Ocidental

Maria Rafaela da Costa Martins

Associação entre Interleucina-10 e o parto prematuro na malária gestacional por *Plasmodium vivax*

Dissertação **aprovada** em 13 de maio de 2022, pela banca examinadora constituída pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rodrigo Medeiros de Souza
Universidade Federal do Acre
Orientador

Prof. Dra. Suiane Negreiros Costa do Valle
Universidade Federal do Acre
Membro da Banca Examinadora

Prof. Dr. Miguel Junior Sordi Bortolini
Universidade Federal do Acre
Membro da Banca Examinadora

Rio Branco – Acre
2022

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

- M386a Martins, Maria Rafaela da Costa, 1994 -
Associação entre a Interleucina-10 e o parto prematuro na malária gestacional por *Plasmodium vivax* / Maria Rafaela da Costa Martins; orientador: Dr. Rodrigo Medeiros de Souza. - 2022.
111 f.: il.; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação do Mestrado em Ciências da Saúde da Amazônia Ocidental, Rio Branco, 2022.
Inclui referências bibliográficas, anexos e apêndices.
1. Citocinas. 2. Complicações na gravidez. 3. Inflamação. I. Souza, Rodrigo Medeiros de (Orientador). II. Título.

CDD: 660

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe que tão habilmente despertou em mim o desejo pelo saber, e a todas as mulheres na ciência que lutam incansavelmente pelo espaço e reconhecimento que por muito tempo nos foi negado.

EPIGRAFE

“Cada pessoa deve trabalhar para seu aperfeiçoamento e ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade”. – Marie Curie

RESUMO

Introdução: A malária é uma patologia associada mundialmente a impactos negativos sobre a saúde, principalmente em países subdesenvolvidos e em regiões tropicais. Alterações imunológicas na gestação ocorrem de forma fisiológica e são essenciais para manutenção da vitalidade fetal, incluem alterações no perfil de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, entretanto, na ocorrência de infecção por *Plasmodium spp.* durante a gestação, o sistema imunológico pode induzir resposta inflamatória exacerbada com liberação de citocinas que podem estar relacionadas a desfechos desfavoráveis. **Objetivo:** Este trabalho tem como objetivo investigar as alterações no perfil de citocinas inflamatórias ocasionadas pela infecção por *Plasmodium vivax* no momento do parto. **Materiais e Métodos:** Nesse estudo transversal, foram utilizados dados presentes em um biorrepositório do estudo ViMiP/ICB-USP - *Vivax Malaria in Pregnancy* do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Para análise, após aplicados os critérios de inclusão e exclusão participaram 261 gestantes. **Resultados:** Nos resultados, foi observado um nível significativamente menor da concentração plasmática de interleucina-10 placentária nas mães infectadas por *Plasmodium vivax* que tiveram parto prematuro em relação às que tiveram parto a termo e níveis teciduais mais elevados de interleucina-8 foram significativamente maiores entre essas populações (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p=0,006$) e entre aquelas infectadas por *P. falciparum* (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p=0,034$). No ambiente placentário, somente a IL-10 apresentou nível significativamente maior entre gestantes infectadas no parto e não infectadas (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p=0,009$). Sugere-se que o nível de IL-10 na placenta pode ser útil como biomarcador de inflamação. **Conclusão:** Este estudo forneceu evidências de que mudanças no perfil de citocinas apresentam alterações no momento do parto. O sistema imunológico responde de maneira diferente as formas de infecção por *Plasmodium spp.* considerando inclusive a localização da infecção sendo placentária e/ou periférica. Os presentes resultados contribuem para subsidiar novos trabalhos que poderão ser desenvolvidos nessa linha de pesquisa.

Palavras-chave: Citocinas, Complicações na gravidez, Inflamação, Malária

ABSTRACT

Introduction: Malaria is a pathology associated worldwide with negative impacts on health, especially in underdeveloped countries and tropical regions. Immunological changes during pregnancy occur in a physiological way and are essential for the maintenance of fetal vitality, including changes in the profile of inflammatory and anti-inflammatory cytokines, however, in the event of infection by *Plasmodium spp.* during pregnancy, the immune system can induce an exacerbated inflammatory response with the release of cytokines that may be related to unfavorable outcomes. **Objective:** This study aims to investigate changes in the profile of inflammatory cytokines caused by *Plasmodium vivax* infection at delivery. **Material and Methods:** In this cross-sectional study, data from a biorepository of the ViMiP/ICB-USP - *Vivax Malaria in Pregnancy* study of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo were used. For analysis, after applying the inclusion and exclusion criteria, 261 pregnant women participated. **Results:** In the results, a significantly lower level of placental interleukin-10 plasma concentration was observed in *Plasmodium vivax*-infected mothers who delivered preterm compared to those who delivered at term, and higher tissue levels of interleukin-8 were significantly higher among these populations. (Kruskal-Wallis with Dunn's post-test, $p=0.006$) and among those infected by *P. falciparum* (Kruskal-Wallis with Dunn's post-test, $p=0.034$). In the placental environment, only IL-10 had a significantly higher level between infected and uninfected pregnant women at delivery (Kruskal-Wallis with Dunn's post-test, $p=0.009$). **Conclusion:** It is suggested that the level of IL-10 in the placenta may be useful as a biomarker of inflammation. This study provided evidence that changes in the cytokine profile show changes at the time of delivery. The immune system responds differently to forms of infection by *Plasmodium spp.* including the location of the infection being placental and/or peripheral. The present results contribute to subsidize new works that can be developed in this line of research.

Keywords: Cytokines, Pregnancy complications, Inflammation, Malaria

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida geral do <i>Plasmodium</i>	20
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização clínica das gestantes.....45

Tabela 2 - Caracterização obstétrica das gestantes.....47

LISTA DE SIGLAS

BPN	Baixo peso ao nascer
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos
CSA	do inglês, <i>chondroitin sulfate A</i>
HMCJ	Hospital da Mulher e da Criança do Juruá
IL	Interleucina
IFN-γ	Interferon
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IPA	Índice Parasitário Anual
MCP1	Do inglês, <i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MIF	Do inglês, <i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MIP-1	Do inglês, <i>macrophage inflammatory protein 1</i>
NKu	“Natural Killer” uterina
NK	Natural Killer
P.	<i>Plasmodium</i>
PfEMP1	Proteína da membrana eritrocitária-1 do <i>P. falciparum</i>
USP	Universidade de São Paulo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF	Fator de necrose tumoral
ViMiP	do inglês, <i>Vivax Malaria in Pregnancy</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
mm³	Milímetro
µm	Micrometro
pg/ml	Picograma por mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 GERAL	18
2.2 ESPECÍFICO	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 A MALÁRIA	19
3.1.1 Aspectos epidemiológicos	19
3.1.2 Transmissão e ciclo da malária.....	20
3.1.3 Manifestações clínicas da malária	22
3.1.4 Fisiopatologia da malária.....	23
3.1.5 O <i>Plasmodium vivax</i>	24
3.2 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.....	24
3.3 IMUNIDADE DURANTE A GRAVIDEZ	25
3.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DURANTE A INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM</i> EM GRÁVIDAS	26
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	28
4.1 TIPO DE ESTUDO.....	28
4.2 LOCAL DO ESTUDO.....	28
4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO	28
4.3.1 Critérios de inclusão	29
4.3.2 Critérios de exclusão	29
4.4 COLETA DE DADOS.....	29
4.5 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	29
4.5.1 Coleta do sangue periférico materno	29
4.5.2 Coleta de sangue do cordão umbilical e placentário	30
4.6 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	30
4.6.1 Amostras sanguíneas	30
4.7 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA MALÁRIA.....	31
4.7.1 Extração e avaliação da concentração e pureza do DNA	31
4.7.2 qPCR em tempo real.....	31
4.8 DOSAGEM DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ANTI- INFLAMATÓRIAS	31

4.9	ASPECTOS ÉTICOS.....	31
4.10	ANÁLISE DOS DADOS.....	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6	CAPÍTULO 1 - Associação entre Interleucina-10 e o parto prematuro na malária gestacional por <i>Plasmodium vivax</i>.....	34
7	CONCLUSÕES FINAIS.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	APÊNDICES	76
	Figura suplementar 1.....	76
	Tabela suplementar 1	77
	ANEXOS.....	78
	A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	78
	B - Questionário	84
	C - Formulários de vigilância da malária	97
	D - Formulários de vigilância da morbidades	100
	E - Formulários de vigilância da morbidades	102
	F - Formulários de vigilância do parto e análise da placenta	103
	G – Aprovação pelo Comitê de Ética	106
	H – Normas da Revista PLOS Neglected Tropical Diseases	107

APRESENTAÇÃO

A dissertação apresentada a seguir, intitulada “Associação entre a Interleucina-10 e o parto prematuro na malária gestacional por *Plasmodium vivax*” está organizada nos tópicos: Introdução, Objetivos, Referencial Teórico, Casuística e Métodos, Capítulo 1, Conclusão Geral, Referências Bibliográficas e Anexos.

O capítulo 1 é um artigo original intitulado “Associação entre a Interleucina-10 e o parto prematuro na malária gestacional por *Plasmodium vivax*”, que será submetido para publicação na Revista PLOS Neglected Tropical Diseases.

Posteriormente, é apresentada uma conclusão geral sobre a pesquisa abordando os principais resultados do capítulo. Por fim, são apresentadas as referências utilizadas no trabalho, seguida dos anexos

1. INTRODUÇÃO

A infecção malárica é um tema de relevância mundial por estar associada a impactos negativos sobre a saúde, principalmente em países subdesenvolvidos e em regiões tropicais. Trata-se de uma doença parasitária febril aguda causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* (*P.*). Existem seis formas infectantes aos seres humanos, porém, as que possuem maior importância clínica são *P. vivax* e o *P. falciparum*, devido sua alta endemicidade e sua correlação com quadros de malária grave (BRASIL, 2021).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019, estima-se que ocorreram 229 milhões de casos de malária em todo o mundo, com 409 mil mortes, o *P. falciparum* foi responsável pela maioria dos casos. Em áreas com alta transmissão de malária, crianças menores de 5 anos e mulheres grávidas são particularmente suscetíveis a infecções, doenças e morte. No Brasil em 2020, foram notificados 145.188 casos confirmados e 44 óbitos neste período, na região amazônica a malária continua se apresentando como um importante problema de saúde pública devido a característica de hiperendemicidade dessa região (BRASIL, 2021; WHO, 2020).

Aproximadamente 125 milhões de mulheres por ano engravidam em área endêmica aumentando assim, o risco de casos de malária gestacional (DELLICOUR et al., 2010). No Brasil ainda existem poucas informações sobre malária e seu impacto no processo gestacional e desfecho final, principalmente no que se refere a infecções por *P. vivax*. Existem evidências de que gestantes apresentam maior suscetibilidade à infecção por malária devido às alterações imunológicas e hormonais. Além disso, em áreas de transmissão instável como é o caso da região amazônica no Brasil, a malária gestacional tem-se associado ao parto prematuro e perímetro cefálico reduzido (DOMBROWSKI et al., 2021).

A infecção por *Plasmodium* spp. traz alterações tanto nos níveis de citocinas como no TNF- α que, na presença de um nível elevado, tem sido associado a efeitos adversos à sobrevivência placentária, podendo resultar em baixo peso ao nascer e anemia. A IL-10 pode ser benéfica, pois amorteceria as respostas pró-inflamatórias induzidas pelo fenômeno de sequestro, suprimindo a produção de citocinas do tipo Th1 e reduzindo

possíveis danos. Contudo, altos níveis de IL-10 no momento do parto foram associados ao aumento do risco de perda da gravidez (BRUTUS et al., 2013; DOBAÑO et al., 2018).

Na gestação ocorrem diversas alterações imunológicas que serão importantes para manutenção da vitalidade do feto. Desta forma, o organismo materno apresenta uma tendência para respostas anti-inflamatórias tipo T Helper 2 (Th2), importante para uma gravidez bem-sucedida. Isto se deve a sua capacidade de promover a proliferação e diferenciação de células trofoblásticas e, além disso, deprimir a via T Helper 1 (Th1) que é responsável pela resposta inflamatória. Conseqüentemente, o combate à patógenos associados à gestação pode exercer efeitos deletérios e até ocasionar danos placentários (DOBAÑO et al., 2020).

Em decorrência, este processo poderá ocasionar inflamação e, assim, alterar a função placentária. Poderão ocorrer também modificações no sistema imunológico que induzirão respostas inflamatórias e liberação de citocinas, dentre estas, aumento da síntese de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) -2 e interferon gama (IFN- γ) estando frequentemente associadas ao baixo peso ao nascer, parto prematuro e perda da gravidez (HIRAKO, 2016).

Uma melhor compreensão dos fatores imunológicos relacionados à malária gestacional ocasionada por *P. vivax* e identificação dessas alterações durante a gestação e no seu desfecho, torna-se um instrumento importante para se buscar mecanismos a fim de melhorar a assistência no pré-natal e no momento do parto às mulheres pertencentes a áreas endêmicas. Portanto, este estudo tem como objetivo investigar a correlação de citocinas inflamatórias causadas pela infecção por *P. vivax* no momento do parto a partir da análise do contexto inflamatório sistêmico e placentário e sua influência no desfecho materno-infantil.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar as alterações no perfil de citocinas inflamatórias ocasionadas pela infecção por *Plasmodium vivax* no momento do parto.

2.2 ESPECÍFICO

- 1) Comparar os níveis dos componentes pro-inflamatórios e anti-inflamatórios em gestantes infectadas por *Plasmodium vivax* e não infectadas.
- 2) Identificar a associação do ambiente inflamatório sistêmico e placentário com a história da doença no parto.
- 3) Analisar a influência do padrão inflamatório relacionado à infecção sobre os desfechos obstétricos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A MALÁRIA

A malária é uma doença parasitária febril aguda, transmitida pela fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* e seu agente etiológico é um protozoário do gênero *Plasmodium* (*P.*). No Brasil as espécies *P. vivax*, *P. falciparum* estão presentes com maior prevalência na região amazônica e alguns casos isolados de *P. malarie* também podem ser observados (MONTEIRO; RIBEIRO; FERNANDES, 2013)

3.1.1 Aspectos epidemiológicos

Cerca de 40% da população mundial estão sob risco de serem acometidos por malária, aproximadamente 1,2 bilhões de pessoas estão sob alto risco, com uma probabilidade $>1/1.000$. Em países subdesenvolvidos a mortalidade é expressiva, principalmente quanto ao acometimento de crianças menores de 5 anos de idade (78% das mortes) e em mulheres grávidas (SOUSA et al., 2015). Em média, 125 milhões de mulheres engravidam por ano em regiões endêmicas, destas gestações, aproximadamente 85 milhões ocorrem em áreas com transmissão de *P. falciparum* e 93 milhões em áreas com transmissão de *P. vivax*, sendo que, nas áreas em que as espécies coexistem, ocorrem cerca de 53 milhões de casos (DELLICOUR et al., 2010).

Estima-se que o Brasil seja responsável por quase metade de todos os casos de malária na América Latina. Em 2009, 308.498 casos de malária foram notificados neste país, sendo que 257.571 foram causados por *P. vivax*, representando 83,49% de toda a malária notificada nas Américas, evidenciando a alta incidência dessa espécie de *Plasmodium* no País. O Brasil possui uma situação epidemiológica peculiar sendo um dos poucos países no mundo com uma predominância de *P. vivax*, sendo esta responsável por 85% dos casos de malária (DOMBROWSKI et al., 2021; LACERDA et al., 2012; SOUSA et al., 2015; WHO, 2020).

Fatores como a migração interna, crescimento agropecuário, construção de rodovias e hidrelétricas, garimpo e mineração, têm sido determinantes na dinâmica da transmissão da malária favorecendo a proliferação do vetor da doença e, conseqüentemente, a exposição de grandes contingentes populacionais, principalmente na Região Amazônica que compreende 99% dos casos de malária autóctones onde se incluem os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins,

Mato Grosso e Maranhão. O *Plasmodium vivax* responde por 83,7% dos casos registrados, enquanto o *Plasmodium falciparum* é responsável por 16,3% e o *Plasmodium malariae* raramente é observado (BRASIL et al., 2020; SOUSA et al., 2015).

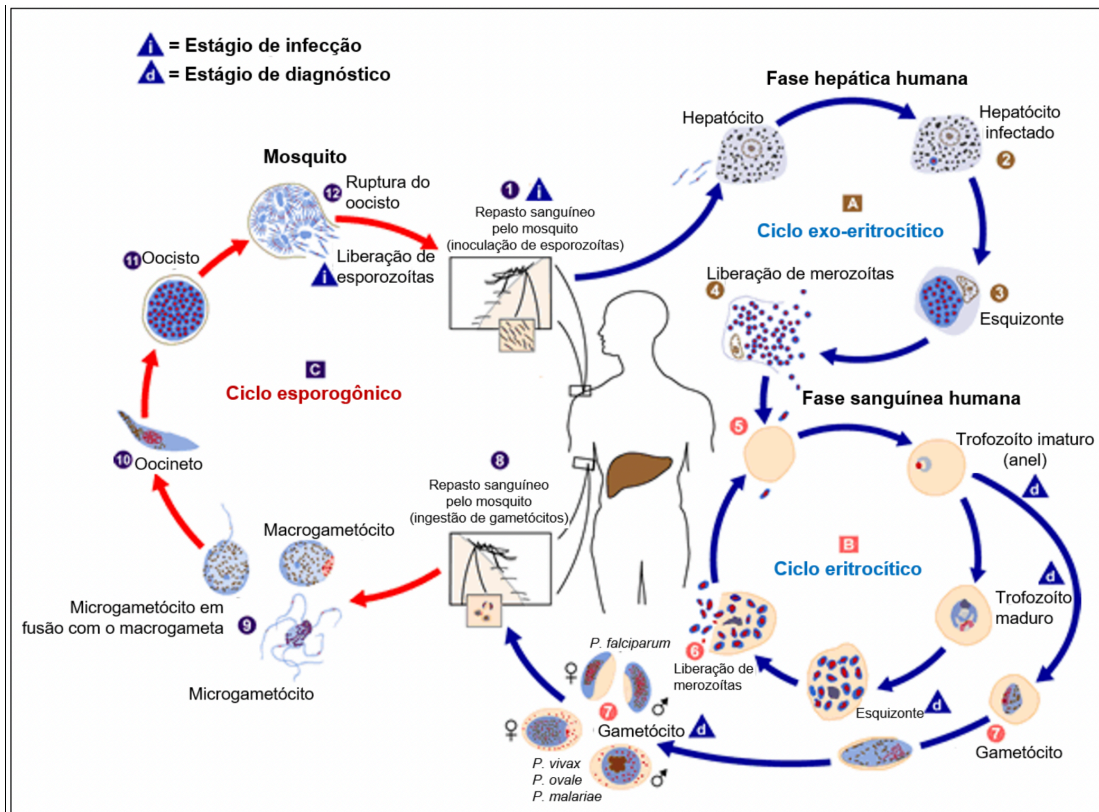
Em 2014, o estado do Amazonas foi responsável por 47% dos casos, seguido pelo estado do Acre (22%). O Acre nesse mesmo ano apresentou índice parasitário anual (IPA) de alto risco (≥ 50) concentrando a maior parte dos casos em três municípios (Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Rodrigues Alves) (BRASIL et al., 2010).

3.1.2 Transmissão e ciclo da malária

A transmissão da malária envolve os seres humanos (susceptíveis e infectados), as fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* e o agente biológico infeccioso do gênero *Plasmodium*, que se inter-relacionam de forma dinâmica e complexa (MACIEL; ESPINOSA; ATANAKA-SANTOS, 2013). O *Anopheles darlingi* é a espécie mais importante na transmissão da doença no Brasil. O risco de transmissão está diretamente ligado ao horário de atividade do vetor que possui hábitos crepusculares. Contudo não se restringem somente a esse horário e permanecem ativos durante todo o período noturno (CARLOS et al., 2019).

O ciclo de vida do *Plasmodium* é compreendido por dois hospedeiros: humanos (vertebrado) e mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (invertebrado) (Figura 1). O ciclo no hospedeiro vertebrado inicia-se quando a fêmea do *Anopheles* infectada inocula esporozoítos ao realizar repasto no sangue humano. Após inoculação destes na derme, eles invadem a corrente sanguínea e em seguida infectam os hepatócitos. No ciclo hepático, ocorre a reprodução assexuada, denominada esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais. Como resultado desse processo, ocorre a maturação de milhares de merozoítos. Após a ruptura do esquizonte, esses merozoítos invadem os eritrócitos dando início ao ciclo eritrocítico (BRASIL et al., 2020).

Figura 1 - Ciclo de vida geral do *Plasmodium*.



Fonte: Adaptada de CDC (2016).

Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, pode surgir a forma evolutiva do parasita denominado hipnozoíto. Este apresenta como característica a permanência em estado de latência nos hepatócitos, são responsáveis pelas recaídas da doença quando reativados, em um período de incubação, em geral, de seis a nove semanas (BRASIL et al., 2020; CDC, 2016).

Os merozoítos, liberados na circulação infectam os eritrócitos, iniciando novo processo de esquizogonia originando trofozoítos jovens, os quais maturarão em esquizontes e posteriormente se romperão liberando novos merozoítos que infectarão novos eritrócitos. Alguns merozoítos sanguíneos se diferenciarão em formas sexuadas, denominados gametócitos (forma infectante para mosquito). Os ciclos eritrocitários acontecem a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae*. As manifestações clínicas da malária surgem em decorrência da fase eritrocitária do ciclo do *Plasmodium* (BRASIL et al., 2020).

Os gametócitos femininos e masculinos transformados por gametogênese em macrogametas e microgametas quando ingeridos pela fêmea do anófeles durante o repasto desenvolvem o ciclo sexuado no trato digestivo. No estômago do invertebrado, ocorre a

formação do zigoto pela fecundação dos gametas. O zigoto se transforma em uma forma móvel e alongada (oocineto) que invadirá a parede do intestino, gerando os oocistos. Esses se multiplicam por esporogonia e liberarão os esporozoítos, que alcançarão as glândulas salivares do mosquito através da hemolinfa (CDC, 2016).

3.1.3 Manifestações clínicas da malária

Dentro do grupo das doenças parasitárias febris agudas a clínica da malária se destaca principalmente pela presença de febre intermitente e elevada, sudorese profusa e calafrios, em padrões geralmente cíclicos, de acordo com o agente etiológico. Devendo ser iniciado o tratamento tão logo observado o surgimento dos sintomas, caso contrário podendo evoluir para formas graves, com febre superior a 41° C, hiperparasitemia (> 200.000/mm³), anemia intensa, icterícia, hemorragias e hipotensão arterial, levando a coma e óbito (MONTEIRO; RIBEIRO; FERNANDES, 2013).

As manifestações clínicas da malária aparecem no estágio de esquizogonia sanguínea, mais especificamente na fase final com a ruptura das hemácias gerando o ataque paroxístico agudo também citado como “acesso malárico”. O quadro de manifestações clínicas da infecção irá depender da espécie do parasita e da quantidade de parasita circulante, podendo ser leve, moderado ou grave. Casos assintomáticos são característicos em indivíduos de áreas de alta transmissão frequentemente expostos a infecção, resultando em uma imunidade parcial (BRASIL et al., 2020).

A infecção por *P. vivax* na gravidez possui importante impacto na saúde materna e infantil, alguns estudos sugeriram que a infecção está associada a anemia materna, aborto, malária congênita e parto prematuro, bem como o desenvolvimento de quadros graves da doença (BARDAJÍ et al., 2017).

Além disso, no estudo de revisão de Lacerda (LACERDA et al., 2012) sobre aspectos clínicos de malária complicada por *P. vivax* apontou que também é recorrente no desfecho materno-fetal o baixo peso ao nascer, sangramento vaginal, amniorrexe, aborto, parto prematuro, hipoglicemia, hepatite e icterícia como complicações. Foi analisado também que a hiperêmese gravídica pode se sobrepor à síndrome febril e aos efeitos colaterais gastrointestinais associados à cloroquina em gestantes, contribuindo para o vômito descontrolado e consequentes desordens metabólicas. Aparentemente, no caso da gravidez, as comorbidades não parecem ser frequentes entre as pacientes com

complicações clínicas. O estudo de coorte de Dombrowski (DOMBROWSKI et al., 2021) revelou que infecções associadas ao *P. vivax* durante o primeiro trimestre gestacional esteve associado a resultados adversos como parto prematuro e redução do perímetro cefálico.

A susceptibilidade de mulheres grávidas à malária está relacionada a alterações hormonais que durante a gestação são responsáveis pela manutenção da gravidez e pelo crescimento fetal. Também podemos destacar as alterações na imunidade celular, que se apresenta diminuída em virtude da série de mudanças fisiológicas decorrentes da gravidez. Com relação à malária placentária, a suscetibilidade das mulheres é atribuída ao aumento de parasitas sequestrados na placenta (WHO, 2020).

3.1.4 Fisiopatologia da malária

O ciclo eritrocítico e a ativação do sistema imune na malária são fatores que estão associados ao aparecimento de sintomatologia. Isto é devido a liberação de toxinas e moléculas bioativas do parasito decorrente do rompimento de eritrócitos infectados. Esse processo ativa o sistema imunológico e induz a produção de mediadores inflamatórios. A presença de *Plasmodium* e seus produtos (como a hemozoína) no tecido placentário, altera essencialmente o ambiente imunológico que regula a placenta (LÓPEZ-GUZMÁN; CARMONA-FONSECA, 2020).

A infecção por *P. vivax* comumente apresenta um baixo índice de parasitemia devido à sua preferência por invadir reticulócitos em vez de eritrócitos, se diferenciando da infecção por *P. falciparum* que tende a apresentar índice médio de parasitemia mais alto. Em razão disso, métodos mais sensíveis são necessários para determinar a extensão da carga de parasitemia por *P. vivax*, pois é difícil detectar *P. vivax* em indivíduos infectados assintomáticos e em infecções de espécies mistas por microscopia de luz convencional. Esta propriedade distinta do *P. vivax* em invadir reticulócitos resulta em menor biomassa do parasita, raramente excedendo 2–3% de parasitemia, mesmo em face de infecções que causam doenças graves. Apesar de ter menor limiar pirogênico do que *P. falciparum* a produção de citocinas, ativação endotelial e respostas inflamatórias pulmonares são maiores na infecção por *P. vivax* em comparação com a infecção por *P. falciparum* (DAYANANDA; ACHUR; GOWDA, 2018).

O intenso infiltrado inflamatório no espaço intervilo ocorre através da adesão

dos eritrócitos infectados ao sinciciotrofoblasto onde tem-se a liberação de fatores quimiotáticos, estimulando células mononucleares a secretar quimiocinas para atração de monócitos e macrófagos, incluindo MIP-1 α , MIP-1 β , CXCL10, MCP1 e CCL1, e produção de citocinas pro-inflamatórias (CHSAVANEEYAKORN et al., 2002)

Importantes alterações histológicas podem ser observadas na placenta, tais como deposição de fibrina, necrose fibrinóide, proliferação trofoblástica e espessamento irregular da membrana trofoblástica. Agressões que afetam a interação uteroplacentária podem interferir no crescimento fetal, determinando a restrição do crescimento intrauterino. Além disso, as mudanças patológicas que ocorrem na placenta parasitada podem reduzir a área sincicial exposta ao sangue materno e, portanto, prejudicar as trocas materno-fetais (ABBAS; PILLAI; LICHTMAN, 2019).

3.1.5 O *Plasmodium vivax*

No mundo mais de um terço da população está em risco de infecção por *P. vivax*, 90% dos quais vivem nas regiões da Ásia e do Pacífico, enquanto o restante vive nas regiões da América (6%) e da África (3%). Em comparação com *P. falciparum*, a infecção por *P. vivax* recebeu pouca atenção principalmente porque foi considerada uma doença relativamente benigna. No entanto, nos últimos anos, devido à crescente evidência da gravidade da infecção por *P. vivax* e ao reconhecimento de seu impacto econômico em países endêmicos, um maior interesse tem sido dedicado a esta espécie negligenciada e complexa (BARDAJÍ et al., 2017).

A principal característica biológica desse parasita é a presença de hipnozoítos hepáticos responsáveis pelas frequentes recidivas, que agregam um número substancial de casos à carga geral da doença, o que está sendo enfrentado como um dos gargalos mais desafiadores na erradicação da malária *vivax* (LACERDA et al., 2012).

3.2 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Células efetoras do sistema imunológico são reguladas por substâncias conhecidas como mediadores inflamatórios. As citocinas, importantes mediadores inflamatórios são secretadas por leucócitos e por várias outras células do corpo em

resposta a estímulos internos e /ou externos. Algumas citocinas são designadas como interleucinas, que indica que são secretadas por alguns leucócitos e agem sobre outros leucócitos. Outras são denominadas quimiocinas e agem sobre o comportamento dos leucócitos (ABBAS; PILLAI; LICHTMAN, 2019).

Dentre as várias funções dos mediadores inflamatórios está a regulação da intensidade e da duração da resposta imune. Isso ocorre devido sua capacidade de estimular ou inibir a ativação e a proliferação de células e a secreção de anticorpos e de outras citocinas. Quando se tem a invasão de patógenos, a resposta imune é induzida, e ocorre uma diferenciação do perfil de citocinas entre os subtipos T auxiliares (Th) a serem secretadas. Células Th CD4⁺ atuam na secreção de citocinas e podem ser divididas conhecidamente em cinco subgrupos: Th₁, Th₂, Th₁₇, Th₉ e Th₂₂. Cada subgrupo possui diferenças funcionais e, portanto, secreta diferentes citocinas (ABBAS; PILLAI; LICHTMAN, 2019).

Associadas à promoção de inflamação excessiva e dano tecidual a subpopulação Th₁ secreta citocinas (IL-1, IL-12, TNF- α , TNF- β e IFN- γ). Elas têm efeito sobre a produção de anticorpos opsonizantes e fixadores de complemento pelas células B, ativação de macrófagos, citotoxicidade celular e indução de imunidade mediada por células. Já a subpopulação Th₂ secreta citocinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), que atuam evocando fortes respostas de anticorpos, incluindo IgE, favorecem a diferenciação e ativação de eosinófilos, e inibição da função fagocítica, fornecendo assim uma forma de inflamação independente de fagócitos que auxiliam a célula B e promovem alteração na síntese de imunoglobulinas (ROMAGNANI, 2000).

3.3 IMUNIDADE DURANTE A GRAVIDEZ

A gestação depende de várias mudanças imunológicas e endócrinas que buscam aumentar a tolerância a antígenos maternos e fetais, a fim de obter um desfecho positivo para o binômio materno-fetal. A decídua (camada funcional do endométrio) constitui-se um local de migração e desenvolvimento celular, comportando células como *Natural Killer* uterinas (NKu), linfócitos T e macrófagos que atuaram diretamente na resposta imune materna. As células NKu atuam sobre respostas imunológicas locais através da interação com outras células, atuando também sobre o perfil de citocinas. Os macrófagos

uteroplacentários também atuam na produção de citocinas como a IL-1 e TNF- α (DAHER; MATTAR, 2009).

Os mediadores inflamatórios estão presentes em todo processo da gestação e no trabalho de parto. Durante esse percurso, exercem inúmeros efeitos através de interações que podem, de acordo com as condições, favorecer ou dificultar o desenvolvimento da gestação. O perfil Th1 é suprimido durante a gestação, uma vez que exerce efeito deletério por estar relacionado à ativação da reação inflamatória e à necrose placentária, trazendo prejuízos materno-fetal. A imunidade predominante do tipo Th2 também é relatada na perda recorrente da gravidez. Portanto, um equilíbrio adequado para a imunidade, ou seja, ligeiramente alterado para a imunidade do tipo Th2 e Treg, pode ser adequado para a manutenção da gravidez. O perfil de resposta Th2 é benéfico para gestação à medida que promove a proliferação e a diferenciação de células trofoblásticas e a placentação. Além disso, suprime a produção de citocinas do tipo Th1 favorecendo esse equilíbrio (SAITO et al., 2010).

Contudo, os mediadores inflamatórios variam durante a gestação, sendo que seus efeitos dependem do período e da concentração. O fator de necrose tumoral (TNF) é importante para que se tenha diferenciação placentária atuando no desenvolvimento e parturição, mas pode ocasionar trombose impedindo a irrigação necessária para o embrião. O IFN- γ , que pode ocasionar abortos e partos prematuros nas etapas iniciais do processo reprodutivo, tem função importante, pois favorece reações inflamatórias que viabilizam a nidação do blastocisto e apresentam ação determinante sobre a angiogênese e o processo de invasão trofoblástica juntamente com IL-12, IL-15 e IL-18 produzidas por células NK. A IL-18 indutora da produção de interferons tem sua produção aumentada durante a gestação, atingindo níveis máximos no momento do parto (PICCINNI, 2007)

3.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DURANTE A INFECÇÃO POR *PLASMODIUM* EM GRÁVIDAS

Durante a infecção por *Plasmodium* em gestantes tanto a imunidade mediada por anticorpos quanto a mediada por células desempenham um papel importante para alcançar a imunidade clínica. Estudos sugerem que a resolução satisfatória da infecção por malária depende do ajuste entre a resposta inflamatória e anti-inflamatória através da

capacidade do hospedeiro acometido em induzir durante os estágios principais da infecção níveis adequados de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias (HOJO-SOUZA et al., 2017).

O aumento das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 está associado a danos trofoblásticos, baixo peso ao nascer e prematuridade na malária gestacional e placentária, observa-se também que níveis de citocinas pró-inflamatórias placentárias são altas em mulheres com malária placentária e a expressão de citocinas anti-inflamatórias é baixa (LÓPEZ-GUZMÁN; CARMONA-FONSECA, 2020). Durante a malária placentária ocorre uma exacerbação do infiltrado inflamatório de macrófagos, células T citotóxicas e células B no espaço interviloso que induz um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Ademais, em áreas de alta transmissão da malária, os infiltrados inflamatórios da placenta são mais comuns em primigestas, pois não possuem imunidade específica aos parasitas da placenta, esse infiltrado placentário associa-se a desfechos gestacionais graves tais como baixo peso ao nascer e parto prematuro (FRIED et al., 2017).

A literatura sugere que a infecção por malária induz citocinas pró-inflamatórias que eliminam o parasita ou promovem a remoção de glóbulos vermelhos infectados pelo parasita. Esta resposta é suprimida, por sua vez, por citocinas anti-inflamatórias, e a eliminação dos parasitas remanescentes, bem como a prevenção de recrudescência ou reinfeção, são mediados por anticorpos antiparasitários (HOJO-SOUZA et al., 2017).

Estudos demonstraram que as concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ estão diretamente relacionadas à gravidade da malária por *P. vivax*, enquanto as concentrações plasmáticas de IL-10 mostraram-se inversamente relacionadas as complicações da doença, observa-se tamb a concentração plasmática de superóxido dismutase, uma enzima produzida durante o estresse oxidativo, também foi associada à gravidade da doença por *P. vivax* (DAYANANDA; ACHUR; GOWDA, 2018).

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo do tipo transversal com amostragem não probabilística.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Hospital da Mulher e da Criança do Juruá (HMCJ), maternidade pública e de referência para os municípios do Vale do Juruá e Envira. Ele está situado na cidade de Cruzeiro do Sul (Estado do Acre) e localizado nas coordenadas 72°40'30,49" de longitude oeste e 7°38'10,82" de latitude sul.

4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foi selecionado uma amostra transversal do momento do parto do estudo de coorte prospectivo *Vivax Malaria in Pregnancy* / Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo - ViMiP/ICB-USP, o qual continha 600 participantes. Após a aplicação dos critérios de exclusão, a amostra foi constituída por 261 gestantes, sendo 117 (44,8%) infectadas e 144 (55,2%) não infectadas. Das infectadas, 76 foram por *P. vivax* (56 durante a gestação e 20 no momento do parto) e 41 por *P. falciparum* (32 durante a gestação e 09 no momento do parto). No período compreendido entre dezembro de 2012 a outubro de 2014, na coorte prospectiva do estudo de base, foram admitidas as gestantes de qualquer idade gestacional que aceitaram participar do estudo e que assinaram o TCLE seguindo os critérios de triagem: 1) Gestantes infectadas: em qualquer idade gestacional e que foram acompanhadas pela equipe de pesquisa desde o primeiro diagnóstico de malária pelos postos de diagnóstico e notificação da Gerência de Endemias e encaminhadas para atendimento clínico no HMCJ; e 2) Gestantes não infectadas: em qualquer idade gestacional que realizavam consultas de pré-natal na rede municipal de assistência básica à saúde.

4.3.1 Critérios de inclusão:

Neste estudo foram incluídas gestantes, independentemente da idade, que apresentaram parto normal, cesárea, aborto ou natimorto, de qualquer paridade e com qualquer idade gestacional, que apresentaram ou não, em seu período gestacional atual, infecções por *Plasmodium* spp.

4.3.2 Critérios de exclusão:

Foram excluídas as gestantes usuárias de drogas lícitas (álcool e tabaco) e ilícitas, bem como aquelas que apresentaram diagnóstico positivo para infecções ativas por bactérias, vírus ou outros protozoários (sífilis, hepatites virais, HIV e toxoplasmose) e/ou que apresentaram alguma morbidade tais como hipertensão, pré-eclâmpsia, eclâmpsia e diabetes. Aquelas que tiveram gestação múltipla ou má-formação fetal também foram excluídas.

4.4 COLETA DE DADOS

Os dados para esta pesquisa foram coletados no biorrepositório gerado a partir de um questionário estruturado do estudo de coorte prospectiva ViMiP/ICB-USP, aplicados os critérios de inclusão e exclusão para seleção da população desse estudo, foram utilizadas informações pessoais, indicadores socioeconômicos e culturais, história clínica, história reprodutiva prévia e da gravidez atual, bem como sobre a história para malária. Informações sobre malária atual, morbidades, sobre o parto e a placenta também foram apensados (apêndices C, D, E e F).

4.5 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

4.5.1 Coleta do sangue periférico materno

Todas as coletas de sangue periférico foram realizadas sob condições assépticas e mediante punção da veia mediana cubital ou do dorso da mão, quando necessário.

Utilizou-se um sistema de coleta a vácuo composto de um escalpe 21G ou 23G, conector e tubo à vácuo contendo heparina de lítio (Becton Dickinson, New Jersey, EUA) para coleta de 5 mL de sangue. Quando as visitas quinzenais foram realizadas, o sangue periférico foi coletado através de punção digital somente em lâmina para confecção da gota espessa e esfregaço sanguíneo.

4.5.2 Coleta de sangue do cordão umbilical e placentário

As amostras de sangue do cordão umbilical foram coletadas após a limpeza dos anexos das placentas, sendo armazenadas em tubos heparinizados e posteriormente homogeneizadas. As amostras de sangue placentário foram coletadas com pipetas de Pasteur a partir de uma incisão nos cotilédones da face materna das placentas e homogeneizadas.

4.6 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

4.6.1 Amostras sanguíneas

Para cada amostra, independentemente do tipo de sangue, retirou-se 300 µl de sangue total para um microtubo de 1,5 ml e o restante do sangue foi transferido do tubo heparinado para um tubo de centrifugação de 15 ml. O plasma foi descartado após a centrifugação do microtubo a 6.673 rcf por 1 minuto. Em seguida foi adicionado 1 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) filtrada, homogeneizando cuidadosamente e centrifugando em seguida, repetindo-se esta etapa por mais 3 a 4 vezes. Por último, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µl de RNAlater® (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), homogeneizando cuidadosamente. Posteriormente, o conteúdo foi transferido para um tubo criogênico previamente identificado e armazenado a -80 °C. Além disso, foram coletados 2 ml de plasma após a centrifugação do tubo de 15 ml a uma velocidade de 1.562 rcf durante 10 minutos e, em seguida, distribuídos em tubos criogênicos previamente identificados e armazenados a -80 °C.

4.7 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA MALÁRIA

4.7.1 Extração e avaliação da concentração e pureza do DNA

A purificação do DNA genômico a partir do sangue foi realizada utilizando-se o kit de extração QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo sistematicamente o protocolo de centrifugação fornecido pelo fabricante.

4.7.2 qPCR em tempo real

Para a verificação do qPCR em tempo real foi empregado o protocolo de Lucchi para amplificação do gênero e das espécies de plasmódio (*P. falciparum* e *P. vivax*) através da técnica de PET-PCR e utilizando as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (primers). Todo material utilizado para as reações por PET-PCR foi gentilmente fornecido pelo Centers for Diseases Control and Prevention - CDC (Malária Branch, Atlanta, EUA).

4.8 DOSAGEM DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS

Os níveis de citocinas inflamatórias (IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) foram mensuradas através da técnica de CBA (Cytometric Bead Array) (MORGAN et al., 2004) em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, New Jersey, EUA). Utilizou-se a metodologia do CBA proposta pelo fabricante, adaptando o protocolo para 25 μ l de amostra. Os dados foram adquiridos em citômetro de fluxo *FACScalibur* e foram analisados com auxílio do programa FCAP Array 3.01.

