



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Caracterização de Factores de Risco da Malária Placentária por *Plasmodium falciparum*
em Luanda

Paulo Adão de Campos

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR, RAMO DAS
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE PARASITOLOGIA**

MAIO DE 2011

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Caracterização de Factores de Risco da Malária Placentária por *Plasmodium falciparum*
em Luanda

Paulo Adão de Campos

**Médico e Mestre em Educação Médica, Docente do Departamento de Ginecologia
e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto, Luanda**

Orientador: Professor Doutor Henrique Silveira

Co orientador: Professor Doutor Luís Varandas

Comissão tutorial: Professor Doutor Henrique Silveira, Professor Doutor Luis
Varandas, Professor Doutor Virgílio E. do Rosário

**Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, realizada sob a orientação científica
de Henrique Silveira e Luís Varandas**

**Apoio financeiro do Ministério da Saúde da República de Angola e da Faculdade de
Medicina da Universidade Agostinho Neto**

À minha família, amigos e às pessoas envolvidas no estudo

Agradecimentos

- Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que este momento se concretizasse. Em especial,

- À minha família pela confiança que sempre depositou em mim.

- Ao Professor Doutor Virgílio Estólio do Rosário membro da UEI Parasitologia Médica do CMDT/IHMT/UNL, Professor Catedrático do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Presidente do Conselho Científico do IHMT, responsável pela ligação CMDT com os países africanos de língua portuguesa, que foi a primeira entidade científica IHMT que me deu a conhecer o estado de arte da pesquisa que pretendíamos fazer na área da Malária Placentária. Apreciei a sua liderança científica.

- Ao Professor Doutor Henrique Condinho da Silveira por me ter aceite como seu orientando e partilhado comigo as angústias de conceber, implementar e redigir a pesquisa. Apreciei a sua orientação precisa, atenta e exigente.

- Ao Professor Doutor Luís Varandas da UEI Clínica de Doenças Tropicais e do CMDT/IHMT, pela co-orientação e pelo acervo de referências bibliográficas que permitiu a reorientação da pesquisa sobre malária placentária na vertente clínica

- À Investigadora Doutora Sónia Centeno Limada UEI Clínica de Doenças Tropicais e CMDT/IHMT/UNL pela grata transferência de tecnologia e colaboração científica e pedagógica com a Direcção Nacional de Saúde Pública de Angola, dando continuidade ao programa de doutoramentos iniciado em 2006.

- À Doutora Dinora Lopes do Biotério e CMDT/IHMT/UNL pela competência com que participou na formação em técnicas de diagnóstico de malária por microscopia óptica, biologia molecular (extração de DNA e PCR), IFA e TDR em Luanda

- À Investigadora Doutora Maria de Fátima Carvalho Nogueira, pela dedicação especial na formação em técnicas de determinação de susceptibilidade a antimaláricos por microscopia óptica (MARK III da OMS);
- Às Dr^{as}. Bianor Valente, Inês Satar, Carla Marisa Lima Pereira e aos Doutores Luís Filipe Susana Ramos, pelo apoio pessoal e inestimável ajuda no processamento (PCR) de algum material biológico.
- À Professora Doutora Luzia Gonçalves pelo interesse que demonstrou no apoio de alguns aspectos estatísticos.
- A toda a equipa do IHMT, em especial à Professora Doutora Maria Amélia Grácio, pelo excelente apoio e pela antecipação e disponibilidade para me ajudar a resolver problemas burocráticos, quando exercia as funções de Presidente do Conselho Científico da Universidade Nova de Lisboa.
- Ao Professor Doutor Albano Ferreira que no início deste Doutoramento exercia as funções de Vice Decano para os Assuntos da Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto, pelo encorajamento e confiança manifestados quanto à finalização de todo o processo conducente ao Doutoramento.
- Ao Professor Dr. João Baptista Vieira Lopes, Chefe de Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto, pelo apoio moral e institucional, que permitiu a dedicação prioritária nos assuntos ligados ao Doutoramento.
- Ao Professor Dr. José Belchior da Silva e a sua equipa de trabalho, pelas sugestões pertinentes no delineamento estatístico preliminar da pesquisa.
- Finalmente ao Professor Miguel Bettencourt Mateus, decano da Faculdade de Medicina da UAN pelo apoio financeiro e institucional, para as despesas de viagens a congressos ligadas ao Doutoramento.

SUMÁRIO

A malária causada por *Plasmodium falciparum* é a maior causa de morbidade e mortalidade materna e infantil na África subsahariana. O objectivo desta tese foi caracterizar factores do parasita e do hospedeiro que são determinantes para o desenvolvimento das manifestações patológicas da malária placentária em Luanda. Os objectivos específicos foram: 1. Determinar a prevalência da infecção por *P. falciparum* e caracterizar os factores de risco de malária em mulheres grávidas que recorrem à consulta pré-natal; 2. Determinar a prevalência da infecção placentária por *P. falciparum*. 3. Caracterizar os factores socioeconómicos e avaliar a eventual existência de associações com malária placentária, baixo peso à nascença, anemia, prematuridade, risco acrescido de mortalidade para o recém-nascido, malária congénita e paridade. 4. Caracterizar genotipicamente os parasitas na placenta, sangue periférico da mãe e sangue do cordão.

Métodos: (I) De Abril a Setembro 2008, 679 mulheres grávidas que acorreram à consulta pré-natal foram envolvidas no estudo após consentimento informado. O perfil sócio-demográfico, história de malária e obstétrica foram investigados através de um questionário. O diagnóstico foi efectuado por microscopia óptica e as concentrações da hemoglobina foram determinadas pelo método do ácido hemático segundo Sahli *et al.*, (1984), usando hemoglobímetro (HaemoCue, Switzerland) a todas as mulheres recrutadas. Foi analisada a associação entre a idade, paridade, tempo de gestação, residência, escolaridade, malária durante a gravidez, anemia e tratamento com a infecção por *P. falciparum*. (II) O estudo envolveu 866 mulheres grávidas, em trabalho de parto nas Maternidades Lucrecia Paím e Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula, de Abril 2006 a Fevereiro 2008. As mulheres só participaram no estudo após consentimento informado. Foi efectuado um questionário a todas as parturientes. *P. falciparum* foi diagnosticado por PCR, em três compartimentos: sangue periférico da mãe, do cordão umbilical e da placenta. Foi analisada a associação entre a idade, paridade, tempo de gestação, residência, escolaridade e malária durante a gravidez com a infecção por *P. falciparum* nos três compartimentos. (III) As amostras de 143 grávidas positivas por PCR para *P. falciparum*, em pelo menos um dos compartimentos, foram genotipadas utilizando microssatélites.

Resultados: (I) Das 679 mulheres estudadas, a média de idade foi 25,7 anos. No momento do estudo 10,9% mulheres estavam infectadas com *P. falciparum* no sangue

periférico. O valor médio de hemoglobina foi $11,1 \pm 0,07$ g/dL, encontrou-se uma associação significativa entre a história de malária na gravidez e a anemia com a infecção actual por *P. falciparum*. **(II)** A média de idade das mulheres estudadas foi 24,1 anos, sendo 39,6% primigestas e 60,4% multigestas. No momento da pesquisa estavam infectadas por *P. falciparum* 15,6% e 12% destas tinham parasitas detectados em todos os compartimentos, sendo 47% na placenta, 8% no sangue periférico e 6% no cordão umbilical. **(III)** Os nove *loci* estudados revelaram-se altamente polimórficos, o número médio de alelos variou de 9,2 no cordão umbilical, 11 no sangue periférico, a 14,2 na placenta. O número efectivo de alelos foi geralmente menor no sangue do cordão umbilical. O número efectivo de alelos foi menor do que o número de alelos, indicando que muitos alelos têm baixa frequência ou são raros. A multiplicidade de infecção foi ligeiramente superior na placenta.

Conclusões: **(I)** Os resultados sugerem que a história de malária anterior na gravidez é um factor de risco para uma infecção actual e que a anemia foi uma complicação importante associada à malária, mesmo em mulheres que receberam tratamento durante a gravidez com sulfadoxina-pirimetamina. **(II)** A prevalência da malária placentária é maior do que a do sangue periférico. A presença de parasitas no sangue do cordão sugere malária congénita. **(III)** A comparação da frequência alélica no cordão umbilical, placenta e sangue periférico indica que não existem diferenças entre as subpopulações.

ABSTRACT

In sub-Saharan Africa, malaria in pregnancy remains a major cause of maternal and child morbidity and mortality. The aim of the present thesis was to characterize parasite and host factors that determine the development of pathological manifestations of placental malaria in Luanda, Angola. The specific objectives were: 1. To determine the prevalence of *Plasmodium falciparum* infection and to characterise possible risk factors in pregnant women attending antenatal care. 2. To determine the prevalence of placental infection by *P. falciparum*. 3. To characterise the socio-economic factors and evaluate the possible association of placental malaria with low birth weight, anemia, prematurity, increased risk of mortality for the newborn, congenital malaria and parity. 4. To characterise genotypically the parasites in the placenta, mother peripheral blood and cord blood.

Methods: (I) From April to September 2008, 679 pregnant women who attended the antenatal care clinics were involved in the study after informed consent. The social demographic profile and obstetric history of malaria were investigated through a questionnaire. The diagnosis was made by optical microscopy. The hemoglobin concentration in the peripheral blood was determined. The effect of age, parity, gestational age, residence, education, malaria during pregnancy, anemia and treatment on *P. falciparum* infection was investigated. (II) The study involved 866 women when they presented for delivery at the Augusto Ngangula and Lucrecia Paim maternities between April 2006 and February 2008. After informed consent was given a questionnaire was used to record social, demographic and clinical information. *P. falciparum* was diagnosed by PCR in the 3 compartments: peripheral, placental and cord blood. The association between age, parity, gestational age, residence, education, malaria in pregnancy with the infection by *P. falciparum* in the three compartments was investigated. (III) Microsatellites were used to genotype *P. falciparum* from peripheral, placental and umbilical cord blood from 143 pregnant women who were infected at least in one of the 3 compartments.

Results: (I) Of the 679 women studied, the average age was 25.7 years. At the time of study 10.9% women were infected with *P. falciparum* in peripheral blood. Present *P. falciparum* infection showed significant association with history of malaria in pregnancy and with anemia at the time of observation. (II) The average women age was 24.1 years, 39.6% were primiparous and 60.4% were multiparous *P. falciparum*

infection was detected in 15.6% of the women. Twelve per cent had parasites detected in all compartments, 47% in the placenta, 8% in peripheral blood and 6% in the umbilical cord. (III) The 9 loci studied were highly polymorphic, the mean number of alleles ranged from 9.2 in the umbilical cord, 11 in peripheral blood, to 14.2 in the placenta. The effective number of alleles was generally lower in cord blood. The effective number of alleles was lower than the number of alleles, indicating that many alleles have low frequency or are rare. The multiplicity of infection was slightly higher in the placenta

Conclusions: (I) The results suggest that the previous history of malaria in pregnancy is a risk factor for a current infection and anemia was a major complication associated with malaria, even in women who received treatment with sulfadoxine-pyrimethamine during pregnancy. (II) The placental malaria prevalence is higher than the peripheral blood. The presence of parasites in cord blood suggests congenital malaria. (III) A comparison of allele frequencies in the umbilical cord, placenta and peripheral blood indicates that there are no differences between populations of samples.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARO – Alto Risco Obstétrico

AU - Altura Uterina

CIDR - cysteine-rich inter domain region

CMI - cell-mediated immune

CPN – Consulta Pré-Natal

CSA - Sulfato de Condroitina A

CSP - Proteína Circum-Sporozoítica

CU – Cordão Umbilical

DBL, Duffy binding-like;

DL - Desequilíbrio de *Linkage*

DNA – Ácido Desoxirribo Nucleico

DPP - Data Provável do Parto

DUM - Data da Última Menstruação

EP – Eritrócitos Parasitados

GAG - glycosaminoglycan;

GLURP - Proteína Rica em Glutamato

GLUT1 - Glucose Transporter 1

HA - hyaluronic acid;

Hb – Hemoglobina

He - heterozigotia esperada

HGEAN – Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula

HS - Sulfato de Heparana

IC – Intervalo de Confiança 95%

ICAM-1 – intercellular adhesion molecule-1

IG - Idade Gestacional

IL-10 Interleukin-10

INE – Instituto Nacional de Estatística

mAb - monoclonal antibody;

MICS - Inquérito de Indicadores Múltiplos da UNICEF

MOI - Multiplicidade de Infecção (*multiplicity of infection*)

MSP-1 – Proteína 1 da Superfície do Merozoito

MSP-2 – Proteína 2 da Superfície do Merozoito

MVS - Membrana vasculo-sincicial

Na - Número de alelos

OMS - Organização Mundial da Saúde

OR - Odds Ratio

PAM - Pregnancy-associated malária

PCR – Polimerase Chain Reaction

PECAM-1 – Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1

PfEMP1 - Proteína 1 da membrana do eritrócito de *P. falciparum*

PL – Placentário

PPT – Parto Pré-Termo

Ra - Número efectivo de alelos

RCIU – Restrição do Crescimento Intra Uterino

RDC – República Democrática do Congo

RSP - Ring-stage surface protein

SP - Sangue Periférico Materno

ssrRNA - Genes da subunidade menor do RNA ribossomal

sVEGFR1- soluble vascular endothelial growth factor receptor 1

TGF - Tissue growth factor

TH1 - Type 1 helper T-cell

TH2 - Type 2 helper T-cell

TIP – Tratamento Intermitente Preventivo

USAID – Agência Americana para o Desenvolvimento Internacional

VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule-1

VEGF- vascular endothelial growth factor

VIH – Vírus de Imunodeficiência Humana

WHO -World Health Organization

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	vii
SUMÁRIO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
ÍNDICE GERAL.....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
ÍNDICE DE TABELAS	xxi
I- INTRODUÇÃO	1
I.1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	4
I.1.1. Factores de Virulência de <i>Plasmodium falciparum</i>	5
I.2. Distribuição Geográfica da Malária	8
I.2.1. A Situação da Saúde em Angola.....	9
I.2.2. Malária em Angola.....	10
I.3. Malária na Gravidez.....	12
I.3.1 Anemia Materna e Malária.....	12
I.3.2. Malária Placentária	14
I.3.3. Malária Periférica e Malária Placentária	16
I.3.4. Idade Materna e Malária	17
I.4. Paridade e Malária Placentária.....	17
I.5. Patogénese da Malária Placentária	19
I.6. Citoaderência na Placenta	21
I.7. Anticorpos Anti-adesão	25
I.8. Vacinação e Malária Placentária.....	25
I.9. Restrição de Crescimento Intra-Uterino e Parto Pré-termo devida à Malária	26
I.9.1. Susceptibilidade Materna Depois do Parto	28
I.10. Malária Placentária e o Recém-Nascido	28
I.11. Morbilidade e Sobrevivência Infantil.....	29
I.11.1. Transferência Placentária dos Anticorpos Maternos.....	30
I.11.2. Transferência dos Nutrientes Placentários	30
II. OBJECTIVOS.....	33
II. 1 – Objectivos Gerais	35
II. 2 – Objectivos Específicos.....	35
III. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO E ÁREA DE ESTUDO	37
IV – ASPECTOS ÉTICOS.....	45
V. PREVALÊNCIA E FACTORES DE RISCO PARA INFECÇÃO POR PLASMODIUM FALCIPARUM EM MULHERES GRÁVIDAS EM CONSULTAS PRÉ-NATAL EM LUANDA	49
V.1 – Introdução	49
V.2- Pacientes, Materiais e Métodos.....	51
V.2.1- Local de Estudo e Participantes	51
V.2.2 - Colheita de Dados	51
V.2.3 - Colheita de Sangue e Diagnóstico de Malária.....	51
V.2.4 – Determinação da Hemoglobina	52

V.2.5- Análise Estatística dos Dados	52
V.3 - Resultados	53
V.3.1- Estudo da População.....	53
V.3.2 - Parasitologia e Hematologia	54
V.4- Discussão	62
V.5- Conclusões.....	63
VI. CARACTERIZAÇÃO DA MALÁRIA PLACENTÁRIA POR <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> EM LUANDA – ANGOLA.....	65
VI.1 – Introdução.....	67
VI.2 – Pacientes, Materiais e Métodos.....	68
VI.2.1. Área e População de Estudo	68
VI.2.2 – Colheita dos Dados	68
VI.2.3- Avaliação do Recém-Nascido	69
VI.2.4. Colheita de Sangue e Diagnóstico de Malária	70
VI.2.5- Análise dos Dados Estatísticos	71
VI.3. Resultados.....	72
VI.3.1. Malária e Gravidez	72
VI.3.2 – Detecção e Prevalência da Infecção por <i>P. falciparum</i>	73
VI.3.3 – Factores de Risco para a Infecção por <i>Plasmodium</i> na Altura do Parto	75
VI.4 – Discussão.....	82
VI.5 – Conclusões	86
VII. GENOTIPAGEM DE PLASMODIUM FALCIPARUM EM MULHERES COM INFECÇÃO PLACENTÁRIA EM LUANDA.....	87
VII.1. Introdução.....	89
VII.2 – Pacientes, Materiais e Métodos.....	90
VII.2.1. Área e População de Estudo	90
VII.2.2. Amplificação de DNA.....	90
VII. 2.3. Genotipagem de Microssatélites.....	91
VII.2.4. Multiplicidade de Infecções	92
VII.2.5. Diversidade Genética	93
VII.2.6. O Desequilíbrio de Linkage	93
VII.3. Resultados.....	93
VII.3.1. Diversidade Genética	94
VII.3.2. Desequilíbrio de <i>linkage</i>	100
VII.4. Discussão	100
VII.5. Conclusões	102
IX – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	103
X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
ANEXOS.....	129
Anexo 1- Desequilíbrio de <i>linkage</i> (por população).....	131
Anexo 2- Desequilíbrio de <i>linkage</i> (todas as populações).....	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – O ciclo de vida de <i>P.falciparum</i>	5
Figura 2: Mecanismos de sequestro envolvidos na malária por <i>P.falciparum</i>	6
Figura 3- Aspectos essenciais da composição molecular dos “knobs” de <i>P. falciparum</i> e as suas interações com o endotélio vascular.....	7
Figura 4 - Distribuição geográfica da malária 2006.	8
Figura 5 - Representação esquemática dos eventos de citoaderências dos eritrócitos infectados por <i>P. falciparum</i> na placenta in vivo e ex vivo.	22
Figura 6 – Possíveis mecanismos pelos quais o sequestro placentário dos eritrócitos infectados pode activar monócitos e outras células para provocar alterações na função placentária que resulta em RCIU.....	27
Figura 7 - Estimativa da População de Luanda.	39
Figura 8. Distribuição dos casos de malária em mulheres que acorreram ao HGEAN em função do tempo.	56
Figura 9 - Valores de hemoglobina sérica em mulheres grávidas com e sem malária.....	57
Figura 10. Valores de hemoglobina sérica em função da paridade.....	58
Figura 11. Valores de hemoglobina sérica em mulheres grávidas com ou sem tratamento anti-malárico.	59
Figura 12. Valores de hemoglobina sérica em mulheres grávidas em função do tratamento e malária.	60
Figura 13 – Prevalência da infecção por <i>P. falciparum</i> em função dos meses do ano.....	74
Figura 14 – Prevalência da infecção por <i>Plasmodium</i>	74
Figura 15 – Distribuição da infecção por <i>P. falciparum</i> em função do tipo de amostra	75
Figura 16 – Relação da infecção no sangue periférico e escolaridade	79
Figura 17 – Relação da morte intrauterina e malária placentária	81
Figura 18 – Distribuição da morte intrauterina segundo o grupo etário.....	81
Figura 19 – Número de amostras analisadas nos diferentes compartimentos..	94

Figura 20 – Amplificação dos loci de microsatélites de <i>P. falciparum</i> para o clone K1.....	97
Figura 21 – Frequência alélica dos nove loci estudados	98
Figura 22 – Infecções múltiplas por locus	99
Figura 23 – Multiplicidade de infecção (MOI) em grávidas infectadas com <i>P. falciparum</i>	99

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Precipitação e temperaturas mensais em Luanda.....	40
Tabela 2 - Perfis demográfico e obstétrico das participantes no estudo (n=679)	54
Tabela 3 – Taxa de infecção por Plasmodium falciparum em mulheres que acorreram ao HGEAN	55
Tabela 4 – Concentração sérica de hemoglobina nas mulheres grávidas com e sem malária que ocorreram ao HGEAN	56
Tabela 5 – Anemia entre as mulheres grávidas com e sem malária que ocorreram ao HGEAN.....	57
Tabela 6 – Anemia entre as mulheres em função do tempo de gestação e tratamento	58
Tabela 7 – Odds ratio entre as diferentes variáveis e o risco de a mulher grávida estar com malária	61
Tabela 8 – Passo 5 do método de Backward/Wald entre as diferentes variáveis e o risco de a mulher grávida estar com malária	61
Tabela 9 – Características das mulheres grávidas incluídas neste estudo	73
Tabela 10 - OR ajustado entre variáveis de risco potencial e os diferentes tipos de malária.....	77
Tabela 11 – Número de alelos, (Na), heterozigotia esperada (He) e número efectivo de alelos (Ra) por locus, na placenta, sangue periférico e sangue do cordão umbilical	95
Tabela 12 – A dimensão dos alelos identificada na placenta, sangue periférico e cordão umbilical.	95
Tabela 13- Valores de diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações estudadas.....	100

I- INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa, causada por protozoários unicelulares, do género *Plasmodium*. São parasitas pertencentes à Ordem *Coccidiida*, Sub-Ordem *Haemosporidiidea*, Família *Plasmodiidae*, Género *Plasmodium*. Existem cinco espécies geralmente reconhecidas como agentes etiológicos da malária humana e causam padrões distintos da doença: *Plasmodium malariae* (Laveran, 1880) *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) e *Plasmodium knowlesi* (Chin *et al.*, 1968 e Marcelo *et al.*, 2003). De todas as espécies, *P. falciparum* é a mais patogénica e predomina nas áreas endémicas da África, sendo a espécie encontrada em 80-90% das infecções, podendo levar à morte por, entre outras, anemia e malária cerebral. Do ponto de vista clínico, a distinção mais importante entre *P. falciparum* e as demais espécies está na sua capacidade de produzir uma doença potencialmente mais grave e de desenvolver rapidamente resistência a diversos antimaláricos de uso corrente (Marcelo, 2003). Estima-se a ocorrência anual de 300 a 500 milhões de casos em todo o mundo, com cerca de 1 milhão de óbitos, dos quais mais de 90% se registam nos países em desenvolvimento da África Subsaariana (Steketee *et al.*, 2001). A malária durante a gravidez apresenta um risco substancial para a mãe, feto e recém-nascido, sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade materna e fetal a nível mundial. Na mulher grávida com malária são comuns: abortos, nados mortos, partos prematuros, anemia materna, baixo peso à nascença (Guyatt, *et al.*, 2004) e hemorragia pós parto, que é a principal causa de morte obstétrica directa em países endémicos (Dorman, *et al.*, 2000 e Uddenfeldt *et al.*, 2006).

A malária placentária é considerada uma complicação da malária na gravidez nas áreas de transmissão estável e é particularmente frequente e grave nas primigestas (Matteelli *et al.*, 1997). A África Subsaariana é a região do mundo de maior impacto da malária na gravidez (Riley *et al.*, 1989) onde se estima que ocorram, por ano, 400.000 casos de anemia materna grave, 75.000-200.000 mortes perinatais e 10.000 mortes maternas. A exposição anual de quase 50 milhões de grávidas à malária torna-a na infecção parasitária mais comum e recorrente que, directamente, afecta a placenta (Brabin, 2004). Curiosamente, pode haver parasitas sequestrados na placenta sem que os haja no sangue periférico (Beeson *et al.*, 2002). A malária placentária é muitas vezes

assintomática e com frequência, subvalorizada como problema de saúde pública por clínicos que tratam problemas individuais. Nas zonas urbanas africanas o impacto da malária placentária está pouco documentado (Demba Sarr *et al.*, 2006). Em Luanda, Angola, são escassos os estudos que se debruçam sobre a malária urbana (Thwing *et al.*, 2009), daí a pertinência de um estudo biomolecular de malária placentária numa área urbana de Luanda.

I.1. Ciclo de vida de *Plasmodium*

Pode considerar-se como início do ciclo de vida de *Plasmodium*, a reprodução assexuada do parasita no estágio eritrocítico (Krogstad, 2005). Durante a fase eritrocitária assexuada, os parasitas evoluem de anéis a trofozoitos e, por fim, a esquizontes. Estes ocasionam o rompimento das hemácias, sendo libertados merozoitos que penetram em novas hemácias onde se repete a fase assexuada. Alguns parasitas eritrocíticos evoluem para as formas sexuadas (gametócitos), que são ingeridas pelas fêmeas do mosquito anofelino. No intestino médio do anofelino, que é o hospedeiro definitivo, as formas masculina e feminina dos gametócitos transformam-se em gâmetas, fundindo-se para formar o zigoto, que se desenvolve num oocineto. Este atravessa o epitélio do intestino médio e aloja-se na lâmina basal onde forma o oocisto. Dentro deste, o parasita multiplica-se formando milhares de esporozoitos, que quando maduros são libertados para o hemocélio e se dirigem para as glândulas salivares (Fig.1). Quando um mosquito infectado pica um ser humano, os esporozoitos são transportados até ao fígado, onde invadem os hepatócitos e evoluem para a forma de esquizontes hepáticos. Estes libertam merozoitos, que são capazes de infectar as hemácias e iniciar a fase sexuada eritrocitária. Duas das cinco espécies patogénicas ao ser humano (*P. vivax* e *P. ovale*) apresentam formas latentes (hipnozoitos) que se alojam no fígado. No geral, entre dois a 11 meses após a infecção inicial, os hipnozoitos podem evoluir e ocasionar uma recaída da malária.

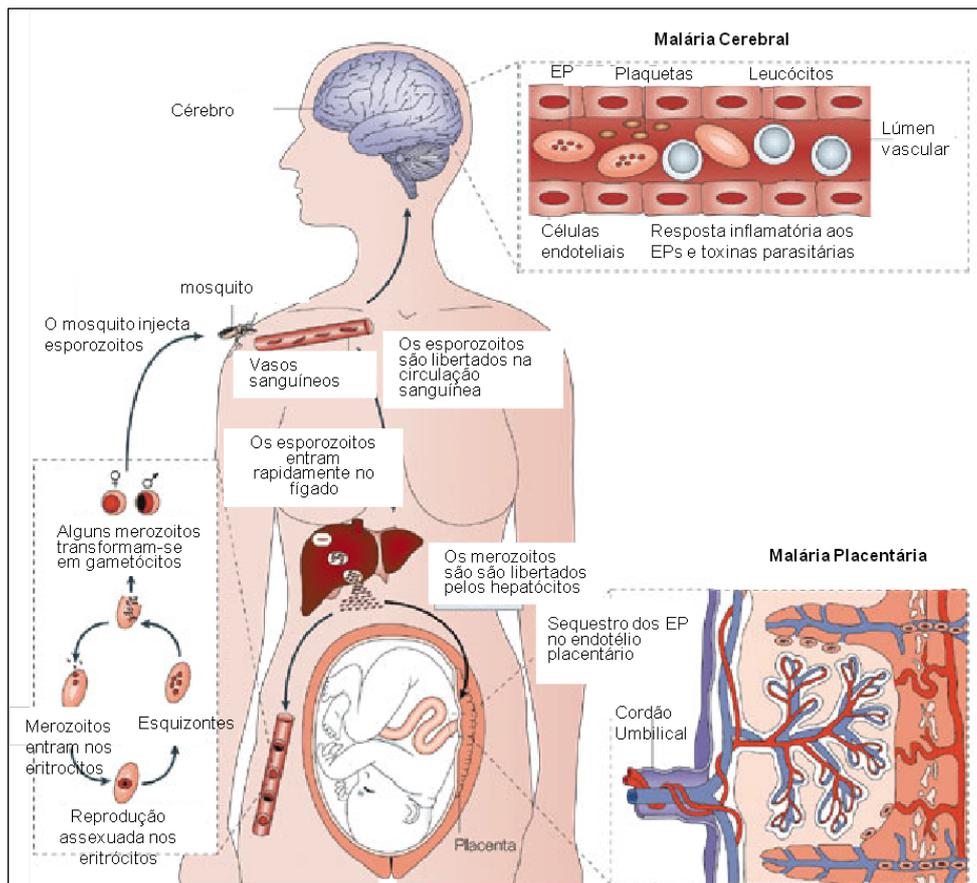


Figura 1 – O ciclo de vida de *P.falciparum*. (Adaptado de Louis Schofield and Georges E. Grau, 2005). Os mosquitos inoculam uma pequena quantidade de esporozoítos de *P.falciparum* na corrente sanguínea. Em poucos minutos são levados para o fígado, onde invadem e se replicam nos hepatócitos. Dez a 12 dias mais tarde, milhares de merozoítos são libertados na corrente sanguínea, onde invadem novos eritrócitos. Os parasitas circulam na corrente sanguínea dentro dos glóbulos vermelhos e enquanto se desenvolvem expressam à superfície dos eritrócitos moléculas de adesão – tais como a proteína 1 da membrana do eritrócito de *P. falciparum* (PfEMP1). Estas proteínas permitem aos parasitas ligarem-se aos receptores expressos pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos das redes vasculares profundas dos órgãos como o cérebro, pulmões e placenta. Depois de 48 horas os eritrócitos parasitados (EP) rompem e libertam mais merozoítos, perpetuando assim o ciclo eritrocitário. A presença do parasita e a invasão dos eritrócitos podem não ser suficientes para provocar a doença; entretanto, a libertação de moléculas bioactivas do parasita e uma resposta imune do hospedeiro inapropriadamente regulada podem ser as principais causas da patogénese fatal, que ocorre numa minoria de doentes. Alguns merozoítos diferenciam-se em gametócitos, que, quando ingeridos pelo mosquito durante a sua refeição sanguínea, perpetuam o ciclo sexual no insecto.

I.1.1. Factores de Virulência de *Plasmodium falciparum*.