4.9 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido tanto ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (CEPSH) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, quanto ao CEPSH da Universidade Federal do Acre, sob o número de Certificado

de Apresentação para apreciação Ética (CAAE) 03941012.6.0000.5467, recebendo aprovação através do parecer 70.324 de 8 de agosto de 2012 e 136.622 de 18 de outubro de 2012, respectivamente. A pesquisa atual seguirá as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e foi submetida ao CEPESH da Universidade Federal do Acre, sob o número CAAE 30323420.9.0000.5010, sendo aprovado através do parecer 4.167.041 de 21 de julho de 2020 (ANEXO G).

4.10 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram armazenados no software EpiData 3.0 (Epidata Association, Odense, Dinamarca) e analisados através do programa Stata 14 (StataCorp, College Station, EUA). O nível de significância dos testes foi fixado aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha = 0,05$). A análise foi realizada através da observação de médias e medianas, além dos desvios padrão e intervalos interquartis para variáveis quantitativas. Para as variáveis qualitativas foram calculadas as frequências absolutas e relativas. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se as variáveis tinham distribuição normal, a distribuição foi considerada normal se $p > 0,05$. Para a detecção de diferenças entre proporções, foram utilizados os testes não-paramétricos: teste do Qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher. Para a detecção de diferenças entre duas medianas, utilizou-se o teste U de Mann-Whitney (não-paramétrico) para as amostras de distribuição não-normal. Para verificar a diferença entre médias utilizou-se t de Student. No caso de comparação entre mais de duas médias, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, para populações de distribuição não-normal, com teste *post hoc* de Dunn e para se verificação da correlação entre variáveis não paramétricas utilizou-se o teste Rho de Spearman.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir os resultados e discussão serão apresentados no Capítulo 1 no formato de artigo científico a ser submetido à Revista PLOS Neglected Tropical Diseases, cujas regras encontram-se no ANEXO H.

6 **CAPÍTULO 1 - Associação entre Interleucina-10 e o parto prematuro na malária gestacional por *Plasmodium vivax***



Associação entre IL-10 e o parto prematuro na malária gestacional por *Plasmodium vivax*

Maria Rafaela da Costa Martins¹, Jamille Gregório Dombrowski², Claudio Romero Farias Marinho², Rodrigo Medeiros de Souza³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazonia Ocidental, Universidade Federal do Acre – UFAC, Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil.

² Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, São Paulo, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazonia Ocidental, Universidade Federal do Acre – UFAC, Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil.

Correspondência dos autores

E-mail: rafaelamartins.czs@gmail.com

E-mail: rodrigo.souza@ufac.br

RESUMO

A malária é uma patologia associada mundialmente a impactos negativos sobre a saúde, principalmente em países subdesenvolvidos e em regiões tropicais. Alterações imunológicas na gestação ocorrem de forma fisiológica e são essenciais para manutenção da vitalidade fetal, incluem alterações no perfil de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, entretanto, na ocorrência de infecção por *Plasmodium spp.* durante a gestação, o sistema imunológico pode induzir resposta inflamatória exacerbada com liberação de citocinas que podem estar relacionadas a desfechos desfavoráveis. Foi realizado um estudo transversal em Cruzeiro do Sul, estado do Acre, Brasil, em uma área de baixa transmissão onde o *Plasmodium vivax* se mostra endêmico, foram utilizados dados presentes em um biorrepositório do estudo “*Vivax Malária in Pregnancy*” do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Para análise, após aplicados os critérios de inclusão e exclusão, participaram 261 gestantes. Encontramos um nível significativamente menor da concentração plasmática de interleucina-10 placentária nas mães infectadas por *Plasmodium vivax* que tiveram parto prematuro em relação às que tiveram parto a termo e níveis teciduais mais elevados de interleucina-8 foram significativamente maiores entre essas populações (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p=0,006$) e entre aquelas infectadas por *P. falciparum* (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p=0,034$). No ambiente placentário, somente a interleucina-10 apresentou nível significativamente maior entre gestantes infectadas no parto e não infectadas (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p=0,009$). Sugere-se que o nível de interleucina-10 na placenta pode ser útil como biomarcador de inflamação. Este estudo forneceu evidências de que mudanças no perfil de citocinas apresentam alterações no momento do parto. O sistema imunológico responde de maneira diferente as formas de infecção por *Plasmodium spp.* considerando inclusive a localização da infecção sendo placentária e/ou periférica. Os presentes resultados contribuem para subsidiar novos trabalhos que poderão ser desenvolvidos nessa linha de pesquisa.

RESUMO DO AUTOR

As infecções por *Plasmodium* durante a gravidez estão associadas a desfechos deletérios para o binômio mãe e filho, levando a parto prematuro, baixo peso ao nascer, abortos e natimortalidade. Muito se sabe a respeito dos mecanismos biológicos envolvidos na malária gestacional associada a infecções por *Plasmodium falciparum*, entretanto pouco se sabe dos eventos envolvidos na malária gestacional ocasionada por *Plasmodium vivax* apesar de estudos recentes apontarem impactos negativos relacionados a essa espécie, que erroneamente vinha sendo apontada anteriormente como infecção benigna. O sistema imunológico reage a presença de patógenos como o *Plasmodium* expressando uma série de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias que quando exacerbadas estão associadas a desfechos adversos. No presente estudo buscamos elucidar a associação entre IL-10 e o parto prematuro na malária gestacional por *Plasmodium vivax*, entendendo a expressão desta e outras citocinas no ambiente sanguíneo periférico e placentário materno. Descobrimos que associada ao parto prematuro a IL-10 apresentou nível significativamente menor da concentração plasmática placentária nas mães infectadas por *Plasmodium vivax* em relação às que tiveram parto a termo e níveis teciduais mais elevados de interleucina-8 foram significativamente maiores entre essas populações.

INTRODUÇÃO

A infecção malárica é um tema de relevância mundial por estar associada a impactos negativos sobre a saúde, principalmente em países subdesenvolvidos e em regiões tropicais. Trata-se de uma doença parasitária febril aguda causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* (*P.*). Existem seis formas infectantes aos seres humanos, porém, as que possuem maior importância são *P. vivax* e o *P. falciparum*, devido sua alta endemicidade e sua correlação com quadros de malária grave [1].

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019, estima-se que ocorreram 229 milhões de casos de malária em todo o mundo, com 409 mil mortes, o *P. falciparum* foi responsável pela maioria dos casos. Em áreas com alta transmissão de malária, crianças menores de 5 anos e mulheres grávidas são particularmente suscetíveis a infecções, doenças e morte. No Brasil em 2020, foram notificados 145.188 casos confirmados e 44 óbitos neste período, na região amazônica a malária continua se apresentando como um importante problema de saúde pública devido a característica de hiperendemicidade dessa região [1,2].

Aproximadamente 125 milhões de mulheres por ano engravidam em área endêmica aumentando assim, o risco de casos de malária gestacional (DELLICOUR et al., 2010). No Brasil ainda existem poucas informações sobre malária e seu impacto no processo gestacional e desfecho final, principalmente no que se refere a infecções por *P. vivax*. Existem evidências de que gestantes apresentam maior suscetibilidade à infecção por malária devido às alterações

imunológicas e hormonais. Além disso, em áreas de transmissão instável como é o caso da região amazônica no Brasil, a malária gestacional tem-se associado ao parto prematuro e perímetro cefálico reduzido [4].

A infecção por *Plasmodium* spp. traz alterações tanto nos níveis de citocinas como no fator de necrose tumoral – α (TNF- α) que, na presença de um nível elevado, tem sido associado a efeitos adversos à sobrevida placentária, podendo resultar em baixo peso ao nascer e anemia. A interleucina-10 (IL-10) pode ser benéfica, pois amortece as respostas pró-inflamatórias induzidas pelo fenômeno de sequestro, suprimindo a produção de citocinas do tipo T Helper – 1 (Th1) e reduzindo possíveis danos. Contudo, altos níveis de IL-10 no momento do parto foram associados ao aumento do risco de perda da gravidez [5,6].

Na gestação ocorrem diversas alterações imunológicas que serão importantes para manutenção da vitalidade do feto. Desta forma, o organismo materno apresenta uma tendência para respostas anti-inflamatórias tipo Treg e expressões de interleucinas de ação anti-inflamatórias expressas por Th₂, importante para uma gravidez bem-sucedida, isto se deve a sua capacidade de promover a proliferação e diferenciação de células trofoblásticas e, além disso, deprimir a via Th₁ que é responsável pela resposta inflamatória. Conseqüentemente, o combate à patógenos associados à gestação pode exercer efeitos deletérios e até ocasionar danos placentários [7].

Em decorrência disso, este processo poderá ocasionar inflamação e, assim, alterar a função placentária. Poderão ocorrer também modificações no sistema imunológico que induzirão respostas inflamatórias e liberação de citocinas, dentre estas, aumento da síntese de TNF- α , IL-2 e interferon gama (IFN- γ)

estando frequentemente associadas ao baixo peso ao nascer, parto prematuro e perda da gravidez [8].

Uma melhor compreensão dos fatores imunológicos relacionados à malária gestacional ocasionada por *P. vivax* e identificação dessas alterações durante a gestação e no seu desfecho, torna-se um instrumento importante para se buscar mecanismos a fim de melhorar a assistência no pré-natal e no momento do parto às mulheres pertencentes a áreas endêmicas. Portanto, este estudo teve como objetivo verificar a associação entre IL-10 e o parto prematuro na malária gestacional por *Plasmodium vivax* no momento do parto a partir da análise do contexto inflamatório sistêmico e placentário e sua influência no desfecho materno-infantil. Sendo confirmada nossas hipóteses.

Materiais e métodos

Desenho do estudo, região e população

Trata-se de um estudo do tipo transversal com amostragem não probabilística. A região onde nosso estudo foi realizado foi descrita em outros lugares (ATAÍDE et al., 2015). Foi selecionado uma amostra transversal do momento do parto do estudo de coorte prospectivo *Vivax Malaria in Pregnancy* / Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo - ViMiP/ICB-USP, realizado no período compreendido entre dezembro de 2012 a outubro de 2014, o qual continha 600

participantes que tiveram seus partos realizados na Maternidade do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá em Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil, no período compreendido entre dezembro de 2012 a outubro de 2014. Após a aplicação dos critérios de exclusão, a amostra foi constituída por 261 gestantes, sendo 117 (44,8%) infectadas e 144 (55,2%) não infectadas. Das infectadas, 76 foram por *P. vivax* (56 durante a gestação e 20 no momento do parto) e 41 por *P. falciparum* (32 durante a gestação e 09 no momento do parto). Neste estudo foram incluídas gestantes, independentemente da idade, que apresentaram parto normal, cesárea, aborto ou natimorto, de qualquer paridade e com qualquer idade gestacional, que apresentaram ou não, em seu período gestacional atual, infecções por *Plasmodium* spp. Foram excluídas as gestantes usuárias de drogas lícitas (álcool e tabaco) e ilícitas, bem como aquelas que apresentaram diagnóstico positivo para infecções ativas por bactérias, vírus ou outros protozoários (sífilis, hepatites virais, HIV e toxoplasmose) e/ou que apresentaram alguma morbidade tais como hipertensão, pré-eclâmpsia, eclâmpsia e diabetes. Aquelas que tiveram gestação múltipla ou má-formação fetal também foram excluídas.

Coleta de dados e processamento de amostras

Os dados para esta pesquisa foram coletados no biorrepositório gerado a partir de um questionário estruturado do estudo de coorte prospectiva ViMiP/ICB-USP, aplicados os critérios de inclusão e exclusão para seleção da população desse estudo, foram utilizadas informações pessoais, indicadores socioeconômicos e

culturais, história clínica, história reprodutiva prévia e da gravidez atual, bem como sobre a história para malária. Informações sobre malária atual, morbidades, sobre o parto e a placenta também foram apensados.

Coleta de amostras biológicas

Todas as coletas de sangue periférico foram realizadas sob condições assépticas e mediante punção da veia mediana cubital ou do dorso da mão, quando necessário. Utilizou-se um sistema de coleta a vácuo composto de um escalpe 21G ou 23G, conector e tubo à vácuo contendo heparina de lítio (Becton Dickinson, New Jersey, EUA) para coleta de 5 mL de sangue. Quando as visitas quinzenais foram realizadas, o sangue periférico foi coletado através de punção digital somente em lâmina para confecção da gota espessa e esfregaço sanguíneo. As amostras de sangue do cordão umbilical foram coletadas após a limpeza dos anexos das placentas, sendo armazenadas em tubos heparinizados e posteriormente homogeneizadas. As amostras de sangue placentário foram coletadas com pipetas de Pasteur a partir de uma incisão nos cotilédones da face materna das placentas e homogeneizadas.

Processamento das amostras biológicas

Para cada amostra, independentemente do tipo de sangue, retirou-se 300 µl de sangue total para um microtubo de 1,5 ml e o restante do sangue foi transferido do tubo heparinizado para um tubo de centrifugação de 15 ml. O plasma foi descartado após a centrifugação do microtubo a 6.673 rcf por 1 minuto. Em seguida foi adicionado 1 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) filtrada, homogeneizando cuidadosamente e centrifugando em seguida, repetindo-se esta etapa por mais 3 a 4 vezes. Por último, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µl de RNAlater® (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), homogeneizando cuidadosamente. Posteriormente, o conteúdo foi transferido para um tubo criogênico previamente identificado e armazenado a -80 °C. Além disso, foram coletados 2 ml de plasma após a centrifugação do tubo de 15 ml a uma velocidade de 1.562 rcf durante 10 minutos e, em seguida, distribuídos em tubos criogênicos previamente identificados e armazenados a -80 °C.

Diagnóstico molecular da malária

A purificação do DNA genômico a partir do sangue foi realizada utilizando-se o kit de extração QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo sistematicamente o protocolo de centrifugação fornecido pelo fabricante. Para a verificação do qPCR em tempo real foi empregado o protocolo de Lucchi para amplificação do gênero e das espécies de plasmódio (*P. falciparum* e *P. vivax*) através da técnica de PET-PCR e utilizando as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (primers). Todo material utilizado para as reações

por PET-PCR foi gentilmente fornecido pelo Centers for Diseases Control and Prevention - CDC (Malária Branch, Atlanta, EUA).

Dosagem das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias

Os níveis de citocinas inflamatórias (IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) foram mensuradas através da técnica de CBA (Cytometric Bead Array) (MORGAN et al., 2004) em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, New Jersey, EUA). Utilizou-se a metodologia do CBA proposta pelo fabricante, adaptando o protocolo para 25 μ l de amostra. Os dados foram adquiridos em citômetro de fluxo *FACScalibur* e foram analisados com auxílio do programa FCAP Array 3.01.

Considerações Éticas

Este estudo foi submetido tanto ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (CEPSH) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, quanto ao CEPSH da Universidade Federal do Acre, sob o número de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 03941012.6.0000.5467, recebendo aprovação através do parecer 70.324 de 8 de agosto de 2012 e 136.622 de 18 de outubro de 2012, respectivamente. A

pesquisa atual seguiu as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e foi submetida ao CEPIS da Universidade Federal do Acre, sob o número CAAE 30323420.9.0000.5010, sendo aprovado através do parecer 4.167.041 de 21 de julho de 2020.

Análise dos dados

Os dados foram armazenados no software EpiData 3.0 (Epidata Association, Odense, Dinamarca) e analisados através do programa Stata 14 (StataCorp, College Station, EUA). O nível de significância dos testes foi fixado aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha = 0,05$). A análise foi realizada através da observação de médias e medianas, além dos desvios padrão e intervalos interquartis para variáveis quantitativas. Para as variáveis qualitativas foram calculadas as frequências absolutas e relativas. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se as variáveis tinham distribuição normal, a distribuição foi considerada normal se $p > 0,05$. Para a detecção de diferenças entre proporções, foram utilizados os testes não-paramétricos: teste do Qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher. Para a detecção de diferenças entre duas medianas, utilizou-se o teste U de Mann-Whitney (não-paramétrico) para as amostras de distribuição não-normal. Para verificar a diferença entre médias utilizou-se t de Student. No caso de comparação entre mais de duas médias, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, para populações de distribuição não-normal, com teste *post hoc* de Dunn e para se verificação da correlação entre variáveis não paramétricas utilizou-se o teste Rho de Spearman.

RESULTADOS

Características da população de estudo

A população de estudo foi composta por 261 gestantes que tiveram seus partos acompanhados e suas amostras de sangue periférico e placentário analisadas, sendo 117 (44,8%) infectadas e 144 (55,2%) não infectadas. Das infectadas, 76 foram por *P. vivax* (56 durante a gestação e 20 no momento do parto) e 41 por *P. falciparum* (32 durante a gestação e nove no momento do parto). As gestantes infectadas por *P. vivax* eram mais jovens (Kruskal-Wallis, $p=0,032$). As infectadas por ambas as espécies de *Plasmodium* residiam predominantemente na zona rural ($\chi^2=81,2$, $p<0,001$) e apresentavam mais que 8 anos de estudo (Fisher, $p<0,001$). De modo geral, a etnia autodeclarada mais predominante foi a preta/parda (85,8%). As características desta população são indicadas na tabela suplementar 1 (Tabela S1).

Quanto a história prévia de malária, o grupo de gestantes infectadas apresentaram uma maior proporção de infecções tanto prévias ($\chi^2=34,7$, $p<0,001$) quanto em gestações anteriores ($\chi^2=10,8$, $p<0,004$), quando comparadas as NI, com a maioria delas apresentando até cinco infecções [IIQ: 2-10], contra até duas infecções [IIQ: 1-5] das NI (Mann-Whitney, $p=0,032$). Além disso, a frequência de malária em gestação anterior foi significativamente maior entre as gestantes infectadas ($\chi^2=10,4$, $p=0,001$). Apesar de um número significativo de gestantes infectadas (91,5%) terem disponíveis em suas residências os mosquiteiros/cortinados ($\chi^2=22,9$, $p<0,001$) e 65,4% serem impregnados com inseticida ($\chi^2=23,6$, $p<0,001$), elas tiveram até quatro

infecções durante a gestação. Adicionalmente a isso, identificou-se uma baixa adesão aos métodos de prevenção individual, principalmente pelas gestantes infectadas.

Sobre os aspectos clínicos no momento do parto (Tabela 1), o índice de massa corporal nas gestantes infectadas foi significativamente menor do que o observado nas NI (Mann-Whitney, $p=0,002$). Embora não significativo estatisticamente, a incidência de anemia moderada/grave foi maior no grupo das gestantes infectadas (Pv e Pf) e o nível de hemoglobina, quando observado em conjunto Pv e Pf, foi significativamente menor do que naquelas mulheres que não haviam sido infectadas (Mann-Whitney, $p=0,041$).

Tabela 1 - Caracterização clínica das gestantes.

Características Clínicas	NI(n=144)	Pv (n=76)	Pf (n=41)	Valor de p
IMC ¹	27,8 [25,8-30,6] (143)	26,8 [24,5-29,3] (73)	26,2 [24,6-28,3] (39)	0,006 ^a
Hemoglobina ¹	12,0 [11,2-12,8] (99)	11,7 [10,7-12,4] (60)	11,5 [10,8-12,0] (28)	0,089 ^a
Anemia ¹	20,2 (20/99)	30,0 (18/60)	32,1 (9/28)	0,251 ^b
Moderada à Grave	7,1 (7/99)	6,7 (4/60)	10,7 (3/28)	0,801 ^c
Espécie parasitária periférica no	-	26,3 (20)	14,6 (6)	-

momento do parto² (n=26)				
Parasitemia periférica no parto (n=26) ²	-	108 [4-1429] (20)	2660 [19-5195] (6)	-
Parasitemia placentária (n=21) ²	-	6 [3-30] (12)	418 [2-21460] (9)	-

As variáveis estão representadas em mediana [intervalo interquartil], em percentual (número absoluto) ou em média \pm desvio padrão. NI: Não infectadas. Pv: infectadas por *Plasmodium vivax*. Pf: infectadas por *Plasmodium falciparum*. ¹No momento do parto. ²Diagnóstico por PCR com resultado em números de cópia de DNA. ^aTeste de Kruskal-Wallis; ^bTeste de χ^2 ; ^cTeste exato de Fisher;

No momento do parto, vinte e seis (22,2%) mulheres do grupo gestantes infectadas apresentaram diagnóstico positivo por RT-PCR para *Plasmodium* spp. no sangue periférico materno e vinte e uma (18,1%) no sangue placentário. Uma gestante não apresentou avaliação do sangue placentário devido ao aborto sofrido. Dezoito (15,4%) das gestantes infectadas apresentaram resultados positivos para a presença de *P. vivax* (12) ou *P. falciparum* (6) nos dois compartimentos da mesma paciente. Curiosamente, oito das que tiveram infecção por *P. vivax* não apresentaram parasitemia placentária e três das que apresentaram diagnóstico positivo para *P. falciparum* no sangue placentário não tiveram detecção de parasitemia no sangue materno (S1 Fig). Observou-se ainda que os níveis de parasitemia para *P. vivax* foram menores tanto no sangue periférico, quanto no sangue placentário.

Em relação as características obstétricas, apesar do parto ter ocorrido por volta da 40ª semana gestacional em sua maioria, em conjunto Pv e Pf, as gestantes infectadas apresentaram uma significativa proporção de recém-nascidos prematuros ($\chi^2=5,7$, $p<0,017$), menor peso ao nascimento (Mann-Whitney, $p=0,011$) e menor índice ponderal de Rohrer (t de Student, $p=0,012$). As gestantes infectadas apresentaram significativamente menor frequência nas consultas pré-natal em relação as NI (Kruskal-Wallis, $p<0,001$). Embora o parto vaginal, aborto e o baixo peso ao nascer tenham sido mais frequentes no grupo de mulheres infectadas, eles não apresentaram diferenças significativas em relação às NI (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização obstétrica das gestantes.

Dados Obstétricos	NI(n=144)	Pv (n=76)	Pf (n=41)	Valor de p
Primigestas	49,3 (71)	39,5 (30)	41,6 (17)	0,330 ^b
IG do parto	39,9 [38,9-41,6]	39,9 [38,6-40,6] (75)	39,7 [38,4-40,4]	0,626 ^a
Parto vaginal	45,1 (65)	53,3 (40/75)	53,7 (22)	0,183 ^b
Aborto	0 (0)	1 (1,3)	0 (0)	0,448 ^c
Parto prematuro	2,1 (3)	7,9 (6)	7,3(3)	0,077 ^c
Peso do RN (g)	3258 [2990- 3560]	3135 [2870- 3460] (74)	3110 [2905- 3320]	0,023 ^a
Baixo peso ao nascer	2,1 (3)	6,8 (5/74)	4,9 (2)	0,176 ^c

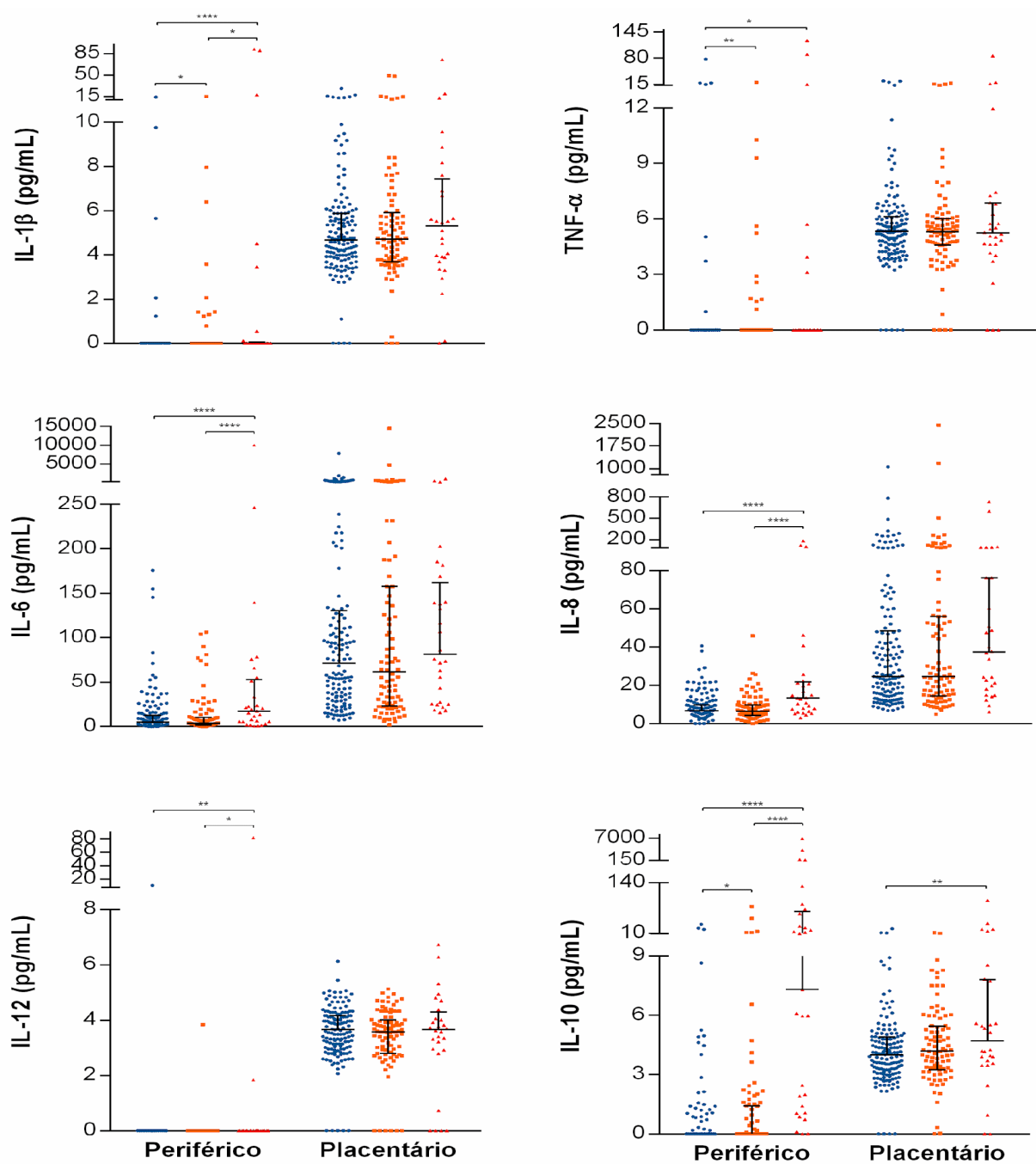
Consultas de pré-natal	8 [6-10] (143)	6 [5 - 8] (75)	6 [4-8]	<0,001 ^a
Sexo do RN (feminino)	56,9 (82)	48,7 (36/74)	56,1 (23)	0,494 ^b

As variáveis estão representadas em mediana [intervalo interquartil], em percentual (número absoluto) ou em média \pm desvio padrão. NI: gestantes não infectadas. PV: *Plasmodium vivax*. PF: *Plasmodium falciparum*. ^aTeste de Kruskal-Wallis; ^bTeste de χ^2 ; ^cTeste exato de Fisher;

Níveis de citocinas no parto

Foram comparados os níveis de citocinas no sangue periférico e placentário entre as gestantes não infectadas e infectadas (Figura 2). A concentração plasmática das citocinas nas amostras de sangue periférico foram mais baixas do que nas amostras placentárias. Porém, os níveis de todas as citocinas avaliadas no sangue periférico foram significativamente maiores nas mulheres com malária gestacional no momento do parto do que daquelas infectadas no período antenatal ou não infectadas. Os níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-10 no plasma periférico de gestantes que apresentaram malária durante a gestação foram significativamente maiores do que as gestantes não infectadas (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, p=0,032, p=0,032 e p=0,014, respectivamente). No entanto, no ambiente placentário, somente a IL-10 apresentou nível significativamente maior entre gestantes infectadas no parto e não infectadas (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, p=0,009).

Figura 1 - Níveis das citocinas no sangue periférico e placentário entre as gestantes não infectadas e infectadas no período antenatal e no momento do parto.



As concentrações plasmáticas das citocinas inflamatórias (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-12) e anti-inflamatória (IL10) no plasma periférico foram comparados com as da placenta de mulheres não infectadas (azul) (n=144), infectadas no período antenatal (laranja) (n=88) e infectadas no momento do parto (vermelho) (periférico, n=29; placentário, n=28) usando o teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. A linha sobre os pontos representa a mediana com intervalo interquartil. * p <0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.

Independentemente, os níveis periféricos de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 correlacionaram-se significativamente com a parasitemia periférica (Rho de Spearman = 0,50; p=0,009, 0,40; p=0,044, 0,41; p=0,037 e 0,80; p<0,001, respectivamente). As concentrações de IL-10 placentária também estiveram correlacionadas positivamente com as parasitemias placentária e periférica (Rho de Spearman = 0,51; p=0,018 e 0,68; p<0,001, respectivamente). A IL-1 β placentária teve correlação positiva com a parasitemia periférica (Rho de Spearman = 0,42; p=0,036) e a IL-10 periférica teve correlação positiva significativa com a parasitemia placentária (Rho de Spearman = 0,48; p=0,025).

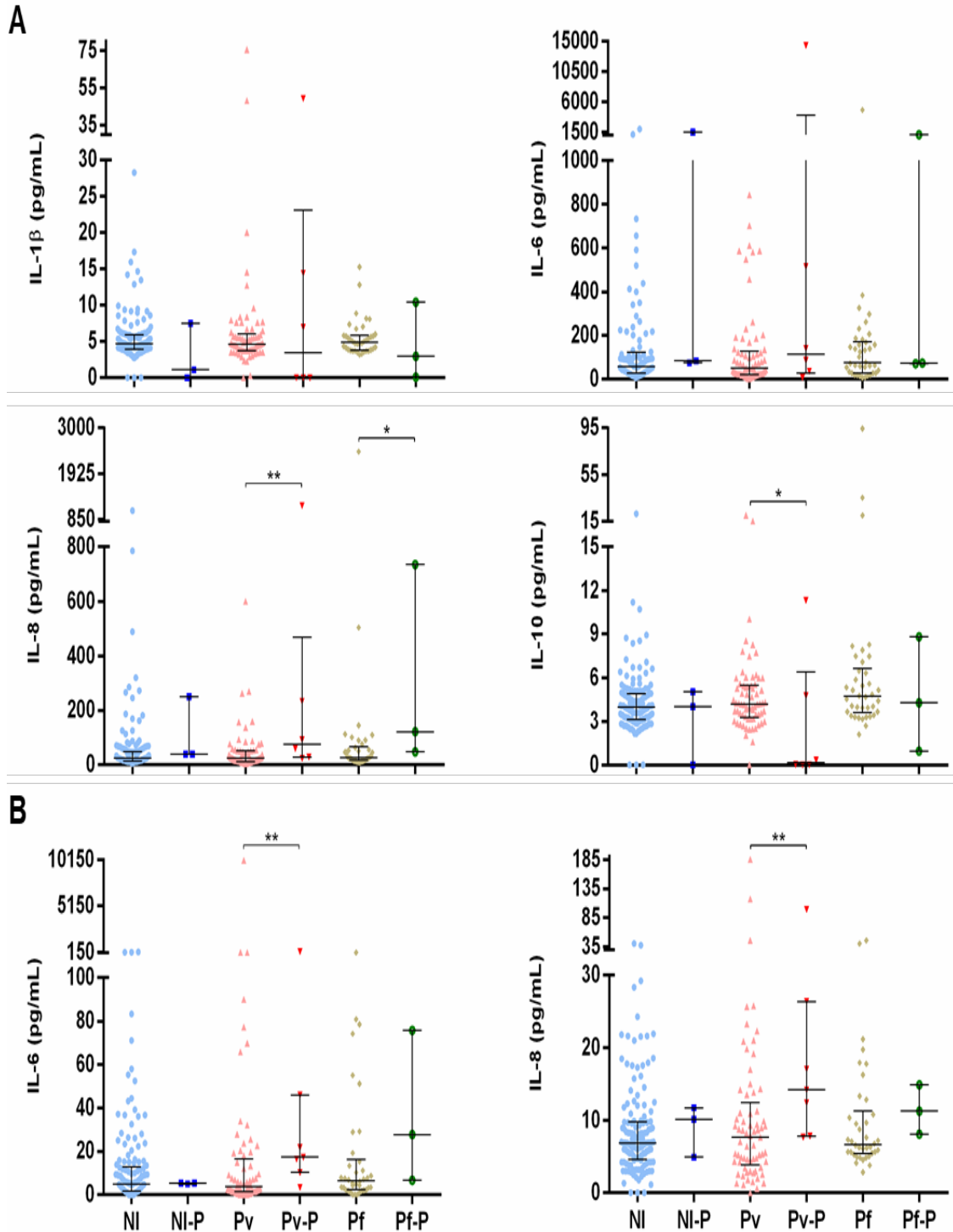
Quando a análise ocorreu por espécie parasitária, observou-se a correlação positiva entre os níveis periféricos de IL-1 β e IL-10 e a parasitemia periférica naquelas infectadas por *P. vivax* (Rho de Spearman = 0,54; p=0,015 e 0,76; p<0,001, respectivamente) e uma correlação negativa entre os níveis de IL-8 e a parasitemia placentária (Rho de Spearman = -0,76; p=0,004). Naquelas infectadas por *P. falciparum* a IL-10 periférica apresentou uma forte correlação com a parasitemia periférica e placentária (Rho de Spearman = 0,83; p=0,042 e 0,83; p=0,005, respectivamente).

Níveis das citocinas periférica e placentária na ocorrência de prematuridade

Os níveis das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias nos casos de prematuridade estão apresentados na Figura 3. Observou-se um nível significativamente menor da concentração plasmática de IL-10 placentária nas

mães infectadas por *P. vivax* que tiveram parto prematuro em relação às que tiveram parto a termo (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p=0,026$). Níveis teciduais mais elevados de IL-8 foram significativamente maiores entre essas populações (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p=0,006$) e entre aquelas infectadas por *P. falciparum* (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p=0,034$). Os níveis periféricos de IL-6 e IL-8 foram significativamente mais elevados nas gestantes infectadas por *P. vivax* que tiveram um parto antes das 37 semanas de gestação em relação às que tiveram parto acima dessa idade gestacional.

Figura 2 - Níveis das citocinas no (A) sangue periférico e (B) sangue placentário entre as gestantes não infectadas e infectadas com ou sem parto prematuro.



As concentrações plasmáticas das citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8) e anti-inflamatória (IL10) no plasma placentário (A) e periférico (B) foram comparados entre gestantes não infectadas (NI) ou infectadas por *P. vivax* (Pv) ou *P. falciparum* (Pf) com parto ocorrendo antes (P) ou depois da 37^a semana gestacional. NI, n=92; NI-P, n=3; Pv, n=69; Pv-P, n=6; Pf, n=38 e Pf-P, n=3. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. A linha sobre os pontos representa a mediana com intervalo interquartil. * p < 0,05 e ** p \leq 0,01.

DISCUSSÃO

Os desfechos desfavoráveis para o binômio mãe e filho são observados frequentemente associados à infecção por *Plasmodium* spp., acredita-se que alterações imunológicas do perfil de citocinas podem desenvolver um importante papel como marcadores de maus resultados durante a gestação: baixo peso ao nascer, parto prematuro e aborto, todavia pouco se sabe como as respostas inflamatórias e anti-inflamatórias agem em áreas de transmissão instáveis como é o caso do extremo ocidente Amazônico onde o presente estudo foi realizado (FRIED et al., 2017; KABYEMELA et al., 2008).

Este estudo confirmou através das análises de amostras do sangue periférico e placentário materno de gestantes infectadas e não infectadas por *Plasmodium* spp. alterações nos níveis de citocinas no momento do parto daquelas que apresentaram infecção na gestação e que contribuíram para um desfecho fetal desfavorável, corroborando com estudos semelhantes (CHUA et al., 2021; OMER et al., 2021; RUIZ et al., 2012).

As características demográficas e socioeconômicas das gestantes foram fatores que estiveram associados a maior incidência de malária nessa população. Foi constatado que as gestantes infectadas por *P. vivax* eram mais jovens em comparação às não infectadas, residiam em zona rural, resultados consistentes com estudos anteriores em outras regiões endêmicas para malária. Esse perfil sociodemográfico pode ser explicado pelo fato da região Norte do Brasil possuir as maiores taxas de natalidade entre adolescentes do País, além de concentrar os menores índices de escolaridade e predominância populacional na zona rural,

considerando ainda que mulheres jovens apresentam maior risco de infecção por malária. (DESAI et al., 2007; FONTOURA, 2016; KALINJUMA et al., 2020; STANISIC et al., 2015)

A observância de que as gestantes infectadas eram mais jovens em relação as não infectadas foi associada com o risco de parto prematuro em uma coorte histórica que constatou que em mulheres infectadas por *P. vivax* durante a gravidez o risco de parto prematuro diminuiu com a idade materna mais avançada, maior paridade e maior número de consultas pré-natal. Resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo onde observamos entre as infectadas menor idade, menor paridade e menor adesão no número de consultas pré-natal (BÔTTO-MENEZES et al., 2015)

A frequência no número de infecções por *Plasmodium* em gestações anteriores foi maior nas gestantes infectadas, apesar de possuírem em sua residência mosquiteiros/cortinados e serem impregnados com inseticida, essas mulheres tiveram até quatro infecções durante a gestação. 64,9% das infectadas dessa população de estudo eram por *P. vivax*, podendo ser considerado o fator de recrudescência possível nesse tipo de infecção. Esse resultado foi encontrado em outros estudos que atribuíram essa ocorrência ao fato de, por residirem em zona rural possuem maior exposição ao vetor, vale salientar que a maioria das casas tem banheiros fora de suas residências e como as mulheres durante a gestação tem um aumento na frequência urinária acabam se expondo ainda mais ao saírem de suas camas no período noturno/crepuscular o que não garante a total eficácia do cortinado ou mosquiteiro (FONTOURA, 2016; SAMESIMA, 2019). Outrossim, foi observada uma baixa adesão aos métodos de prevenção individual, principalmente pelas gestantes infectadas, sugerimos que essa baixa

adesão poderia ser justificada pelo fato da malária por *P. vivax* ainda ser popularmente apontada como benigna devido a baixa sintomatologia, sendo que nessa região, diferente das regiões de alta endemicidade onde prevalece o *P. falciparum*, observa-se predominância do adoecimento pela espécie *vivax*.

Foi observado quanto aos aspectos clínicos que houve um índice de massa corporal significativamente menor nas gestantes infectadas quando comparadas às NI, situação encontrada também em um estudo de coorte histórica realizado entre 1986 e 2016 com um quantitativo de 72.622 mulheres grávidas, ao longo da fronteira entre Tailândia e Mianmar (HASHMI et al., 2019). A malária gestacional pode ocasionar uma depleção nutricional; baixo ganho de peso gestacional sendo que esse quadro de desnutrição materna é apontada como gatilho para aumentar o risco de resultados desfavoráveis no desfecho materno-fetal. Deficiências nutricionais associadas à gravidez podem gerar distúrbios na produção de antioxidantes que eliminam os radicais livres e aumento da produção destes, estando, portanto, associadas a uma má resposta imune a infecções como a malária. (BLACK et al., 2013; BURKI, 2013; KATONA; KATONA-APTE, 2008; UNGER et al., 2016).

Constatamos que apesar da incidência de anemia moderada/grave não ter sido estatisticamente significativo, mesmo sendo maior entre as gestantes infectadas, o nível de hemoglobina, quando observado em conjunto Pv e Pf, encontrado nesta população foi significativamente menor nas gestantes infectadas do que naquelas mulheres que não haviam sido infectadas. Estudos apontam que durante a gestação mulheres apresentam maior propensão ao desenvolvimento de anemia, situação que pode ser justificada por dieta inadequada, falta de suplementação pré-natal e deficiência de micronutrientes (AGBOZO et al., 2020;

LEBSO; ANATO; LOHA, 2017). No estudo desenvolvido por Neves et al., 2019 no município de Cruzeiro do Sul, Acre, a prevalência de anemia materna afetou 40% das participantes, sendo esta associada a infecção por malária, idade materna inferior a 19 anos, comparecer a um número de consultas pré-natal inferior a seis e não fazer uso de suplemento nutricional de micronutrientes durante a gravidez. O que pode justificar a incidência entre a anemia em gestantes infectadas e NI não ter sido maior, uma vez que o estado anêmico materno sendo multifatorial não pode ser atribuído a uma única causa.

Em relação ao nível de hemoglobina que se apresentou significativamente diminuído nas gestantes infectadas em relação as não infectadas, mostrou-se semelhante ao encontrado no estudo de Ononge e colaboradores (ONONGE; CAMPBELL; MIREMBE, 2014) constatando que a malária tende a agravar a anemia na gravidez, uma vez que o ciclo eritrocítico do *Plasmodium* possui característica espoliativa do hospedeiro gerado pelo rompimento das hemácias assim levando a morte dessa célula e dissociação de seus componentes. Alguns fatores que podem influenciar os baixos níveis de hemoglobina ocasionados pela malária são a malária placentária (OMER et al., 2021), o aumento da parasitemia (NDAM et al., 2017), e infecções submicroscópicas (COTTRELL et al., 2015).