As duas características de *P. falciparum* que estão associadas à maior virulência desta espécie são: a produção de grande número de merozoítos no final da esquizogonia hepática e a capacidade desses merozoítos invadirem eritrócitos em diferentes graus de maturação (Wahlgren *et al.*, 1999). Para além disso, o principal factor de virulência de

P. falciparum está na propriedade da adesão ao endotélio dos pequenos vasos sanguíneos, particularmente de vénulas pós capilares (fenómeno conhecido como citoaderência), bem como de adesão a eritrócitos parasitados (auto-aglutinação) ou não parasitados (formando estruturas conhecidas como rosetas) (Wahlgren *et al.*, 1999) (Fig.2).

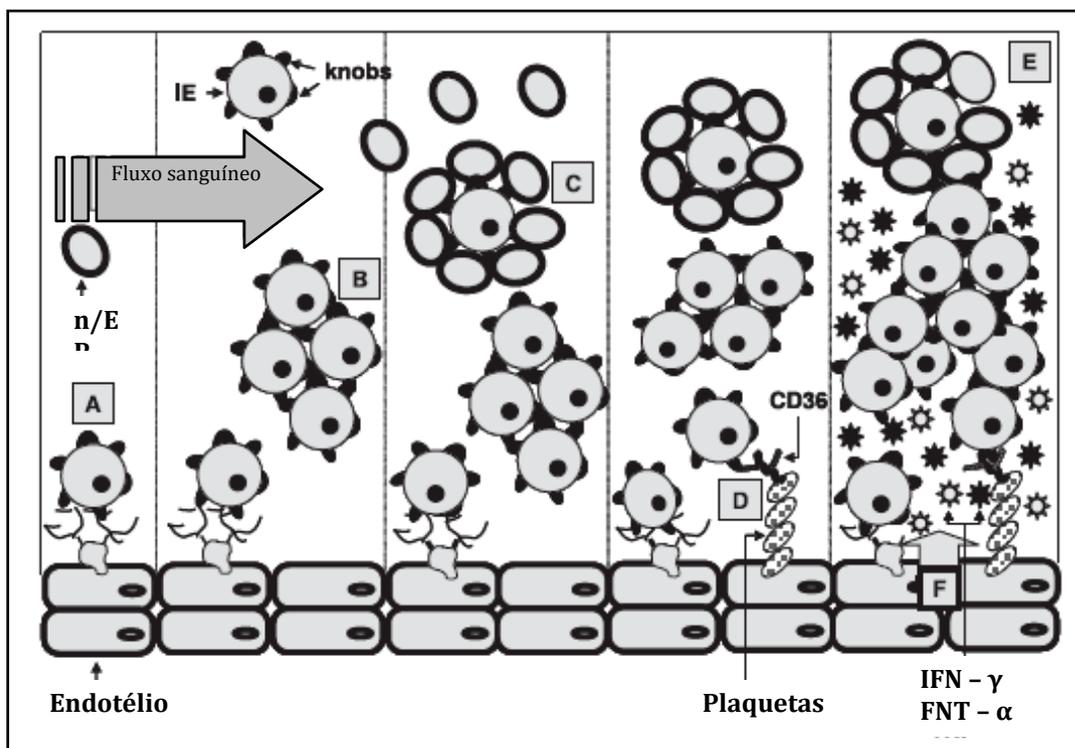


Figura 2: Mecanismos de sequestro envolvidos na malária por *P.falciparum* (Adaptado de Costa *et al.*, 2006). Os eritrócitos parasitados (EP) aderem directamente aos diferentes receptores sobre o endotélio do hospedeiro através de estruturas denominadas “knobs” (A), aos outros EP por auto-aglutinação (B), aos eritrócitos não parasitados, formando rosetas (C), e às plaquetas que actuam como uma ponte na citoaderência dos EP através dos receptores CD36 (D). Todos estes fenómenos parecem contribuir para a obstrução do fluxo sanguíneo e produção de citocinas inflamatórias, FNT- α e IFN- γ (F); levando assim a resultados clínicos deletérios que se observam na malária grave.

Os fenómenos de citoaderência e formação de rosetas estão ligados à produção, pelos estadios sanguíneos de *P. falciparum*, de moléculas que são exportadas para a membrana dos EP, formando protuberâncias na sua superfície conhecidas como “knobs” (Fig. 3). A principal molécula do parasita envolvido na aderência a receptores endoteliais é uma proteína variável de alta massa molecular conhecida como PfEMP-1 (proteína 1 da membrana do eritrócito de *P. falciparum*) que é codificada pela família de genes *var*. Esses genes estão presentes, em múltiplas cópias, predominantemente nas regiões subteloméricas de diferentes cromossomas do parasita. A PfEMP-1 pode ligar-

se a diversos receptores presentes no endotélio vascular, tais como moléculas sulfatadas, como o sulfato de condroitina A (CSA) ou sulfato de heparana (HS), a CD36 e outras moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1. Não se identificaram moléculas com propriedades de citoaderência nas demais espécies de plasmódios humanos.

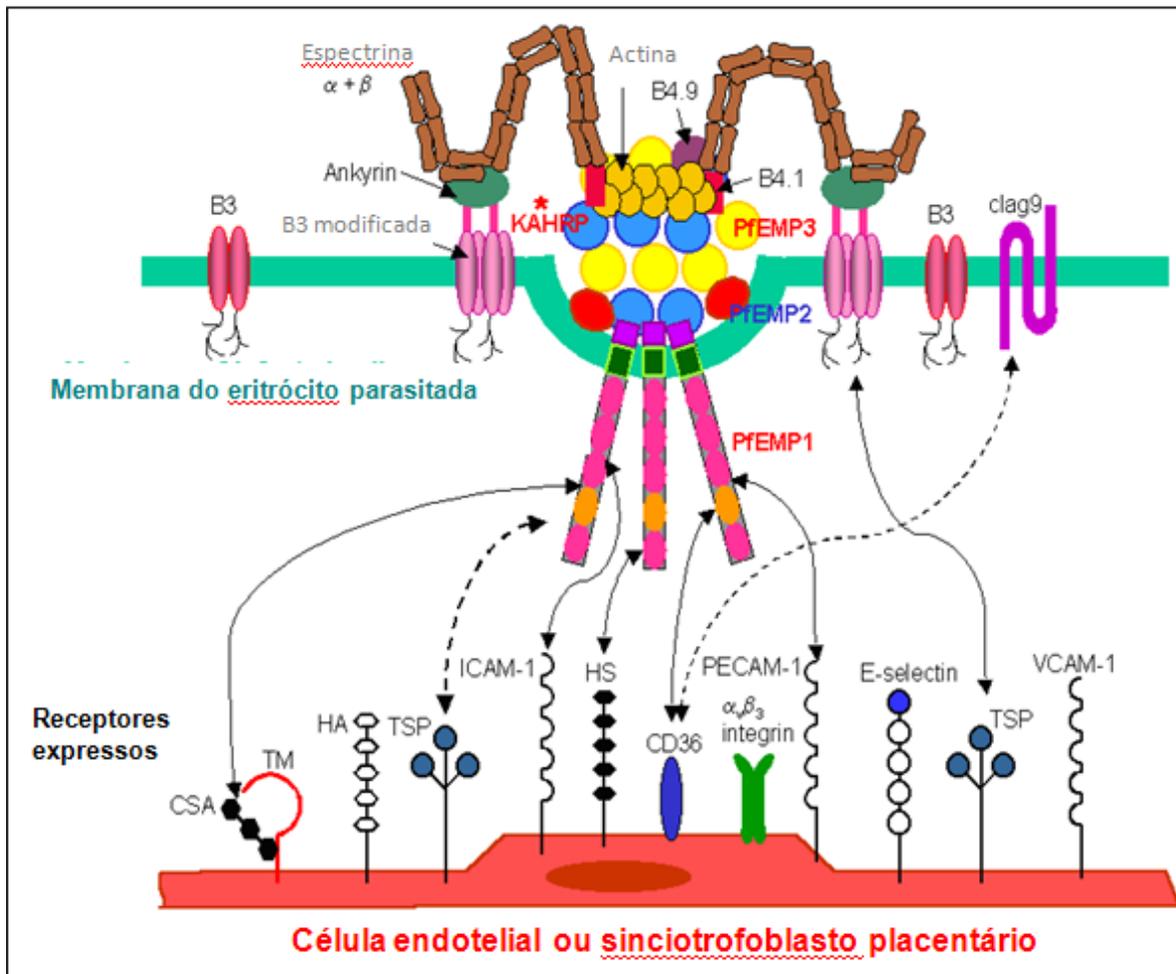


Figura 3- Aspectos essenciais da composição molecular dos “knobs” de *P. falciparum* e as suas interações com o endotélio vascular. São representados os antígenos de membrana da hemácia infectada e receptores expressos pelas células endoteliais. Adaptado de Cooke, et al., (2000).

As consequências fisiopatológicas dos fenômenos de citoaderência e da formação de rosetas e as suas relações com a malária grave são discutidas intensamente. Existem duas hipóteses principais. A primeira enfatiza que as hemácias parasitadas aderidas ao endotélio e aquelas que formam rosetas são responsáveis pela obstrução de pequenos vasos, com consequente hipoxia tecidual (Wahlgren *et al.*, 1999). A segunda enfatiza o papel deletério das citocinas pró-inflamatórias, cuja produção seria

estimulada por moléculas do parasita, libertadas localmente no final da esquizogonia eritrocitária (Clark e Schofield, 2000). A expressão de “várias” moléculas de adesão que servem de receptor para PfEMP-1, no endotélio vascular, é estimulada por citocinas pró-inflamatórias, especialmente pelo factor alfa de necrose tumoral (TNF- α). É importante ressaltar que muitas das complicações clínicas que caracterizam a malária grave por *P. falciparum*, e que muito raramente acontecem em infecções pelos demais plasmódios humanos, são consequências directas ou indirectas dos fenómenos de citoaderência.

I.2. Distribuição Geográfica da Malária

Segundo dados da OMS referentes a 2008, cerca de 2,2 bilhões de pessoas, equivalendo 42% da população mundial, vivem em áreas, onde há risco de transmissão da malária, abrangendo cerca de 103 países (Fig. 4).

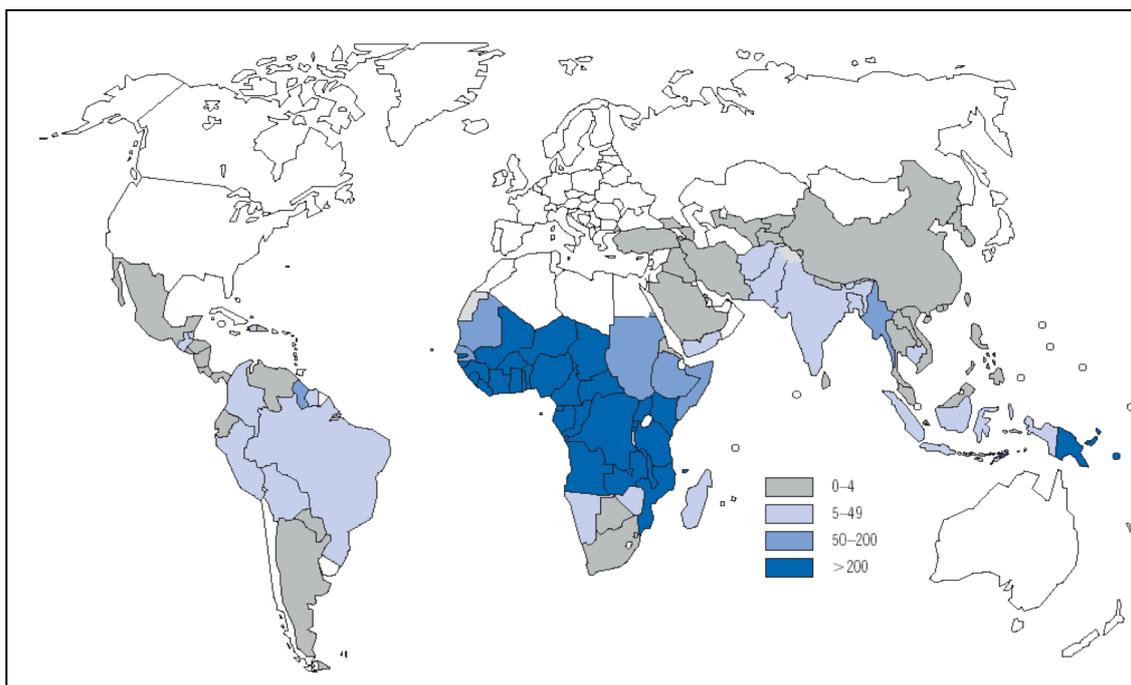


Figura 4 - Distribuição geográfica da malária 2006. (World Malaria Report 2008)

A incidência nos países tropicais da Ásia, América Latina e Caribe é mais elevada em áreas de fronteira de desenvolvimento económico, de conflito armado, de comércio ilegal de mercadorias e de movimentos migratórios de trabalhadores ou de

refugiados. São áreas de população instável, em condições precárias de habitação e de trabalho. A malária predomina ainda em países endémicos que nunca chegaram a desenvolver programas nacionais de controlo da doença, como é o caso da maioria dos países africanos situados a sul do Sahara. Assim, compreende-se que o registo de casos e de óbitos de malária seja bastante inferior à realidade epidemiológica. Os casos de malária grave estão associados à infecção por *P. falciparum*, e estima-se que ocorram de 1,5 a 2,7 milhões de óbitos por ano, sendo a grande maioria em África (Steketee *et al.*, 2001). Neste Continente as crianças menores de cinco anos, gestantes, pessoas não imunes recém chegadas a áreas endémicas, como trabalhadores rurais, garimpeiros e colonizadores compõem os grupos de maior risco de falecerem pela doença, principalmente em locais remotos, onde o diagnóstico e tratamento apropriados não estão suficientemente disponíveis (Guyatt *et al.*, 2001). Residentes de áreas não-endémicas, viajando para áreas endémicas por trabalho ou por lazer, podem desenvolver formas graves de malária, incluindo morte, se o diagnóstico e o tratamento correctos não forem realizados precocemente (Tauil, 2005).

1.2.1. A Situação da Saúde em Angola

A República de Angola situa-se na Costa do Atlântico Sul da África Ocidental e é um dos maiores países do Continente; possui uma extensão geográfica de 481.350 milhas quadradas, aproximadamente 1.246.700 Km² e uma população crescente estimada em 17 milhões de habitantes, dos quais 44% têm menos de 14 anos de idade e 57% são urbanos segundo estimativas da CIA World Factbook (2009), Embassy of Republic of Angola, (2007) e Angolan Health System (2010). O país é multicultural e multilinguístico. Falam-se mais de 18 línguas nacionais, mas o Português é falado pela maioria da população e coexistem a modernidade e as formas ancestrais de vida. Política e administrativamente, Angola está dividida em 18 províncias, 164 municípios e 557 comunas. Os indicadores de saúde de Angola são alguns dos piores da África subsahariana (Ministry of Planning of Republic of Angola, 2003 e UNICEF, 2008). A taxa de crescimento de Angola estima-se actualmente em 2,8%, devido a uma taxa de natalidade muito elevada (43,1 nascimentos por cada 1.000 indivíduos) segundo os Inquéritos de Indicadores de Malária (IIMA 2006-07; http://www.usaid.gov/ao/mis_pt.pdf, acessado em 2008). A fertilidade total é estimada em 7,2 partos por mulher, e a esperança média de vida é de 40 anos. A malária é

considerada a causa principal de mortalidade e morbidade no país, com um total de 3,25 milhões de casos e 38.000 mortes devidas à malária relatadas em 2003 (USAID, 2005). Um pequeno número de doenças, nomeadamente a malária, doenças diarreicas agudas, infecções respiratórias agudas, sarampo, tétano neonatal, é directamente responsável por 60% das mortes de crianças, apesar de serem relativamente fáceis de prevenir ou tratar ao nível dos Cuidados Primários de Saúde (Ministry of Health, 2004b). A malnutrição é a principal causa associada à mortalidade de menores de cinco anos. A taxa de mortalidade materna foi estimada entre 900 e 1.300 mortes maternas por 100.000 nados vivos, que era 12 vezes mais alta do que noutros países em vias de desenvolvimento (Ministry of Planning and UNICEF, 2003 e MICS, 2001); em 2010 a taxa de mortalidade materna estimada pela OMS era de 660/100,000 Nados Vivos. A prevalência nacional do uso de contraceptivos é estimada como sendo apenas de 6% entre as mulheres de 15-49, que são casadas ou em comunhão de facto (Ministry of Planning and UNICEF, 2003). A prevalência contraceptiva mais alta (17%) foi encontrada em três municípios de Luanda (Management Sciences for Health and Consaúde, 2002). Estes indicadores de saúde reflectem uma série de factores contribuintes, tais como a falta de acesso aos serviços de saúde, água, meios de depósito dos dejectos, higiene pessoal e alimentar, segurança alimentar, lar, salário, conhecimento dos cuidados de saúde, práticas na comunidade e lares. Os problemas da saúde ambiental são significativos. O inquérito de Indicadores Múltiplos do UNICEF (MICS) 2001, calcula que apenas 62% da população tem acesso a água potável, e 59% utiliza instalações sanitárias apropriadas. De acordo com estes indicadores (MICS) 56% das crianças em idade escolar frequentam o ensino primário; 67% da população com 15 anos ou acima são alfabetizados (capazes de ler uma carta ou jornal), decrescendo para 54% entre as mulheres. A taxa de mortalidade infantil é de 150 mortes por 1.000 nados vivos e a mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade é de 220 por 1.000 nados vivos (INE/UNICEF, 2008).

I.2.2. Malária em Angola

A malária é um grande problema de saúde pública em Angola (IIMA 2006-07). A malária é a principal causa de morbidade e mortalidade, sendo endémica em toda a extensão territorial, com diferentes graus de endemicidade. Em 2004, Angola notificou 3,2 milhões de casos de malária, dois terços dos quais em crianças menores de cinco

anos de idade. Aproximadamente 38.000 mortes por malária foram relatadas em 2004. Estima-se que a malária seja responsável por 35% das mortes e 60% dos internamentos de crianças menores de cinco anos de idade e 10% dos internamentos de mulheres grávidas (President's Malaria Initiative Needs Assessment, Angola, 2005). Na cidade de Luanda, esta situação é agravada por factores ligados ao contexto sócio político, com destaque para os movimentos populacionais massivos, deterioração das condições de higiene e saneamento do meio e retracção da rede sanitária nas zonas periféricas.

Todo o país é endémico, com intensidade de transmissão variável, predominando, no entanto as áreas de hiperendemia. Estão identificados vários vectores em Angola, sendo *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus* e *Anopheles melas*, os mais importantes. Nas regiões de maior transmissão (Cabinda, Malanje, Kwanza Norte, Lunda Norte e Lunda Sul) predomina *A. funestus* e *A. gambiae*, os quais apresentam maior agressividade quer em termos de picada, quer na adaptação às condições do meio ambiente. *A. melas* predomina sobretudo nas regiões litorais e tem menor agressividade. Em Angola, estão identificadas três espécies de *Plasmodium*, implicadas na transmissão da malária: *P. falciparum* (92% dos casos), *P. vivax* (7%) e *P. malariae* (1%). No entanto estudos recentes utilizando técnicas de PCR mostram, também, a existência de *P. ovale*. Considerando a heterogeneidade das características de transmissão da malária no país, existem extractos populacionais com variados índices de população infectada (Programa Nacional de Controlo da Malária, 2005). *P. falciparum* é o único capaz de produzir casos graves e complicados. *P. vivax* é responsável pelos casos de recaídas da doença, devido às suas formas hepáticas, designadas hipnozoitos.

A transmissão aumenta durante a estação de chuva, com um pico entre os meses de Janeiro e Maio. A malária, em Angola, representa a primeira causa de morte, de doença e de absentismo laboral e escolar; sendo endémica nas 18 províncias do país, apresenta a possibilidade de surtos epidémicos em algumas delas. Luanda, a capital de Angola, é considerada como mesoendémica estável. A taxa de mortalidade institucional por malária é de 53% para os menores de cinco anos, e de 32% nas grávidas. Por ordem decrescente, as taxas de mortalidade são mais elevadas, nas províncias de Benguela, Kuando Kubango, Luanda, Cabinda, Malanje, Zaire, Bié e Huíla (Programa Nacional de Controlo da Malária, 2005).

I.3. Malária na Gravidez

A malária na gravidez é um problema sério de saúde pública na África Subsaariana. Porém é frequentemente subestimada como tal e pelos clínicos que tratam de casos individuais (Christopher *et al.*, 2005). Uma em cada quatro mulheres tem evidência de infecção placentária na altura do parto (Steketee *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 2007). A malária constitui uma ameaça grave para a gravidez de qualquer mulher e é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade materna, fetal e neonatal (Bellamy, 2004). Uma mulher grávida está significativamente em maior risco de contrair malária do que aquela que não o esteja, independentemente da área geográfica em que resida (Nosten, 2004). As grávidas não-imunes têm elevado risco de desenvolver malária complicada e de perda fetal. (Luxemburger *et al.*, 2001; Shulman *et al.*, 2003). Nas mulheres grávidas são comuns, o aborto, nascidos mortos e partos pré-termos (Feresu, 2004). Para além da anemia materna causada pela malária (Shulman *et al.*, 2001) é comum o baixo peso à nascença em recém nascidos de mulheres que tiveram malária durante a gravidez e estima-se que 5% das mortes perinatais nas áreas de baixos recursos sejam causadas por este mecanismo (Guyatt, 2004). Muitas, e provavelmente a maior parte destas mortes maternas e perinatais são preveníveis (Hinderaker, 2003).

A interacção fisiopatológica entre a malária e a gravidez é complexa; quase tudo favorecendo o parasita em detrimento da mãe e do feto. Esta interacção vai desde a atractividade aumentada para o mosquito até à morbidade, que continua no período puerperal (Diagne, 2000; Lindsay, 2000). A prevalência da infecção e a densidade parasitária atingem o pico na primeira metade da gravidez e depois decrescem progressivamente até ao parto (Brabin, 1983). Estão identificados factores que influenciam a prevalência da malária nas grávidas, nomeadamente a idade materna, a paridade, uso de profilaxia, nutrição, a genética do hospedeiro, o nível de imunidade anti-parasitária, bem como a genética do parasita (Tako *et al.*, 2005).

I.3.1 Anemia Materna e Malária

A malária na gravidez é uma causa importante de anemia grave na mulher africana (Guyatt *et al.*, 2001). Na África Subsaariana, estima-se que entre 200.000 e 500.000 grávidas desenvolvam anemia grave como resultado da malária (Steketee,

2001). Das mais de 10.000 mortes maternas anuais relacionadas com a anemia na África Subsaariana o *P. falciparum* na gravidez é apontado como a primeira causa. (Shulman, 1999 e Brabin *et al.*, 2002). A anemia é considerada assim uma das consequências mais comuns da malária por *P. falciparum* é uma causa directa e indirecta importante de mortalidade materna (Uneke, 2008) e a maior consequência da malária materna nas regiões de malária endémica (Brabin *et al.*, 1990). Para além da sua contribuição significativa na morbidade materno fetal e mortalidade materna, a anemia na gravidez é um factor de risco para a anemia por deficiência de ferro do recém-nascido (Matteelli *et al.*, 1994) que, se não é corrigida, pode estar associada a um desenvolvimento adverso comportamental e cognitivo infantil (Colomer *et al.*, 1990).

Durante a gravidez, a anemia grave pode resultar em alterações circulatórias, aumentando o risco de insuficiência cardíaca, por diminuição aguda da concentração da hemoglobina (Hb) para valores de $<8\text{g/dL}$. Tais alterações podem resultar na falência dos mecanismos compensatórios, acumulação do ácido láctico e dispneia em repouso (Nokes *et al.*, 1998). Além disso, durante o trabalho de parto, as mulheres com anemia grave são menos capazes de suportar perdas sanguíneas moderadas e consequentemente, estão em maior risco de necessitarem de transfusão de sangue, (Fleming, 1989). Relativamente ao feto, a anemia materna grave pode resultar em restrição de crescimento intra-uterino (RCIU), nado morto e baixo peso à nascença (Achidi *et al.*, 2005; Brabin, 1991).

Fried *et al.*, (1998) demonstraram uma relação forte nas primigestas quenianas entre a presença de anemia materna grave e TNF-alfa. Embora os mecanismos subjacentes a essa correlação ainda não estejam esclarecidos, o TNF-alfa tem sido considerado como inibidor da eritropoiese em murganhos pela supressão da formação das células eritroides em resposta à eritropoietina (Udupa e Sharma, 1996). Dado o papel da eritropoietina, a supressão da sua produção a partir do trofoblasto humano pode contribuir para a anemia materna (Fred *et al.*, 1994; Conrad *et al.*, 1996).

A anemia devida à malária é, provavelmente, causada por uma combinação de disfunção da medula óssea e destruição dos eritrócitos parasitados e não parasitados. Na gravidez, isso é sobreposto, muitas vezes, à deficiência de micronutrientes (i.e. ferro e ácido fólico), VIH, parasitoses e inflamações crónicas (van den Broek *et al.*, 1998 e van den Broek *et al.*, 2000). A acumulação de monócitos pigmentados tem sido associada com anemia materna (Jilly, 1969 e Rogerson *et al.*, 2003), talvez porque estas células

libertem mediadores inflamatórios, tais como TNF-*alfa*, que suprimem a eritropoiese na ausência de IL-10 ou porque elas causam um stress oxidativo, alterando as membranas eritrocitárias e levando ao aumento da destruição eritrocitária (Kurtzhals *et al.*, 1998 e Becker *et al.*, 2004).

I.3.2. Malária Placentária

A placenta é um órgão importante para o óptimo crescimento e desenvolvimento do embrião e feto durante a gravidez. Ela assume as características funcionais de vários órgãos da vida extra uterina. A absorção de nutrientes, excreção dos desperdícios e transporte de gases são as principais funções da placenta, que no recém-nascido são executadas respectivamente pelos intestinos, rins e pulmões. Além disso, são de grande importância a síntese hormonal da placenta, como órgão endócrino, bem como a actividade metabólica, que será mais tarde função primária do fígado. A primeira serve para manter o estado da gravidez e a última para assegurar o fornecimento de energia para a contínua síntese dos processos de transporte activo (Netter, 1965).

A infecção placentária tem sido largamente utilizada como indicador para caracterizar a infecção na mulher grávida em investigações epidemiológicas (Uneke, 2007), partindo da convicção de que muitos dos efeitos deletérios da malária na gravidez são provavelmente devidos à malária placentária (Christopher *et al.*, 2005). Os parasitas podem ser sequestrados em grande quantidade na placenta, sem que se encontre um único no sangue periférico (Beeson, 2002). Num estudo realizado por Rogerson, (2003) em Blantyre, Malawi a sensibilidade para o diagnóstico de malária foi de 47% para os parasitas no sangue periférico, 63% no esfregaço do sangue placentário e de 91% para o exame histológico placentário). Daqui se deduz que a gota espessa negativa para a malária não exclui *ipso facto* a existência do parasita numa mulher grávida. Por outro lado Makhambo (2002) e Van der Jagt *et al.*,(2005), corroboram a ideia de que a microscopia do esfregaço sanguíneo periférico para a detecção de malária placentária tem limitações e por isso não é de todo confiável, quando se pretende excluir o diagnóstico.

A ausência de correlação entre malária placentária e a parasitemia do sangue periférico tem vindo a ser estudada desde a década de oitenta e a explicação pode ser encontrada no facto de que o exame do sangue periférico nem sempre é bastante

sensível para detectar infecções, quando os parasitas estão concentrados na placenta, sobretudo quando esse exame só se realiza durante o parto (Walter *et al.*, 1981; Watkinson, 1983; Matteelli *et al.*, 1994). Por outro lado a malária que ocorre no período gestacional precoce pode não deixar sinais de doença placentária no parto (Ruston, 1983).

A prevalência e os factores de risco da malária placentária têm sido obtidos com base em diferentes definições de malária placentária, usando técnicas diversas de colheita de amostras e análise (Uneke, 2007). Alguns estudos baseiam as suas definições na presença do parasita e/ou pigmento nas amostras de esfregaços de sangue placentário (Tako, *et al.*, 2005; Achidi *et al.*, 2005; Achidi *et al.*, 2005). Outros estudos baseiam-nas em dados histológicos (Menendez *et al.*, 2000, Ismail *et al.*, 2000, Rogerson *et al.*, 2003; Anchang-Kimbi *et al.*, 2009) e no teste rápido da *histidine-rich-protein-2* (HRP2) (Leke *et al.*, 1999; Mockenhaupt *et al.*, 2006).

A malária placentária é reconhecida como uma complicação comum da malária na gravidez em áreas de transmissão estável, e é particularmente frequente e grave em primigestas (Matteelli *et al.*, 1997). Nas áreas de transmissão instável, as mulheres grávidas são susceptíveis a todas as manifestações da malária grave por *P. falciparum* e têm duas a dez vezes maior mortalidade do que as mulheres não grávidas (Brabin, 1983; Brabin, 1991). Nas áreas de transmissão estável de malária a morbidade materna é representada principalmente pela anemia (Brabin, 1983) e o maior efeito sobre o feto é o baixo peso à nascença (Jeliffe, 1968; Gilles *et al.*, 1969; McGregor *et al.*, 1983; Watkinson, 1983; Cot *et al.*, 1992; Matteelli *et al.*, 1996; Steketee *et al.*, 1996a). Na África Subsaariana *P. falciparum* é o factor não genético mais importante que contribui para o baixo peso à nascença nas primeiras gravidezes e está associado com o aumento da mortalidade neonatal e anemia infantil (Le Cessie *et al.*, 2002 e Garner *et al.*, 2003).

Depois do primeiro relatório de Bruce-Chwatt (1952), têm surgido muitos outros estudos, demonstrando uma forte associação entre malária placentária e baixo peso à nascença (Jeliffe, 1968; McGregor *et al.*, 1983; Watkinson and Rushton, 1983; Cot *et al.*, 1992; Matteelli *et al.*, 1996; Steketee *et al.*, 1996a), embora outros factores, incluindo anemia (Brabin *et al.*, 1990), possam provavelmente contribuir para o nascimento de recém nascidos de baixo peso. A malária pode causar baixo peso à nascença por restrição de crescimento intra-uterino (RCIU), parto prematuro ou ambos.