No momento do parto 22,2% das mulheres do gestantes infectadas apresentaram diagnóstico positivo para *Plasmodium spp.* no sangue periférico materno e 18,1% no sangue placentário. 15,4% das gestantes apresentaram parasitemia tanto na placenta quanto no sangue periférico, oito das que tiveram infecção por *P. vivax* não apresentaram parasitemia placentária e três das que apresentaram diagnóstico positivo para *P. falciparum* no sangue placentário não tiveram detecção de parasitemia no sangue materno. Este fato pode ser

explicado pelo mecanismo de adesão às células endoteliais de órgãos como a placenta, pulmão e cérebro através da ligação com receptores, como a CSA utilizado pelo *P. falciparum*. Esse é um fenômeno que contribui para baixas parasitemias sistêmicas e uma elevada parasitemia tecidual. Além disso como já era esperado observou-se níveis menores de parasitemia para *P. vivax* tanto no sangue periférico, quanto no sangue placentário podendo ser explicado pelo seu mecanismo patogênico de infecção que é caracterizado por ser restrito aos reticulócitos, limitando sua proliferação assexuada, resultados semelhantes aos encontrados em estudos da área (LIM et al., 2016; MILNER, 2018).

Apesar do parto ter ocorrido por volta da 40^a semana gestacional em sua maioria, as gestantes infectadas apresentaram uma significativa proporção de recém-nascidos prematuros, quando comparadas a NI, sendo este um dos efeitos da malária na gestação observado em estudos tanto no Brasil (BÔTTO-MENEZES et al., 2015) como em na África Subsaariana (COTTRELL et al., 2015; STANISIC et al., 2015) além disso um estudo realizado em uma área de baixa transmissão na região amazônica aponta que a infecção por *P. falciparum* na gestação é responsável por uma alta proporção de partos prematuros (DOMBROWSKI et al., 2021). Embora não encontrada significância no baixo peso ao nascer entre as gestantes infectadas e NI, foi encontrado menor peso ao nascimento e menor índice ponderal de Rohrer, sendo que este pode ser um resultado que esteja correlacionado ao parto prematuro observado nesse estudo e em outros (DOMBROWSKI et al., 2018; RIJKEN et al., 2014).

As citocinas avaliadas no sangue periférico apresentaram-se significativamente maiores nas gestantes infectadas no momento do parto do que daquelas

infectadas no período antenatal ou não infectadas. Os níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-10 no plasma periférico das gestantes infectadas durante a gestação foram significativamente maiores do que as gestantes não infectadas, observado também em um estudo na Índia que mostrou que mulheres grávidas infectadas por *P. vivax* apresentaram no plasma periférico níveis elevados de IL-1 β e TNF- α em comparação as gestantes não infectadas (SINGH et al., 2018). No entanto, no ambiente placentário, somente a IL-10 apresentou nível significativamente maior entre gestantes infectadas no parto e não infectadas sendo que esta citocina já foi apontada como marcador de inflamação placentária relacionada a infecção em níveis aumentados no sangue da placenta e periférico materno (CHÊNE et al., 2014; RUIZ et al., 2012; YAO et al., 2013). Além disso IL-10 é responsável por atenuar respostas inflamatórias a fim de reduzir danos já que um dos seus principais efeitos é inibir a proliferação de células Th1, ou seja, secreção de IFN-gama e ativação de monócitos/macrófagos.

Em relação a parasitemia, os níveis periféricos de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 correlacionaram-se significativamente com a parasitemia periférica, consistente ao achado por outros autores (HOJO-SOUZA et al., 2017) que encontraram associada a parasitemia níveis elevados de IL-6, TNF- α e IL-10. Além disso a IL-10 citocina anti-inflamatória atua em parte bloqueando a produção de IL-1 β , IL-6, TNF- α e perfil Th-1 (KABYEMELA et al., 2008) o que pode justificar o achado desse estudo, sendo que na presença de parasitas há uma ativação da resposta inflamatória e por conseguinte da IL-10 que surge com a finalidade de atenuar essa resposta. A IL-10 placentária também esteve correlacionada positivamente com a parasitemia placentária, assim como a IL-10 periférica, entende-se que no ambiente placentário a IL-10 atua em maior concentração devido a presença do

intenso infiltrado inflamatório tecidual provocado pelo tropismo parasitêmico que o tecido placentário sofre devido a expressão de receptores específicos que facilitam a adesão do *Plasmodium* ao tecido, além da adesão eritrocitária ao trofoblasto.

Quanto a espécie parasitária, observou-se correlação positiva entre os níveis periféricos de IL-1 β e IL-10 e a parasitemia periférica naquelas infectadas por *P. vivax* sendo a IL-1 β uma citocina inflamatória característica da inflamação periférica ocasionada por *P. vivax* relatada em estudos (DOBAÑO et al., 2018; SINGH et al., 2018). Acredita-se que a IL-10 inibe a síntese de IL-1, numa tentativa de manter controle sobre a resposta imune. Em um estudo prospectivo também foi constatado um aumento de quatro vezes na expressão de IFN- β e IL-10 em multigrávidas com malária placentária quando comparada as gestantes do grupo controle não infectadas (QUANQUIN et al., 2020).

Foi observado que menor concentração plasmática de IL-10 placentária nas mães infectadas por *P. vivax* e níveis teciduais elevados de IL-8 foram relacionados a parto prematuro, dados que corroboram com resultados em populações de estudo semelhantes na Amazônia brasileira (DOBAÑO et al., 2020b) e no mundo (CORWIN, 2000; MOBINI et al., 2016; RAGHUPATHY, 2001). Sugerimos que a plena expressão de IL-10 esteja diretamente ligada a inibição de perfis inflamatórios que estimulam o parto prematuro. Em um estudo sobre o papel da IL-10 na resistência ao parto prematuro em camundongos, demonstraram que a proteína de IL-10 e o mRNA regulam positivamente nos tecidos gestacionais na gravidez normal, concluindo que a regulação positiva de IL-10 pode ser apontada como um fator decisivo para a resistência ao trabalho de parto prematuro (ROBERTSON; SKINNER; CARE, 2006).

Foi também observado que as IL-6 e IL-8 foram significativamente mais elevadas em níveis periféricos nas gestantes infectadas por *P. vivax* que tiveram um parto antes das 37 semanas de gestação em relação às que tiveram parto acima desta idade gestacional, a IL-6 desempenha um papel importante na indução de reações de fase aguda e seu aumento tem sido associado ao aumento da gravidade da malária (SINGH et al., 2018; YASNOT et al., 2013). A IL-8 é uma quimiocina pró-inflamatória que está associada a placentas infectadas com malária sendo ela produzida por macrófagos placentários carregados de hemozoína que sugerem que esta célula fagocitou um eritrócito infectado com *plasmodium*, são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos desempenha um papel no resultado da gravidade das doenças infecciosas em geral e da malária, já houveram estudos que associaram seu nível elevado em mulheres infectadas com malária ao baixo peso ao nascer, retardo do crescimento intrauterino (ABRAMS et al., 2003) e trabalho de parto prematuro (KRASNYI et al., 2022). Um estudo mostrou que a IL-10 é responsável por inibir fortemente a produção de IL-8 portanto neste caso a IL-10 diminuída é um importante determinante da gravidade da doença (MOBINI et al., 2016; YILDIZ ZEYREK et al., 2006), além de corroborar com demais estudos que apontam os efeitos regulatórios da IL-10 em doenças inflamatórias como a malária (YAO et al., 2013).

Esse estudo fornece evidências de que alterações no perfil de citocinas podem provocar resultados adversos no momento do parto, em relação as GI e as GNI. Foi observado que o sistema imunológico responde de maneira diferente as formas de infecção por *Plasmodium spp.* considerando inclusive a localização da infecção sendo placentária e/ou periférica. Sugerimos que a expressão do

perfil de citocinas pode atuar como marcador de infecção por malária independentemente da espécie. Os presentes resultados apesar da limitação relacionada ao número baixo de gestantes infectadas por *P. vivax* e *P. falciparum* que nos impossibilitou de realizar estudos mais aprofundados e correlacionar maiores números de variáveis contribuem para subsidiar novos estudos com populações maiores a fim de compreender melhor a resposta imune materna no momento do parto.

Agradecimentos

Nós agradecemos ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo por ceder os dados de seu biorrepositório do estudo “*Vivax Malária in Pregnancy*” para essas análises, ao Hospital da Mulher e da Criança do Juruá/SESACRE, por ser local de coleta e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde na Amazonia Ocidental em nome da Universidade Federal do Acre pelo constante incentivo a ciência.

Contribuições dos autores

Concebeu e desenhou os experimentos: RMS, JGD e CRFM. Coleta de amostra: RMS e JGD. Realizou os experimentos: RMS e JGD. Analisou os dados: RMS e MRCM. Contribuição de reagentes/materiais/ferramentas de análise: RMS e CRFM. Escreveu o artigo: MRCM e RMS. Revisou o manuscrito: RMS.

Referências

- ABBAS, A.; PILLAI, S.; LICHTMAN, A. **Imunologia: Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- ABRAMS, E. T. et al. Host Response to Malaria During Pregnancy: Placental Monocyte Recruitment Is Associated with Elevated β Chemokine Expression. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 5, p. 2759–2764, 2003.
- AGBOZO, F. et al. Maternal dietary intakes, red blood cell indices and risk for anemia in the first, second and third trimesters of pregnancy and at predelivery. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 1–16, 2020.
- ATAÍDE, R. et al. Malaria in pregnancy interacts with and alters the angiogenic profiles of the placenta. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1–15, 2015.
- BARDAJÍ, A. et al. Burden and impact of Plasmodium vivax in pregnancy: A multi-centre prospective observational study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–22, 2017.
- BLACK, R. E. et al. **Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries** *The Lancet* Elsevier B.V., , 2013.
- BÔTTO-MENEZES, C. et al. Plasmodium vivax malaria in pregnant women in the Brazilian Amazon and the risk factors associated with prematurity and low birth weight: A descriptive study. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2015.
- BRASIL et al. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL et al. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. BOLETIM ESPECIAL: MALÁRIA, 2021.; MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASÍLIA - DF. NOV. 2021. **Boletim Epidemiológico da Malária 2021**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>.
- BRUTUS, L. et al. Plasmodium vivax malaria during pregnancy, Bolivia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 10, p. 1605–1611, 2013.
- BURKI, T. K. **Malaria and malnutrition: Niger's twin crises** *The Lancet* Elsevier B.V., , 2013.
- CARLOS, B. C. et al. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 1, p. 1–13, 2019.
- CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. . [s.l: s.n.].
- CHSAVANEEYAKORN, S. et al. Immunity to placental malaria. III. Impairment of interleukin (IL) – 12, not IL-18, and interferon-inducible protein - 10 Responses in the placental intervillous

blood of human immunodeficiency virus/malaria - Coinfected women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 1, p. 127–131, 2002.

CHÊNE, A. et al. Placental cytokine and chemokine profiles reflect pregnancy outcomes in women exposed to Plasmodium falciparum infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 9, p. 3783–3789, 2014.

CHUA, C. L. L. et al. Poor Birth Outcomes in Malaria in Pregnancy: Recent Insights Into Mechanisms and Prevention Approaches. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, p. 1–11, 2021.

CORWIN, E. J. **Corwin / Understanding Cytokines Part I** BIOLOGICAL RESEARCH FOR NURSING. [s.l: s.n.].

COTTRELL, G. et al. Submicroscopic Plasmodium falciparum Infections Are Associated With Maternal Anemia, Premature Births, and Low Birth Weight. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 10, p. 1481–1488, 15 maio 2015.

DAHER, S.; MATTAR, R. Gestação: um fenômeno imunológico? Pregnancy: an immunological phenomenon? **Rev Bras. Alerg. Immunopatol.**, v. 32, n. 2, p. 63–67, 2009.

DAYANANDA, K.; ACHUR, R.; GOWDA, DC. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of Plasmodium vivax malaria. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 55, n. 1, p. 1, 2018.

DELLICOUR, S. et al. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: A demographic study. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2010.

DESAI, M. et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 93–104, fev. 2007.

DOBAÑO, C. et al. High production of pro-inflammatory cytokines by maternal blood mononuclear cells is associated with reduced maternal malaria but increased cord blood infection. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2018.

DOBAÑO, C. et al. Cytokine signatures of plasmodium vivax infection during pregnancy and delivery outcomes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. 1–17, 2020a.

DOBAÑO, C. et al. Blood cytokine, chemokine and growth factor profiling in a cohort of pregnant women from tropical countries. **Cytokine**, v. 125, n. May 2019, p. 154818, 2020b.

DOMBROWSKI, J. G. et al. Malaria during pregnancy and newborn outcome in an unstable transmission area in Brazil: A population-based record linkage study. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–16, 2018.

DOMBROWSKI, J. G. et al. Adverse pregnancy outcomes are associated with plasmodium vivax malaria in a prospective cohort of women from the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, p. 1–23, 2021.

FONTOURA, P. S. Perspectivas para eliminação da malária residual em área rural da Amazônia brasileira: Estratégias de Busca Ativa Reativa na identificação de reservatórios de *Plasmodium vivax*. p. 327, 2016.

FRIED, M. et al. Systemic Inflammatory Response to Malaria during Pregnancy Is Associated with Pregnancy Loss and Preterm Delivery. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 10, p. 1729–1735, 15 nov. 2017.

HASHMI, A. H. et al. Nutrition in transition: Historical cohort analysis summarising trends in under- and over-nutrition among pregnant women in a marginalised population along the Thailand-Myanmar border from 1986 to 2016. **British Journal of Nutrition**, v. 121, n. 12, p. 1413–1423, 2019.

HIRAKO, I. C. O sistema imune inato na patogênese da malária. **Fundação Oswaldo Cruz**, p. 181, 2016.

HOJO-SOUZA, N. S. et al. On the cytokine/chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2017.

KABYEMELA, E. R. et al. Maternal peripheral blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria. **Malaria Journal**, v. 7, p. 6–11, 2008.

KALINJUMA, A. V. et al. Factors associated with sub-microscopic placental malaria and its association with adverse pregnancy outcomes among HIV-negative women in Dar es Salaam, Tanzania: a cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–13, 2020.

KATONA, P.; KATONA-APTE, J. The Interaction between Nutrition and Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 1582–1590, 2008.

KRASNYI, A. M. et al. Extracellular DNA levels and cytokine profiles in preterm birth: a cohort study. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, 26 fev. 2022.

LACERDA, M. V. et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: A systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**, v. 11, p. 1–18, 2012.

LEBSO, M.; ANATO, A.; LOHA, E. Prevalence of anemia and associated factors among pregnant women in Southern Ethiopia: A community based cross-sectional study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–11, 2017.

LIM, C. et al. Reticulocyte Preference and Stage Development of *Plasmodium vivax* Isolates. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 7, p. 1081–1084, 2016.

LÓPEZ-GUZMÁN, C.; CARMONA-FONSECA, J. Submicroscopic placental malaria: Histopathology and expression of physiological process mediators. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 37, n. 2, p. 220–228, 2020.

MACIEL, G. B. M. L.; ESPINOSA, M. M.; ATANAKA-SANTOS, M. Epidemiologia da malária no município de Colniza, Estado de Mato Grosso, Brasil: estudo descritivo do período de 2003 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 3, p. 465–474, 2013.

- MILNER, D. A. Malaria pathogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- MOBINI, M. et al. Significant roles played by interleukin-10 in outcome of pregnancy. **Iran J Basic Med Sci**, v. 19, p. 119–124, 2016.
- MONTEIRO, M. R. DE C. C.; RIBEIRO, M. C.; FERNANDES, S. C. Aspectos clínicos e epidemiológicos da malária em um hospital universitário de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, n. 2, p. 33–43, 2013.
- MORGAN, E. et al. Cytometric bead array: A multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clinical Immunology**, v. 110, n. 3, p. 252–266, 2004.
- NDAM, N. T. et al. Resisting and tolerating *P. falciparum* in pregnancy under different malaria transmission intensities. **BMC Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2017.
- NEVES, P. A. R. et al. High prevalence of gestational night blindness and maternal anemia in a population-based survey of Brazilian Amazonian postpartum women. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. 1–14, 2019.
- OMER, S. et al. Impact of placental malaria on maternal, placental and fetal cord responses and its role in pregnancy outcomes in women from Blue Nile State, Sudan. **Malaria Journal**, v. 20, n. 1, p. 4–11, 2021.
- ONONGE, S.; CAMPBELL, O.; MIREMBE, F. Haemoglobin status and predictors of anaemia among pregnant women in Mpigi, Uganda. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014.
- PICCINNI, M. P. Role of T-Cell Cytokines in Decidua and in Cumulus Oophorus during Pregnancy. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 64, n. 3, p. 144–148, 2007.
- QUANQUIN, N. M. et al. Gravity-dependent associations between interferon response and birth weight in placental malaria. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2020.
- RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. **Seminars in Immunology**, v. 13, n. 4, p. 219–227, 1 ago. 2001.
- RIJKEN, M. J. et al. Quantifying low birth weight, preterm birth and small-for-Gestational-age effects of malaria in pregnancy: A population cohort study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 3–10, 2014.
- ROBERTSON, S. A.; SKINNER, R. J.; CARE, A. S. Essential Role for IL-10 in Resistance to Lipopolysaccharide-Induced Preterm Labor in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 7, p. 4888–4896, 1 out. 2006.
- ROMAGNANI, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 85, n. 1, p. 9–18, 2000.
- RUIZ, R. J. et al. Second trimester maternal plasma levels of cytokines IL-1Ra, IL-6 and IL-10 and preterm birth. **Journal of Perinatology**, v. 32, n. 7, p. 483–490, jul. 2012.

SAITO, S. et al. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 601–610, 2010.

SAMESIMA, C. Análise de efeitos socioeconômicos sobre a malária na Amazônia Legal, Brasil. p. 92–92, 2019.

SINGH, K. P. et al. Role of IL-1 β IL-6 and TNF- α cytokines and TNF- α promoter variability in Plasmodium vivax infection during pregnancy in endemic population of Jharkhand, India. **Molecular Immunology**, v. 97, n. March, p. 82–93, 2018.

SOUSA, J. R. DE et al. Situação da malária na Região do Baixo Amazonas, Estado do Pará, Brasil, de 2009 a 2013: um enfoque epidemiológico. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 4, p. 39–47, 2015.

STANISIC, D. I. et al. Risk factors for malaria and adverse birth outcomes in a prospective cohort of pregnant women resident in a high malaria transmission area of Papua New Guinea. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 5, p. 313–324, 2015.

UNGER, H. W. et al. Undernutrition and malaria in pregnancy-a dangerous dyad? 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2020 - 20 years of global progress & challenges**. Geneva: [s.n.].

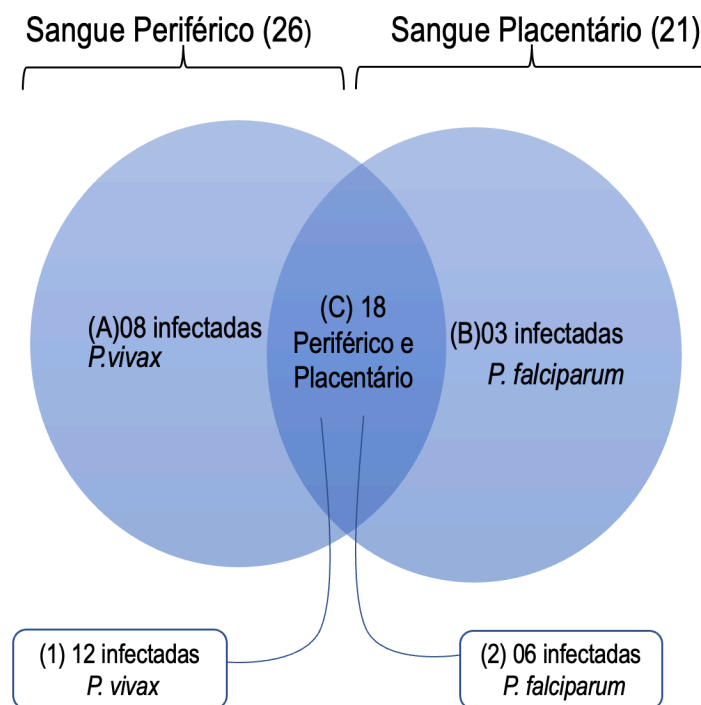
YAO, Y. et al. IL-10-Producing lymphocytes in inflammatory disease. **International Reviews of Immunology**, v. 32, n. 3, p. 324–336, 2013.

YASNOT, M. F. et al. The effects of Plasmodium vivax gestational malaria on the clinical and immune status of pregnant women in Northwestern Colombia. **Colombia Medica**, v. 44, n. 3, p. 172–177, 2013.

YILDIZ ZEYREK, F. et al. Parasite density and serum cytokine levels in Plasmodium vivax malaria in Turkey. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 5, p. 201–207, 2006.

Informações de Apoio (Figuras e Tabelas Suplementares)

S1 Fig. Distribuição do número das gestantes infectadas por compartimento afetado em sangue periférico, sangue placentário e infectadas nos dois compartimentos no momento do parto por *P. vivax* e *P. falciparum*.