Há, contudo, o consenso corrente de que o RCIU é o mecanismo predominante (McGregor, 1984; Steketee *et al.*, 1996a) e que está associado com malária placentária. A malária pode ainda influenciar o risco de morbidade e mortalidade infantil durante o primeiro ano de vida, induzido pelo baixo peso à nascença (Christopher *et al.*, 2005).

I.3.3. Malária Periférica e Malária Placentária

A relação entre parasitemia periférica materna e malária placentária foi avaliada em algumas partes de África Subsahariana. Não há estudos rigorosos sobre se a malária placentária reflecte a existência de malária periférica no pequeno período que precede o parto ou se está relacionada com a malária durante gravidez. Alguns estudos mostraram sim alguma relação com a malária tardia (i.e., malária adquirida durante a fase tardia da gravidez) e a positividade do esfregaço placentário ou a presença de pigmento (Watkinson, *et al.*, 1983); contudo a observação da placenta num único ponto temporal (termo) dificilmente pode reflectir a história da malária durante gravidez. A ocorrência de parasitemia periférica no princípio e no término da gravidez foi significativamente relacionada com a malária placentária e se considerou que a parasitemia periférica no meio de gravidez não o era (Cottrell *et al.*, 2005). Isto sugere que a parasitemia periférica no começo da gravidez possa persistir na placenta ao longo da gestação, com consequências possivelmente mais graves para a placenta e o recém-nascido, do que a malária adquirida na gravidez tardia. Outros estudos mostraram que a malária periférica confere cinco vezes mais risco para malária placentária, e confirma assim a importância das malárias maternas tardias (Cottrell *et al.*, 2005). Embora a infecção periférica materna no fim da gravidez (depois dos sete meses) predisponha a mulher à malária placentária, o risco desta é maior se a malária periférica acontece no início da gravidez (Brabin, 1983). No Malawi, a malária placentária foi mais frequente em mulheres que estavam parasitadas na altura do envolvimento no estudo (i.e., durante o primeiro trimestre de gravidez) do que as que não estavam parasitadas (Steketee, 1996). A malária periférica durante a gravidez precoce pode ser um factor de risco particularmente importante para a infecção placentária, devido à baixa protecção imunitária no começo da gravidez.

I.3.4. Idade Materna e Malária

Estudos levados a cabo na África Subsaariana relataram a existência de uma associação significativa entre a idade materna e malária durante a gravidez. (Steketee *et al.*, 1996 e Brabin *et al.*, 1997). Num estudo em Blantyre, Malawi, depois da estratificação por paridade, as associações entre idade e prevalência do parasita foram mais fortes do que as da paridade e prevalência depois da estratificação por idade (Bouyou *et al.*, 2003). Nas áreas de transmissão baixa a moderada, a imunidade específica da gravidez leva tempo a desenvolver-se e a imunidade relacionada com a idade influenciam a prevalência da malária na idade reprodutiva (Bouyouet *et al.*, 2003). Os estudos mostraram que as mulheres jovens na idade reprodutiva podem ser mais susceptíveis à malária do que mulheres mais velhas porque ainda estão em processo de aquisição da imunidade natural contra os antigénios do plasmódio (Johnson *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 1995). Nos Camarões, a idade foi o maior factor de risco para a malária placentária, estando as mulheres mais jovens e as primigestas mais propensas de ter malária placentária (Tako *et al.*, 2005). Do mesmo modo, na RDC (ex-Zaire) mães com placentas com malária eram mais jovens (média de idade 24 anos) do que as mães com placentas sem malária (média idade 29 anos) (Antelman *et al.*, 2000). Foi sugerido que o desenvolvimento da imunidade associada à gravidez, i.e. produção de anticorpos que inibem a aderência dos parasitas placentários ao sulfato de condroitina A (CSA), pode ser muito importante em mulheres com menos de 25 anos de idade que têm níveis mais baixos de imunidade adquirida (devido à menor frequência de exposição a *P. falciparum*) do que em mulheres que podem ter obtido imunidade, decorrente de exposições repetidas e, portanto, menos dependentes dos anticorpos anti-citoaderentes (Tako *et al.*, 2005). Contudo é importante ter-se em conta que a imunidade idade-dependente e gravidez-dependente podem ser influenciadas pelo hospedeiro ou por factores ambientais (Uneke, 2008).

I.4. Paridade e Malária Placentária

A relação entre malária placentária e paridade está bem estabelecida nas áreas de alta transmissão da malária. Muitos estudos mostraram que a prevalência é mais alta nas primigestas do que nas multigestas (Okoko *et al.*, 2002; Cot *et al.*, 2003). Estas observações são coincidentes com os achados de estudos anteriores nos quais a

paridade influenciou a prevalência da malária placentária independentemente da idade, sendo o risco de malária placentária duas a quatro vezes maior nas primigestas do que nas multigestas (McGregor *et al.*, 1983; McGregor, 1984). Na Gâmbia, foi observado que as formas mais graves de malária placentária aconteceram numa proporção mais alta de primigestas do que de multigestas (Okoko *et al.*, 2002). Na região de Tanga, na Tanzânia, a malária placentária estava associada com hipertensão em primigestas jovens com características histológicas de doença crónica, mas não estava relacionada com a hipertensão em mulheres mais velhas ou multigestas. De modo semelhante, a malária placentária estava associada com níveis elevados do receptor solúvel 1 do factor de crescimento do endotélio vascular (sVEGF1) derivado da placenta em primigestas, mas não em multigestas mesmo após controlo para a idade (Muehlenbachs *et al.*, 2006). O sVEGF1 pode causar uma disfunção endotelial sistémica, ligando-se e sequestrando o factor de crescimento do endotélio vascular sérico livre (VEGF) e o factor de crescimento placentário (Muehlenbachs *et al.*, 2006).

A razão exacta por que as primigestas são mais susceptíveis à malária placentária, e sofrem as suas consequências mais do que as multigestas não está totalmente esclarecida (Uneke, 2008). Porém, uma explicação comum é que a gravidez está associada com uma diminuição da imunidade que é mais pronunciada nas primigestas do que nas multigestas e pode estar associada com a idade (Cottrell *et al.*, 2005). Estudos imunológicos mostraram que este aumento na susceptibilidade podia estar relacionado com a propriedade dos eritrócitos parasitados de aderirem ao sulfato de condroitina A (CSA) expressa pelo sinciotrofoblasto da placenta (Achur *et al.*, 2003 e Scherf *et al.*, 2001). Assim a placenta pode seleccionar o fenótipo de *P. falciparum* para a ligação ao CSA, pondo as primigestas, que não tiveram exposição prévia a esta forma de parasita, em risco aumentado para desenvolver malária placentária (Uneke, 2008). A decrescente susceptibilidade da malária associada à gravidez com o aumento da paridade reflecte-se na aquisição de anticorpos específicos para os antígenos do parasita, expressos na superfície dos eritrócitos parasitados (Staalsoe *et al.*, 2001). Outra possível explicação para esta susceptibilidade relacionada com a paridade é dada pelos achados de Duffy e Fried (Staalsoe *et al.*, 2001), que mostraram que as multigestas desenvolvem anticorpos para a malária que bloqueiam a adesão do parasita aos receptores do CSA nas placentas das gravidezes subsequentes.

I.5. Patogénese da Malária Placentária

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar o aumento da susceptibilidade das mulheres grávidas à malária e a alta frequência da infecção placentária (Matteelli *et al.*, 1996), que podem ser descritos em dois mecanismos principais. O primeiro, propõe que a gravidez é um período de imunodepressão generalizada que é sustentada, principalmente, pelo aumento dos níveis de cortisol sanguíneo. Os níveis de cortisol são mais elevados em mulheres grávidas com malária do que nas grávidas sem malária, e as respostas imunitárias mediadas pelas células aos antígenos da malária estão marcadamente mais suprimidas nas primigestas do que nas gravidezes subsequentes (Vleugels *et al.*, 1989). Contudo, esta hipótese não explica a replicação preferencial dos parasitas dentro da placenta. Além disso, os níveis de cortisol aumentam linearmente durante a gravidez, ao passo que a susceptibilidade à malária tem o pico no segundo trimestre e depois decresce. O segundo mecanismo defende que a imunossupressão é principalmente um fenómeno local ao nível da placenta, sustentado pelo aumento das concentrações locais de estrogénios. A produção de estrogénios diminui com a paridade e, possivelmente, durante a gestação das mulheres infectadas, devido à produção diminuída da hormona pela placenta infectada e danificada. (Watkinson *et al.*, 1985). Contudo requerem-se mais estudos para associar as concentrações de estrogénios placentários com a infecção placentária. Mais recentemente, uma hipótese imunológica alternativa foi proposta para explicar a susceptibilidade aumentada à malária durante a gravidez (Smith, 1996). Têm sido observados mecanismos efectores e não-específicos que jogam um papel importante na limitação da replicação de *P. falciparum* nos indivíduos não-ímmunes, pela activação das respostas das citocinas tipo-1 (i.e. IFN-gama, interleuquina 2, 12 e TNF). Contudo a aquisição da imunidade protectora e específica está associada com a activação das respostas das citocinas do tipo-2 (i.e. interleuquinas 10, 4 e 6). Ficou proposto que as mulheres grávidas têm um sistema imunológico que se confunde com os mecanismos de defesa humoral do tipo-2 e diferente das respostas celulares do tipo-1, porque estas comprometeriam a viabilidade da unidade fetoplacentária (Smith, 1996; Deloron e Maubert, 1995). As mulheres grávidas estariam portanto mais susceptíveis à malária pela inibição da resposta das citocinas do tipo-1. Contudo, esta hipótese, não explicaria porque é que os efeitos da malária sobre a mãe e o feto são mais severos nas áreas de transmissão instáveis da malária do que nas áreas onde a transmissão é estável (Matteelli *et al.*, 1996). Há mais

de uma década, McGregor *et al.*, (1983) sugeriram que a placenta é um local preferencial de multiplicação dos parasitas da malária por causa de factores não identificados. Recentemente esta hipótese recebeu um subsídio adicional pela descoberta de uma subpopulação de *P. falciparum*, que adere ao CSA da placenta (Fried and Duffy, 1996). Utilizando ensaios *in-vitro* que medem a aderência à proteína da matriz extracelular imobilizada, os investigadores identificaram uma subpopulação de *P. falciparum* distinta, com fenótipo de ligação CSA-específico (que não se ligam a outros receptores). Noutra série de experiências *in-vitro*, verificou-se que esta subpopulação de parasitas se liga, preferencialmente, às vilosidades trofoblásticas, vilosidades extracelulares e às trabéculas sinciciais do tecido placentário; ligação inibida pela presença de CSA livre. Embora, a CSA seja um componente comum da matriz extracelular e encontrada abundantemente no corpo, propôs-se que a placenta é o único local onde a interacção entre a CSA e os eritrócitos parasitados podem realmente ocorrer, uma vez que o fenótipo de ligação-CSA estava ausente nas amostras do sangue periférico de mulheres não-grávidas (Fried e Duffy, 1996). No modelo proposto, as mulheres só providenciam um substrato para o fenótipo dos parasitas de ligação-CSA, quando elas estão grávidas, na altura em que a sequestração dos parasitas determina o quadro da malária placentária. Nas áreas de alta endemicidade, as primigestas são presumivelmente as mulheres grávidas mais afectadas pela malária, porque apesar do reconhecimento humoral de uma gama de antigénios parasitários, na altura em que são adultas, elas quase não dispõem dos anticorpos contra a população parasitária que se liga ao CSA. As multigestas são, presumivelmente, menos afectadas por causa da retenção da memória imunológica das primeiras gravidezes. A hipótese de Fried e Duffy (1996) está também em consonância com o reconhecimento recente da diversidade de genes do parasita que codificam as proteínas que ligam aos receptores existentes sobre as várias moléculas de superfície da célula do hospedeiro. Esta diversidade indica que os parasitas têm um enorme reportório de locais potenciais de ligação-hospedeiro e que ocorrem provavelmente subpopulações com tropismos para órgãos específicos.

Nos estudos histológicos de placentas infectadas, o diagnóstico de malária placentária é baseado na identificação de parasitas ou de pigmento malárico. Os eritrócitos parasitados têm sido constantemente descritos no espaço intervilositário (i.e. no lado materno da corrente sanguínea). O estadio predominante é o trofozoito, mas

também foram reportados esquizontes. O pigmento, durante as fases precoces da infecção, concentra-se nos macrófagos nos espaços intervilositários, no trofoblasto, nas células de Hoffbauer e nos depósitos de fibrina do estroma vilositário. O desaparecimento do pigmento pode ser completo depois duma infecção activa ser resolvida, mas depósitos de fibrina levam tempo a desaparecer (Bulmer *et al.*, 1993). Presume-se que o desaparecimento do pigmento ocorra dentro de meses e que o pigmento identificado em placentas de termo surge de infecções adquiridas na segunda metade da gravidez. Parasitas e pigmento não são as únicas características da malária placentária. As observações histológicas-chave foram feitas por Galbraith *et al.*, (1980) e Walter *et al.*, (1981), que demonstraram que a malária da placenta resulta em várias alterações histológicas nas vilosidades coriônicas. As três alterações observadas foram: (1) abundantes monócitos dentro dos espaços intervilositários; (2) células citotrofoblásticas mais comuns (reflectindo uma resposta não específica à lesão do trofoblasto; e (3) espessamento evidente da membrana basal do trofoblasto (Galbraith *et al.*, 1980; Walter *et al.*, 1981). Alterações histológicas similares (numerosos monócitos nos espaços intervilositários, lesão do trofoblasto e necrose focal, perda parcial de microvilosidades e espessamento da membrana basal do trofoblasto) foram descritas por Yamada *et al.*, (1989), noutra série de 20 placentas.

De acordo com Steketee *et al.*, (2001), foi Blumer *et al.*, 1993 que introduziram pela primeira vez a classificação da malária placentária. Esta classificação foi mais tarde ligeiramente modificada por Ismail *et al.*, 2000. A infecção activa, que é definida pela presença de eritrócitos parasitados no espaço intervilositário da placenta, inclui duas categorias: Infecções agudas (só parasitas e depósito mínimo de hemozoina nos macrófagos, mas não fibrina), e infecções crónicas (parasitas e depósito de hemozoina). A categoria “infecções passadas” inclui casos com hemozoina, geralmente misturados com fibrina, mas sem parasitas (Brabin *et al.*, 2004). Considera-se não infectada quando não há evidências de parasitas ou pigmento.

I.6. Citoaderência na Placenta

O sequestro dos eritrócitos parasitados por *P. falciparum* na placenta revela dados de aderência distintos dos que acontecem nos outros órgãos. Em primeiro lugar os eritrócitos infectados (E) acumulam-se principalmente no espaço intervilositário e só

alguns parecem estar directamente unidos à superfície do sinciotrofoblasto, que é uma camada de células multinucleadas e contínua, derivada do feto e que tapeta o espaço intervilositário e está em contacto com o suprimento sanguíneo materno (Fig. 5) (Miller e Smith, 1998; Yamada *et al.*, 1989).

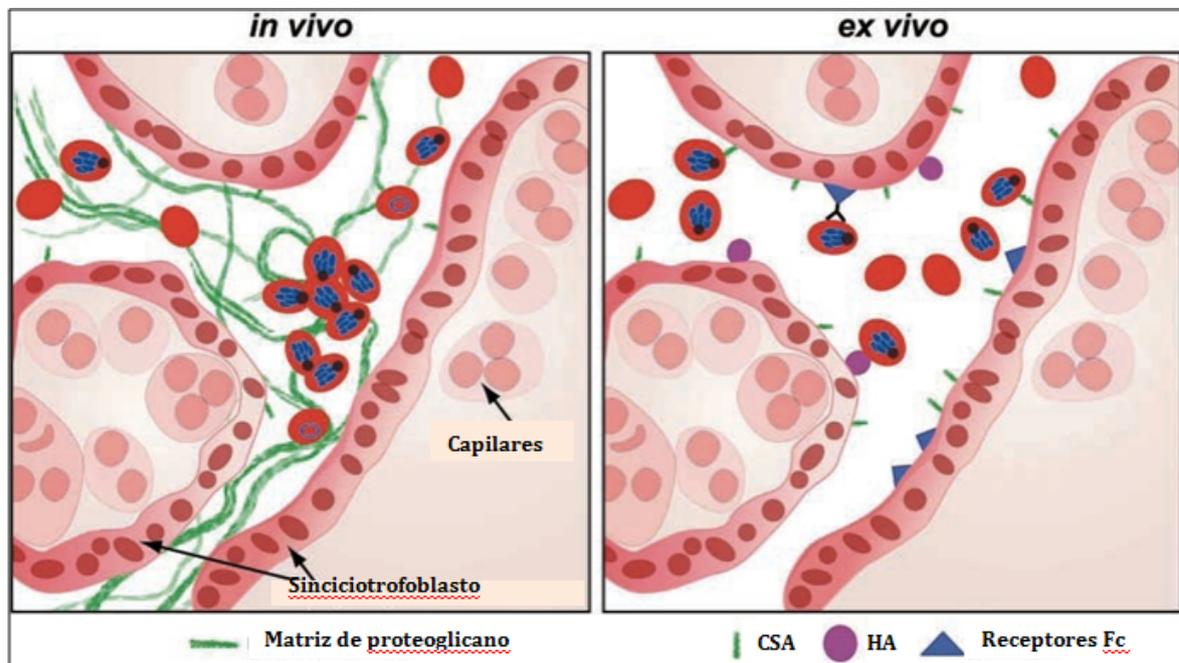


Figura 5 - Representação esquemática dos eventos de citoaderências dos eritrócitos infectados por *P. falciparum* na placenta *in vivo* e *ex vivo*. Os eritrócitos parasitados são sequestrados no espaço intervilositário pela ligação a uma matriz de proteoglicano extracelular. Em condições de *ex vivo* tal como acontece nos ensaios *in vitro*, usando criosecções placentárias os EP aderem directamente à superfície do sinciotrofoblasto. Parece que a matriz de proteoglicano que cobre o espaço intervilositário é destruído durante a preparação das criosecções da placenta. Como resultado, os receptores escondidos são expostos sobre a superfície do sinciotrofoblasto aos quais os EP se podem ligar em condições *ex vivo*. Está ainda por se saber se tais interações adesivas acontecem *in vivo*. HA, ácido hialurónico; CSA, sulfato de condroitina A; Receptores Fc neonatal (Katherine *et al.*, 2002).

O sequestro dos EP é diferente daquele que acontece noutros órgãos, incluindo o cérebro, onde os EP se ligam directamente à superfície dos capilares microvasculares. Em segundo lugar tanto os parasitas imaturos como os maduros aderem à placenta (Pouvelle *et al.*, 2000), ao passo que só os parasitas maduros sequestram noutros órgãos.

Até agora foram identificados três receptores do hospedeiro como alvos do sequestro dos parasitas na placenta. O primeiro receptor foi identificado por Fried e Duffy (1996), que obtiveram eritrócitos parasitados de placentas de mulheres quenianas depois do parto e examinaram proteínas da matrix extracelular para propriedades adesivas. Descobriram que os eritrócitos parasitados isolados da placenta se ligavam

especificamente à CSA, um glicosaminoglicano previamente identificado como um receptor para a adesão parasitária (Rogerson *et al.*, 1995). Os mesmos eritrócitos parasitados não se ligaram a outros receptores de eritrócitos parasitados de *P. falciparum*, tais como CD36 e ICAM-1 (Fried e Duffy, 1996). Além disso, quando se testaram os soros de multigestas do Quênia e da Tailândia, verificou-se que continham anticorpos que inibem a ligação entre os eritrócitos parasitados e o CSA (Fried *et al.*, 1998). Com base nestes achados concluiu-se que os eritrócitos parasitados interagem de uma maneira específica com CSA na placenta. Esta hipótese porém, não reconciliou o facto de que o CSA não só é achado no sinciotrofoblasto placentário, mas também nas células endoteliais pulmonares humanas cultivadas (Robert *et al.*, 1995) e, possivelmente, nas células endoteliais do cérebro, como determinaram as necrópsias do cérebro de pacientes que morreram de malária cerebral. (Silamut *et al.*, 1999). Estas observações sugerem que a adesão ao CSA possa ocorrer noutros órgãos que não a placenta (Pouvelle *et al.*, 1997). Os resíduos de CSA de baixa sulfatação isolados do espaço intervilositário placentário estão ligados a um núcleo de proteínas incacterísticas de 670 kDa e 56 kDa (Achur *et al.*, 2000). Estes proteoglicanos de CSA de baixa sulfatação ligam-se eficientemente aos eritrócitos parasitados e é, muito provavelmente, o principal receptor para a citoaderência dos eritrócitos parasitados na placenta (Achur *et al.*, 2000; Alkhalil *et al.*, 2000). O elo de ligação mínimo foi identificado como um dodessacárido com dois a três grupos sulfato. O grau baixo de sulfatação distingue o CSA placentário do CSA de outro órgão e também do CSA da traqueia bovina e do CSA existente na superfície das células endoteliais da microvasculatura cerebral do Saimiri, ambos usados em ensaios prévios de ligação e de sequestro (Maubert *et al.*, 1997; Pouvelle *et al.*, 1997; Rogerson *et al.*, 1997; Maubert *et al.*, 2000). A ligação mediadora da adesina parasitária ao CSA placentária é a PfEMP1 (Achur *et al.*, 2000). A PfEMP1 pode ser imunoprecipitada, usando soros de mulheres grávidas das áreas endêmicas de malária (Pouvelle *et al.*, 2000) e a clonagem dos genes var expressos nos parasitas tirados da placenta infectada confirma a ligação ao CSA (Khattab *et al.*, 2001). Embora o CSA de baixa sulfatação pareça ser o principal receptor para a citoaderência na placenta (Achur *et al.*, 2000; Alkhalil *et al.*, 2000), as interacções do receptor adesivo parasita/hospedeiro parecem contribuir para o sequestro placentário.

Os vários métodos que têm sido empregues para identificar a malária placentária, contribuem possivelmente para as diferenças observadas entre os estudos (Brabin *et al.*, 2004). Nalguns estudos, a malária placentária era definida só pela presença de parasitas nas vilosidades coriônicas; ao passo que noutros, a definição inclui a presença de pigmento. Assim o aparecimento de parasitas indica infecção recente na gravidez, ao passo que o pigmento indica a cronologia da infecção na placenta (Blumer *et al.*, 1993). Os espaços intervilositários para onde os parasitas são sequestrados mais tarde na gravidez formam lacunas no trofoblasto entre os dias 10 e 21 da gestação e não está claro se o sangue materno entra nestes espaços antes das 12 semanas de gestação (Fox, 1997). Isto pode explicar o porquê dos parasitas não serem sequestrados na placenta antes dos quatro meses de gestação (Garnham, 1938). Os dados da malária placentária só se obtêm depois do parto, quando as estimativas da prevalência da malária placentária e do sangue periférico mostram uma certa correlação (Brabin *et al.*, 2001). Alguns estudos demonstraram alta densidade de parasitas placentários, porém com escassa parasitemia periférica (Clark, 1915; Blacklock *et al.*, 1925). No entanto, outros estudos demonstraram a existência de parasitas no sangue periférico, sem que os houvesse na placenta (Walter, 1982; McGread *et al.*, 2003). Ismail *et al.*, (2003) mostraram em Ifakara, Tanzania, uma área de transmissão intensa e perene de malária, que 68,8% de mulheres com parasitemia negativa no sangue periférico tinham alguma evidência de malária placentária, quer activa, quer passada. Neste estudo 46,3% de placentas activamente infectadas não mostraram parasitas no exame de sangue periférico, ao passo que somente 5,2% de casos sem parasitas no estudo histológico tinham sangue periférico positivo.

Devido ao facto dos parasitas serem sequestrados na placenta, os esfregaços do sangue periférico muitas vezes não detectam a existência de malária. A falha no diagnóstico resulta num tratamento inadequado ou extemporâneo que pode levar a um prognóstico adverso da gravidez, incluindo a anemia grave, que é a principal consequência materna da malária e que pode ser mortal (Etard *et al.*, 2003). Para além da anemia, a malária contribui para a mortalidade materna, aumentando em 50% o risco e a severidade de condições obstétricas tais como a pré-eclâmpsia/eclâmpsia e a hemorragia pós-parto. (Dorman *et al.*, 2000 e Mockenhaupt *et al.*, 2006).

I.7. Anticorpos Anti-adesão

Há cada vez mais evidência de que os anticorpos anti-adesão fornecem protecção imunológica contra a malária placentária (Fried, 1998; Ricke *et al.*, 2000; Duffy *et al.*, 1999). Os anticorpos anti-adesão contra os parasitas que se ligam ao CSA estão associados com densidade e prevalência reduzidas de malária placentária. A susceptibilidade da malária nas primigestas tem sido relacionada com deficiência nestes anticorpos (Fried, 1998). Nos Camarões, a resposta dos anticorpos aos parasitas associados à gravidez estava relacionada com a paridade, explicando a diferença entre primigestas e multigestas (Maubert *et al.*, 1999). Os níveis dos anticorpos anti-adesão, mais do que o grau de imunidade humoral dependente da paridade, têm sido relacionados com a protecção da malária placentária (Ricke *et al.*, 2000; O'Neil-Dunne *et al.*, 2001). No Gana, o reconhecimento dos anticorpos dos parasitas da placenta de termo não estava correlacionado com a paridade do hospedeiro, embora a inibição da adesão estivesse relacionada com o nível do anticorpo, independentemente da paridade. A amostra dos soros de primigestas, de termo, com níveis plasmáticos altos de anticorpos anti-adesão era tão eficiente como na das multigestas, quanto à inibição da adesão específica ao CSA (Ricke *et al.*, 2000). O'Neil-Dunne *et al.*, (2001) e Udomsangpetch *et al.*, (1993) relataram que as mulheres grávidas com malária placentária nos Camarões, independentemente da paridade, tinham falta de anticorpos anti-adesão durante o início da gravidez. Oitenta por cento dessas mulheres adquiriram anticorpos, durante o segundo trimestre. As multigestas produziram anticorpos anti-adesão mais cedo, pelas 12 semanas de gestação, ao passo que as primigestas iniciaram apenas por volta das 20 semanas de gestação. No termo da gravidez a maioria das mulheres grávidas, independentemente da paridade, tinham adquirido anticorpos anti-adesão. Estes anticorpos protectores foram capazes de bloquear a ligação ao CSA em parasitas isolados de outras partes do mundo. O atraso da resposta nas primigestas diminui a protecção contra a malária placentária, durante o segundo trimestre.

I.8. Vacinação e Malária Placentária

As vacinas constituem um meio potencialmente importante de prevenção da malária durante a gravidez (Greenwood, *et al.*, 2007). Uma vez que as grávidas nas

áreas malarígenas produzem anticorpos que reconhecem especificamente a ligação à CSA de *P. falciparum*, isto poderia formar a base para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária placentária (Uneke, 2008). Qualquer vacina pré-eritrocitária altamente eficaz que induza protecção e que não seja específica à espécie, protegeria contra a malária na gravidez. A vacina com o produto de *var* genes responsável pela ligação de *P. falciparum* ao sulfato de condroitina A é um método potencial para prevenir os danos induzidos pela malária à placenta e o consequente baixo peso à nascença. É provável que a prevenção do sequestro reduziria também a incidência da anemia materna. Existe a inquietação sobre a segurança da vacina durante a gravidez, sobretudo no primeiro trimestre. Assim a vacinação das mulheres deveria ocorrer na idade reprodutiva antes da gravidez (Greenwood *et al.*, 2007), talvez administrá-la com outras vacinas da adolescência como a vacina do papiloma vírus e teria por objectivo induzir altos níveis de IgG específica para VSA_{PAM}, que são geralmente vistos em multigestas que são resistentes à malária associada à gravidez. O controlo da malária através da vacinação não tem sido realizado apesar dos resultados encorajadores recentes (Alonso *et al.*, 2005). Se for desenvolvida uma vacina para uso em crianças, será importante testá-la quanto a sua eficácia contra a malária na gravidez, uma vez que qualquer vacina que diminua as taxas de infecção ou abrande a replicação parasitária podia diminuir o peso da malária na gravidez. A malária na gravidez pode constituir uma síndrome bem definida sujeita a vacinação, especialmente contra os parasitas que sequestram na placenta. A VAR2CSA parece ser um candidato promissor para tal vacina, como atestam numerosos trabalhos recentes (Uneke, 2008).

I.9. Restrição de Crescimento Intra-Uterino e Parto Pré-termo devida à Malária

O parto pré-termo (parto antes das 37 semanas de gestação) está associado com a parasitemia da malária (Sullivan *et al.*, 1999, Menendez *et al.*, 2000, Tako *et al.*, 2005), anemia e altos níveis de TNF-alfa e interleucina 10 (Suguitan, 2003). A RCIU está associada com malária crónica, provavelmente através da insuficiência placentária. A malária associada à gravidez pode comprometer a circulação placentária se a malária durante a invasão do trofoblasto impedir a remodelação das artérias espiraladas uterinas, como acontece na pré-eclâmpsia (Redman *et al.*, 2005). A remodelação, que

continua até às 18-20 semanas de gestação (Lyall, 2005) e num período de alta susceptibilidade à malária (Brabin, 1991) é crítica para o desenvolvimento de uma circulação placentária adequada perto do término da gravidez. Por outro lado os eritrócitos infectados, monócitos e depósito de fibrina (Imamura *et al.*, 2002) no espaço intervilositário podem diminuir o fluxo sanguíneo placentário por meios mecânicos. Alguns estudos têm encontrado uma relação entre malária e o risco de pré-eclâmpsia e hipertensão na gravidez (Sartelet *et al.*, 1996; Muelenbachs *et al.*, 2006). O risco de hipertensão aumenta nas primigestas com formas crónicas e inflamatórias de malária placentária, que podem resultar da resposta fetal à inflamação placentária (Muelenbachs *et al.*, 2006). Sabe-se que a inflamação placentária e a diminuição do fluxo sanguíneo placentário dificultam a função de transporte de nutrientes da placenta e a insuficiência placentária é um dos mecanismos que tem sido evocado para a compreensão do RCIU (Regnault *et al.*, 2002 e Tazuke *et al.*, 1998) (Figura 6).