Apresentaram infecção por *Plasmodium* no sangue periférico (26), apresentaram infecção por *Plasmodium* no sangue placentário (21); (A) número absoluto de gestantes infectadas por *P. vivax* no sangue periférico no momento do parto; (B) número absoluto de gestantes infectadas por *P. falciparum* no sangue placentário no momento do parto; (C) número absoluto de gestantes infectadas em ambos os compartimentos periférico e placentário no momento do parto independente da espécie. (1) Das 18 infectadas em ambos os compartimentos 12 eram por *P. vivax*. (2) Das 18 infectadas em ambos os compartimentos 06 eram por *P. falciparum*.

Tabela S1. Caracterização socioepidemiológica das gestantes.

Características	NI(n=144)	Pv (n=76)	Pf (n=41)	Valor de p
Socioeconômicas				
<i>Idade materna¹(anos)</i>	24 [19-28]	20 [17-28]	23 [19-28]	0,032 ^a
<i>Local de residência (rural)</i>	9,0 (13)	60,5 (46)	63,4 (26)	<0,001 ^b
<i>Etnia</i>				
Branca	11,8 (17)	15,8 (12)	19,5 (8)	0,409 ^b
Preta/Parda	88,2 (127)	84,2 (64)	80,5 (33)	
<i>Grau de instrução</i>				
Sem escolaridade	0 (0)	1,3 (1)	0 (0)	<0,001 ^c
1 a 4 anos	4,2 (6)	10,5 (8)	17,1 (7)	
5 a 8 anos	17,4 (25)	36,8 (28)	39,0 (16)	
Maior que 8 anos	78,5 (113)	51,3 (39)	43,9(18)	
História para malária				
Prévia à gestação	54,2 (78)	82,9 (63)	95,1 (39)	<0,001 ^c
Em gestação anterior	4,9 (7)	15,8 (12)	19,5(8)	0,004 ^b
Prevenção contra a malária				
Prevenção individual ²	23,6 (34)	19,7 (15)	12,2 (5)	0,279 ^c
Uso de cortinado ³	78,1 (75/96)	73,9 (51/69)	60,5 (23/38)	0,115 ^b

As variáveis estão representadas em mediana [intervalo interquartil], em percentual (número absoluto) ou em média ± desvio padrão. NI: Não infectadas. Pv: infectadas por *Plasmodium vivax*. Pf: infectadas por *Plasmodium falciparum*. ¹No momento do parto. ²Métodos de proteção individual contra o mosquito: roupas adequadas, inseticida em spray e uso de repelente. ³Se fez uso de mosquiteiro/cortinado na noite anterior a triagem. ^aTeste de Kruskal-Wallis; ^bTeste de χ^2 ; ^cTeste exato de Fisher.

7 CONCLUSÕES FINAIS

Esse estudo fornece evidências de que alterações no perfil de citocinas podem provocar resultados adversos no momento do parto, em relação as gestantes infectadas. Foi observado que o sistema imunológico responde de maneira diferente as formas de infecção por *Plasmodium* spp. considerando inclusive a localização da infecção sendo placentária e/ou periférica. A IL-8 placentária apareceu como associada nas infecções por *P. vivax* a parto prematuro, em associação com níveis reduzidos de IL-10 tecidual. A IL-10 em níveis aumentados juntamente com elevação de citocinas pró-inflamatórias reafirma a sua função de regulação do controle da resposta imunológica além de sua elevação periférica associada a parasitemia tecidual servir como reafirmação de outros estudos que pode ser utilizado como biomarcador de lesão tecidual. Os presentes resultados contribuem para subsidiar novos estudos com populações maiores a fim de compreender melhor a resposta imune materna no momento do parto.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; PILLAI, S.; LICHTMAN, A. **Imunologia: Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- ABRAMS, E. T. et al. Host Response to Malaria During Pregnancy: Placental Monocyte Recruitment Is Associated with Elevated β Chemokine Expression. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 5, p. 2759–2764, 2003.
- AGBOZO, F. et al. Maternal dietary intakes, red blood cell indices and risk for anemia in the first, second and third trimesters of pregnancy and at predelivery. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 1–16, 2020.
- ATAÍDE, R. et al. Malaria in pregnancy interacts with and alters the angiogenic profiles of the placenta. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1–15, 2015.
- BARDAJÍ, A. et al. Burden and impact of Plasmodium vivax in pregnancy: A multi-centre prospective observational study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–22, 2017.
- BLACK, R. E. et al. **Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries** *The Lancet* Elsevier B.V., , 2013.
- BÔTTO-MENEZES, C. et al. Plasmodium vivax malaria in pregnant women in the Brazilian Amazon and the risk factors associated with prematurity and low birth weight: A descriptive study. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2015.
- BRASIL et al. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL et al. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. BOLETIM ESPECIAL: MALÁRIA, 2021.; MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASÍLIA - DF. NOV. 2021. **Boletim Epidemiológico da Malária 2021**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>.
- BRUTUS, L. et al. Plasmodium vivax malaria during pregnancy, Bolivia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 10, p. 1605–1611, 2013.
- BURKI, T. K. **Malaria and malnutrition: Niger's twin crises** *The Lancet* Elsevier B.V., , 2013.
- CARLOS, B. C. et al. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 1, p. 1–13, 2019.
- CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. . [s.l: s.n.].
- CHSAVANEEYAKORN, S. et al. Immunity to placental malaria. III. Impairment of interleukin (IL) – 12, not IL-18, and interferon-inducible protein - 10 Responses in the placental intervillous blood of human immunodeficiency virus/malaria - Coinfected women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 1, p. 127–131, 2002.

- CHÊNE, A. et al. Placental cytokine and chemokine profiles reflect pregnancy outcomes in women exposed to *Plasmodium falciparum* infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 9, p. 3783–3789, 2014.
- CHUA, C. L. L. et al. Poor Birth Outcomes in Malaria in Pregnancy: Recent Insights Into Mechanisms and Prevention Approaches. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, p. 1–11, 2021.
- CORWIN, E. J. **Corwin / Understanding Cytokines Part I** BIOLOGICAL RESEARCH FOR NURSING. [s.l: s.n.].
- COTTRELL, G. et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Infections Are Associated With Maternal Anemia, Premature Births, and Low Birth Weight. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 10, p. 1481–1488, 15 maio 2015.
- DAHER, S.; MATTAR, R. Gestação: um fenômeno imunológico? Pregnancy: an immunological phenomenon? **Rev Bras. Alerg. Imunopatol.**, v. 32, n. 2, p. 63–67, 2009.
- DAYANANDA, K.; ACHUR, R.; GOWDA, DC. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 55, n. 1, p. 1, 2018.
- DELLICOUR, S. et al. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: A demographic study. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2010.
- DESAI, M. et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 93–104, fev. 2007.
- DOBAÑO, C. et al. High production of pro-inflammatory cytokines by maternal blood mononuclear cells is associated with reduced maternal malaria but increased cord blood infection. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2018.
- DOBAÑO, C. et al. Cytokine signatures of *plasmodium vivax* infection during pregnancy and delivery outcomes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. 1–17, 2020a.
- DOBAÑO, C. et al. Blood cytokine, chemokine and growth factor profiling in a cohort of pregnant women from tropical countries. **Cytokine**, v. 125, n. May 2019, p. 154818, 2020b.
- DOMBROWSKI, J. G. et al. Malaria during pregnancy and newborn outcome in an unstable transmission area in Brazil: A population-based record linkage study. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–16, 2018.
- DOMBROWSKI, J. G. et al. Adverse pregnancy outcomes are associated with *plasmodium vivax* malaria in a prospective cohort of women from the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, p. 1–23, 2021.
- FONTOURA, P. S. Perspectivas para eliminação da malária residual em área rural da Amazônia brasileira: Estratégias de Busca Ativa Reativa na identificação de reservatórios de *Plasmodium vivax*. p. 327, 2016.

FRIED, M. et al. Systemic Inflammatory Response to Malaria during Pregnancy Is Associated with Pregnancy Loss and Preterm Delivery. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 10, p. 1729–1735, 15 nov. 2017.

HASHMI, A. H. et al. Nutrition in transition: Historical cohort analysis summarising trends in under- and over-nutrition among pregnant women in a marginalised population along the Thailand-Myanmar border from 1986 to 2016. **British Journal of Nutrition**, v. 121, n. 12, p. 1413–1423, 2019.

HIRAKO, I. C. O sistema imune inato na patogênese da malária. **Fundação Oswaldo Cruz**, p. 181, 2016.

HOJO-SOUZA, N. S. et al. On the cytokine/chemokine network during Plasmodium vivax malaria: new insights to understand the disease. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2017.

KABYEMELA, E. R. et al. Maternal peripheral blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria. **Malaria Journal**, v. 7, p. 6–11, 2008.

KALINJUMA, A. V. et al. Factors associated with sub-microscopic placental malaria and its association with adverse pregnancy outcomes among HIV-negative women in Dar es Salaam, Tanzania: a cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–13, 2020.

KATONA, P.; KATONA-APTE, J. The Interaction between Nutrition and Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 1582–1590, 2008.

KRASNYI, A. M. et al. Extracellular DNA levels and cytokine profiles in preterm birth: a cohort study. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, 26 fev. 2022.

LACERDA, M. V. et al. Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: A systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**, v. 11, p. 1–18, 2012.

LEBSO, M.; ANATO, A.; LOHA, E. Prevalence of anemia and associated factors among pregnant women in Southern Ethiopia: A community based cross-sectional study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–11, 2017.

LIM, C. et al. Reticulocyte Preference and Stage Development of Plasmodium vivax Isolates. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 7, p. 1081–1084, 2016.

LÓPEZ-GUZMÁN, C.; CARMONA-FONSECA, J. Submicroscopic placental malaria: Histopathology and expression of physiological process mediators. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 37, n. 2, p. 220–228, 2020.

MACIEL, G. B. M. L.; ESPINOSA, M. M.; ATANAKA-SANTOS, M. Epidemiologia da malária no município de Colniza, Estado de Mato Grosso, Brasil: estudo descritivo do período de 2003 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 3, p. 465–474, 2013.

MILNER, D. A. Malaria pathogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

- MOBINI, M. et al. Significant roles played by interleukin-10 in outcome of pregnancy. **Iran J Basic Med Sci**, v. 19, p. 119–124, 2016.
- MONTEIRO, M. R. DE C. C.; RIBEIRO, M. C.; FERNANDES, S. C. Aspectos clínicos e epidemiológicos da malária em um hospital universitário de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, n. 2, p. 33–43, 2013.
- MORGAN, E. et al. Cytometric bead array: A multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clinical Immunology**, v. 110, n. 3, p. 252–266, 2004.
- NDAM, N. T. et al. Resisting and tolerating *P. falciparum* in pregnancy under different malaria transmission intensities. **BMC Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2017.
- NEVES, P. A. R. et al. High prevalence of gestational night blindness and maternal anemia in a population-based survey of Brazilian Amazonian postpartum women. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. 1–14, 2019.
- OMER, S. et al. Impact of placental malaria on maternal, placental and fetal cord responses and its role in pregnancy outcomes in women from Blue Nile State, Sudan. **Malaria Journal**, v. 20, n. 1, p. 4–11, 2021.
- ONONGE, S.; CAMPBELL, O.; MIREMBE, F. Haemoglobin status and predictors of anaemia among pregnant women in Mpigi, Uganda. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014.
- PICCINNI, M. P. Role of T-Cell Cytokines in Decidua and in Cumulus Oophorus during Pregnancy. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 64, n. 3, p. 144–148, 2007.
- QUANQUIN, N. M. et al. Gravity-dependent associations between interferon response and birth weight in placental malaria. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2020.
- RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. **Seminars in Immunology**, v. 13, n. 4, p. 219–227, 1 ago. 2001.
- RIJKEN, M. J. et al. Quantifying low birth weight, preterm birth and small-for-Gestational-age effects of malaria in pregnancy: A population cohort study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 3–10, 2014.
- ROBERTSON, S. A.; SKINNER, R. J.; CARE, A. S. Essential Role for IL-10 in Resistance to Lipopolysaccharide-Induced Preterm Labor in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 7, p. 4888–4896, 1 out. 2006.
- ROMAGNANI, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 85, n. 1, p. 9–18, 2000.
- RUIZ, R. J. et al. Second trimester maternal plasma levels of cytokines IL-1Ra, IL-6 and IL-10 and preterm birth. **Journal of Perinatology**, v. 32, n. 7, p. 483–490, jul. 2012.
- SAITO, S. et al. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 601–610, 2010.

SAMESIMA, C. Análise de efeitos socioeconômicos sobre a malária na Amazônia Legal, Brasil. p. 92–92, 2019.

SINGH, K. P. et al. Role of IL-1 β IL-6 and TNF- α cytokines and TNF- α promoter variability in Plasmodium vivax infection during pregnancy in endemic population of Jharkhand, India. **Molecular Immunology**, v. 97, n. March, p. 82–93, 2018.

SOUSA, J. R. DE et al. Situação da malária na Região do Baixo Amazonas, Estado do Pará, Brasil, de 2009 a 2013: um enfoque epidemiológico. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 4, p. 39–47, 2015.

STANISIC, D. I. et al. Risk factors for malaria and adverse birth outcomes in a prospective cohort of pregnant women resident in a high malaria transmission area of Papua New Guinea. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 5, p. 313–324, 2015.

UNGER, H. W. et al. Undernutrition and malaria in pregnancy-a dangerous dyad? 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2020 - 20 years of global progress & challenges**. Geneva: [s.n.].

YAO, Y. et al. IL-10-Producing lymphocytes in inflammatory disease. **International Reviews of Immunology**, v. 32, n. 3, p. 324–336, 2013.

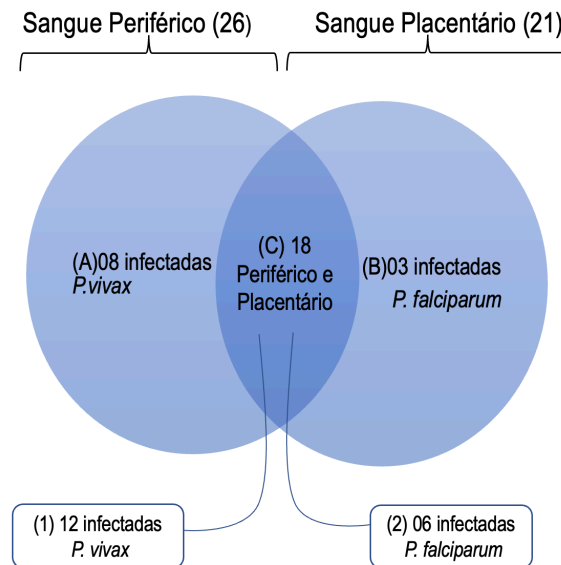
YASNOT, M. F. et al. The effects of Plasmodium vivax gestational malaria on the clinical and immune status of pregnant women in Northwestern Colombia. **Colombia Medica**, v. 44, n. 3, p. 172–177, 2013.

YILDIZ ZEYREK, F. et al. Parasite density and serum cytokine levels in Plasmodium vivax malaria in Turkey. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 5, p. 201–207, 2006.

APÊNDICES

Figura suplementar 1

S1 Fig. Distribuição do número das gestantes infectadas por compartimento afetado em sangue periférico, sangue placentário e infectadas nos dois compartimentos no momento do parto por *P. vivax* e *P. falciparum*.



Apresentaram infecção por *Plasmodium* no sangue periférico (26), apresentaram infecção por *Plasmodium* no sangue placentário (21); (A) número absoluto de gestantes infectadas por *P. vivax* no sangue periférico no momento do parto; (B) número absoluto de gestantes infectadas por *P. falciparum* no sangue placentário no momento do parto; (C) número absoluto de gestantes infectadas em ambos os compartimentos periférico e placentário no momento do parto independente da espécie. (1) Das 18 infectadas em ambos os compartimentos 12 eram por *P. vivax*. (2) Das 18 infectadas em ambos os compartimentos 6 eram por *P. falciparum*.

Tabela suplementar 1

Tabela S1. Caracterização socioepidemiológica das gestantes.

Características	NI(n=144)	Pv (n=76)	Pf (n=41)	Valor de <i>p</i>
Socioeconômicas				
<i>Idade materna</i> ¹ (anos)	24 [19-28]	20 [17-28]	23 [19-28]	0,032 ^a
<i>Local de residência (rural)</i>	9,0 (13)	60,5 (46)	63,4 (26)	<0,001 ^b
<i>Etnia</i>				
Branca	11,8 (17)	15,8 (12)	19,5 (8)	0,409 ^b
Preta/Parda	88,2 (127)	84,2 (64)	80,5 (33)	
<i>Grau de instrução</i>				
Sem escolaridade	0 (0)	1,3 (1)	0 (0)	<0,001 ^c
1 a 4 anos	4,2 (6)	10,5 (8)	17,1 (7)	
5 a 8 anos	17,4 (25)	36,8 (28)	39,0 (16)	
Maior que 8 anos	78,5 (113)	51,3 (39)	43,9(18)	
História para malária				
Prévia à gestação	54,2 (78)	82,9 (63)	95,1 (39)	<0,001 ^c
Em gestação anterior	4,9 (7)	15,8 (12)	19,5(8)	0,004 ^b
Prevenção contra a malária				
Prevenção individual ²	23,6 (34)	19,7 (15)	12,2 (5)	0,279 ^c
Uso de cortinado ³	78,1 (75/96)	73,9 (51/69)	60,5 (23/38)	0,115 ^b

As variáveis estão representadas em mediana [intervalo interquartil], em percentual (número absoluto) ou em média ± desvio padrão. NI: Não infectadas. Pv: infectadas por *Plasmodium vivax*. Pf: infectadas por *Plasmodium falciparum*. ¹No momento do parto. ²Métodos de proteção individual contra o mosquito: roupas adequadas, inseticida em spray e uso de repelente. ³Se fez uso de mosquiteiro/cortinado na noite anterior a triagem. ^aTeste de Kruskal-Wallis; ^bTeste de χ^2 ; ^cTeste exato de Fisher.

ANEXOS

A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AO PACIENTE (TCLE)

PROJETO DE PESQUISA

Malária Gestacional – Estudo de Seguimento

Patrocinadores: Universidade de São Paulo - USP
Universidade Federal do Acre - UFAC

Equipe responsável: Prof. Rodrigo Medeiros de Souza
(Pesquisador)

Dra. Jamille Gregório Dombrowski
(Pesquisadora)

Dr. Ricardo Ataíde (Pesquisador)

Dra. Suiane Negreiros da Costa do Valle
(Médica)

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

OBJETIVO E DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Este é um estudo que estamos realizando no Hospital da Mulher e da Criança do Juruá, com o objetivo de **estudar o sangue materno, a placenta e o sangue do cordão umbilical em gestantes com ou sem malária.**

A malária é uma doença transmitida pela picada do carapanã. No Brasil existem dois tipos de malária: a malária **vivax** e a malária **falciparum**. Nos dois tipos, o paciente pode ter só febre, mas também pode morrer se não for tratado.



A gravidez reduz a imunidade da mulher contra a malária. No caso dela ser infectada pelo mosquito, ela pode apresentar **anemia**. A infecção da placenta por malária poder causar **aborto, parto prematuro e baixo peso ao nascer. Mesmo que a mãe infectada não tenha febre, o bebê ainda corre PERIGO!!!**



Para podermos estudar o motivo das complicações para o bebê, precisamos analisar o sangue da mãe e do cordão umbilical, bem como a placenta. Estudaremos então a anemia materna, os problemas causados na placenta, bem como verificaremos se o *Plasmodium* passou para o sangue do feto. Para tanto, serão realizados um hemograma completo e também exames para excluir outros interferentes: HIV, VDRL, toxoplasmose, teste de hepatite, verificação da pressão arterial e exame de glicose.



Para isso, é preciso que sejam colhidos **5mL de sangue** da veia do braço, além do exame da malária, que será colhido no dedo (**duas gotas de sangue**), quinzenalmente ou mensalmente.

Depois de colher o sangue do braço, ele pode doer um pouco e até ficar com uma mancha roxa.

Depois que os resultados dos exames estiverem prontos, a gestante que participar da pesquisa poderá ver estes resultados, que ficarão arquivados no seu prontuário do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá e/ou nos postos de saúde. **O sangue colhido que sobrar será guardado no freezer com um número (sem o nome da pessoa) e poderá ser utilizado para outro estudo no futuro.**

Além dos exames de laboratório, **a pessoa será consultada e examinada por um médico ou enfermeira responsável pela pesquisa**, que poderá pedir outros exames, caso ache necessário.



Os **remédios para malária, que são de distribuição gratuita**, vão depender do tipo de malária e da gravidade do caso. Se a malária for grave, a paciente deverá ficar internada, como acontece com todas as outras pacientes graves que chegam ao Hospital da Mulher e da Criança do Juruá.