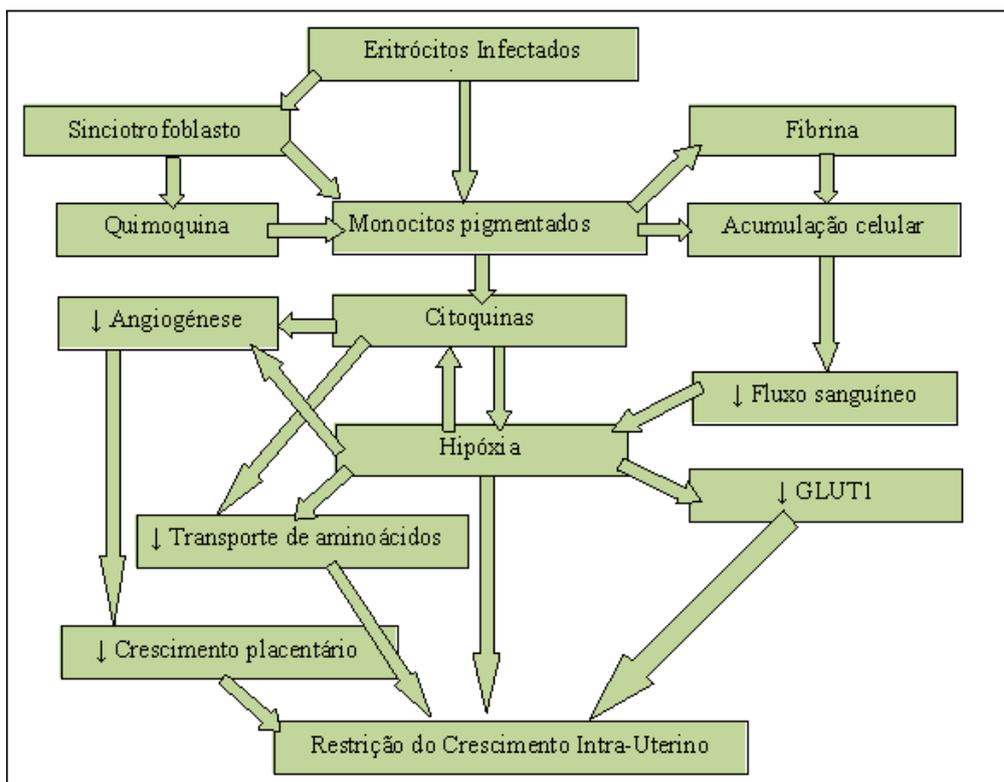


Figura 6 – Possíveis mecanismos pelos quais o sequestro placentário dos eritrócitos infectados pode activar monócitos e outras células para provocar alterações na função placentária que resulta em RCIU.

Os eritrócitos infectados ou os seus produtos podem activar os sinciotrofoblastos e os monócitos para libertar quimoquinas e citoquinas. As primeiras contribuem para a acumulação de monócitos, ao passo que as segundas podem ter efeitos directos para crescimento placentária (através de angiogénese). As citoquinas e a acumulação de células podem levar a hipóxia placentária. As citoquinas podem afectar directa ou indirectamente os mecanismos de transporte de nutrientes. A diminuição do crescimento placentário e a diminuição do transporte de nutrientes são prováveis mecanismos finais comuns pelos quais a malária leva a RCIU. GLUT1= glucose transporter 1. (Adaptação de Rogerson *et al.*, 2007).

I.9.1. Susceptibilidade Materna Depois do Parto

Parece existir uma evidência aumentada de que pelo menos algumas mulheres mantêm um risco elevado de malária no puerpério (Diagne *et al.*, 2000 e Ramharter *et al.*, 2005). A relação entre os parasitas que causam malária na gravidez e as que são vistas no puerpério ainda não está esclarecida e merece ser estudada (Rogerson *et al.*, 2007).

I.10. Malária Placentária e o Recém-Nascido

A malária do cordão umbilical é comum (Tobian *et al.*, 2000 e Kamewendo *et al.*, 2002), mas a doença clínica nos recém nascidos é rara, porque a transferência transplacentária de variante-específica e de outros anticorpos (p.expl. a MSP1) parece proteger o recém-nascido, embora ainda se discuta qual mecanismo (Rily *et al.*, 2001 e Hviid *et al.*, 2004). A infecção fetal pode ser adquirida por microtransfusão transplacentária pré-natal (Malhotra *et al.*, 2006). E esta pode ser o *priming* das respostas das células B e T à malária (King *et al.*, 2002 e Malhotra *et al.*, 2005). A malária materna também induz células reguladoras T CD4⁺ CD25⁺ do sangue do cordão, aumentando a produção da IL-10 e a diminuição dos níveis de IFN-gama (Brustowski, *et al.*, 2006), o que pode influenciar a susceptibilidade do recém-nascido à doença. Em circunstâncias de imunidade materna baixa, a malária congênita pode apresentar-se como uma doença grave duas a seis semanas depois do parto e a malária *in utero* tem sido associada com nados mortos (Wickramasuriya, 1935). A malária placentária diminui a transferência transplacentária de anticorpos maternos e IgG aos antígenos não maláricos – e.g. sarampo, *Streptococcus pneumoniae* e outros (Okoko, 2001).

O baixo peso à nascença induzido pela malária placentária podia ser um mediador importante, mas poucos dados estão disponíveis para compreender o efeito da malária placentária sobre os resultados imunoparasitológicos específicos durante os primeiros momentos de vida (Rogerson *et al.*, 2007).

I.11. Morbidade e Sobrevivência Infantil

A RCIU e o parto pré termo são reconhecidos como as consequências mais importantes da malária placentária. Estas têm implicações uma vez que os bebés de baixo peso à nascença possuem morbidade e mortalidade aumentada. A infecção placentária materna por *P. falciparum* pode ser associada positivamente com a morbidade da malária durante os dois primeiros anos de vida (Le Hesran *et al.*, 1997), anemia infantil (Le Cessie *et al.*, 2002), anemia fetal (Brabin, 1992; Brabin *et al.*, 2003), parasitemia malárica do cordão (Tobian *et al.*, 2000), “priming” imunitário prenatal para os antigénios da malária (King *et al.*, 2002), e mortalidade neonatal e perinatal (Garner *et al.*, 2003; Verhoeff *et al.*, 1999; McDermott *et al.*, 1996; Bloland *et al.*, 1995). A malária placentária por *P. falciparum* parece ter um papel muito mais significativo na sobrevivência infantil em África do que foi previamente assumido (Guyatt *et al.*, 2001). Estes riscos ocorrem mesmo que a malária congénita sintomática seja um evento pouco comum para os bebés nascidos de mães semi-imunes que estejam a viver sob condições holoendémicas (Fischer, 1997). A acumulação de ertrócitos parasitados na interface entre a circulação materna e fetal resulta, apesar disso, num pequeno número de casos de malária congénita sintomática. Isto em parte explica porque os recém-nascidos e as crianças estão relativamente protegidas de malária clínica se nascem de mães semi-imunes (Brabin, 1990; Riley *et al.*, 2001). Contudo nas áreas de baixa transmissão a malária placentária pode levar à malária congénita e à morte perinatal (Wickramasuriya, 1937). A parasitemia placentária pode ser usada como um sinal de alerta para identificar as crianças que necessitam de triagem activa e tratamento de parasitemia periférica, para prevenir mortes por malária (McGready *et al.*, 2003).

Curiosamente num estudo efectuado nos Camarões, a produção pelo feto de imunoglobulinas específicas anti-*P. falciparum* estava associada à malária placentária, à anemia materna e a um aumento na multiplicidade genotípica da infecção (Xi *et al.*, 2003). A relação entre activação precoce “priming” observada neste estudo e a aquisição de imunidade pelas crianças é desconhecida. Estudos por Achidi *et al.*, (2005) mostram que o feto pode montar uma resposta imune humoral contra antígenos de malária e que os anticorpos de *P. falciparum* são transferidos da mãe para o recém-nascido contribuindo para a protecção relativa observada em recém nascidos. Contudo também observaram que a activação precoce em alguns recém-nascidos induz a

produção de IL-4, sugerindo o predomínio de uma resposta anti-inflamatória, o que poderá levar a uma maior susceptibilidade em recém nascido de mães com malária placentar.

I.11.1. Transferência Placentária dos Anticorpos Maternos

A transferência placentária de anticorpos anti-*P. falciparum* está relacionada com o estado imunitário infantil (Brabin, 1992; Riley *et al.*, 2001; Edozien *et al.*, 1962). O efeito da malária placentária sobre a transferência de anticorpos maternos tem um interesse particular, por causa dos efeitos sobre a imunidade infantil às doenças infecciosas. Isso é um processo activo e acredita-se que seja mediado por receptores específicos na interface materno fetal, ou sinciotrofoblasto (Simister *et al.*, 1997). Num estudo feito no Malawi (De Moraes-Pinto, 1998), a transferência reduzida de anticorpos estava associada com a malária placentária e à hipergamaglobulinemia materna. A fisiopatologia é incerta mas pode reflectir a disrupção inflamatória do sinciotrofoblasto. Por outro lado, a saturação dos receptores com imunoglobulinas não específicas, secundárias à hipergamaglobulinemia da malária, pode também ser responsável. Curiosamente há evidência sugerindo que a imunoglobulina materna não imune pode desempenhar um papel no sequestro parasitário no sinciotrofoblasto (Flick *et al.*, 2001). Há implicações para a vacinação das crianças nascidas de mães com malária. Tais crianças podem-se tornar susceptíveis ao sarampo mais cedo do que as que nasceram de mães não infectadas, requerendo vacinas contra o sarampo em idades mais jovens (Cáceres *et al.*, 2003). Do mesmo modo, levantaram-se inquietações sobre o efeito da malária placentária sobre o sucesso da vacinação pré-natal contra o tétano como estratégia do controlo do tétano neonatal (Dietz *et al.*, 1997).

I.11.2. Transferência dos Nutrientes Placentários

As anomalias do fluxo sanguíneo placentário relacionadas com a malária placentária podem influenciar vários índices da função placentária, incluindo as capacidades secretórias, de transferência, metabólicas e proliferativa (Sibley *et al.*, 1998a; Sibley *et al.*, 1998). Além disso tem sido revisto que a infecção por *P. falciparum* poderia perturbar o mecanismo do folato-B12 e também a evidência deste mecanismo como um contribuinte para a RCIU (Brabin *et al.*, 2003). Esta revisão

também sublinhou as possíveis consequências que o distúrbio deste mecanismo teria sobre a disponibilidade da metionina, aminoácido essencial, e também da vitamina B6, não só para o desenvolvimento do feto, mas também para o aumento da placenta. Brabin et al., (2003) e Sibley et al., (1998a) relatam, também, que a tão referida insuficiência placentária, que surge das alterações patológicas do trofoblasto, poderia ser uma causa importante de RCIU. Estes investigadores enfatizaram que havia, não só anormalidades do fluxo sanguíneo uterino ou umbilical envolvido, mas que estavam possivelmente alterados os mecanismos de transporte específico, porque o transporte por difusão dos solutos não pode explicar os dados da RCIU fetal. Há, presentemente, boa evidência para os mecanismos de transporte activo dos aminoácidos e que os mesmos podem estar perturbados na insuficiência placentária.

II. OBJETIVOS

II. OBJECTIVOS

II. 1 – Objectivos Gerais

O objectivo geral deste estudo foi caracterizar a prevalência de malária e de malária placentária em mulheres grávidas, assim como alguns mecanismos de patogenezidade associados à malária placentária. A compreensão destes mecanismos é essencial já que as mulheres grávidas são um grupo de risco importante em todo o mundo. Mais ainda, sendo o primeiro a estudar malária placentária em Luanda, poderá contribuir de uma forma efectiva para o controlo e gestão da malária durante a gravidez em Angola.

II. 2 – Objectivos Específicos

Objectivo 1 – Determinar a prevalência e caracterizar os factores de risco de malária, em mulheres grávidas que recorem à consulta pré-natal, em Luanda, Angola.

Objectivo 2 – Determinar a prevalência da infecção placentária por *P. falciparum*, em Luanda, Angola.

Objectivo 3 – Caracterizar os factores socio-económicos do grupo de estudo e avaliar a eventual existência de associações com malária placentária, baixo peso à nascença, anemia, prematuridade, risco acrescido de mortalidade para o recém-nascido, malária congénita e paridade.

Objectivo 4 – Caracterizar genotipicamente os parasitas na placenta, sangue periférico da mãe e sangue do cordão.

III. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO E ÁREA DE ESTUDO

III. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO E ÁREA DE ESTUDO

Este estudo foi conduzido em duas fases. A primeira consistiu num estudo transversal com o intuito de determinar a prevalência e factores de risco associados à malária, durante a gravidez, na província de Luanda. A segunda fase consistiu num estudo caso-controlo para caracterizar a malária placentária por *P. falciparum* na cidade de Luanda.

O estudo foi realizado na província de Luanda, Angola, onde *P. falciparum* é responsável por mais de 90% de todas as infecções. Luanda é a maior cidade e capital de Angola, sendo também a capital da província homónima. Localizada na costa do Oceano Atlântico, é o principal porto e centro administrativo de Angola. Tem uma população de aproximadamente 4,5 milhões de habitantes (estimativa da ONU em 2004), tornando-a a terceira maior cidade lusófona do mundo, atrás de São Paulo e Rio de Janeiro. Luanda é a maior e a mais densamente habitada cidade de Angola. Inicialmente projectada para uma população a rondar os 500.000 habitantes é hoje uma cidade sobre habitada. Segundo os últimos estudos, vivem actualmente em Luanda mais de 5.000.000 de habitantes como ilustra a figura 7.

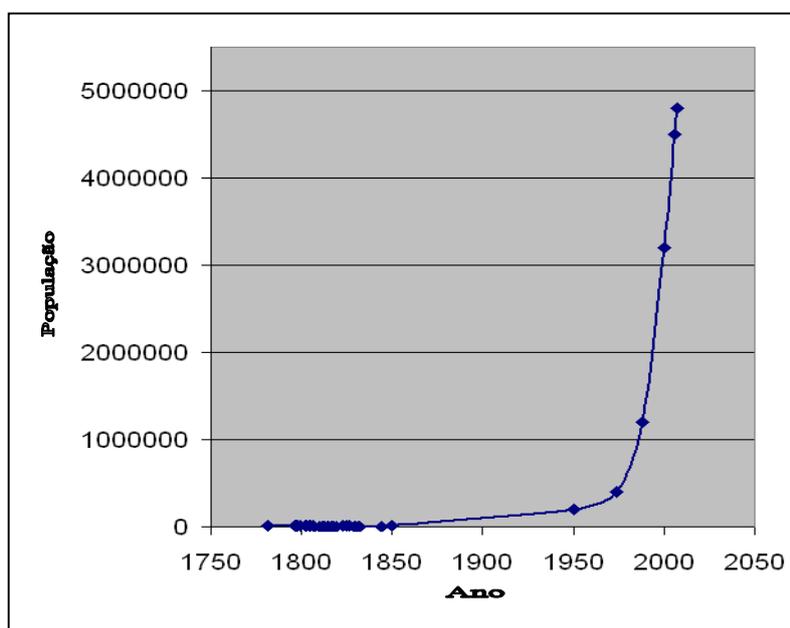


Figura 7 - Estimativa da População de Luanda. Fonte ONU 2004

Luanda está dividida em duas partes, a Baixa de Luanda (a cidade antiga) e a Cidade Alta (a nova cidade). A Baixa de Luanda está situada próxima do porto, tem

ruas estreitas e velhos edifícios do tempo colonial. O litoral é marcado pela Baía de Luanda, formada pela protecção do litoral continental por meio da Ilha de Luanda e a Baía de Mussulo, ao sul do núcleo urbano principal, formada pela restinga de Mussulo.

O clima é quente e húmido, mas surpreendentemente de pouca pluviosidade, devido à corrente fria de Benguela que impede a condensação da humidade para gerar chuva. Frequentemente, o nevoeiro impede a queda das temperaturas durante a noite, mesmo durante o mês de Junho, que costuma causar secas completas até Outubro. Luanda possui uma precipitação anual de 323 milímetros, mas a variabilidade está entre as mais altas do mundo, com um coeficiente de variação superior a 40%. O curto período de chuvas nos meses de Março e Abril depende de uma contra-corrente de norte que traz humidade à cidade, como se pode depreender da Tabela 1.

Tabela 1 – Precipitação e temperaturas mensais em Luanda

Mês	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
P	25	36	76	117	13	0	0	0	3	5	28	20
TM	29	30	31	30	28	25	24	24	25	27	28	29
Tm	24	25	25	24	23	20	19	19	20	22	23	23

P, pluviosidade em mm³; TM, Temperatura máxima (°C); Tm, Temperatura mínima (°C).

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Luanda>, acessado em Junho, 2009.

A cidade de Luanda é a mais desenvolvida de Angola e o único grande centro económico do país. Vale a pena mencionar, no entanto, as favelas chamadas de Musseques, que prolongam Luanda muitas milhas para além da antiga cidade, como resultado da migração de refugiados em grande escala durante várias décadas da guerra civil, resultando numa anarquia habitacional. Apenas 20% da cidade tem água e saneamento básico e apenas 30% das casas têm água corrente. No entanto, existem projectos inovadores, como a urbanização de Luanda Sul que visa melhorar esta situação. As municipalidades da Província de Luanda incluem: Cacuaco, Viana, Cazenga, Ingombota, Kilamba Kiaxi, Maianga, Rangel, Samba e Sambizanga. De acordo com uma recente pesquisa da *Angola Malaria Indicator Survey*, Luanda tem a taxa de fertilidade total mais baixa de Angola (3,9 crianças). A proporção de mães adolescentes que deram à luz em Angola é de 14%. A cobertura pré-natal em Luanda é

das mais altas, onde 93% das mulheres receberam cuidados pré-natais por pessoal treinado. A possibilidade de receber assistência pré-natal varia com a educação da mulher. Setenta e oito por cento dos partos ocorrem em unidades de saúde, mas as mães com educação secundária e superior são quatro vezes e meia mais propensas para dar à luz em unidades de saúde do que as iletradas.

O nível de endemicidade de malária, em Luanda, foi durante algum tempo motivo de debate, mas mais recentemente várias informações têm vindo a ser publicadas sobre o assunto. Em 2006, a *Angola Malaria Indicator Survey* concluiu que a percentagem de crianças (<5 anos de idade) com malária em Luanda era baixa (5,5 %). Além disso, durante a vigilância entomológica efectuada, de Janeiro de 2007 a Janeiro de 2008, em 350 casas em Luanda foram coletados, apenas, 35 mosquitos Anofelinos e não foram encontrados locais de postura adequados (*President Malaria Initiative*, 2009). Além disso, um estudo conduzido em 30 instalações hospitalares e centros de saúde de Luanda também encontrou maior incidência de malária em crianças mais velhas e em adultos do que em crianças menores de cinco anos (Thwing *et al.*, 2009) indicando que em Luanda o nível de transmissão de malária é baixo.

IV – ASPECTOS ÉTICOS

IV – ASPECTOS ÉTICOS

Foi elaborado o modelo de consentimento informado, que obedece aos princípios da declaração de Helsínquia em que os indivíduos participantes são informados oralmente do:

- a) Título do Projecto
- b) Responsável local
- c) Objectivos do projecto
- d) Procedimentos experimentais (recolha de sangue por punção digital)
- e) Garantia de liberdade de participação no estudo

Só foram incluídas no estudo as mulheres que deram o seu consentimento informado, através de assinatura ou aplicação de impressão digital; bem como pela anuência do Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto e do Comité de Ética do Ministério da Saúde da República de Angola, sediado no Instituto Nacional de Saúde Pública. A Direcção da Maternidade Lucrecia Paim e do Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula também deram os consentimentos escritos para a realização da pesquisa nas respectivas unidades hospitalares.

**V. PREVALÊNCIA E FACTORES DE RISCO PARA INFECÇÃO POR
PLASMODIUM FALCIPARUM EM MULHERES GRÁVIDAS EM CONSULTAS
PRÉ-NATAL EM LUANDA**

V. PREVALÊNCIA E FACTORES DE RISCO PARA INFECCÃO POR *PLASMODIUM FALCIPARUM* EM MULHERES GRÁVIDAS EM CONSULTAS PRÉ-NATAL EM LUANDA

V.1 – Introdução

A malária, devida a *Plasmodium falciparum* durante a gravidez é um sério problema de saúde pública na África Subsaariana. Anualmente, mais de 50 milhões de mulheres, que vivem nas áreas endémicas de malária, engravidam (WHO, 2004; Menendez *et al.*, 2007; ter Kuile *et al.*, 2007). Embora a malária na gravidez possa ser assintomática, devido ao desenvolvimento de alguma imunidade nas mulheres que vivem em áreas de transmissão estável, pode apresentar resultados desfavoráveis durante a gravidez, quer para a mãe quer para a criança (Kayentao *et al.*, 2005; Adegniko *et al.*, 2006; Uddenfeldt *et al.*, 2007; Valley *et al.*, 2007; Enato *et al.*, 2009; Kayentao *et al.*, 2005; Adegniko *et al.*, 2006). Como consequência da malária na gravidez são comuns os abortos, nascidos mortos, partos pré-termo e mortes maternas (Feresu, 2004; Schellenberger *et al.*, 2003; Marchant *et al.*, 2004; Enato *et al.*, 2009). Estima-se que na África subsaariana 200.000 a 500.000 grávidas desenvolvam anemia severa como resultado da malária (Brabin, 1983; McGregor, 1984 e Riley *et al.*, 1989).

Durante as últimas décadas, a importância da anemia associada à malária para a mulher grávida (risco de morte) e para o feto (baixo peso à nascença) tem sido cada vez mais reconhecido (Menendez *et al.*, 2000; Shulman *et al.*, 2002 e Menendez, 2003). A anemia não precisa de ser sintomática para constituir um risco apreciável durante a gravidez. *P. falciparum* pode estar na placenta e contribuir para a anemia materna mesmo na ausência de parasitemia periférica documentada. Por isso, a mulher grávida com anemia severa numa área endémica de malária deve ser tratada presuntivamente com um medicamento antimalárico eficaz, quer a parasitemia esteja ou não presente, quer tenha ou não história de febre (WHO/AFRO, 2004).

Para além da importância da anemia materna causada pela malária (Shulman *et al.*, 2001) é comum o baixo peso à nascença em recém nascidos de mulheres que tiveram malária durante a gravidez e pensa-se que 5% das mortes perinatais nas áreas de baixos recursos tenham sido causadas por este mecanismo (Guyatt, 2004). Muitas, e provavelmente a maior parte destas mortes maternas e perinatais são preveníveis

(Hinderaker, 2003). A prevalência da infecção e a densidade parasitária, atingem o pico na primeira metade da gravidez e depois decrescem progressivamente até ao parto (Brabin, 1983). Estão identificados factores que influenciam a prevalência da malária nas mulheres grávidas, nomeadamente a idade materna, a paridade, uso de profilaxia, nutrição, a genética do hospedeiro, o nível de imunidade anti-parasitária, bem como a genética do parasita (Tako, *et al.*, 2005). Estima-se que todos os anos 75.000-200.000 mortes infantis e cerca de 10.000 mortes maternas estejam associadas com a malária na gravidez e que esta contribuiu para, aproximadamente, 2-15% da anemia materna; 8-14% das crianças de baixo peso à nascença e 3-8% de todas as mortes infantis (Steketee *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 2007).

A abordagem preventiva mais promissora, usando medicamentos antimaláricos na mulher grávida é o tratamento preventivo intermitente (TIP). O TIP é baseado na administração de antimaláricos, em doses terapêuticas e em intervalos predefinidos, depois do início dos movimentos fetais. A OMS recomenda que nas áreas de transmissão estável se forneça o TIP como parte dos cuidados pré-natal, depois de se constatarem os movimentos fetais (WHO/AFRO, 2004). Estudos no Quênia e Malawi têm mostrado que o TIP com sulfadoxina-pirimetamina (SP) tem um impacto benéfico na saúde materna e infantil, reduzindo significativamente a prevalência da anemia materna e a parasitemia placentária, bem como a incidência do baixo peso à nascença (Shulman *et al.*, 1999, Schultz *et al.*, 1994 e Verhoeff *et al.*, 1998).

Embora existam vários estudos em países africanos de alta transmissão (McGregor, 1984; Brabin, 1991; Menendez, 1995; Sartelet *et al.*, 1997; Oeuvray *et al.*, 2000; Rogerson *et al.*, 2000; Lander *et al.*, 2002; Dafallah *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2003; Dicko *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004; Adam *et al.*, 2005; Brabin *et al.*, 2005; Demba *et al.*, 2006), são poucos os dados publicados em Angola. Segundo Guerra *et al.*, (2007) Angola é um dos cinco países com menos informação disponível, no que diz respeito à malária durante a gravidez, o que dificulta a tomada de decisões sobre a sua prevenção e controle. O objectivo deste estudo foi o de avaliar a prevalência de *P. falciparum* e os possíveis factores de risco associados, em mulheres grávidas que acorreram à consulta pré-natal no Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula (HGEAN), em Luanda.

V.2- Pacientes, Materiais e Métodos

V.2.1- Local de Estudo e Participantes

Estudo transversal, efectuado na consulta pré-natal (CPN) do Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula (HGEAN), em Luanda, Angola. Este estudo foi realizado de Abril a Setembro 2008. As mulheres grávidas foram recrutadas durante a consulta pré-natal de rotina. Todas as pacientes foram convidadas a fazer parte do estudo. Foram incluídas, apenas, aquelas que deram o seu consentimento informado e excluídas as que eram portadoras de outras patologias, nomeadamente as portadoras conhecidas de VIH. Cada mulher foi avaliada, apenas, uma vez.

V.2.2 - Colheita de Dados

Os dados sobre a malária em mulheres grávidas que acorreram às CPN do HEAN foram obtidos através de um questionário que incluía as seguintes informações: perfil sócio demográfico, história de malária, história obstétrica, incluindo a idade, paridade, tempo de gestação e morada. O tempo de gestação foi calculado a partir da data da última menstruação e pela ecografia, nos casos incertos. O exame físico obstétrico ajudou a completar os dados (tensão arterial, palidez conjuntival, nível do fundo do útero e frequência cardíaca fetal).

V.2.3 - Colheita de Sangue e Diagnóstico de Malária

O sangue foi obtido por picada digital ou por punção venosa. As amostras foram preparadas para a detecção do parasita e determinação da parasitemia. O esfregaço e gota espessa foram preparados segundo o protocolo descrito pela OMS (*WHO 1991 - Basic laboratory methods in medical parasitology. WHO Library Cataloguing in Publication Data Geneva 114 pp*). A coloração do esfregaço e da gota espessa foi feita com o corante – Giemsa 10%. O esfregaço foi fixado com metanol durante um minuto antes de ter sido corado. A densidade parasitária foi determinada pela contagem dos parasitas em 200 leucócitos, assumindo-se que cada mulher tenha 8.000 leucócitos/ μ l de sangue. Um esfregaço foi considerado negativo se não fosse visualizado nenhum

parasita em 200 leucócitos por campo de um esfregaço de gota espessa em óleo de imersão (Shutte, 1988).

V.2.4 – Determinação da Hemoglobina

As concentrações da hemoglobina foram determinadas pelo método do ácido hemático segundo Sahli *et al.*, (1984), usando hemoglobímetro (HaemoCue, Switzerland) a todas as mulheres recrutadas.

V.2.5- Análise Estatística dos Dados

Os dados foram armazenados numa folha do Windows Microsoft Excel® e revistos para a verificação. O programa SPSS v 10.0 para o Windows (SPSS, Inc) foi utilizado para a análise dos dados. Com o objectivo de procurar um modelo mais simples utilizou-se o método de rotina Backward/Wald, para eliminação automática de variáveis não significativas.

As comparações de grupos para as variáveis contínuas foram feitas pelos testes Mann-Witney U e Kruskal-Wallis. Para as variáveis qualitativas utilizou-se o teste qui-quadrado de Pearson. O valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

A variável “malária” (com as categorias “com” e “sem”) foi considerada a variável dependente e como variáveis independentes a idade, paridade, tempo de gestação, residência e escolaridade, casos de malária durante a gravidez (não actuais) e tratamento. As variáveis foram categorizadas e usadas como a seguir: idade [< 18 anos, 18-24 anos e > 24 anos]; paridade [primigestas e multigestas ≥ 2 partos]; tempo de gestação [primeiro trimestre (< 14 semanas), segundo trimestre (14–27 semanas) e terceiro trimestre (≥ 28 semanas)]; tratamento durante a gravidez [sem tratamento, sulfadoxina/pirimetamina e outros fármacos]. A hemoglobina foi estratificada em anemia (< 11 g/dL), anemia severa (< 7 g/dL) e normal (≥ 11 g/dL).

A regressão logística simples e múltipla foi utilizada para analisar os potenciais factores de risco associados à presença de malária atual. Para explorar as associações entre diversas variáveis independentes e malária, começou-se por efectuar regressão logística simples com cada variável independente.

De seguida foram aplicados modelos de regressão múltipla de forma a controlar possíveis confundimentos (Marcopito & Santos, 2006). Foram incluídas as variáveis que apresentaram associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ou com significado epidemiológico importante. As covariáveis foram mantidos nos modelos, independentemente da sua significância na análise univariada, porque foram consideradas como tendo possível relevância para os resultados, deste modo permitindo analisar a sua possível influência quando consideradas em conjunto com as demais. No primeiro modelo foram incluídas as variáveis independentes: tratamento, idade, anemia (com e normal), paridade e malária durante a gravidez, no segundo foi acrescentado o tempo de gestação.

V.3 - Resultados

V.3.1- Estudo da População

Os dados sobre malária foram recolhidos de um total de 679 mulheres grávidas que foram atendidas na consulta pré-natal do Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula (HGEAN). O perfil demográfico e obstétrico e a informação sobre parasitologia-hematologia foram obtidos das participantes ($n=679$). Estes perfis estão sumarizados na Tabela 2. Em resumo, a média de idade das mulheres foi de 25,7 anos e a mediana de 25 anos; a maioria das mulheres tinha baixa escolaridade (66,1%) e eram multigestas (74,1%); o segundo trimestre de gestação foi o mais representado (46,2%).

Tabela 2 - Perfis demográfico e obstétrico das participantes no estudo (n=679)

	N (%)
Idade (anos)	
Mediana	25
Mínimo-máximo	12-42
Educação	
Sem escolaridade e ensino básico	449 (66,1%)
Ensino médio e superior	230 (33,9%)
Residência	
Urbana	160 (23,6%)
Peri-urbana	519 (76,4%)
Paridade	
Primigesta	176 (25,9%)
Multigesta	503 (74,1%)
Tempo de gestação	
1º Trimestre(<14 semanas)	185 (27,3%)
2º Trimestre(14–27 semanas)	314 (46,2%)
3º Trimestre(≥28 semanas)	180 (26,5%)

No momento do estudo foi confirmada a presença de plasmódio no sangue periférico, por microscopia óptica, em 10,9% (n=74) de todas as mulheres entrevistadas no HGEAN. A distribuição por tempo de gravidez foi a seguinte: 1º trimestre 9,7% (n=18); 2º trimestre 11,5% (n=36) e 3º trimestre 11,1% (n=20) (Tabela 3).

V.3.2 - Parasitologia e Hematologia

Por microscopia óptica demonstrou-se, apenas, a existência de *P. falciparum*. Os detalhes sobre a parasitemia e a estratificação da paridade e tempo de gestação estão sumarizados na Tabela 3. A prevalência de *P. falciparum* (expressa em percentagens) diminuiu com a paridade. Contudo, não foi estatisticamente significativa. Não houve diferenças significativas entre as densidades parasitárias nas mulheres primigestas e multigestas infectadas. A taxa de infecção por trimestres (expressa em percentagens) foi mais alta no segundo e terceiro trimestres do que no primeiro trimestre de gestação (embora não estatisticamente significativa).

Tabela 3 – Taxa de infecção por *Plasmodium falciparum* em mulheres que acorreram ao HGEAN

	Grávidas com infecção	Grávidas sem infecção	% de Grávidas infectadas	<i>p</i>*
Idade				0,552
≤ 18 anos	5	43	10,4	
19 - 24 anos	25	242	9,4	
≥ 25 anos	44	320	12,1	
Paridade				0,350
Primigesta	21	155	11,9	
Multigesta	53	450	10,5	
Educação				
Sem escolaridade e ensino básico	46	403	10,2	0,270
Ensino médio e superior	28	202	13,8	
Residência				
Urbana	15	145	9,4	0,292
Peri-urbana	59	460	11,4	
Tempo de gestação				
1º Trimestre (<14 semanas)	18	167	9,7	0,830
2º Trimestre (14–27 semanas)	36	278	11,5	
3º Trimestre (≥28 semanas)	20	160	11,1	
Tratamento				
Sem	50	420	10,6	0,464
Sulfadoxina pirimetamina	12	109	9,9	
Outro	11	62	15,1	
Não sabe/não responde	1	14	6,7	
Total	74	605	10,9	

*valor *p* do teste de Qui-Quadrado de Pearson

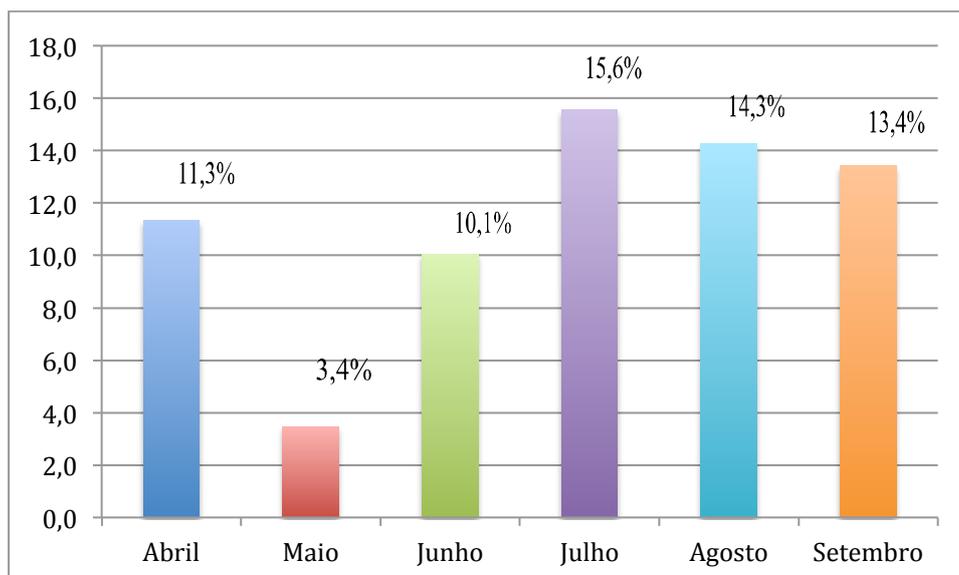


Figura 8. Distribuição dos casos de malária em mulheres que acorreram ao HGEAN em função do tempo.

A prevalência da malária variou ao longo dos meses em estudo, com maior pico nos meses de Julho e Agosto de 2008, o que não coincide com o período de maior pluviosidade que ocorre entre Janeiro a Abril [<http://pt.wikipedia.org/wiki/Luanda>, acessado em 2009] (Figura 8).

O valor médio das concentrações da hemoglobina nas mulheres grávidas estudadas (n=676) foi de $11,1 \pm 0,07$ g/dl e o valor da mediana foi 10,9g/dl. O valor médio para a hemoglobina nas mulheres grávidas com malária foi significativamente menor quando comparado com o das sem malária (Tabela 4). Tendo as mulheres com malária apresentado uma grande dispersão nos valores de hemoglobina sérica (Figura 9).

Tabela 4 – Concentração sérica de hemoglobina nas mulheres grávidas com e sem malária que acorreram ao HGEAN

Hemoglobina(g/dl)	Média	SD	Mediana	P ₂₅	P ₇₅	Min	Max	P*
total	11,1	0,07	10,9	10,0	12,2	5,6	20,1	
Grávidas com malária	10,2	0,06	9,9	9,4	10,6	7,6	14,4	<0,001
Grávidas sem malária	11,2	0,07	11,1	10,2	12,3	5,6	20,1	

*valor *p* do teste de qui-quadrado de Pearson

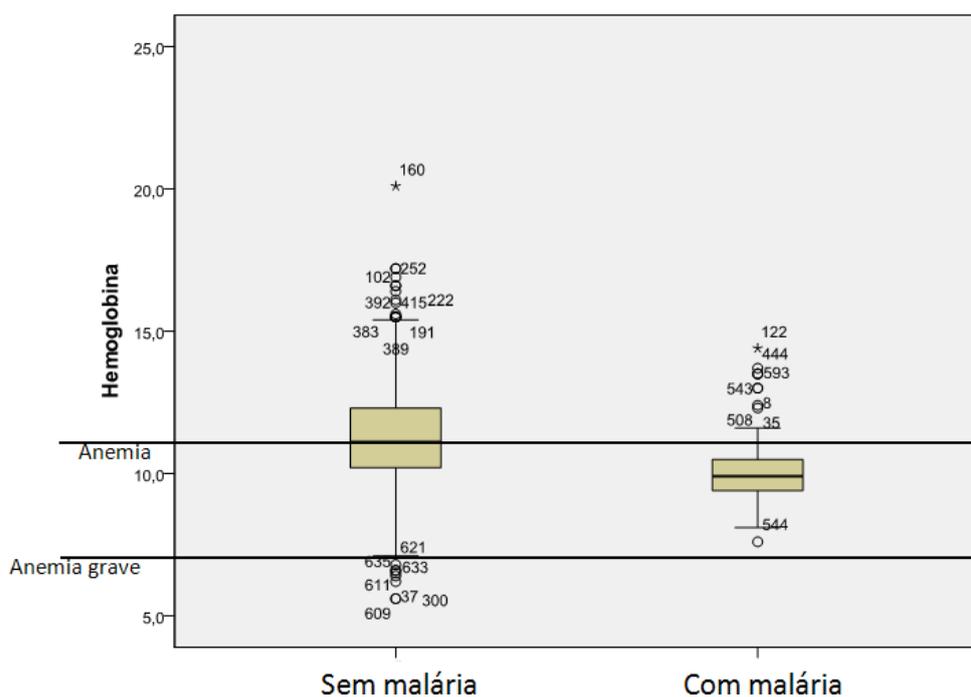


Figura 9 - Valores de hemoglobina sérica em mulheres grávidas com e sem malária.

Observou-se uma associação significativa entre ter anemia (hemoglobina <11g/dl) e a malária, das 358 mulheres anémicas 57 estavam com malária, (Tabela 5). A percentagem de mulheres com malária foi superior nas mulheres com anemia. Quando as mulheres foram categorizadas com anemia grave (< 7g/dL), apenas 8 (1,2%) apresentaram anemia grave, nenhuma delas tinha malária. Por este motivo a regressão logística, registou algumas instabilidades numéricas. Assim, nas análises subsequentes apenas se considerou com e sem anemia, independentemente da gravidade.

Tabela 5 – Anemia entre as mulheres grávidas com e sem malária que acorreram ao HGEAN

	Grávidas com malária	Grávidas sem malária	% de Grávidas infectadas	<i>p</i> *
Anemia				
Sem (Hb ≥ 11g/dl)	17	320	5%	<0,001
Com (Hb < 11g/dl)	56	283	16,5%	

* valor *p* do teste de Qui-Quadrado de Pearson

Observou-se ainda que a anemia estava associada com o tempo de gestação e com tratamento (Tabela 6).

Tabela 6 – Anemia entre as mulheres em função do tempo de gestação e tratamento

	Sem anemia	Com anemia	<i>p</i> *
Tempo de gestação			0,001
1º trimestre	114 (33,8%)	70 (20,6%)	
2º trimestre	141 (41,8 %)	172 (50,7%)	
3º trimestre	82 (24,3%)	97 (28,6%)	
Tratamento			<0,001
Sem	260 (78,1%)	217 (64,4%)	
Sulfadoxina pirimetamina	41 (12,3%)	80 (23,7%)	
Outros	32 (9,6%)	40 (11,9%)	

*valor *p* do teste de Qui-Quadrado de Pearson

Quando as mulheres foram estratificadas em primíparas e múltiparas, observou-se que as mulheres com malária tinham menores valores de hemoglobina do que as sem malária, e embora este valor para a média fosse menor nas primíparas, com ou sem malária, estas diferenças não eram estatisticamente significativas (Figura 10).

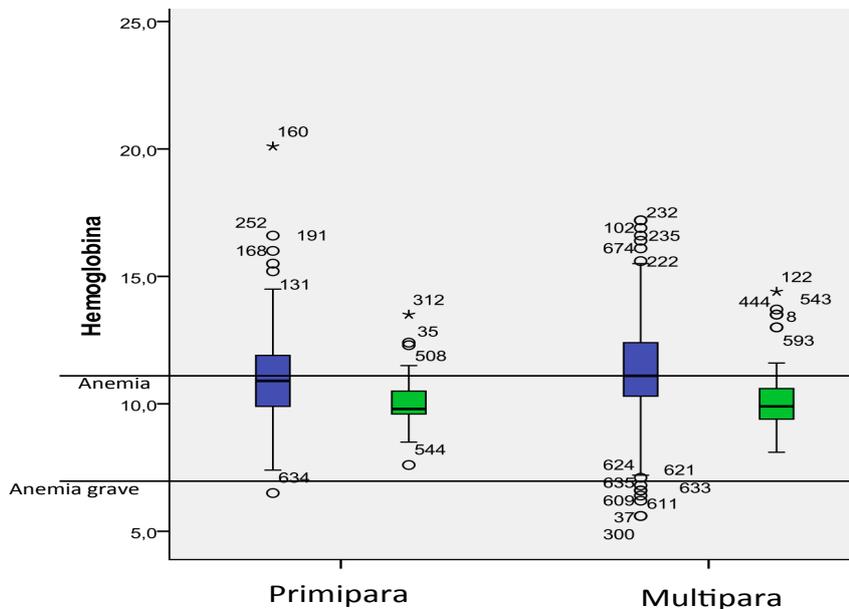


Figura 10. Valores de hemoglobina sérica em função da paridade. Azul - mulheres grávidas sem malária; Verde – mulheres grávidas com malária

Quando comparados os valores medianos da hemoglobina por tipo de tratamento, foram observadas diferenças significativas ($p < 0.001$, teste de Kruskal-Wallis) (Figura 11), e quando se efetuaram comparações múltiplas, verificou-se que os valores da hemoglobinas das mulheres tratadas com Sulfadoxina/Primetamina, têm valores menores de hemoglobina e diferem significativamente dos restantes tipos de tratamento (Figura 11). Esta alteração mantém-se quando as mulheres não têm malária ($p < 0.001$) (Figura 12).

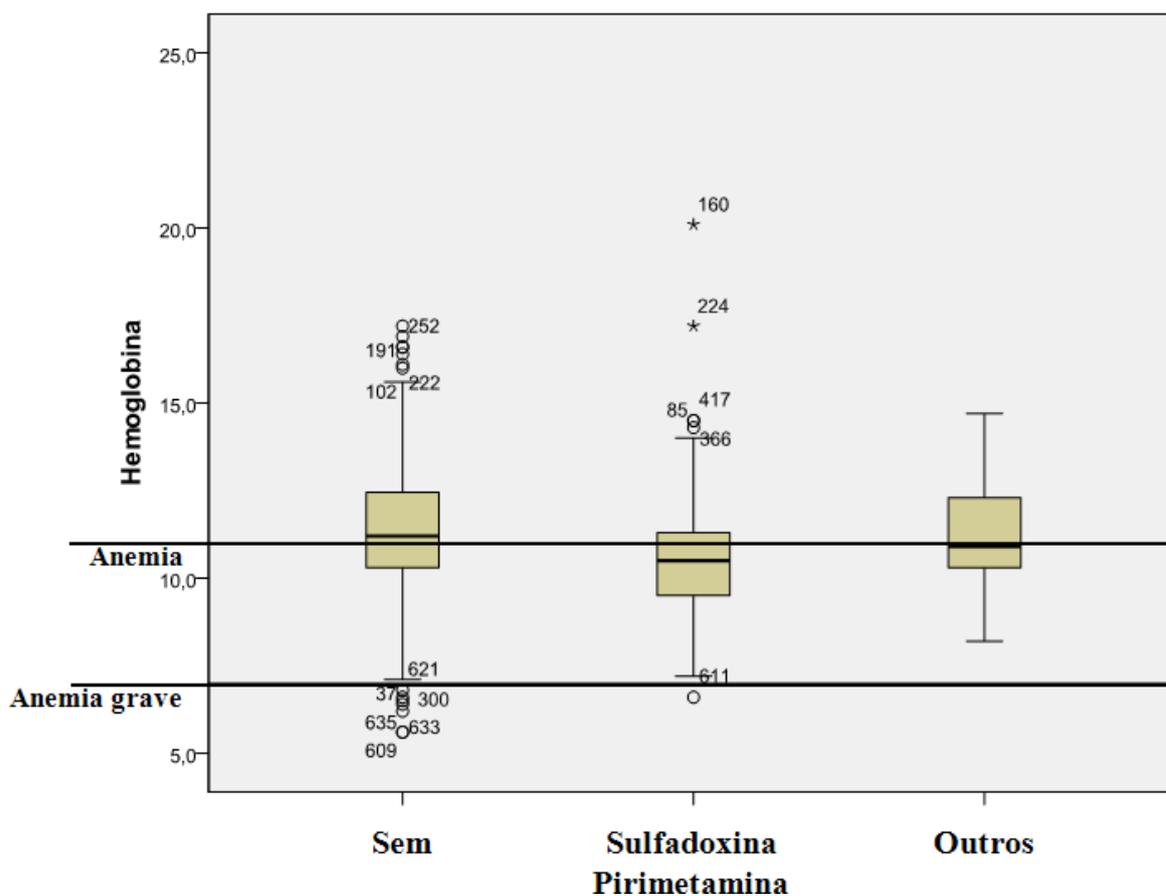


Figura 11. Valores de hemoglobina sérica em mulheres grávidas com ou sem tratamento anti-malárico. (Kruskal-Wallis, amostras independente $p=0,032$)

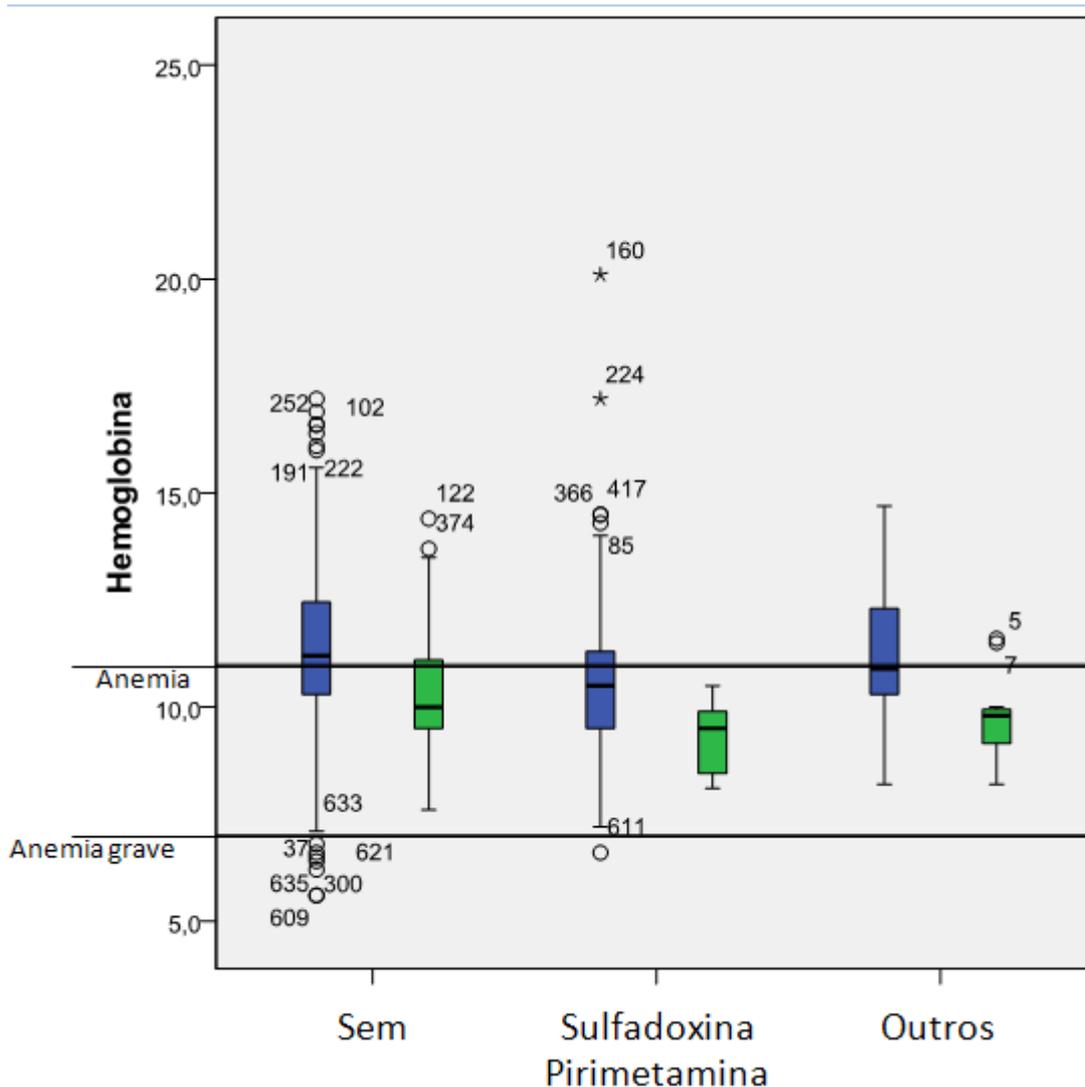


Figura 12. Valores de hemoglobina sérica em mulheres grávidas em função do tratamento e malária. Azul - mulheres grávidas sem malária; Verde – mulheres grávidas com malária.

Quando se aplicou um modelo de regressão logística múltipla, com as variáveis tratamento, idade, anemia, paridade, malária durante a gravidez e tempo de gestação, apenas a anemia e a malária durante a gravidez foram significativamente correlacionadas com a malária actual (Tabela 7). A infecção foi significativamente mais comum em mulheres com anemia do que em mulheres sem anemia [odds ratio (OR) = 4,03, IC 95% 2,23-7,27] As mulheres que tiveram malária anteriormente na gravidez também tiveram um risco aumentado de malária actual [odds ratio (OR) = 4,86, IC 95% 1,45-16,25]

Tabela 7 – Odds ratio entre as diferentes variáveis e o risco de a mulher grávida estar com malária

	% com malária	OR	95% C.I.		p
			inferior	superior	
Idade (anos)					
≤ 18 anos	10,42	ref			0,87
19 - 24 anos	9,36	0,76	0,25	2,26	0,62
≥ 25 anos	12,09	0,90	0,49	1,66	0,74
Paridade					
Primigesta	11,93	ref			
Multigesta	10,54	1,32	0,71	2,45	0,38
Malaria na gravidez					
Não	12,56				
Sim	22,97	4,86	1,45	16,25	0,01
Anemia					
Sem	5,03	ref			
Com	15,92	4,03	2,23	7,27	<0,001
Tratamento					
Sem	10,64	ref			0,16
Sulfadoxina-pirimetamina	9,92	3,40	0,90	12,86	0,07
Outro	15,07	2,43	0,58	10,14	0,22
Tempo de gestação					
1º Trimestre (<14 semanas)	9,73	ref			0,99
2º Trimestre (14–27 semanas)	11,46	1,11	0,55	2,21	0,78
3º Trimestre (≥28 semanas)	11,11	1,00	0,47	2,11	0,99

Finalmente, quando se utilizou o método de Backward/Wald terminamos no passo 5, com modelos a incluir a anemia e a malária na gravidez, confirmando a influência destas variáveis na malária actual.

Tabela 8 – Passo 5 do método de Backward/Wald entre as diferentes variáveis e o risco de a mulher grávida estar com malária

	OR	95% IC		p
		inferior	superior	
Malária na gravidez	2,04	1,10	3,81	0,025
Anemia	3,90	2,18	6,97	<0,001

V.4- Discussão

A malária é uma causa evitável de mortalidade e morbidade materna e fetal, mas a comunidade internacional está longe de implementar as intervenções necessárias para reduzir drasticamente o peso da doença nos países endêmicos. A detecção precoce e o tratamento atempado e adequado são os pré-requisitos essenciais para redução da incidência da morte e deverão ser os componentes principais da intervenção antimalárica nos países em vias de desenvolvimento (WHO 2000; Uddenfeldt *et al.*, 2007; Valley *et al.*, 2007; Enato *et al.*, 2009). Este estudo procurou caracterizar o padrão da morbidade da malária, durante a gravidez no Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula em Luanda numa área urbana, considerada pelo Departamento de Controlo de Endemias, como sendo de transmissão estável. A prevalência da malária na gravidez foi de 10,9% que está um pouco na linha da prevalência dos países africanos caracterizados por transmissão de malária intensa (Rogerson *et al.*, 2000; Dicko *et al.*, 2003; Enato *et al.*, 2009). O estudo demonstrou que não há associação entre malária e paridade, o que também é reportado por outros estudos realizados em área de transmissão intensa da malária (Sartelet *et al.*, 1997; Oeuvray *et al.*, 2000; Okoko *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004). Nas áreas onde a transmissão é alta, o nível de imunidade adquirida contra a malária é significativa e as primigestas são mais afectadas (Rogerson *et al.*, 2000; Dicko *et al.*, 2003); porém no nosso estudo encontramos maior número de multigestas afectadas. No presente estudo a média de idade não mostrou diferenças significativas entre as mulheres infectadas e não infectadas. Um outro estudo também reporta que não há uma associação significativa entre a malária e a idade materna (Lander *et al.*, 2002). Porém, alguns estudos realizados na África subsahariana têm relatado uma associação significativa entre idade materna e malária durante a gravidez (Rogerson *et al.*, 2000; Brabin, 1991). As mulheres que acorreram à consulta pré-natal no segundo e terceiro trimestre tiveram maior número de casos (n=36 e 20 respectivamente). Isto está de acordo com vários estudos que reportam o segundo trimestre e o início do terceiro trimestre como o momento do pico da prevalência (Brabin, 1983; Nosten *et al.*, 1991; Menendez, 1995; Dafallah *et al.*, 2003; Dicko *et al.*, 2003). Porém, Dicko *et al.*, 2003 reportaram o primeiro trimestre como o principal período de risco. A média de hemoglobina foi significativamente mais baixa nas

mulheres infectadas. Neste estudo, o facto de as mulheres que fizeram sulfadoxina-pirimetamina apresentarem Hemoglobina mais baixa, do que as mulheres que efectuaram outros tratamentos pode indicar que a curto prazo este medicamento deixará de ser eficaz. Os resultados de um estudo epidemiológico feito em Luanda mostraram a presença relativamente baixa de marcadores de resistência (9%) à Sulfadoxima-Perimetamina face aos marcadores de resistência à Cloroquina (Figueiredo *et al.*, 2008). Porém, a resistência à Sulfadoxima-Perimetamina encontrada nalgumas regiões de Angola (Huambo e Bié), atingiu valores de 25% (Guthmann *et al.*, 2005).

V.5- Conclusões

Os resultados sugerem que *Plasmodium falciparum* é comum nas mulheres grávidas que acorreram à consulta pré-natal, em Luanda, e que a anemia é uma complicação importante. O segundo trimestre de gravidez parece ser o pico de maior risco, podendo isto apoiar a decisão tomada quanto ao tratamento intermitente preventivo com Sulfadoxina-Perimetamina e uso de redes mosquiteiras, actualmente recomendados, em Angola.

**VI. CARACTERIZAÇÃO DA MALÁRIA PLACENTÁRIA
POR *PLASMODIUM FALCIPARUM* EM LUANDA – ANGOLA**

VI. CARACTERIZAÇÃO DA MALÁRIA PLACENTÁRIA POR *PLASMODIUM FALCIPARUM* EM LUANDA – ANGOLA

VI.1 – Introdução

A malária durante a gravidez é um problema sério na África subsahariana, que afecta aproximadamente 24 milhões de grávidas por ano (Riley *et al.*, 1989). A exposição anual, de quase 50 milhões de grávidas à malária, torna-a na infecção parasitária mais comum e mais recorrente que directamente afecta a placenta. Muitos dos efeitos deletérios da malária na gravidez são devidos à permanência de parasitas na placenta (WHO, 2004; Menendez *et al.*, 2007; ter Kuile *et al.*, 2007). Nas áreas endémicas, para além das crianças, as mulheres grávidas são o principal grupo de risco para a malária o que contribui para resultados adversos perinatais, como alto risco de morte infantil, particularmente, nas áreas de baixa endemicidade (Shulman, 1999; Anya, 2004).

Explicações correntes para o risco aumentado, em mulheres grávidas, baseiam-se na convicção de que a placenta constitui um ambiente ideal para o desenvolvimento de subpopulações de parasitas da malária que aderem aos receptores na placenta, geralmente não acessível para adesão placentária, como o sulfato de condroitina A (CSA) (Menendez *et al.*, 1995; Steketee *et al.*, 2001; Brabin *et al.*, 2004). O sequestro dos eritrócitos infectados por *P. falciparum* na placenta é, provavelmente, a maior causa da patogénese da malária durante a gravidez. Na maior parte dos casos os parasitas permanecem no lado materno da placenta mas esta síndrome materno-fetal tem riscos substanciais sobre a mãe, o feto e o recém-nascido (WHO, 2007). Devido ao facto de muitos parasitas serem sequestrados para a placenta, o esfregaço do sangue periférico, muitas vezes, não consegue detectar a infecção. A falta de um tratamento adequado e atempado leva a resultados adversos da gravidez, incluindo a anemia severa, que é a principal consequência materna da malária, por *P. falciparum*, que pode ser mortal (Okoko *et al.*, 2002; Mockenhaupt *et al.*, 2006). Os eventos patológicos podem ocorrer através de vários mecanismos: obstrução do fluxo sanguíneo; produção sistémica ou local de citocinas pró-inflamatórias; bloqueio do sinal de transdução (Hviid, 2004). Contudo, os sintomas e as complicações diferem com a intensidade de transmissão da

malária e por isso com o nível da imunidade adquirida. Existe um número de outros factores, que demonstraram influenciar a prevalência da malária placentária, incluindo idade materna, paridade, nutrição, uso de profilaxia, genética do hospedeiro, o nível de imunidade pré-gestacional, a genética do parasita, a intensidade e a estabilidade de transmissão da malária na região (Uneke, 2007; Tako, *et al.*, 2005). O impacto da malária placentária nas zonas urbanas africanas é pouco documentado (Demba *et al.*, 2006), nomeadamente na zona urbana de Luanda (Thwing *et al.*, 2009).

Uma vez que a informação é essencial para tomada de decisões conscientes na prevenção e estratégias de controlo, o principal objectivo foi de caracterizar a malária placentária na província de Luanda, onde reside 25% da população do país.

VI.2 – Pacientes, Materiais e Métodos

VI.2.1. Área e População de Estudo

O estudo foi levado a cabo na província de Luanda, Angola, onde *P. falciparum* é responsável por mais de 90% de todas as infecções (President's Malaria Initiative, 2009). Os Municípios de província de Luanda incluem Cacucaco, Viana, Cazenga, Ingombota, Kilamba Kiaxi, Maianga, Rangel, Samba e Sambizanga. O centro da cidade compreende os municípios da Ingombota e Maianga. A população de Luanda varia amplamente, uma vez que não tem havido censo da população desde 1970. Porém dados de 2000 apontavam uma população acima de 3,2 milhões (Institute for Security Studies, 2009). No entanto, Luanda ainda se tem expandido, devido à migração, o que tem levado à criação de vizinhança heterogénea nesta área. Os estudos disponíveis sobre malária em Luanda são escassos, mas um estudo recente realizado em unidades de saúde e hospitais em Luanda, mostrou que só 3,6% dos 864 pacientes envolvidos no estudo tinham gota espessa positiva (Thwing *et al.*, 2009).