Após o tratamento, será verificado se houve a cura completa através de **uma nova coleta de 5 mL de sangue e do exame para malária**, que poderá ser quinzenal ou mensal. Poderão ser realizadas visitas domiciliares.

QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS EM PARTICIPAR DA PESQUISA?

Além de ter um médico e uma enfermeira especializados em malária que irão acompanhar o paciente durante toda a crise de malária, ao participar deste estudo, **você não receberá qualquer benefício adicional, nem ganhará dinheiro**, mas estará contribuindo para o estudo desta doença que ainda mata muitas mães e crianças.

Se tiver algum prejuízo participando da pesquisa, **os pesquisadores poderão lhe ajudar de alguma maneira, basta conversar com eles!**

Você também receberá uma cartilha educativa e informações sobre os mecanismos de como se pega a doença e as formas de evitar uma próxima infecção. Também receberá um cartão de vigilância de morbidade para acompanhamento da equipe de pesquisa.

QUEM VAI FICAR SABENDO DO RESULTADO DOS MEUS EXAMES?

A participação neste estudo será confidencial e os resultados dos exames serão mostrados somente para os profissionais de saúde do Hospital da Mulher e da Criança do Juruá que trabalham com gestação e malária ou para pesquisadores de outras cidades ou países, mas o nome da pessoa que participa nunca será revelado.

Os dados ou material biológico obtidos neste estudo, desde que autorizado, poderão ser utilizados em outros projetos, desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Em qualquer momento a gestante poderá retirar a autorização sem qualquer prejuízo.

O QUE ACONTECE SE EU QUISER DESISTIR DE PARTICIPAR DA PESQUISA?

A pessoa que aceitou participar da pesquisa tem todo o direito de dizer que não quer mais participar. E mesmo que isso aconteça, a pessoa será bem tratada e terá direito ao atendimento nos Postos de Saúde no momento do pré-natal ou Hospital da Mulher e da Criança sempre que precisar.

ATENÇÃO: NENHUM PESQUISADOR PODE DEIXAR DE ME TRATAR BEM SE EU DISSER QUE NÃO QUERO ENTRAR NA PESQUISA OU QUERO SAIR DELA DEPOIS DE ALGUNS DIAS!!!

EU GUARDAREI COMIGO ALGUM PAPEL DIZENDO QUE PARTICIPEI DA PESQUISA?

A pessoa que aceitar participar da pesquisa **assinará duas cópias deste documento**. Uma cópia ficará com o pesquisador, no centro de pesquisa clínica em malária gestacional, e outra cópia ficará com a paciente ou responsável.

E O QUE FAZER SE ACONTECER ALGUMA COISA COMIGO DEPOIS DA PESQUISA?

Para qualquer esclarecimento ou ajuda, a paciente poderá falar com a **Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos** do

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelo **telefone: 011-3091-7733**, e-mail: **cep@icb.usp.br** ou com os pesquisadores abaixo:

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu,

_____, portador da identidade _____, nascida em ____/____/_____, recebi a explicação de que serei uma das participantes voluntárias dessa pesquisa, entendendo todas as suas etapas e objetivos. Declaro que recebi todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança irá ler este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome e a data do preenchimento.

Caso deseje, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.

[] Desejo conhecer os resultados [] Não desejo conhecer os resultados

Autorizo a utilização dos meus dados e material biológico em outros projetos,

O Prof. Rodrigo Medeiros de Souza, cujo número de telefone é (68) 3322 8450 ou (68) 9968 6655, terá disponibilidade para atender e esclarecer quaisquer dúvidas.

com dispensa de uma nova TCLE, desde que autorizado por uma Comissão de Ética e pelo responsável por esta pesquisa?

[] Sim [] Não

A Enfa. Jamille Gregório Dombrowski cujo número de telefone é (68) 92813503 ou (68) 3322 8450, e também poderá atender e esclarecer outras dúvidas.

O Prof. Cláudio Romero Farias Marinho, cujo número de telefone é (11) 3091 7209 ou (11) 3091 7989, terá disponibilidade para atender e esclarecer quaisquer dúvidas.

E por estar devidamente informada e esclarecida sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expresso meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

_____ / ____ / 20__

Assinatura da paciente

Data

Impressão do polegar direito da paciente, caso esta não saiba escrever seu nome.

Testemunha 1 - RG _____

Testemunha 2 - RG _____

Nome do pesquisador que entrevistou

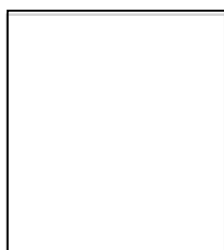
Assinatura do pesquisador

Código ViMiP- _____

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu,

_____, portador da identidade _____, nascida em ____/____/____,



recebi a explicação de que serei uma das participantes voluntárias dessa pesquisa, entendendo todas as suas etapas e objetivos. Declaro que recebi todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança

irá ler este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome e a data do preenchimento.

Caso deseje, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.

[] Desejo conhecer os resultados [] Não desejo conhecer os resultados

Autorizo a utilização dos meus dados e material biológico em outros projetos, com dispensa de uma nova TCLE, desde que autorizado por uma Comissão de Ética e pelo responsável por esta pesquisa?

[] Sim [] Não

E por estar devidamente informada e esclarecida sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expresso meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

_____ / _____ /20____

Assinatura da paciente

Data

Impressão do polegar direito da paciente, caso esta não saiba escrever seu nome.

Testemunha 1 - RG _____ Testemunha 2 - RG _____

Nome do pesquisador que entrevistou

Assinatura do pesquisador

B - Questionário



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO

PROJETO DE PESQUISA

MALÁRIA GESTACIONAL – ESTUDO DE SEGUIMENTO

Data: ____/____/20____

CÓDIGO ViMiP-

OBSERVAÇÃO: Este questionário contém **78 questões** e sua aplicação associado ao exame físico terá duração média de **30 minutos**. Todas as informações fornecidas serão mantidas em **SIGILO** e em hipótese alguma seu nome será revelado.

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Idade (anos): _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Naturalidade: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Profissão: _____ Telefone: _____

Nome da mãe: _____

Cartão SUS: _____ Nº SIVEP: _____

Sua residência está localizada em área:

Pelo menos 2 itens para Zona Urbana (Lei 5.172/66):

(1) Urbana

I - meio-fio ou calçamento, com canalização de águas pluviais;

(2) Rural

II - abastecimento de água;

(99) Não sabe / Não quer responder

III - sistema de esgotos sanitários;

A quanto tempo reside nesta área? |__|__| ano(s) |__|__| mes(es) |__|__| dia(s)

Pesquisador responsável pela aplicação do questionário:



QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO

Agora irei perguntar sobre sua vida pessoal e condições de moradia.

1. PERGUNTAS PESSOAIS

1.1 Qual o seu estado civil?

- (1) Solteira
- (2) Casada
- (3) Convivente/união estável
- (4) Divorciada
- (5) Viúva

1.2 Qual o seu grau de instrução?

- (1) Sem escolaridade
- (2) 1 a 4 anos
- (3) 5 a 8 anos
- (4) > 8 anos

1.3 Qual a sua raça/cor? (1) branca (2) negra/preta (3) parda (4) amarela (5) indígena

2. INDICADORES SOCIOECONÔMICOS E CULTURAIS

2.1 Quantos cômodos tem o domicílio?

2.2 Quantas pessoas habitam
(incluindo você)?

2.3 Seu banheiro é (marcar um):

- (1) Banheiro privado dentro da sua casa
- (2) Banheiro privado fora da sua casa
- (3) Banheiro compartilhado dentro da sua casa
- (4) Banheiro compartilhado fora da sua casa
- (5) Uma privada/latrina
- (6) Não tem banheiro ou latrina (mato, rio, igarapé)



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



2. INDICADORES SOCIOECONÔMICOS E CULTURAIS

2.4 Sua família tem qualquer um dos seguintes itens (marcar todos os correspondentes):

- (1) Eletricidade em sua casa todo o dia
- (2) Eletricidade em sua casa com gerador parte do dia
- (3) Rádio
- (4) Televisão
- (5) Telefone (fixo)
- (6) Telefone (celular)
- (7) Bicicleta
- (8) Motocicleta
- (9) Carro
- (10) Canoa

- (11) Barco a motor
- (12) Refrigerador
- (13) Nenhum dos anteriores

2.5 Usa água potável de (marcar um):

- (1) Água encanada dentro da sua casa
- (2) Água encanada compartilhada (fora)
- (3) Um poço artesiano privado
- (4) Um poço artesiano compartilhado/público
- (5) Uma cacimba
- (6) Lago, rio ou igarapé
- (7) Caminhão pipa
- (8) Água da chuva
- (9) Água mineral
- (10) Nenhuma das anteriores

2.6 O piso da sua casa é feito de que? (marcar um)

- (1) Terra ou areia
- (2) Madeira sem acabamento / tábua
- (3) Madeira polida
- (4) Lajota, cimento ou carpete
- (5) Outros materiais



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



2. INDICADORES SOCIOECONÔMICOS E CULTURAIS

2.7 Qual o tipo de telhado da sua casa?

- (1) Palha
- (2) Zinco ou alumínio

(3) Brasilite (Amianto)

(4) Telha ou laje

2.8 As janelas da sua casa são feitas de que?

(1) Não há janelas

(2) Janelas de madeira

(3) Janelas de vidro

(4) Janelas de alumínio

2.9 Elas são teladas? (1) Sim (2) Não

2.10 Sua família produz alimentos para consumo próprio? (1) Sim (2) Não

Se SIM, quais?

(1) Verdura e hortaliças (horta)

(2) Leite e derivados

(3) Carne e ovos

(4) Feijão

(5) Arroz e milho

(6) Frutas

(7) Extrativismo

(8) Caça / pesca

(9) Outros: _____

2.11 A família recebe auxílio da prefeitura, Estado ou outra instituição? (1) Sim (2) Não

2.12 Qual a renda mensal da família?

(1) Até 1 salário mínimo

(2) De 1 a 3 salários mínimos

(3) De 3 a 5 salários mínimos

(4) 5 ou mais salários mínimos

(99) Não sabe / Não quer responder



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



Agora farei perguntas sobre sua saúde.

3. HISTÓRIA CLÍNICA

3.1 Tem pressão alta? (1) Sim (2) Não (99) Não sabe

3.2 Fuma? (Inclui cigarros ou outras formas de fumo) (1) Sim (2) Não

a. Nesta gestação, você continua fumando? (1) Sim (2) Não

b. Se SIM, em média quantos cigarros fuma por dia? (1) 0-1 (2) 2-9 (3) ≥ 10

3.3 Toma algum remédio? (1) Sim (2) Não

a. Se SIM, qual(is)? _____

3.4 Faz uso de drogas ilícitas? (1) Sim (2) Não

3.5 Ingerir bebidas alcoólicas? (1) Sim (2) Não

a. Ingeriu bebidas alcoólicas durante esta gestação? (1) Sim (2) Não

b. Se SIM, com qual frequência?

(1) Mensalmente ou menos

(2) 2-4 vezes ao mês

(3) 2-3 vezes por semana

(4) 4-6 vezes por semana

(5) Diariamente

3.6 Tem HIV? (1) Sim (2) Não (99) Não sabe/Não quer responder

3.7 Antecedentes pessoais

(1) Infecção urinária (2) Cardiopatia

(3) Infertilidade (4) Diabetes

(5) Cirurgia pélvica uterina (6) Má formação

(7) Outro(s)? Especifique: _____

Agora farei perguntas sobre sua história reprodutiva.

4. GESTAÇÕES PRÉVIAS

Se a paciente não tiver certeza se está grávida atualmente, registre 99. Conte cada gravidez somente uma vez. A gravidez na qual mais de uma criança nasceu deve ser contada somente como uma gravidez.

4.1 Quantas vezes engravidou? (Incluir esta gravidez) |__|__|

a. Nascidos vivos? (não conte esta gravidez) |__|__|

b. Nascidos mortos / Abortos espontâneos? |__|__|
(não conte esta gravidez)



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



4. GESTAÇÕES PRÉVIAS

a. Abortos provocados? |__|__| (99) Não quer responder

b. Quantos partos cesáreas? |__|__|

c. Quantos partos normais? |__|__|

4.2 Alguma anormalidade ao nascimento? (1) Sim (2) Não

(99) Não quer responder

Se SIM, qual?

(1) Palato (2) Coração (3) Coluna

(4) Lábios (5) Cabeça (6) Abdomen

(7) Dedos (8) Genitália

Outro? Especifique: _____

4.3 Se multigrávida, qual a data do término da última gestação? |__|__|/|__|__|
(mês/ano)

4.4 Amamentação (1) Sim (2) Não

4.5 Algum RN pesou menos de 2.500g (1) Sim (2) Não

4.6 Nascimento com maior peso? |__|__|__|__|g

5. GRAVIDEZ ATUAL

5.1 Idade gestacional? (semanas) |__|__|

5.2 Sentiu os movimentos do bebê? (1) Sim (2) Não (99) Não sabe

5.3 Está tomando qualquer um dos seguintes medicamentos?

(1) Suplemento de ferro

(2) Ácido fólico

(3) Vitaminas de pré-natal

(4) Complexo B

(5) Nenhuma das anteriores

5.4 Teve alguma das seguintes complicações em sua gestação?

(1) Sangramento vaginal

(2) Anemia

(3) Pressão alta (pré-eclâmpsia)

(4) Diabetes gestacional

(5) Nenhuma das anteriores

(6) Outras

Especifique: _____

5.5 Você recebeu transfusão de sangue nesta gravidez? (1) Sim (2) Não



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



Agora farei perguntas sobre malária e por fim faremos o exame físico.

6. MEDIDAS DE PREVENÇÃO DE MALÁRIA

6.1 Tem cortinado em casa? (1) Sim (2) Não

a. Se sim, dormiu embaixo do mosquiteiro na noite passada? (1) Sim (2) Não

b. O mosquiteiro é impregnado com inseticida de longa duração? (1) Sim (2) Não
(3) Não sabe

6.2 Sua casa foi borrifada no último ano? (1) Sim (2) Não
(3) Não sabe

6.3 Usou alguma prevenção (inseticida em spray, repelente, repelente elétrico) para evitar carapanãs ou malária? (1) Sim (2) Não
(3) Não sabe

6.4 Se grávida, você tomou algum medicamento para prevenir malária nesta gravidez? (1) Sim (2) Não

a. Se SIM, qual?

(1) Cloroquina

(2) Cloroquina + primaquina

(3) Quinina

(4) Quinina + clindamicina

(5) Artemeter + lumefantrina (Coartem)

(6) Artesunato + mefloquina

(7) Doxiciclona

(8) Mefloquina

(9) Atovaquona/proguanil

(10) Outro

Especifique: _____

b. Se SIM, quantas vezes você fez uso deste medicamento?

(1) Uma vez

- (2) Duas vezes
- (3) Diariamente
- (4) Semanalmente
- (5) Mensalmente
- (6) Esquema do Ministério da Saúde
- (7) Outro



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



7. HISTÓRIA PARA MALÁRIA

7.1 Você já teve malária alguma vez na vida? (1) Sim (2) Não

a. Quantas vezes? (excluindo a atual) |__|__|

7.2 Você já teve malária durante alguma gravidez? (1) Sim (2) Não

a. Quantas vezes? (excluindo a atual) |__|__|

b. Qual a quantidade por gestação?

(1)|__|__| (2)|__|__| (3)|__|__| (4)|__|__| (5)|__|__| (6)|__|__| (7)|__|__|

7.3 Fez viagem recente? (nos últimos 30 dias) Se não, item 8. (1) Sim (2) Não

Se SIM, para onde? _____

7.4 Qual foi o objetivo da viagem? (1) Trabalho (2) Recreativo (3) Visita a parentes

Outro: _____

7.5 Dormiu neste local? (1) Sim (2) Não

a. Qual foi o tipo de acomodação?

(1) Ar livre (2) Acampamento (3) Barco (4) Habitação

7.6 Quanto tempo permaneceu nesta localidade? (1) ≤ 7 dias (2) > 7 dias

8. EXAME FÍSICO ATUAL

- 8.1 Temperatura axilar (°C) |_|_|,|_| °C
- 8.2 Frequência cardíaca (batimentos por minuto) |_|_|_| bpm
- 8.3 Frequência respiratória (incursões respiratórias por minuto) |_|_| irpm
- 8.4 Pressão arterial (mmHg) MSD MSE |_|_|_|/|_|_|_| mmHg
- 8.5 Peso no início da gestação (kg) |_|_|_|,|_| kg
- 8.6 Peso no final da gestação (kg) |_|_|_|,|_| kg
- 8.7 Altura (cm) |_|_|_|,|_| cm
- 8.8 Altura do fundo uterino (cm) |_|_|,|_| cm
- 8.9 DUM (dia/mês/ano) |_|_|/|_|_|/|_|_|
- 8.10 DPP (dia/mês/ano) |_|_|/|_|_|/|_|_|

8.11 Apresenta

- a. Icterícia? (1) Sim (2) Não c. Cianose? (1) Sim (2) Não
- b. Palidez? (1) Sim (2) Não d. Edema (MMII)? (1) Sim (2) Não

8.12 Batimento cardíaco fetal audível? (1) Sim (2) Não |_|_|_| bpm



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



9. DADOS DO PRÉ-NATAL

- 9.1 Você fez pré-natal? (1) Sim (2) Não
- 9.2 Quantas visitas? (Conferir pelo cartão) |_|_|

Consulta nº	1	2	3	4	5	6	7	8
Data								
IG (sem)								
Peso (kg)								
Pressão Arterial								
Edema								
Altura uterina (cm)								
BCF								
Mov. Fetal								

Data: ___/___/___ Data: ___/___/___ Data: ___/___/___

9.2 Hemoglobina (g/dl)	_ _ , _	_ _ , _	_ _ , _
9.3 Hematócrito (%)	_ _ , _	_ _ , _	_ _ , _
9.4 VCM (fl)	_ _ _ , _	_ _ _ , _	_ _ _ , _
9.5 HCM (pg)	_ _ , _	_ _ , _	_ _ , _
9.6 CHCM (g/dl)	_ _ , _	_ _ , _	_ _ , _
9.7 Tipo Sanguíneo / Rh	_ _ / <input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg		
9.8 Leucócitos total (mm ³)	_ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _	_ _ . _ _ _
9.9 Plaquetas (x10 ³)	_ _ _ . _	_ _ _ . _	_ _ _ . _
9.10 AST / TGO (UI/dl)	_ _ _	_ _ _	_ _ _
9.11 ALT / TGP (UI/dl)	_ _ _	_ _ _	_ _ _
9.12 Bilirrubina total (mg/dl)	_ _ , _	_ _ , _	_ _ , _
9.13 Bilirrubina direta (mg/dl)	_ _ , _	_ _ , _	_ _ , _
9.14 Creatinina (mg/dl)	_ , _	_ , _	_ , _
9.15 Uréia (mg/dl)	_ _ _	_ _ _	_ _ _
9.16 Glicemia jejum (mg/dl)	_ _ _	_ _ _	_ _ _
9.17 VDRL	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg
9.18 HBsAg	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg
9.19 Toxoplasmose	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg
9.20 Anti-HIV	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg
9.21 Coombs indireto	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg	<input type="checkbox"/> Pos <input type="checkbox"/> Neg

OBS: Caso não existam dados preencher com 00.

Testes laboratoriais adicionais

- 1) Anexe a cópia dos resultados laboratoriais nesta página, se aplicável.
- 2) Anexe a cópia do cartão de pré-natal, se possível.