VI.2.2 – Colheita dos Dados

Foram recrutadas para o estudo 1009 grávidas em trabalho de parto nas Maternidades Lucrecia Paím e Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula, desde Abril 2006 a Fevereiro 2008. Estas são dois centros obstétricos de referência que recebem pacientes de toda a província e fazem o maior número de partos em Luanda.

Os critérios de inclusão para o estudo foram gravidez de feto único e residência na província de Luanda. Os critérios de exclusão incluíram: gravidez múltipla ou de alto risco obstétrico (ARO); partos distócicos e cesarianas; assim como qualquer infecção aparente (excepto a malária), determinadas pela história clínica e exame físico obstétrico. Também foram excluídas as pacientes com VIH positivo conhecido. Das 1009 mulheres inicialmente recrutadas para o estudo foram, após aplicação dos critérios de exclusão, incluídas 866 mulheres. Depois de obtido o consentimento informado foi efectuado um questionário para a recolha de informação sócio demográfica e clínica, incluindo a idade da mãe, paridade, tempo de gestação, em semanas completas, calculadas a partir do primeiro dia da data da última menstruação (DUM), e acesso ao parto pela parteira assistente, auto informação de episódios de malárias anteriores e uso de fármacos antimaláricos, temperatura axilar (as mulheres eram consideradas como tendo febre, quando a sua temperatura axilar era $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$) e história de queixas correntes de cefaleias. A idade gestacional foi estratificada em trimestres, sendo definido como primeiro (<14 semanas), segundo (14-27 semanas) e terceiro (> 27 semanas). O exame físico obstétrico ajudou a completar os dados (tensão arterial, palidez conjuntival, nível do fundo do útero e frequência cardíaca fetal). O sangue periférico materno foi colhido por punção do dedo indicador, e depois do parto foram obtidas quatro sub-amostras da placenta e impressionadas em papel de filtro. Com vista a analisar um pouco mais o fenómeno da malária nos recém-nascidos através da transmissão placentária, também se colheu o sangue do cordão umbilical.

VI.2.3- Avaliação do Recém-Nascido

Os bebés foram pesados logo após a avaliação e estabilização, estando secos e sem roupa em pesagem única. As características da balança são as seguintes: SECA gmbh, & co. Kg, Model. 354A, (Alemanha). A DUM foi retirada do cartão de grávida de cada paciente e confirmada pela mesma (é um método de boa precisão para determinar o tempo de gestação). Para a avaliação da idade gestacional nos casos duvidosos recorreu-se à regra de MacDonald pela mensuração da Altura Uterina (AU). Assim a AU, medida em cm, multiplicada por oito é aproximadamente igual à idade gestacional (IG), em semanas (sem) dividida por sete (Neto *et al.*, 2002):

$$\text{IG (semana)} = \frac{8 \times \text{AU (cm)}}{7}$$

Por outro lado houve para alguns casos recurso à ecografia pélvica para esclarecer e/ou ajustar a idade gestacional. A par do Índice de Apgar para a avaliação da vitalidade do recém-nascido também se fez recurso à escala de Ballard.

VI.2.4. Colheita de Sangue e Diagnóstico de Malária

O sangue periférico foi obtido por picada digital ou por punção venosa para a preparação de esfregaços, gota espessa e impressão em papel de filtro. Logo após o parto a placenta foi subdividida em quatro quadrantes arbitrários e colectadas quatro sub-amostras por cada placenta, o sangue do cordão umbilical foi também colectado. O sangue foi impressionado em papel de filtro. A presença da infecção por *Plasmodium* e a identificação das quatro espécies de malária foram realizadas em todos os espécimes (sangue periférico, quatro quadrantes da placenta e do cordão umbilical) das mulheres envolvidas no estudo. A identificação das espécies de malária foi realizada pelo método baseado no PCR de acordo com Snounou *et al.*, (1996).

VI.2.4.1-Microscopia Óptica

Como descrito no ponto IV.2.3.

VI.2.4.2. Extração do DNA

A extração do DNA parasitário de amostras de sangue foi realizada como descrito por Snounou *et al.*, (1996). Foi retirado um fragmento da mancha de sangue no papel de filtro (correspondendo aproximadamente a 50µl) ao qual se adiciona 1 ml de PBS (Sigma) + Saponina 0,05% v/v (Sigma) com agitação vigorosa (vortex); após uma lavagem com PBS e sua eliminação, adicionou-se ao fragmento de papel 75 µl de tampão de lise e uma solução de pronase E (Sigma), numa concentração final de 2 mg/ml, e incubou-se a 37° C, no mínimo por 12 h. A extração do DNA foi efectuada pela adição de 500 µl de fenol (Sigma), seguida de uma centrifugação a 15.800g por 10 min a 4°C, após a qual foi recuperada a fase aquosa, que foi transferida para um novo

tubo com 500 µl de uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma). Após uma nova centrifugação de 15.800g por 15 min a 4°C, o DNA presente na fase aquosa foi precipitado com 45 µl de acetato de sódio 3 M (Sigma) e 1 ml de etanol absoluto, durante 12 h a – 20°C. O DNA precipitado foi centrifugado a 15.800g por 10 min a 4°C e lavado com etanol a 80% (v/v em água). O DNA obtido foi seco sob vácuo à temperatura ambiente. O DNA foi eluído em 20 µl de tampão TE. Durante a extracção foram incluídos controlos negativos, os quais correspondiam a papel de filtro sem amostra, intercalados entre os isolados.

VI. 2.4.3. Detecção de Plasmódios Humanos por PCR

A presença de infecção por *Plasmodium* e a identificação das quatro espécies de malária humana foi efectuada em todos os espécimes (sangue periférico, quatro quadrantes da placenta e cordão umbilical) de todas as mulheres envolvidas no estudo. A identificação foi realizada através de um método de “nested” PCR usando um par de primers específico para o género na primeira reacção, seguida por quatro reacções espécie-específicas seguindo o método descrito por Snounou *et al.*, 1996. Estes pares de primers reconhecem e permitem a amplificação da sequências dos genes da subunidade menor do RNA ribossomal (ssrRNA) de *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax*. Os produtos de DNA amplificados foram então analisadas por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

VI.2.5- Análise dos Dados Estatísticos

Os dados foram introduzidos no computador, usando o Epi Info versão 3.2.2 para o Windows. A infecção por *P. falciparum* foi considerada a variável dependente e como variáveis independentes a idade, paridade, tempo de gestação, residência e escolaridade. As variáveis foram categorizadas e usadas como a seguir: idade: ≤18 anos, 19-24 anos e >24 anos; paridade: primigestas e multigestas (≥ 2 partos); tempo gestacional: primeiro trimestre (<14 semanas), segundo trimestre (14–28 semanas) e terceiro trimestre (>28 semanas). A parasitemia foi classificada em: baixa, até 15.000 parasitas por mm³ de sangue; média, de 15.001-60.000 parasitas por mm³ de sangue; alta, acima de 60.001 parasitas por mm³ de sangue. As variáveis contínuas foram

comparadas entre os grupos pela análise do teste *t* de Student da variância ou o pelo teste U de Mann-Whitney, quando aplicável. O teste de qui-quadrado foi usado para comparar proporções dentro e entre os grupos. O valor $p < 0.05$ foi considerado significativo.

A identificação dos factores de risco para o PPT e o baixo peso à nascença foi também realizada usando os procedimentos da regressão logística. Os bebés nascidos entre as 28 e 37 semanas foram considerados prematuros. Os bebés únicos que pesem menos de 2.500 gramas são de baixo peso. Toda a análise estatística inferencial e descritiva foi realizada, usando o programa SPSS versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

VI.3. Resultados

VI.3.1. Malária e Gravidez

De Abril 2006 a Fevereiro 2008, nas Maternidades Lucrecia Paim e Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula, 866 mulheres em trabalho de parto e que deram o seu consentimento, foram incluídas neste estudo. As características das pacientes estão sumarizadas na tabela 1.II. A média de idade foi 24,2 anos (13-42) com 50% de mulheres com mais do que 24 anos. A paridade variou de um a 10, e as participantes foram divididas em 343 (39,6%) primigestas (13-35 anos) e em 523 (60,4%) multigestas (17-42 anos). Noventa e oito por cento das grávidas tinham realizado pelo menos três consultas pré-natais, 32,9% referiram malária durante a gravidez e apenas 3,8% referiram ter tomado fármacos anti-maláricos. Entre as mulheres com a história de malária durante a gravidez, 100% tiveram malária durante o terceiro trimestre, com 1 a 9 episódios (média 1,2 e uma mediana de 1). As primigestas eram significativamente mais jovens do que as multigestas ($p < 0.001$) mas todos os outros factores foram distribuídos similarmente entre os grupos.

Tabela 9 – Características das mulheres grávidas incluídas neste estudo

Designação	Total	Primigestas	Multigestas	<i>p</i> ^a
	N (866)	N (343)	N (523)	
Mediana de Idade	23 (6,10)	19 (3,96)	26 (5,44)	<0,001
Educação (n° e %)				
Sem escolaridade	83 (9,6)	34 (9,9)	49 (9,4)	0,882
Básico	547 (63)	206 (60,1)	341 (65,2)	
Médio e Mais	236 (27,3)	103 (30)	133 (25,4)	
Residência				
Urbana	304 (35)	146 (42,6)	246 (47)	0,221
Peri-urbana	565 (65)	197 (57,4)	277 (53)	
Consultas Pré-Natal (Mediana/DP)^b	4 (1,85)	4 (1,91)	4 (1,81)	0,376
Fármacos Anti-maláricas referidos (n°/%)	706 (81,5)	267 (30,8)	439 (50,7)	0,043
Só Sulfadoxina Pirimetamina (n° / %)	402 (46,4)	154 (44,9)	248 (47,4)	
Só Cloroquina (n°/%)	124 (14,3)	46 (13,4)	78 (14,9)	
Combinação com SP (n°/%)	81 (9,4)	32 (9,3)	49 (9,4)	
Outras Combinações (n°/%)	20 (2,3)	8 (2,3)	12 (2,3)	
Outros fármacos (n°/%)	79 (9,1)	27 (7,9)	52 (9,9)	
Não Utilizaram (n°/%)	158 (18,5)	76 (22,2)	84 (16,1)	
Malária referida durante a gravidez (Sim /%)	285 (32,9%)	103 (30%)	182 (34,8%)	0,165

^a Valor de *p* ^b Desvio Padrão ⁿ Número de mulheres grávidas

VI.3.2 – Detecção e Prevalência da Infecção por *P. falciparum*

A prevalência da infecção por *P. falciparum* durante o trabalho de parto variou ao longo dos meses, com a prevalência placentária mais alta em Abril 2007 (Figura 13). Considerando, pelo menos uma amostra de sangue positiva (periférica, placentária ou do cordão), 16,5% (143/866) de todas as grávidas tinham *P. falciparum* na altura do trabalho do parto detectado por método de PCR. Se considerarmos apenas aquelas com infecção do sangue periférico e placentário, 13,3% estavam infectadas na altura do parto. *P. falciparum* foi detectado no sangue periférico de 57, na placenta de 115 e no cordão umbilical de 32 grávidas. Independentemente da paridade, a infecção foi claramente mais prevalente na placenta do que no sangue periférico ($p < 0.001$).

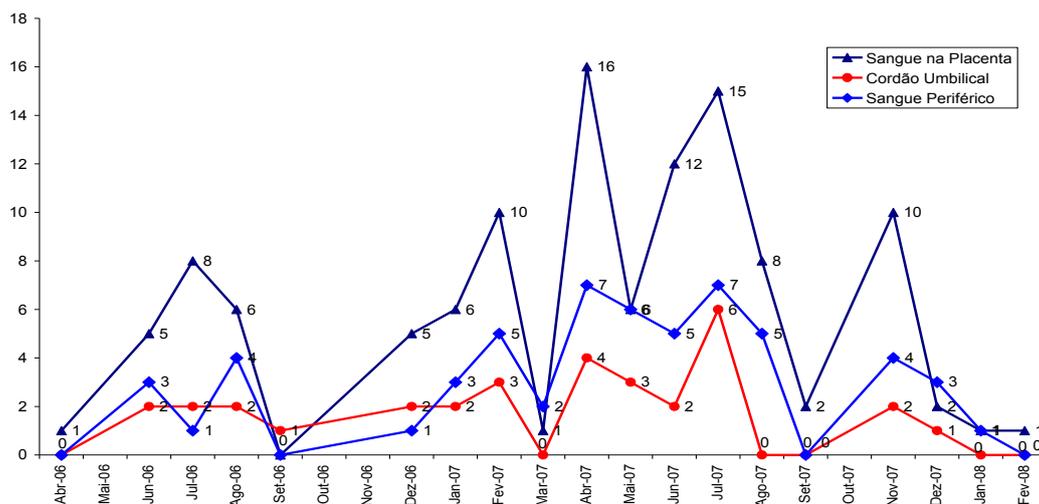


Figura 13 – Prevalência da infecção por *P. falciparum* em função dos meses do ano

Foram encontradas outras espécies de *Plasmodium* em 14 mulheres. Nove foram positivas para *P. vivax*, uma foi positiva para *P. ovale* e quatro para *P. malariae* (Figura 14).

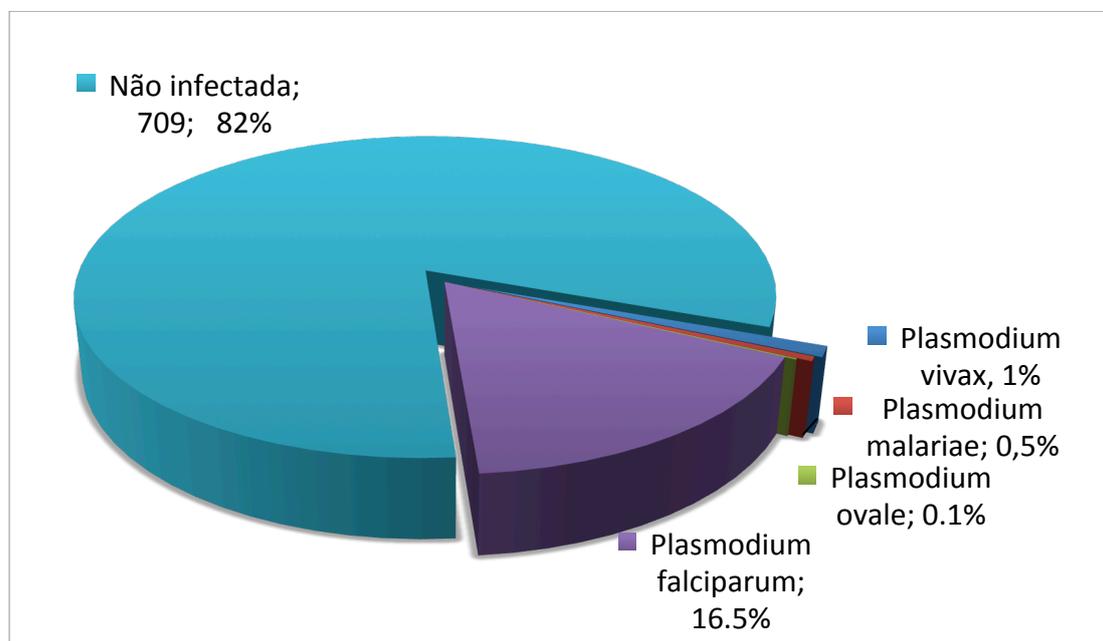


Figura 14 – Prevalência da infecção por *Plasmodium*

De todas as grávidas com infecção por *P. falciparum*, 11% tinham parasitas em todos os tipos de amostras, 48% só na placenta, 6% só no sangue periférico, 8% no

cordão umbilical, 21% no sangue periférico e placenta, 5% no cordão umbilical e placenta e 1% no sangue periférico e cordão umbilical (Figura 15).

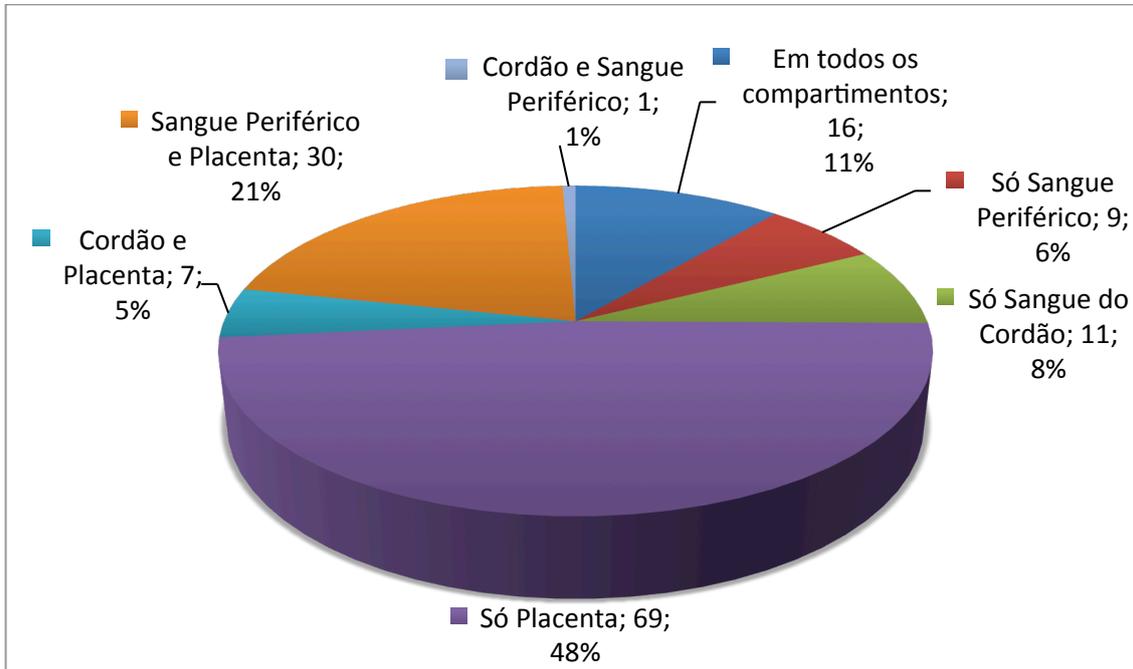


Figura 15 – Distribuição da infecção por *P. falciparum* em função do tipo de amostra

VI.3.3 – Factores de Risco para a Infecção por *Plasmodium* na Altura do Parto

VI.3.3.1 – Idade Materna

A prevalência da infecção por *P. falciparum* entre mulheres adolescentes, jovens e adultas foi comparada, tendo sido significativamente mais comum em adultas [> 24 anos] (47,7%) do que em jovens [>18 anos] (34,4%) e adolescentes [≤ 18 anos] (17,9%). Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre mulheres jovens e adultas (OR 28 [95% IC 16,3-48,1] $p<0,001$). As adolescentes também tiveram um risco aumentado de infecção placentária e periférica quando comparadas com mulheres adultas (OR 1,9 [95% IC 1,21-2,90] $p=0,006$) e (OR 2 [95% IC 1,15-3,67] $p=0,019$), respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10 - OR ajustado entre variáveis de risco potencial e os diferentes tipos de malária

Designação	Total			Cordão Umbilical		Sangue Periférico		Sangue na Placenta			
	%	N (866)	%	(OR e 95%IC)	<i>p value</i>	%	(OR e 95%IC)	<i>p value</i>	%	(OR e 95%IC)	<i>p value</i>
Idade (anos)											
≤ 18 anos	20,4	177	5,08%	1,6 (0,70 - 3,41)	0,381	10,9%	2 (1,15 - 3,67)	0,019	19,8%	1,9 (1,21 - 2,90)	0,006
19 - 24 anos	37,4	324	3,40%	0,8 (0,41 - 1,83)	0,86	6,8%	1 (0,60 - 1,83)	0,96	11,4%	0,7 (0,50 - 1,16)	0,252
≥ 25 anos	42,1	365	3,40%	0,8 (0,39 - 1,69)	0,718	4,4%	0,5 (0,28 - 0,93)	0,036	11,8%	0,8 (0,53 - 1,19)	0,313
Paridade											
Primigesta	39,6	343	5,20%	2 (0,98 - 4,10)	0,075	7,9%	1,4 (0,81 - 2,40)	0,271	15,5%	1,4 (0,91 - 2,01)	0,154
Multigesta	60,4	523	4,08%				5,70%			11,90%	
Educação (Nº e %)											
Sem escolaridade	9,6	83	0%	indefinido	0,116	8,4%	1,4 (0,59 - 3,08)	0,629	13,3%	1,0 (0,51 - 1,95)	0,87
Básico	63	547	4,90%	3 (1,24 - 8,55)	0,018	8,2%	2,2 (1,19 - 4,40)	0,01	14,3%	1,3 (0,83 - 1,92)	0,312
Médio e Mais	27,3	236	2,10%	0,5 (0,18 - 1,27)	0,192	2,1%	0,2 (0,09 - 0,61)	0,002	11%	0,8 (0,47 - 1,19)	0,276
Residência											
Urbana	45,3	392	2,50%	0,5 (0,25 - 1,14)	0,149	5,4%	0,7 (0,39 - 1,20)	0,236	11,7%	0,7 (0,52 - 1,16)	0,263
Peri Urbana	54,7	474	4,64%				7,60%			14,60%	
Malária na gravidez											
Sim	32,9	285	0,70%	1,2 (0,59 - 2,55)	0,71	10,9%	1,8 (1,03 - 3,06)	0,049	18,2%	1,8 (1,23 - 2,73)	0,003
Não	67,1	581					4,50%			10,80%	

OR= odds ratio; CI= intervalo de confiança

VI.3.3.2 – Paridade

Em relação à paridade, 7,5% (343/866) das primigestas e 8,1% (523/866) das multigestas estavam infectadas com *P. falciparum* durante o trabalho de parto, considerando pelo menos uma das amostras positiva (OR 1,51 [95% IC 1,04-2,18], $p=0.03$). A mais alta prevalência em termos de placenta ou de sangue periférico também ocorreu em primigestas. Contudo, essas diferenças entre grupos de paridade não foram significativas. Fez-se uma análise estratificada com vista a explorar um pouco mais a relação entre idade e paridade. Entre as primigestas a idade é um factor de risco importante de malária placentária (OR 28 [95% IC 16,3-48,14], $p<0.005$). Contudo, tal relação não foi observada em multigestas (Tabela 10).

VI.3.3.3 – Educação

Foi verificado que as grávidas com baixo nível de escolaridade estavam associadas com a presença de *P. falciparum* no sangue periférico (OR 2,2 [95% IC 1,19-4,57], $p=0.015$) e do cordão (OR 3,2 [95% IC 1,24-8,55], $p=0.018$), respectivamente (Tabela 10 e Figura 16).

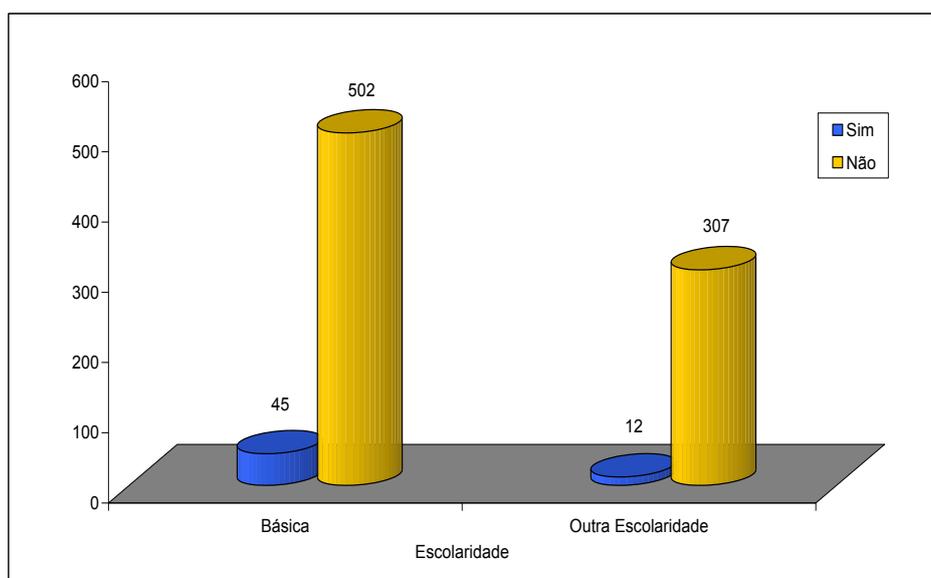


Figura 16 – Relação da infecção no sangue periférico e escolaridade

VI.3.3.4 – Residência

A história da malária durante a gravidez estava significativamente correlacionada com a presença do *Plasmodium* no sangue periférico e malária placentária durante o trabalho de parto. Além disso, a malária placentária (14,6%) não foi significativamente mais comum nas mulheres que vivem nas áreas sub ou peri-urbanas (OR 0,7 [95% IC 0,52-1,16], p=0,263), mas foi significativamente mais comum nas mulheres que tiveram malária durante a gravidez (OR 1,8 [95% IC 1,23-2,73], p<0,05). Viver na área periférica, é um factor de risco significativo para o parto pré-termo (OR=2,4 [IC (1,60 – 3,64) p<0,05]).

VI.3.3.5 – Peso à Nascimento

No estudo 92,3% das crianças recém-nascidas tiveram peso igual ou superior a 2.500g. O baixo peso à nascença ocorreu em 67 casos, o que corresponde a 7,7%. Quando relacionamos o baixo peso à nascença com a infecção por *P. falciparum*, não encontramos resultados estatisticamente significativos (OR 0,9 [95% IC 0,57-1,68], p>0.005).

A frequência do trabalho de parto pré-termo na população em estudo foi de 15,2%.

VI.3.3.6 – Morte Intra-uterina

A morte intrauterina no nosso estudo ocorreu em 25/866 casos (2,9%). Quatro das 25 (3,5%) mortes intrauterinas ocorreram em mulheres com malária placentária por *P. falciparum* (OR 1,2 [95% IC 0,41-3,68], p=0,925). Vinte por cento das mortes (cinco casos) ocorreram em idades inferiores ou iguais a 18 anos; 28% (sete casos) no grupo etário dos 19-24 anos e a maior parte das mortes intrauterinas 52% ocorreu no grupo etário igual ou superior 25 anos (figura 17 e 18).

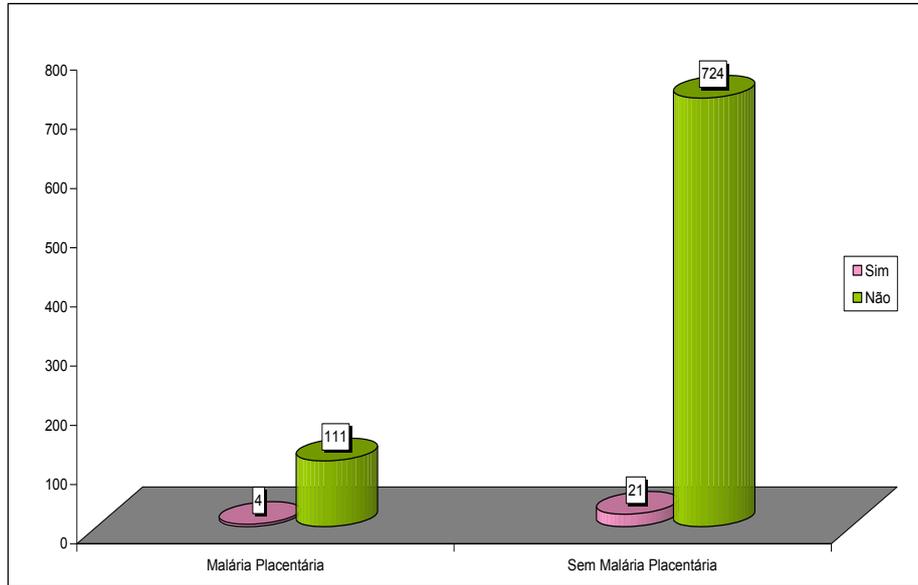


Figura 17 – Relação da morte intrauterina e malária placentária

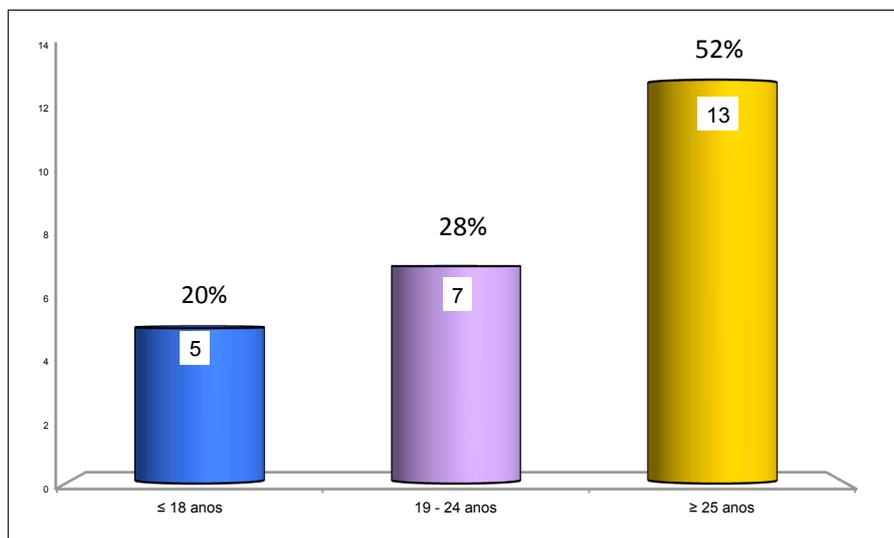


Figura 18 – Distribuição da morte intrauterina segundo o grupo etário

VI.4 – Discussão

Embora o problema da malária na gravidez tenha sido relatado pela primeira vez na literatura médica há mais de 70 anos (Wickaramsuriya, 1937) tem sido no entanto uma área considerada ainda de investigação negligenciada. A malária na gravidez é frequentemente subestimada quer como problema de saúde pública, quer pelos clínicos que tratam de casos individuais (Christopher *et al.*, 2005). Nos nossos dias já está bem definido que as mulheres grávidas têm um risco aumentado de contrair malária. Apesar disso os dados epidemiológicos das mulheres grávidas angolanas são escassos. Tanto quanto é do nosso conhecimento este é o primeiro trabalho que avalia a prevalência *P. falciparum* em mulheres grávidas angolanas que vivem na província de Luanda e procura identificar factores de risco relacionados com a infecção. Com esses objectivos, um total de 866 mulheres em trabalho de parto foram incluídas no estudo entre Abril de 2006 e Fevereiro de 2008, na Maternidade Lucrecia Paim (Município da Ingombota) e Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula (Município de Sambizanga).