C - Formulários de vigilância da malária



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



FORMULÁRIO DE VIGILÂNCIA DA MALÁRIA

PROJETO DE PESQUISA

MALÁRIA GESTACIONAL

Data: ____/____/20____

CÓDIGO VIMiP-

1. HISTÓRIA PARA MALÁRIA (Não aplicar para grupo controle)

1.1 Em qual(is) idade(s) gestacional(is) você teve malária? (meses)

(1)|_|_| (2)|_|_| (3)|_|_| (4)|_|_| (5)|_|_| (6)|_|_| (7)|_|_| (8)|_|_|

1.2 Que tipo de *Plasmodium* / Malária? (01 - *Vivax*; 02 - *Falciparum*; 03 - Mista; 99 - Não se sabe)

(1)|_|_| (2)|_|_| (3)|_|_| (4)|_|_| (5)|_|_| (6)|_|_| (7)|_|_| (8)|_|_|

1.3 Quantas cruzes? (01 - < 1/2+; 02 - 1/2+; 03 - +; 04 - ++; 05 - +++; 06 - ++++ 99 - Não se sabe)

(1)|_|_| (2)|_|_| (3)|_|_| (4)|_|_| (5)|_|_| (6)|_|_| (7)|_|_| (8)|_|_|

1.4 Quando os seus sintomas iniciaram? (Em caso de malária atual)

(1) |_|_|/|_|_|/|_|_|

(5) |_|_|/|_|_|/|_|_|

(2) |_|_|/|_|_|/|_|_|

(6) |_|_|/|_|_|/|_|_|

(3) |_|_|/|_|_|/|_|_|

(7) |_|_|/|_|_|/|_|_|

(4) |_|_|/|_|_|/|_|_|

(8) |_|_|/|_|_|/|_|_|

1.5 Nº da notificação no SIVEP-Malária e data do diagnóstico:

(1) |_|_|_|_|_|_| - |_|_|/|_|_|/|_|_| (5) |_|_|_|_|_|_| - |_|_|/|_|_|/|_|_|

(2) |_|_|_|_|_|_| - |_|_|/|_|_|/|_|_| (6) |_|_|_|_|_|_| - |_|_|/|_|_|/|_|_|

(3) |_|_|_|_|_|_| - |_|_|/|_|_|/|_|_| (7) |_|_|_|_|_|_| - |_|_|/|_|_|/|_|_|

(4) |_|_|_|_|_|_|_| - |_|_|/|_|_|/|_|_| (8) |_|_|_|_|_|_|_| - |_|_|/|_|_|/|_|_|

1.6 Durante este episódio, quais sintomas abaixo você teve? (Marcar todos que se aplicarem)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
(1) Febre (nas últimas 48 horas)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(2) Calafrio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(3) Sudorese	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(4) Dor de cabeça	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(5) Dores nos músculos / articulações	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(6) Fraqueza	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(7) Anorexia / Falta de apetite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



1. HISTÓRIA PARA MALÁRIA (Não aplicar para grupo controle)

(8) Náuseas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(9) Vômitos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(10) Dor abdominal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(11) Diarréia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(12) Tosse	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(13) Prurido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(14) Erupções ou reações da pele	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(15) Zumbido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(16) Desordem ou dificuldade de dormir	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(17) Mudanças comportamentais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(18) Pesadelos ou alucinações	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(19) Convulsões / ataques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| (20) Sangramento vaginal | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| (21) Outros | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Especifique: _____

1.8 Tomou algum medicamento para os sintomas anteriores?

1.9 Usou plantas medicinais?

1.10 Qual o tratamento foi recomendado para malária?

- | | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| (11)Cloroquina | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| (12)Cloroquina + primaquina | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| (13)Quinina | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| (14)Quinina + clindamicina | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| (15)Artemeter + lumefantrina (Coartem) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| (16)Artesunato + mefloquina | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| (17) Outro | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Especifique: _____

OBS: _____

Pesquisador: _____

D - Formulários de vigilância da morbidades



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO QUINZENAL PÓS-MALÁRIA

PROJETO DE PESQUISA - MALÁRIA GESTACIONAL

Data: ____ / ____ /20____

CÓDIGO ViMiP- _____

1. COLETA DE DADOS (Visita domiciliar)

1.1 Seguiu o tratamento recomendado?

(1) Sim

(2) Não

1.2 Se SIM, qual esquema antimalárico administrado? (Marcar os que se aplicam)

(1) Cloroquina

(2) Cloroquina + primaquina

(3) Quinina

(4) Quinina + clindamicina

(5) Artemeter + lumefantrina (Coartem)

(6) Artesunato + mefloquina

(7) Outro

Especifique: _____

1.3 Apresentou algum dos sintomas abaixo nos últimos dias?

(1) Febre

(2) Calafrios

(3) Dor de cabeça

(4) Sudorese

(5) Diarréia

(6) Tosse

(7) Dor ao urinar

(8) Vômitos

1.4. Caso NÃO tenha realizado o tratamento completo, esclarecer o motivo:

Pesquisador: _____

E - Formulários de vigilância da morbidades



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



FORMULÁRIO DE VIGILÂNCIA DA MORBIDADE

PROJETO DE PESQUISA - MALÁRIA GESTACIONAL

Data: ____ / ____ /20____

CÓDIGO ViMiP- _____

1. EXAME CLÍNICO (Visita domiciliar)

Avaliação	1ª visita	2ª visita	3ª visita
Data			
IG (sem)			
Peso (kg)			
Pressão arterial (mmHg)			
Freq. Cardíaca (bpm)			
Freq. Respiratória (irpm)			
Edema (1 a 4)			
Altura interina (cm)			
BCF (bpm)			
Mov. Fetal (+ ou -)			
Temperatura (°C)			

Pesquisador: _____

F - Formulários de vigilância do parto e análise da placenta



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



FORMULÁRIO DE VIGILÂNCIA DO PARTO E ANÁLISE DA PLACENTA

PROJETO DE PESQUISA - MALÁRIA GESTACIONAL

Data: ____ / ____ /20____

CÓDIGO ViMiP-

1. ANÁLISE PLACENTÁRIA (Laboratório)

(1) Realizada (2) Não realizada

1.1 Peso (g): |_|_|_|_|

1.2 Análise macroscópica (1) Sim (2) Não

1.2.1 Presença de alterações na face materna? (1) Sim (2) Não

Se SIM, quais as alterações observadas?

(1) Área de calcificação

(2) Área de hemorragia

(3) Área de infarto (isquemia)

(4) Coágulo

(5) Lesão no(s) cotilédono(s)

(6) Outras: _____

1.2.2 Presença de alterações na face fetal? (1) Sim (2) Não

1.2.2.1 Inserção do cordão umbilical

(1) Central

- (2) Excêntrica
- (3) Marginal
- (4) Velamentosa
- 1.2.2.2 Vasos fetais (1) Três (2) Dois
- 1.2.2.3 Torção do cordão umbilical (1) Direita (2) Esquerda (3) Ausente
- 1.2.2.4 Presença de nós no cordão umbilical (1) Sim (2) Não
- 1.2.3 Presença de alterações nas membranas? (1) Sim (2) Não
- Qual a sua disposição? (1) Marginal (2) Circunvalada
- 1.2.3.1 Cor (1) Normal (2) Verde (3) Opaca



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Parasitologia



1. ANÁLISE PLACENTÁRIA (Laboratório)

- 1.3 Documentação fotográfica (1) Sim (2) Não
- 1.4 Coleta de 4 fragmentos de biópsia em formol tamponado 4% (1) Sim (2) Não
- 1.5 Biópsia para *Imprint* (1) Sim (2) Não
- 1.6 Gota espessa de sangue da placenta (1) Sim (2) Não
- 1.7 Esfregaço de sangue da placenta (1) Sim (2) Não
- 1.8 Sangue da placenta para RT-PCR (1) Sim (2) Não
- 1.9 Biópsia para RNA later[®] (1) Sim (2) Não
- 1.10 Biópsia para microscopia eletrônica (**caso a gestante esteja infectada no momento do parto**) (1) Sim (2) Não
- 1.11 Tissue Tek (1) Sim (2) Não

2. EXAMES LABORATORIAIS DO CORDÃO UMBILICAL (Laboratório)

2.1 Gota espessa do cordão umbilical (1) Sim (2) Não

2.2 Esfregaço do cordão umbilical (1) Sim (2) Não

2.3 Coleta de sangue ou coágulo do cordão umbilical (1) Sim (2) Não

Parto: (1) Normal (2) Cesárea Hora: ____h____

Pesquisador: _____

G – Aprovação pelo Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
ACRE- UFAC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil de citocinas inflamatórias em gestantes infectadas por Plasmodium spp.

Pesquisador: Rodrigo Medeiros de Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30323420.9.0000.5010

Instituição Proponente: Universidade Federal do Acre- UFAC

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Acre- UFAC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.047.426

Apresentação do Projeto:

Trata-se da continuação e da utilização de dados de um projeto de pesquisa vinculado a Universidade Federal do Acre do campus de Cruzeiro do Sul, sendo que este projeto já foi aprovado em dois comitês de ética em pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (parecer 70.324 de 8 de agosto de 2012) e da Universidade Federal do Acre (parecer 136.622 de 18 de outubro de 2012). Além disso, trata-se também de um trabalho de conclusão de curso de Enfermagem.

O projeto tem como objetivo "Identificar as alterações no perfil de citocinas inflamatórias ocasionadas pela infecção por Plasmodium spp. durante a gestação." Trata-se de "um estudo de caráter observacional, retrospectivo, do tipo longitudinal, comparativo, analítico e com amostragem não probabilística e não randomizada. Para a pesquisa proposta, serão utilizados os dados coletados de 206 gestantes, sendo 84 gestantes infectadas por P. vivax, 46 gestantes infectadas por P. falciparum e 160 incluídas no grupo controle. Como unidade de análise teremos as variáveis presentes no questionário que foi aplicado no projeto original como instrumento de coleta estruturado. O estudo será realizado a partir dos dados coletados entre dezembro de 2012 e outubro de 2014, no Hospital da Mulher e da Criança do Juruá (HMCJ), no município de Cruzeiro do Sul, no estado do Acre, Brasil. O atual projeto é parte da continuidade dos estudos do projeto de pesquisa intitulado "Alterações histopatológicas placentárias associadas à infecção por P. vivax em gestantes do Vale do Alto Juruá" submetido tanto ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo

H – Normas da Revista PLOS Neglected Tropical Diseases



TITLE, AUTHOR, AFFILIATIONS FORMATTING GUIDELINES

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

This is the article title

John Doe^{1¶}, Antonie Data^{1¶}, Johannes van Stats^{1,¶a}, Marie Testperson^{2*}, David Ribosome Jr.^{3,4}, Gregory H.T. McBio^{5,¶b}, Angela Reviewerson^{1,2&}, Marina Measure^{1&}, on behalf of The Bunny Genome Sequencing Consortium[^]

¹ Department, Institution, City, State, Country

² Department of Dermatology, Division of Rabbit Health, Section of Veterinary Medicine, St. Hare Hospital, San Francisco, California, United States of America

³ Department of Libraries and Archives, National Contemporary Bunny Museum, Lagomorph, Connecticut, United States of America

⁴ Department of Restoration, National Contemporary Bunny Museum, Lagomorph, Connecticut, United States of America

⁵ Department of Archaeology, Bunny University, Lagomorph, Connecticut, United States of America

^{¶a}Current Address: Department of Carrot Science, Bunny University, Lagomorph, Connecticut, United States of America

^{¶b}Current Address: Department of Canine Evasion, Bunny University, Lagomorph, Connecticut, United States of America

* Corresponding author

E-mail: testperson@university.ed (MT)

[¶]These authors contributed equally to this work.

[&]These authors also contributed equally to this work.

[^]Membership of the Bunny Genome Sequencing Consortium is provided in the Acknowledgments.

Symbol Legend		
Symbol	Name	Definition
¶	Pilcrow (paragraph symbol)	1st set of equal contributors
&	Ampersand	2nd set of equal contributors
*	Asterisk	Corresponding author(s)
#a	Pound/number sign	First Current address
#b	Pound/number sign	Second Current address
†	Dagger/Cross	Deceased
^	Caret	Consortium/Group Authorship

Article Title

- Italics, bold type, symbols, and other text formatting will all be reproduced in the published article as submitted.
- Titles should be written in sentence case (capitalize only the first word of the title, the first word of the subtitle, and any proper nouns and genus names).

Author Byline

- Author names will be published exactly as they appear in the accepted manuscript.
- Indicate affiliations by number only.
- Affiliation footnotes should appear in numerical order at first mention.
- Please use the symbols provided in this document for other designations.
- Numbers and symbols should be in superscript.
- Do not include titles (Dr., PhD, Professor, etc.).

Affiliations

- Affiliations will be published as they appear in the accepted manuscript.
- Include each component in order of small to large (Department, Division, Section, Institution, City, State, Country).
- Do not include ZIP or Postal Codes, street addresses, or building/office numbers.
- Do not use abbreviations (e.g. Dept.).
- Do not list positions within an institution (e.g. Department Chair, Professor, etc.).
- List each affiliation individually and in full.

Corresponding Authorship

- Do not include physical addresses; only email addresses are required.
- List corresponding author's initials in parentheses after the email address.

Contributorship

- Use the symbols provided here to indicate equal contributions.
- If you would like the equal contributions notes to read differently, please specify in your manuscript (e.g., "AR and MM are Joint Senior Authors").

Consortia or other Group Authors

- If there is a consortium or group author on your manuscript, please provide a note that describes where the full membership list is available for the readers.
- The membership list can be listed in the Acknowledgments, in Supporting Information, or on the internet.
- Consortia/Group authors can have affiliations, but it is not required.

Modified April 2021

1 Abstract ←

2 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 3 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 4 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
 5 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
 6 sodales vulputate auctor. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla
 7 ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu
 8 fermentum magna pellentesque vitae. Integer semper viverra mauris
 9 vel pulvinar. Suspendisse sagittis malesuada urna. Praesent mauris
 10 diam, fringilla id fringilla ac, posuere non lorem. Vestibulum mauris
 11 ante, fringilla quis tortor sit amet, accumsan fermentum quam. Nulla
 12 dictum consectetur leo. Ut vulputate ipsum purus, a interdum nibh
 13 viverra et. Praesent aliquam sapien vel massa sodales bibendum.
 14 Nulla interdum accumsan lectus, sed auctor elit accumsan a.
 15 Suspendisse quis rhoncus nibh. The verum est de illic.

16 **NOTE: Before submitting, review the full submission guidelines**
 17 **for the journal to which you are submitting:** [PLOS ONE](#), [PLOS](#)
[Biology](#), [PLOS Medicine](#), [PLOS Neglected Tropical Diseases](#), [PLOS](#)
[Computational Biology](#), [PLOS Genetics](#), [PLOS Pathogens](#)

18 Introduction ←

19 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 20 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 21 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
 22 pharetra quam, vitae convallis nunc.

23 Level 1 heading

24 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 25 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae (Fig 1)
 26 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
 27 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
 28 sodales vulputate auctor. Nam sit amet nulla lacus a, (Figs 1 and 2)
 29 ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu fermentum magna
 30 pellentesque vitae.

31
 32 **Fig 1. This is the Fig 1 Title.** This is the Fig 1 legend.

33 **Fig 2. This is the Fig 2 Title.** This is the Fig 2 legend.

34 File Naming for Figures

- Figure files should be saved as "Fig1.tif", "Fig2.eps", etc.
- Acceptable file formats for figures are ".tif", ".tiff", and ".eps"
- Figures should be uploaded separately as individual files.

Level 1 Heading

- Use Level 1 heading for all major sections (Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, etc.).
- Bold type, 18pt font.
- Only use italics and text formatting where needed (e.g. genus and species names, genes, etc.).
- Headings should be written in sentence case (capitalize only the first word of the heading, the first word of the subheading, and any proper nouns and genus names).

NOTE: Do not cite figures, tables, supporting information, or references in the Abstract.

Figure Citations

- Cite figures as "Fig 1", "Fig 2", etc.
- Cite figures and tables in order.
- Do not cite "Fig 2" before "Fig 1".
- Cite multiple figures as "Figs 1 and 2", "Figs 1-3", etc.

Figure Captions

- Each figure caption should appear directly after the paragraph in which they are first cited.
- Do not include tables within captions.
- Use bold type for the figure titles.

MANUSCRIPT BODY FORMATTING GUIDELINES

35

36 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 37 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 38 interdum. Donec p^2 et q^2 tincidunt porta sem nec hendrerit.

39
$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \tag{1}$$

40 Vestibulum nec pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris
 41 in mattis sapien. Fusce sodales vulputate auctor. Nam lacus felis,
 42 fermentum sit amet nulla ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum
 43 aliquet sapien, eu fermentum magna pellentesque vitae. Integer
 44 semper viverra mauris vel pulvinar dolor sit amet en $(p + q)^2 = 1$.

45

46 **Level 2 heading**

47 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 48 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 49 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Omnes tuum
 50 basi sunt pertinent ad nos. Mauris in mattis sapien. Fusce sodales
 51 vulputate auctor. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla ac,
 52 tristique ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu fermentum
 53 magna pellentesque vitae. Integer semper viverra mauris vel
 54 pulvinar et alst.

55 **Level 3 heading**

56 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 57 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 58 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
 59 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
 60 sodales vulputate auctor. Numquam iens dare tibi up.

61 **NOTE:** This document is presented in single-space paragraph
 62 format for ease of use. Please submit your manuscript in
 double-space paragraph format.

63

64

Display/Numbered Equation

- Format display equations in Mathtype or Equation Tools.
- Do not use Graphic Objects.

Inline Equation

- Format in regular text or as an inline equation in Mathtype or Equation Tools.
- Do not use Symbol Font.
- Do not use Graphic Objects.

Level 2 Heading

- Use Level 2 headings for sub-sections of major sections.
- Bold type, 16pt font.
- Only use italics and text formatting where needed.
- Use sentence case.

Level 3 heading

- Use Level 3 headings for sub-sections within Level 2 headings.
- Bold type, 14pt font.
- Only use italics and text formatting where needed.
- Use sentence case.

65 **Level 1 heading**

66 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 67 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, et bland **Table 1**
 68 Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec pharetra
 69 quam, vitae convalli. Fido nemo.

70 **Table 1. This is the Table 1 Title.**

	Chemical W	Chemical X	Chemical Y	Chemical Z
Chemical 1	Reaction 1W	Reaction 1X	Reaction 1Y	Reaction 1Z
Chemical 2	Reaction 2W	Reaction 2X	Reaction 2Y	Reaction 2Z
Chemical 3	Reaction 3W ^a	Reaction 3X	Reaction 3Y ^b	Reaction 3Z
Chemical 4	Reaction 4W	Reaction 4X	Reaction 4Y	Reaction 4Z
Chemical 5	Reaction 5W	Reaction 5X	Reaction 5Y	Reaction 5Z

71 This is the Table 1 legend.
 72 ^aTable footnotes belong here.
 73 ^bFootnotes should have corresponding symbols in the table.
 74
 75

Tables and Table Citations

- Tables should be cited as "Table 1", "Table 2", etc.
- Cite multiple tables as "Tables 1 and 2", "Tables 1-3", etc.
- Tables should be included directly after the paragraph in which they are first cited.
- Tables must be cell-based in Microsoft Word or embedded with Microsoft Excel.
- Do not use empty rows to create spacing.
- Do not include graphic objects, images, or colored text.

76 **Conclusion**

77 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing **[1-5]**
 78 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 79 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
 80 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
 81 sodales vulputate auctor **S1 Fig.** Dolor sit amet **S1 and S2 Tables.**

Reference Citations

- Cite references in brackets (for example, "[1]" or "[2-5]" or "[3,7,9]").
- References must be cited in order at first mention.

Supporting Information Citations

- Format Supporting Information Citations as "S1 Fig", "S1 Table", etc.
- Cite multiple files as "S1 and S2 Figs", "S1-S3 Figs", etc.
- It is not required to cite each Supporting Information file.
- Supporting information should be uploaded separately as individual files.

83
 3

84

85

86 Acknowledgments

87 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 88 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 89 interdum.

90

91

92 References

- 93 1. Doe J, Data A, van Stats J, Testperson M, Ribosome D Jr,
 94 McBio GHT, et al. This is the article title. PLoS ONE.
 95 2017;12(12):e000000. doi: 10.1371/journal.pone.0000000
 96 2. Doe J, Data A, van Stats J, Testperson M, Ribosome D Jr,
 97 McBio GHT, et al. Bunny dynamics in cartoon landscapes.
 98 PLoS ONE. Forthcoming 2017.

99

100

101 Supporting information

102 **S1 Fig. This is the S1 Fig Title.** This is the S1 Fig legend.

103 **S2 Fig. This is the S2 Fig Title.** This is the S2 Fig legend.

104 **S1 Table. This is the S1 Table Title.** This is the S1 Table legend.

105 **S2 Table. This is the S2 Table Title.** This is the S2 Table legend.

106 **S1 File. This is the S1 File Title.** This is the S1 File legend.

File Naming for Supporting Information

- Supporting Information files should be saved as "S1_Fig.tif", "S1_File.pdf", etc.
- All file types are supported.

Acknowledgments

- Do not include funding or competing interests information in Acknowledgments.

References

- References should be listed after the main text, before the supporting information.
- References with more than six authors should list the first six author names, followed by "et al."
- References should be formatted according to the NLM/ICMJE style: https://www.nlm.nih.gov/bd/uniform_requirements.html

Supporting Information Captions

- List Supporting Information captions at the end of the manuscript in a section titled "Supporting information".
- Use a Level 1 heading.
- Use bold type for the titles.
- Supporting Information files do not require full captions; only labels ("S1 Fig") are fully required.

4 **Before submitting, review the full submission guidelines for the journal to which you are submitting:** [PLOS ONE](#), [PLOS Biology](#), [PLOS Medicine](#), [PLOS Neglected Tropical Diseases](#), [PLOS Computational Biology](#), [PLOS Genetics](#), [PLOS Pathogens](#)