Devido ao sequestro dos glóbulos vermelhos parasitados na placenta o uso de amostras periféricas para detectar a malária na gravidez não é o método mais adequado. No entanto, é o único possível antes do parto. Foram encontradas evidências consistentes de transmissão congénita uma vez que dentre as mulheres grávidas positivas foi identificada a presença de *P. falciparum* no sangue periférico e placenta em 21%. Um facto interessante é que das 16,5% das mulheres infectadas com *P. falciparum* só em 8% foi detectado no cordão umbilical. A transmissão transplacentária dos eritrócitos infectados durante a gravidez, seguida da evasão dos parasitas da circulação materna e a persistência na circulação fetal são a explicação mais plausível para este resultado. Isto pode, também, ser sustentado pelo facto de o feto não ter desenvolvido uma imunidade adequada, tanto celular como humoral, e a transferência passiva dos anticorpos maternos ser insuficiente ou incompleta para eliminar os parasitas adquiridos no período pré-natal. Apesar de todos os cuidados que foram tomados para se evitar a contaminação durante a colheita da placenta e do cordão, esta possibilidade não foi excluída. A prevalência da infecção materna durante o trabalho de parto (definida como *P. falciparum* no sangue periférico, na placenta ou cordão umbilical) foi de 16,5%, usando as amostras de PCR.

As parasitemias do sangue do cordão não têm sido frequentemente relatadas nos esfregaços do sangue examinado por microscopia óptica e estão muito mais associadas com a parasitemia placentária do que com a parasitemia materna (Walter *et al.*, 1982; McGready *et al.*, 2003; Ismail *et al.*, 2000). Nas áreas holoendémicas do Quênia, a microscopia não demonstrou espécies de *Plasmodium* no sangue do cordão, contrariamente o método de PCR no cordão umbilical demonstrou uma prevalência de 32% para o *P. falciparum*, 23% para *P. malariae* e 21% para *P. ovale* (Tobian *et al.*, 2000).

Assim, uma em cada seis mulheres grávidas (866/143) que vive na Província de Luanda tem evidência de infecção por *Plasmodium* no momento do trabalho de parto. Numa revisão de 20 estudos de países africanos com transmissão estável, a prevalência média da infecção materna (definida apenas como malária placentária e periférica) foi de 27,8% (Rogerson *et al.*, 2007). Contudo, esta estimativa é baseada em dados da microscopia óptica. Estudos mais recentes, usando amostras de PCR, apontam uma prevalência materna muito mais elevada (Mayengue *et al.*, 2004 e Walker-Abbey *et al.*, 2005). Por isso a infecção materna na província Luanda é mais baixa do que noutros países africanos caracterizados por transmissão intensa da malária. Tem por isso aspectos particulares. Muitos trabalhos mostraram que a prevalência da malária placentária é mais elevada em primigestas do que em multigestas (McGregor *et al.*, 1984 e Brabin 1983). No presente estudo, as primigestas e secundigestas estavam mais propensas a ter malária placentária, mas só as que tinham uma idade igual ou inferior a 18 anos ($p < 0.001$). As mulheres que tinham poucos filhos (até dois filhos) não apresentaram riscos aumentados comparados com os das múltiparas ($p > 0,05$).

O verdadeiro peso da malária em Luanda, capital de Angola, tem sido matéria de debates. Contudo, em 2006 de acordo com um estudo da *Angola Malaria Indicator Survey* (Consultoria de Gestão e Administração em Saúde – COSEP Lda, 2007), a percentagem de crianças (<5 anos de idade) com malária era baixa (5,5%) assim como em mulheres entre os 14 e os 59 anos (1%), aumentando um pouco em mulheres grávidas (6,9%). Além disso a vigilância entomológica de rotina, de Janeiro 2007 a Janeiro de 2008, em 350 casas de Luanda colectaram apenas 35 mosquitos *Anopheles* e não se encontraram locais de postura adequados (President's Malaria Initiative, 2009). Para além disso, um estudo feito em 30 instituições de saúde e hospitais de Luanda também encontrou uma incidência mais elevada de malária nas crianças mais velhas e

adultos do que nas crianças < 5 anos de idade (Thwing *et al.*, 2009) Todos estes dados sustentam a hipótese de um nível muito baixo de transmissão da malária em Luanda. O nosso estudo está em consonância com estes dados uma vez que a paridade (factor de risco major em áreas de alta transmissão) não é considerada como factor de risco para a malária materna, periférica e placentária.

A idade foi identificada como factor de risco nesta população, mas só para a malária placentária. Depois de estratificadas por paridade descobrimos que as primigestas (mas não as multigestas) com idade ≤ 18 anos de idade, estavam mais propensas a ter malária placentária. Durante um longo período de tempo, a idade nunca foi implicada na malária durante a gravidez, contudo estudos recentes têm apontado a idade como um factor de risco (Rogerson *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002; Dicko *et al.*, 2003; Bouyou-Akotet *et al.*, 2003; Tako *et al.*, 2005; Walker-Abbey *et al.*, 2005;). A importância da idade na malária placentária é ainda mais pertinente uma vez que tem sido relatado que os anticorpos para os outros antigénios, para além daqueles que previnem a citoaderência do parasita ao CSA, são importantes na redução da mesma (Taylor *et al.*, 2004). As hipóteses de um baixo nível de transmissão da malária em Luanda e conseqüentemente uma aquisição retardada da imunidade pode explicar o efeito da idade nesta área: mulheres < 18 anos de idade têm níveis mais baixos de imunidade adquirida e por isso estão mais dependentes da imunidade associada à gravidez (anticorpos anti-citoaderência).

Os estudos epidemiológicos atrás mencionados descrevem que, enquanto que os anofelinos eram abundantes nas áreas periféricas de Luanda, só um pequeno número foi recolhido em algumas áreas centrais da cidade (vinte e um dos 35 *Anopheles* capturados em Luanda provieram da municipalidade peri-urbana de Viana).

O estudo conduzido por uma equipa da *President's malaria initiative* (PMI, 2009) também verificou que a distância a partir do centro da cidade era um factor crítico na susceptibilidade para a malária. Verificou-se que de entre os participantes com febre, aqueles cuja unidade de saúde distava mais de 15 km do centro da cidade estava quase sete vezes mais propensas a ter malária do que os participantes das unidades de saúde dentro dos 15 km centrais. Em conjunto estes resultados indicam que a transmissão da malária é muito baixa nos centros urbanos de Luanda, mas pode ainda ser um problema na periferia da cidade. Os nossos dados indicam que a residência periurbana é um factor de risco para a malária materna e placentária. Nos outros estudos

focalizando grandes e médias cidades, foram detectados heterogeneidades nos índices malariométricos e distribuição do vector dentro de pequenas distâncias (Robert *et al.*, 2003 e Sattler *et al.*, 2005). Uma vez que a cidade de Luanda ainda está a expandir-se, e novos habitantes vêm das áreas rurais, pode manter alta a endemicidade da malária nas áreas periféricas de Luanda. De facto, na província de Luanda a heterogeneidade da transmissão da malária pode estar relacionada com o grau de urbanização, a sua proximidade aos possíveis locais de criação de vectores e também com a diversidade do estado sócio-económico.

Quando se iniciou o presente estudo tinha sido adoptado recentemente o tratamento intermitente preventivo (TIP) com sulfadoxina-pirimetamina (SP) nas mulheres grávidas. Esta nova política só foi parcialmente seguida uma vez que menos de 50% das mulheres grávidas envolvidas neste estudo tomaram SP.

Foi encontrada uma associação significativa entre história de malária na gravidez e malária durante o parto. Contudo, deve-se ter algum cuidado na interpretação destes resultados uma vez que a informação provém somente, de um questionário às mulheres grávidas envolvidas no estudo. Além disso, 99,5% das mulheres durante a gravidez referiram ter tomado fármacos antimaláricos, o que sugere, que haja falta de eficácia dos mesmos. Isto é também sugerido pela falta de associação entre o uso dos fármacos antimaláricos e a prevalência da infecção durante o parto. A razão possível para isso pode incluir a falha em tomar a droga consistentemente ou a presença nesta área de estirpes de *P. falciparum* resistentes à droga (Figueiredo, *et al.*, 2008), ou a contrafacção do medicamento. Contudo, nos nossos valores de regressão logística multivariada, o uso de fármacos antimaláricos foi considerada como uma variável dicotómica. Para uma melhor compreensão desta matéria, seria necessário distinguir o TIP de outro tipo de tratamento, mas esta informação não estava disponível.

A frequência do trabalho de parto pré-termo e o baixo peso à nascença na população em estudo foi de 15,2% e 7,7%, respectivamente. Verificou-se que viver na área periférica, aumenta o risco de parto pré-termo (OR=2,40 [IC (1,60 – 3,64) p<0,05]. O que enfatiza a importância do estado sócio-económico mais pobre na periferia. Por outro lado a malária placentária não foi identificada como um factor de risco quer para o trabalho de parto pré-termo quer para o baixo peso à nascença. Depois do primeiro relatório de Bruce-Chwatt (1952), têm surgido muitos outros estudos, demonstrando uma forte associação entre malária placentária e baixo peso à nascença (Jeliffe, 1968,

McGregor *et al.*, 1983; Watkinson and Rushton, 1983; Cot *et al.*, 1992, Matteelli *et al.*, 1996; Steketee *et al.*, 1996a). A detecção da malária placentária por PCR pode ser uma das causas deste resultado. De facto, há estudos que demonstram que as mulheres que continuam capazes de controlar a densidade parasitária (sub-microscopicamente) podem não ter resultados deletérios da gravidez associados à malária placentária (Mockenhaupt *et al.*, 2006 e Mankhambo *et al.*, 2002).

VI.5 – Conclusões

Na província de Luanda uma em cada seis mulheres tinha *P. falciparum* durante o parto. A residência e a história de malária durante a gravidez estavam, significativamente, associadas com a infecção materna no parto, mas a paridade e o uso de fármacos antimaláricos não. *P. falciparum* na placenta era, de forma significativa, mais frequente em mulheres com menos de 18 anos de idade e em primigestas. Todavia, a malária placentária não se associou a maus resultados da gravidez. Todos estes dados sugerem que na província de Luanda, a malária durante a gravidez tem características particulares. Estes resultados contribuirão para a toma de decisões conscientes sobre as estratégias de controlo da malária na gravidez, uma vez que muitas, e provavelmente a maior parte, das mortes materna e perinatal, em consequência da malária, são preveníveis (Hinderaker, 2003).

VII. GENOTIPAGEM DE PLASMODIUM FALCIPARUM EM MULHERES COM INFECÇÃO PLACENTÁRIA EM LUANDA

VII. GENOTIPAGEM DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* EM MULHERES COM MALÁRIA PLACENTÁRIA EM LUANDA

VII.1. Introdução

A infecção devida ao *P. falciparum* é comum na gravidez aumentando o risco de morte materna e neo-natal. (Guyatt *et al.*, 2001 e Steketee *et al.*, 2001). Apesar dos avanços significativos no tratamento e prevenção obtidos nas últimas décadas, a malária ainda ameaça a vida de milhões de mulheres e crianças nos países tropicais (Jane *et al.*, 2010). Nas áreas endémicas, os indivíduos infectados geralmente albergam vários genótipos do parasita. A distribuição e a associação da diversidade de *P. falciparum* a determinantes da infecção têm sido investigadas em áreas com vários perfis de endemicidade, com o intuito de se esclarecer a dinâmica das subpopulações de *P. falciparum* e sua influência no desenrolar da infecção e doença. Muitos estudos basearam-se em marcadores antigénicos de superfície (proteína 1 da superfície do merozoito [MSP-1] e proteína 2 da superfície do merozoito [MSP-2], proteína circum-esporezoítica [CSP], e a proteína rica em glutamato [GLURP], que estão sob forte selecção devido às respostas imunológicas do hospedeiro (por exemplo Rich *et al.*, 2000, Adwalla *et al.*, 2001). Alguns estudos indicam que uma maior diversidade parasitária está associada à infecção na grávida (Chleiermacher *et al.*, 2001) mas não foram encontrados genótipos específicos associados à infecção da placenta (Mayengue *et al.*, 2004). A multiplicidade de infecção MOI (*multiplicity of infection*), definida pelo número mínimo de alelos presentes num indivíduo, já foi correlacionada com a paridade nos Camerões (Walker-Abbey *et al.*, 2005), no Senegal (Schleiermacher *et al.*, 2002), no Gabão (Kassberger *et al.*, 2002) e em Moçambique (Saute *et al.*, 2002). Contudo não conseguiram associar a diminuição na MOI com a paridade, enquanto que no trabalho realizado por Beck e colaboradores (2001) observou-se um decréscimo significativo na MOI, quando comparadas primíparas com múltiparas.

A utilização de microssatélites para caracterizar populações de *P. falciparum* tem vindo a ser cada vez mais frequente, pois estes são marcadores mendelianos neutros com variabilidade, constituindo ferramentas mais apropriadas para a investigação genética da estrutura da população, quando comparadas com os marcadores atrás mencionados de menor variabilidade (Jarne *et al.*, 1996). Existem

vários estudos com microssatélites sobre a análise genética das populações de *P. falciparum* em África (e.g. Durand *et al.*, 2003; Bogreau *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2007), Aproximadamente 25% da população Africana vive em cidades, e a taxa de urbanização (2–6% por ano) nos países em desenvolvimento permanece alta (Keiser *et al.*, 2004). A urbanização impede a transmissão da malária, aumentando o número de indivíduos não-imunes nas áreas urbanas (Robert *et al.*, 2003), e estando a maior parte em risco de contrair formas potencialmente severas da doença (Keiser *et al.*, 2004). O conhecimento da estrutura da população parasitária é essencial para a compreensão dos estudos epidemiológicos, da evolução da compatibilidade vector/parasita e da dinâmica da resistência aos fármacos (Carrara *et al.*, 2006).

Efectuamos um estudo longitudinal para caracterizar as subpopulações de *P. Falciparum* em três compartimentos da mulher grávida em Luanda, nomeadamente no sangue periférico materno (SP), umbilical (CU) e placentário (PL).

VII.2 – Pacientes, Materiais e Métodos

VII.2.1. Área e População de Estudo

O estudo foi levado a cabo nas Maternidades Lucrecia Paim e Hospital Geral Especializado Augusto Ngangula em Luanda. A área e população de estudo estão descritas no capítulo VI. As amostras do sangue periférico, da placenta e do cordão umbilical de 143 grávidas positivas por PCR para *P. falciparum*, em pelo menos um dos compartimentos, foram genotipadas utilizando microssatélites.

A extracção do DNA das amostras e a identificação da espécie de *Plasmodium* foram realizadas como descrito em VI.2.4.2.

VII.2.2. Amplificação de DNA

Tendo em consideração a baixa concentração de DNA de parasita obtido no processo de extracção, o mesmo foi submetido a amplificação com o kit GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a cada microlitro de DNA foram adicionados 9µl de *SampleBuffer* e as amostras incubadas a 95°C por três minutos. De seguida adicionaram-se 9µl de

ReactionBuffer e 1µl de *EnzymeMix*. As amostras foram incubadas a 30°C por 90 minutos e de seguida 65°C por 10 minutos. O DNA foi guardado a -20°C. O DNA resultante da amplificação foi purificado, de forma a remover o excesso de primers e dNTPs utilizados na reacção. A cada amostra de DNA amplificado foram adicionados 20µl de água MiliQ e 4µl de uma solução de acetato de sódio (1,5M) e EDTA (0,25M, pH >8.0). As amostras foram misturadas no vortex e foram adicionados 100µl de etanol absoluto, de forma a precipitar o DNA. A precipitação decorreu durante a noite à temperatura ambiente. As amostras foram de seguida centrifugadas a 12000 rpm durante 15 minutos de modo a recolher o DNA no fundo do tubo. Após o sobrenadante ter sido removido, o DNA foi lavado com 150µl de etanol a 70%. As amostras foram de novo centrifugadas a 12000rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi removido e o DNA foi seco em vácuo (5 minutos a 30°C), e eluído em 20µl de TE.

VII. 2.3. Genotipagem de Microsatélites

A amplificação do DNA foi feita por PCR em multiplex, como descrita por Anderson *et al.*, (1999) e Conway *et al.*, (2001). A amplificação dos loci foi efectuada por PCR multiplex *semi-nested*, composto por duas reacções. Na primeira foram utilizados os primers não marcados, enquanto que na segunda foi utilizado o primer com um marcador de fluorescência, e o respectivo par. As primeiras reacções foram efectuadas dois a dois, utilizando dois a três pares de primers cada, enquanto que para a segunda reacção foram juntas três das primeiras reacções (ver tabela 11)

Tabela 11. Primers utilizados para a amplificação dos microssatélites por PCR

Primer	Marcação (Cor)	Sequência	Cromossoma
TA1-3(F) TA1-R TA1-F	Azul	CTACATGCCTAATGAGCA TTTTATCTTCATCCCCAC CCGTCATAAGTGCAGAGC	6
ARA2-3(F) ARA2-R ARA2-F	Amarelo	GTACATATGAATCACCAA GCTTTGAGTATTATTAATA GAATAAACAAAGTATTGCT	11
Pfg377-3(R) Pfg377-F Pfg377-R	Amarelo	TTATGTTGGTACCGTGTA GATCTCAACGGAAATTAT TTATCCCTACGATTAACA	12
PfPK2-3(R) PfPK2-F PfPK2-R	Amarelo	CCTCAGACTGAAATGCAT CTTTCATCGATACTACGA AAAGAAGGAACAAGCAGA	12
TA87-3(F) TA87-R TA87-F	Verde	ATGGGTAAATGAGGTACA ACATGTTTCATATTACTCAC AATGGCAACACCATTCAAC	6
TA109-3(F) TA109-R TA109-F	Azul	TAGGGAACATCATAAGGAT CCTATACCAAACATGCTAAA GGTTAAATCAGGACAACAT	6
TA81-3(F) TA81-R TA81-F	Azul	GAAGAAATAAGGGAAGGT TTTCACACAACACAGGATT TGGACAAATGGGAAAGGATA	5
TA42-3(F) TA42-R TA43-F	Verde	ACAAAAGGGTGGTGATTCT GTATTATTACTACTACTAAAG TAGAAACAGGAATGATACG	5

Os fragmentos amplificados foram separados por electroforese de capilaridade num sequenciador automático (ABI 3730, AppliedBiosystems) na. O tamanho dos alelos foi determinado pela análise dos electroferogramas, utilizando o software GeneMarker (Softgenetics). Apenas os picos com intensidade de fluorescência superior a 300 foram registados. Foi registado, para cada amostra e cada *locus*, o número e o tamanho dos alelos presentes. Para a análise estatística, apenas o valor de dimensão do alelo predominante (com maior intensidade de fluorescência) foi utilizado.

VII.2.4. Multiplicidade de Infecções

Como os estadios eritrocíticos de *Plasmodium* são haplóides, cada alelo registado representa um genótipo presente na amostra. Assim, a MOI, que se refere ao número de genótipos mínimo por amostra, foi determinada como o maior número de alelos

detectados para cada *locus* em cada população. Adiferença entre os grupos foi analisada pelo teste Kruskal-Wallis, utilizando o software GraphPad (Prism).

VII.2.5. Diversidade Genética

A diversidade genética das populações foi estimada determinando, para cada *locus*, os valores de números de alelos (N_a), riqueza alélica (R_a), e de heterozigotia esperada. A riqueza alélica, medida do número de alelos, independente da dimensão da amostra, foi determinada utilizando o programa FSTAT v. 2.9.3 (Goudet, 1995). O Microsoft® Office Excel Microsatellite Tool Kit foi usado para obter os valores das frequências alélicas e a heterozigotia esperada (H_e), calculada como em Anderson *et al.*, (2000).

A diferenciação genética entre populações (F_{st}) foi calculada segundo Weir&Cockerham (1984) também no FSTAT.

VII.2.6. O Desequilíbrio de Linkage

Os testes de LD foram efectuados no programa GENEPOP v. 4.0 (Raymond & Rousset, 1995), por teste estatístico G *log-likelihood* (Tabelas de população nos anexos 1 e 2).

Nos testes estatísticos múltiplos o valor nominal de significância ($\alpha=0,05$) foi ajustado pela correcção de Bonferroni de modo a evitar erros do tipo I (falsa rejeição) (Holm, 1979).

VII.3. Resultados

A análise dos dados foi realizada em 206 amostras (61 de sangue periférico, 36 de sangue do cordão umbilical e 118 de sangue da placenta). Apenas 16 mulheres possuíam amostras em todos os compartimentos e a maioria, 67, apenas tinham parasitas na placenta (figura 19).

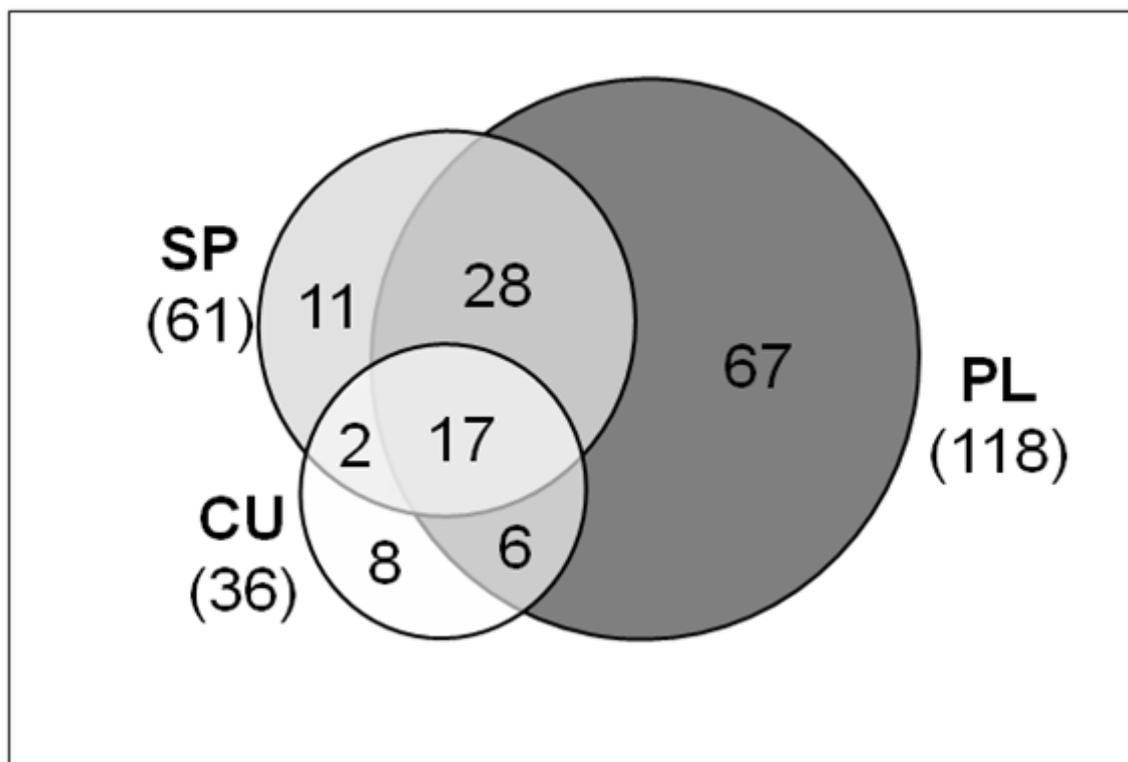


Figura 19 – Número de amostras analisadas nos diferentes compartimentos. PL=Placenta, SP=Sangue Periférico e CU=Cordão Umbilical.

VII.3.1. Diversidade Genética

Os nove *loci* estudados mostraram-se polimórficos em todos os compartimentos. O número de alelos estudados por *locus* nos três compartimentos varia de 8 (TA81) a 14 (PfPK2) para o SP; 6 (TA42) a 12 (TA109, PfPK2 e ARA2) para o CU e 11 (TA81) a 21 (PfPK2) para a PL. A riqueza alélica que é a medida do número médio de alelos independente do tamanho de amostra foi de $11 \pm 2,06$, $9,2 \pm 2,27$ e $14,2 \pm 2,99$ para SP, CU e PL respectivamente (Tabela 11). A diferença entre compartimentos não é tão acentuada. A média da heterozigotia esperada ($H_e + SD$) foi alta no SP ($H_e=0,838 \pm SD=0,06$) (Tabela 11).

A dimensão dos alelos foi identificada pela amplificação de *locus* de microssatélites, através de electrofluorogramas como o apresentado na figura 21, no SP, CU e PL de mulheres grávidas (Tabela 12).

As frequências alélicas dos *loci* microssatélites de *P. falciparum*, no SP, CU e PL de mulheres grávidas, estão descritos na figura 21.

Tabela 11 – Número de alelos, (Na), heterozigotia esperada (He) e número efectivo de alelos (Ra) por locus, na placenta, sangue periférico e sangue do cordão umbilical

locus	SP			CU			PL		
	Na	Ra	He	Na	Ra	He	Na	Ra	He
Pfg377	10	9,642	0,856	9	8,848	0,729	15	11,26	0,825
TA87	9	7,946	0,758	8	7,886	0,699	12	8,975	0,77
TA81	8	7,909	0,835	9	8,958	0,849	11	9,001	0,837
TA109	13	12,278	0,911	12	12	0,924	14	11,904	0,881
PfPK2	14	12,57	0,889	12	11,926	0,801	21	15,397	0,886
TA42	10	9,249	0,737	6	6	0,768	12	8,717	0,686
ARA2	13	11,868	0,865	12	11,782	0,83	16	11,453	0,831
TA102	10	9,348	0,798	7	6,891	0,67	14	9,792	0,817
TA1	12	11,232	0,897	8	7,963	0,854	13	11,331	0,897
Média	11	10,227	0,838	9,222	9,139	0,792	14,222	10,87	0,826
Desvio Padrão	2,062	1,804	0,062	2,279	2,262	0,082	2,991	2,096	0,066

PL=Placenta, SP=Sangue Periférico e CU=Cordão Umbilical.

Tabela 12 – A dimensão dos alelos identificada na placenta, sangue periférico e cordão umbilical.

Locus	SP	CU	PL
Pfg377	62-107	59-116	59-119
TA87	86-113	80-110	71-119
TA81	106-145	106-145	94-145
TA109	152-221	134-221	152-221
PfPK2	144-213	138-228	126-213
TA42	176-248	152-245	140-248
ARA2	73-106	55-112	58-115
TA102	115-188	80-130	76-188
TA1	163-256	154-181	154-256

PL=Placenta, SP=Sangue Periférico e CU=Cordão Umbilical.

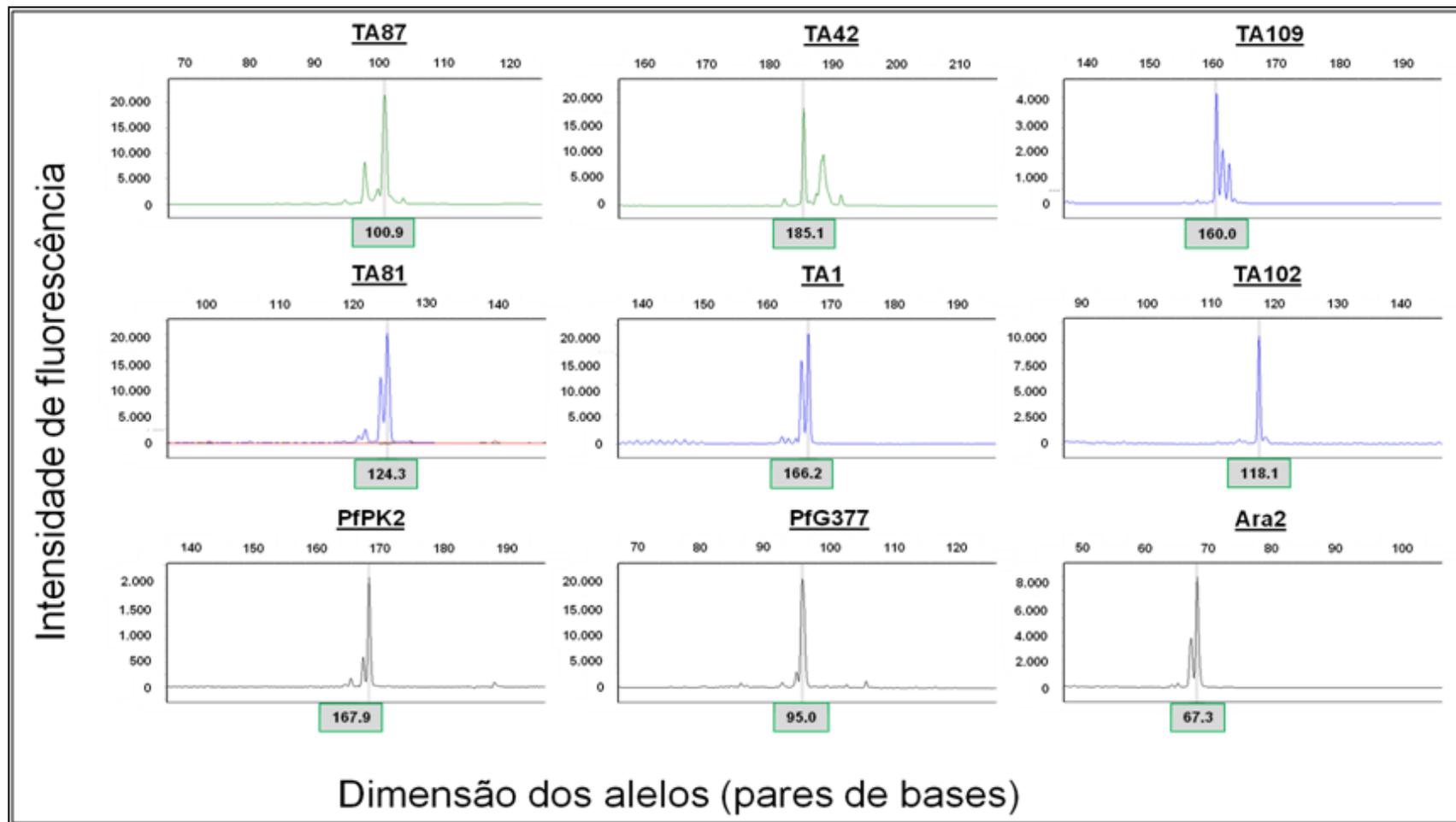


Figura 20 – Amplificação dos loci de microssatélites de *P. falciparum* para o clone K1

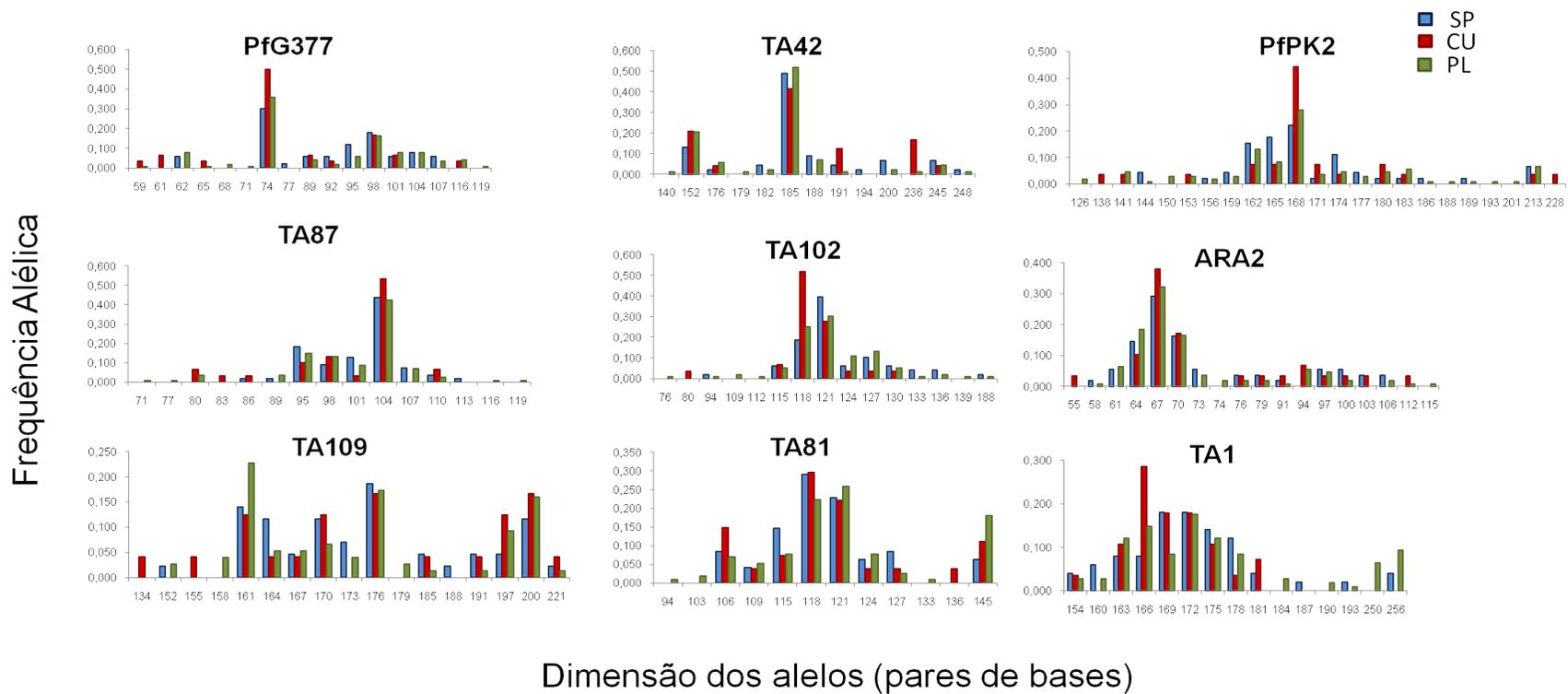


Figura 21 – Frequência alélica dos nove loci estudados

Foram ainda analisadas as infecções múltiplas por *locus* (figura 22). Infecções múltiplas consideradas como percentagem de amostras para as quais foram verificados > 1 pico na amplificação de cada *locus* de microssatélites; para a análise genotípica dos vários *loci* tiveram-se em conta, em amostras com múltiplas infecções, apenas o alelo predominante, havendo 6 picos para a PL; 2 para CU e nenhum para o SP.

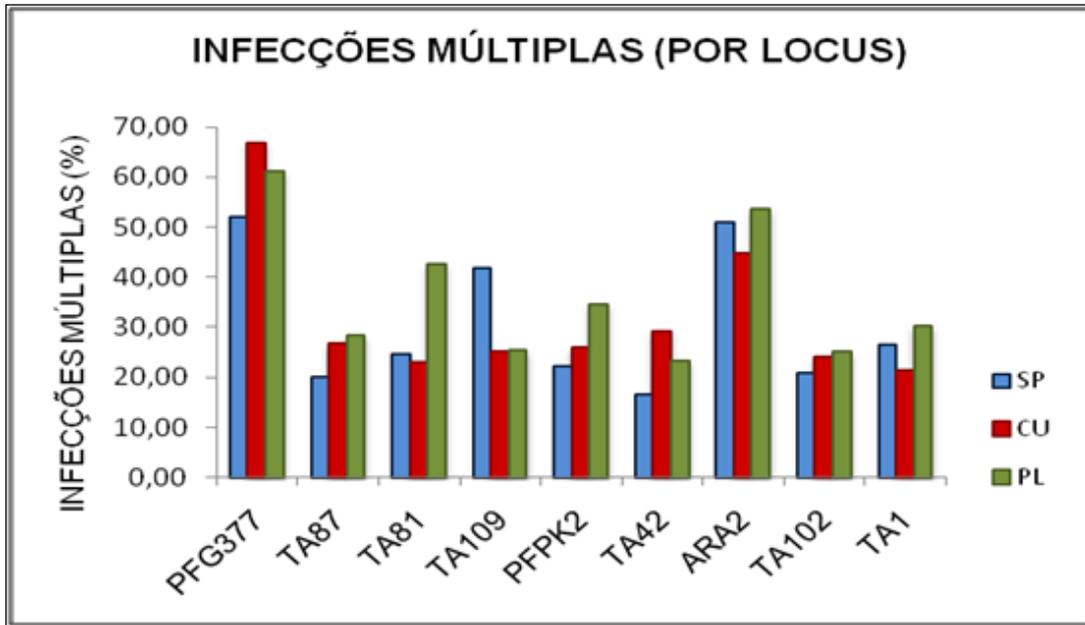


Figura 22 – Infecções múltiplas por locus

A MOI variou de 1-4,5 clones no SP; 1-5,5 clones no CU e 1-4 clones na PL (figura 23).

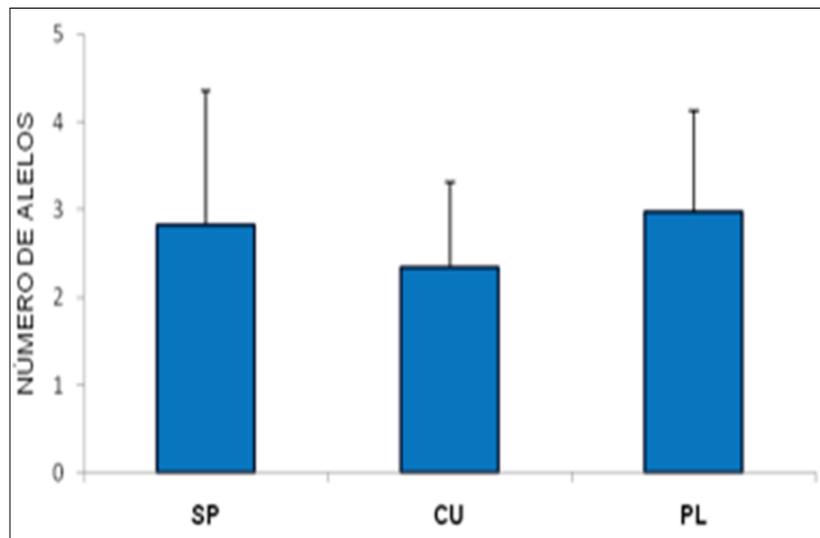


Figura 23 – Multiplicidade de infecção (MOI) em grávidas infectadas com *P. falciparum*. Pl=placenta, SP=sangue periférico e CU=cordão umbilical.

A estimativa de divergência genética entre populações é considerada baixa quando se situa entre 0.22-0.71%, indicando que a maior parte da diversidade genética se encontra

distribuída dentro das populações (~99%, $p > 0,95$). Baixos valores de divergência genética eram esperados, visto que não foram observadas diferenças contrastantes nas frequências alélicas entre as populações. Mesmo considerando apenas as amostras de mulheres que apresentaram infecções por *P. falciparum* em todos os compartimentos estudados (SP, CU e PL) os valores de divergência genética obtidos são muito baixos ($\leq 3\%$) (Tabela 13).

Tabela 13- Valores de diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações estudadas

	CU	PL
SP	0.0071	-0.0040
CU		0.0022

VII.3.2. Desequilíbrio de *linkage*

Os testes de desequilíbrio de *linkage* (DL) revelaram catorze associações significativas entre pares de *loci* de microssatélites em 108 testes realizados. Apenas duas destas se referem a pares de *loci* localizados no mesmo cromosoma (PfG377/PfPK2 e TA81/TA42, ver tabela nos anexos), tendo sido descartadas todas as outras associações.

VII.4. Discussão

O presente trabalho é o primeiro a caracterizar as subpopulações de *P. falciparum* na malária placentária em Luanda, Angola, considerada área de transmissão estável de malária. *P. falciparum* detectados por PCR, foram genotipados com o objectivo de caracterizar as estruturas genéticas dos compartimentos no sangue materno, cordão umbilical e placenta.

A frequência de infecção múltipla aumenta à medida que a transmissão da malária se torna mais prevalente (Susomboon *et al.*, 2008). Estudos feitos nas áreas de alta transmissão como Uganda, Congo e Zimbabué apresentam infecção genética múltipla em 50% das amostras; ao passo que nas áreas de baixa transmissão como o Brasil, Cambodja e Tailândia a frequência não é superior a 10% (Anderson *et al.*, 2000).

No presente estudo constatou-se que a distribuição alélica e das heterozigotias nos nove *loci* estudados foram polimórficos em todos os compartimentos. A média da heterozigotia esperada (H_e) foi alta no sangue periférico, o que se pode enquadrar no cenário epidemiológico de alta transmissão. Estudos prévios realizados por outros autores (Pinheiro *et al.*, 2003) em amostras de *P. falciparum* colhidas na África Ocidental também demonstraram a existência da diversidade genética nessas áreas.

No presente estudo, a maior parte dos *loci* que apresentam associação significativa o valor do p não é aplicável, pois são *locus* que não se encontram no mesmo cromossoma. Os valores indicados a amarelo (anexo 1) referem-se a associações positivas entre *locus* no mesmo cromossoma. No entanto o valor não foi considerado “real” por não ser consistente entre populações (só se verifica para PL). O mesmo acontece no anexo 2, em que são apresentados valores de DL para as populações em conjunto.

Constatou-se um fraco DL, alta diversidade genética nos vários compartimentos estudados. Para estes marcadores neutrais não houve diferenças significativas entre compartimentos, nem indicação de redução populacional em nenhum deles.

Os padrões exibidos neste estudo (fraco DL, alta diversidade genética e mínima diferenciação entre os compartimentos) são compatíveis com as características encontradas nas áreas de alta transmissão (Pinheiro *et al.*, 2003).

Os estudos que procuram relacionar uma determinada doença com o polimorfismo dos genes vão sendo cada vez maiores, com o objectivo de tentar esclarecer até que ponto as alterações genéticas podem influenciar as manifestações ou mesmo na evolução clínica de uma doença; mas ainda não há resultados definitivos no que diz respeito à malária na gravidez. No entanto estas associações apenas se verificaram no tecido placentário, não existindo consistência entre populações, indicando que “na realidade” não se verifica desequilíbrio de *linkage* entre os pares de alelos estudados nestas amostras.

Na associação de pares de *locus* por população, os valores de p corrigidos por teste de Bonferoni só se tornam significativos se > 0.000474825 (Valores significativos a vermelho). Para a maior parte dos *loci* que apresentam associação significativa o valor não é aplicável, pois são *locus* que não se encontram no mesmo cromossoma. Os valores indicados a amarelo referem-se a associações positivas entre *locus* no mesmo cromossoma.

Assim, apesar do presente estudo não demonstrar associação significativa entre os polimorfismos estudados com a malária placentária, futuros estudos poderão ajudar a esclarecer como as mutações genéticas dos parasitas da placenta são capazes de influenciar a evolução clínica da malária, nomeadamente o baixo peso à nascença, a anemia e a malária congénita.

VII.5. Conclusões

No presente estudo, não se encontraram diferenças genéticas entre as subpopulações de amostras da placenta, cordão umbilical e sangue periférico, havendo necessidade de estudos posteriores para correlacionar os achados obtidos com as manifestações da doença, mãe e no recém-nascido.

IX – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

IX – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho, na área da malária na gravidez, englobou: a) o estudo da prevalência da infecção por *P. falciparum* na mulher grávida em consulta pré-natal, b) a caracterização da infecção placentária por *P. falciparum* em mulheres em trabalho de parto e c) a genotipagem do *P. falciparum* em amostras de mulheres com infecção detectada por PCR:

A principal contribuição do presente trabalho foi um maior conhecimento da malária na gravidez em Luanda, Angola, o que poderá servir na tomada de decisões para o controlo da malária em Angola.

Os resultados sugerem que o *P. falciparum* é comum nas mulheres grávidas assintomáticas, que acorreram à consulta pré-natal, em Luanda, e que a anemia é uma complicação importante. Essa anemia é tanto mais importante quando se verifica que está significativamente associada à malária e àquelas que fazem profilaxia da malária com Sulfadoxina-Perimetamina (SP), levando à suspeição de sinais de resistência à SP.

Seria interessante estudar, depois de vários anos de TIP, até que ponto essa resistência acontece nas mulheres grávidas e Luanda, uma vez que já se faz sentir em países de baixa transmissão de malária. Espera-se que a resistência seja baixa, uma vez que se trata de área de alta transmissão de malária. Ou poderá partir-se da hipótese de que a cidade de Luanda começa a ter características epidemiológicas especiais, tendo em conta a modernização que se faz sentir.

O segundo trimestre de gravidez parece ser o pico de maior risco, podendo isto apoiar a decisão tomada quanto ao uso de redes mosquiteiras, actualmente recomendado em todas as mulheres gravidez e às crianças com menos de cinco anos em Angola.

Não havendo estudos específicos em Angola sobre a caracterização e os factores de risco da mulher grávida em trabalho de parto de parto procurámos realizar este estudo na província de Luanda, como ponto de partida para outras pesquisas de interesse nacional.

Dos resultados mais relevantes temos a salientar que uma em cada seis mulheres tinha *P. falciparum*, durante o parto, que é um indicador diferente de outros estudos da mesma região que apontam valores mais baixos de uma em cada quatro.

A residência e a história de malária durante a gravidez estavam, significativamente, associadas com a malária materna no parto, mas a paridade e o uso de fármacos antimaláricos não. *P. falciparum* na placenta era, de forma significativa, mais frequente em mulheres com menos de 18 anos de idade e em primigestas. cremos que este dado exige reflexão por parte dos decisores de políticas de saúde para a juventude. O número elevado de gravidezes na adolescência para além de outras complicações, correm o perigo de infecção placentária, o que poderá também levar a hemorragia pós parto, que a maior causa de mortes maternas em Luanda. Esta é uma linha de investigação com poucos trabalhos publicados e que poderá ajudar a esclarecer essa causa de morte.

Todavia no presente estudo, a malária placentária não se associou a maus resultados da gravidez, talvez porque não se ter feito o acompanhamento puerperal e pós-parto das mulheres envolvidas no estudo.

Estes resultados contribuirão para a toma de decisões conscientes sobre as estratégias de controlo da malária na gravidez, uma vez que muitas, e provalmente a maior parte, das mortes materna e perinatal, em consequência da malária, são preveníveis (Hinderaker, 2003).

No presente estudo, pretendíamos identificar diferenças genéticas entre as subpopulações de amostras da placenta, cordão umbilical e sangue periférico. Depois dos procedimentos biomeleculares recomendados pela literatura, não encontrámos associação significativa entre eles. Há necessidade de estudos posteriores para correlacionar os achados obtidos com as diferentes manifestações da doença, mãe e no recém-nascido.

Em conclusão, embora o estudo tenha contribuído para o esclarecimento sócio demográfico e dos factores de risco associados à infecção por *P. falciparum* na mulher grávida de Luanda, muito aspectos ficaram por esclarecer. Abrem-se, assim, para além das já referidas, outras linhas de investigação, na vertente imunológica, clínica e farmacêutica. Esperamos ter contribuído, de alguma forma, para a diminuição da morte materna associada à malária.

X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

X- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Muhsin AA, Mackinnon MJ, Awadalla P, Ali E, Suleiman S, Ahmed S, Walliker D & Babiker HA (2003) Local differentiation in *Plasmodium falciparum* drug resistance genes in Sudan. *Parasitology* 126: 391–400.
- Achidi EA, Anchang JK, Minang JT, Mokoube JA & Troye-Blomberg M (2005) Studies on *Plasmodium falciparum* isotypic antibodies and numbers of IL-4 and IFN- γ secreting cells in paired maternal cord blood from South West Cameroon. *Int J Infect Dis.* 9:159-69.
- Achidi EA, Kuoh AJ, Minang JT, Ngum B, Achimbom BM, Motaze SC, Ahmadou MJ & Troye-Blomberg M (2005) Malaria infection in pregnancy and its effects on haemoglobin levels in women from a malaria endemic area of Fako Division, South West Province, Cameroon. *J Obstet Gynaecol* 25:235-40.
- Achidi EA, Perlmann H, Salimonu LS, Asuzu MC, Perlman P & Barzins K (1995) Antibodies to Pf155/RESA and circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in paired maternal-cord sera from Nigeria. *Parasite Immunol* 17:535–40.
- Achur RN, Valiyaveetil M & Gowda DC (2003) The low sulfated chondroitin sulfate proteoglycans of human placenta have sulfate group-clustered domains that efficiently bind *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Biol Chem.* 278:11705-11713.
- Adam I & Elbashir MI (2005) Comments on the article: Risk factors for malaria infection and anemia for pregnant women in the Sahel area of Bandiagara, Mali. *Acta Trop.*
- Adegnika AA, Verweij JJ, Agnandji ST, Chai SK, Breitling LPh & Ramharter M (2006) Microscopic and sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infection, but not inflammation caused by infection, is associated with low birth weight. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75:798-803.
- Adwalla P, Walliker D, Babiker H & Mackinnon M (2001) The question of *Plasmodium falciparum* population structure. *Trends Parasitol* 17: 351–353.
- Agomo CH, Oyibo WA, Anorlu RI & Agomo PO (2009) Prevalence of malaria in pregnant women in Lagos, South-West Nigeria. *Korean j. Parasitol* 47, 2: 179-183.
- Alonso PL, Sacarlal J & Aponte JJ (2005) Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet* 366:2012-18.
- Anagnos D, Lanoie LO, Palmieri JR, Ziefer A & Connor DH (1986) Effects of placental malaria on mothers and neonates from Zaire. *Z Parasitenkd* 72:57–64.
- Anchang-Kimbi JK, Achidi EA, Nkengoum B, Ekstrom ES & Troye-Blomberg M (2009) Diagnostic comparison of malaria infection in peripheral blood and placental biopsies in Cameroonian parturient Women. *Malaria Journal* 8:126
- Anderson TJ (1999) Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology* 119, 113-125.
- Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N, Whitworth J, Velez ID, Brockman

- AH, Nosten F, Ferreira MU & Day KP (2000) Microsatellite markers reveal spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* 17: 1467–1482.
- Andrews KT & Lanzer M (2002) Maternal malaria: *Plasmodium falciparum* sequestration in the placenta. *Parasitology Research* 88:715–23.
- Angolan Health System Assessment Set (2005) USAID from the American People.
- Antelman G, Msamanga GI & Spiegelman D (200) Nutritional factors and infectious disease contribute to anemia among pregnant women with human immunodeficiency virus in Tanzania. *J Nutr.* 130:1950–1957.
- Anya SE (2004) Seasonal variation in the risk and causes of maternal death in the Gambia: malaria appears to be an important factor. *Am J Trop Med Hyg* 70(5):510–513.
- Beck S, Mockenhaupt FP, Bienzle U, Eggelte TA, Thompson WN & Stark K. (2001) Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in pregnancy. *Am J Trop Med Hyg.* 65(5):631–6.
- Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S & Ginsburg H (2004) Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J parasitol* 34:163–89.
- Beeson JG, Cooke BM, Rowe JA & Rogerson SJ (2002) Expanding the paradigms of placental malaria. *Trends Parasitol* 18(4):145–147.
- Bellamy C (2004) Globalization and infectious diseases in women. *Emerg. Infect. Dis:* 10:2022–2024.
- Bennington JL (1978) Pathology of the Placenta. Vol VII. In the Series Major Problems in Pathology. Ed. Saunders.
- Bennington JL, Demir R, Kaufmann P & Castellucci M (1989) Fetal Vasculogenesis and Angiogenesis in Human Placenta Villi. *Acta Anat* 136:190.
- Blacklock B & Gordon RM (1925) Malaria parasites in the placental blood. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 19: 37–45.
- Bloland PB, Slutsker L, Steketee R, Wirima JJ, Heymann DL & Breman JG (1996) Rates and risk factors for mortality during the first two years of life in rural Malawi. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55 (Suppl.), S82–S86.
- Bloland PB, Wirima JJ, Steketee RW, Chilima B, Hightower A & Breman J (1995) Maternal HIV infection and infant mortality in Malawi: evidence for increased mortality due to placental malaria infection. *AIDS* 9:721–6.
- Blumer JN, Rasheed FN, Francis N, Morrison L & Greenwood BM (1993) Placental Malaria. I. Pathological classification. *Histopathology* 22:211–8).
- Bouyou-Akotet MK, Ionete-Collard DE & Mabika-Manfoumbi M (2003) Prevalence of *Plasmodium falciparum* infection in pregnant women in Gabon. *Malar J.* 2:18.
- Brabin B, Ginny M, Sapau J & Galme K (1990) Consequences of maternal anaemia on outcome of pregnancy in a malaria endemic area of Papua New Guinea. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 84, 11–24.
- Brabin BJ (1990) An analysis of malaria parasite rates in infants. *Tropical Diseases Bulletin* 87:11–21.

- Brabin BJ (1992) Fetal anaemia in malarious areas: its causes and significance. *Annals of Tropical Paediatrics* 12:303–10.
- Brabin BJ & Piper C (1997) Anemia and malaria-attributable low birthweight in two populations in Papua New Guinea. *Ann Hum Biol.* 24:547–555.
- Brabin BJ & Verhoeff F (2002) The contribution of malaria. In: Mac-Lean AB, Neilson JP., editors. *Maternal Morbidity and Mortality*. London: RCOG Press, pp. 65–78.
- Brabin BJ, Fletcher KA & Brown N (2003) Do disturbances within the folate pathway contribute to low birthweight in malaria? *Trends in Parasitology* 19:39–43.
- Brabin BJ, Kalanda BF, Verhoeff FH, Chimsuku LH & Broadhead RL (in press) Risk factors for fetal anaemia in a malarious area of Malawi. *Annals of Tropical Paediatrics*.
- Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menéndez C, Verhoeff FH, McGready R, Fletcher KA, Owens S, d'Alessandro U, Nosten F, Fischer PR & Ordi J (2004) The Sick Placenta. *The Role of Malária Placenta* 25, 359-378.
- Brabin BJ & Johnson PM (2005) Placental malaria and pre-eclampsia through the looking glass backwards? *J Reproductive Immunol.* 65:1–15.
- Brabin BJ & Rogerson S (2001) The epidemiology and outcomes of maternal malaria. In: Duffy PE, Fried M, editors. *Malaria in Pregnancy, deadly parasite, susceptible host*. London: Taylor and Francis, p. 27-52.
- Brabin BJ (1983) An analysis of malaria infection in Africa. *Bulletin of the World Health Organization*, 61, 1005-1016.
- Brabin BJ (1985) Epidemiology of infection in pregnancy. *Reviews of Infectious Diseases*, 7, 579-603.
- Brabin BJ (1991) The Risk and Severity of Malaria in Pregnant Women. *Applied Field Research in Malaria Reports No. 1*. Geneva: World Health Organization.
- Bray RS & Sinden RE (1979) The sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the placenta. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 716-719.
- Bruce-Chwatt LJ (1952) Malaria in African infants and children in southern Nigeria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 46, 173-200.
- Bruce-Chwatt LJ (1985) *Essential Malarology* 2nd edition. William Heinemann Medical Books, cap 2 pg 13.
- Brustoski K, Moller U & Kramer M (2006) Reduced cord blood immune effector-cell responsiveness mediated by CD4+ cells induced in utero as a consequence of placental *Plasmodium falciparum* infection. *J Infect Dis* 193: 146-54.
- Bulmer JN, Rasheed FN, Morrison L, Francis N & Greenwood BM (1993) Placental malaria. II. A semi-quantitative investigation of the pathological features. *Histopathology*, 22, 219-225.
- Busjahan F (2002) Characteristic and Physiology in single pregnancy, *Rev Obst Gynecol*, 10 (3):120-50.
- Butterworth RF (2001) Maternal thiamine deficiency: still a problem in some world communities. *American Journal of Clinical Nutrition* 74:712–4.

- Cáceres VM, Strebel PM & Sutter RW (2000) Factors determining prevalence of maternal antibody to measles virus throughout infancy: A Review. *Communicable Infectious Diseases* 3:110–9.
- Carrara VI, Sirilak S & Thonglairuam J (2006) Deployment of early diagnosis and mefloquine-artesunate treatment of falciparum malaria in Thailand: the Tak Malaria Initiative. *PLoS Med* 3: e183.
- Chin W, Contacos PG, Collins WE, Jeter MH & Alpert E (1968) Experimental mosquito transmission of *Plasmodium knowlesi* to man and monkey. *Am J Trop Med Hyg.* 17:355-8.
- Christopher JMW, Edmonds S & Mutabingwa TK (2005) Malaria in pregnancy. *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 112:1189–1195.
- CIA World Factbook (2009) <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/> acessado em 02/01/2011.
- Clark HC (1915) The diagnostic value of the placental blood film in aestivo-autummal malaria. *Journal of Experimental Medicine* 22:427-44.
- Colomer J, Colomer C & Gutierrez D (1990) Anaemia during pregnancy as a risk factor for infant iron deficiency: report from the Valencia Anaemia cohort (VIAC) Study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 4:196–204.
- Consultoria de Serviços e Pesquisas – COSEP Lda (2006) Consultoria de Gestão e Administração em Saúde – Consaúde Lda [Angola] e Macro International Inc. 2007. Inquérito de Indicadores da Malária em Angola. Calverton, Maryland: COSEP Lda., Consaúde Lda. E Macro International Inc.
- Conway DJ (2001) Extreme geographical fixation of variation in the *Plasmodium falciparum* gamete surface protein gene Pfs48/45 compared with microsatellite loci. *Molecular and Biochemical Parasitology* 115, 145-156.
- Cooke BM, Wahlgren M & Coppel RL (200) *Falciparum* malaria: sticking-up, standing out and outstanding. *Parasitology Today* 16: 416-420.
- Costa FTM, Fusai T, Parzy D, Sterkers Y, Torrentino M & Douki JBL (2003) Immunization with recombinant Duffy-binding-like-? 3 induces pan-reactive and adhesion-blocking antibodies against placental chondroitin sulfate A-binding *Plasmodium falciparum* parasites. *Journal of Infectious Disease* 188:153–64.
- Costa, FTM, Avril M, Nogueira PA & Gysin J (2006) Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and the infected placenta: a two ways pathway. *Braz J Med Biol Res* 39: 1525-1536.
- Cot M & Deloron P (2003) Paludisme associe a la grossesse: Consequences et perspectives d'intervention. *Med Trop* 63:369–380.
- Cot M, Roisin A, Barro D, Yada A, Verhave JP, Carnevale P & Breart G (1992) Effect of chloroquine chemoprophylaxis during pregnancy on birth weight: results of a randomized trial. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46,21-27.
- Cot M & Deloron P (2003) Malaria prevention strategies. *Br Med Bull.* 67:137–148.
- Cottrell G, Mary JY, Barro D & Cot M (2005) Is malarial placental infection related to peripheral infection at any time of pregnancy? *Am J Trop Med Hyg.* 73:1112–1118.

- Dafallah SE, EL-Agib FH& Bushra GO (2003) Maternal mortality in a teaching hospital in Sudan. *Saudi Med J* 24:369-373.
- De Moraes-Pinto IM, Verhoeff F, Chimsuku L, Milligan PJM, Wesumperuma L& Broadhead RL (1998) Placental antibody transfer: influence of maternal HIV infection and placental malaria. *Archives of Disease in Childhood* 79:202–5 Foetal Neonatal Edition.
- Deloron P& Maubert B (1995) Interactions immunologiques entre paludisme et grossesse. *Medecine Tropicale*, 55(Suppl. 1), 67S-68S.
- Demba S, Marrama L, Gaye A, Dangou JM, Niang M, Mercereau-Puijalon O, Lehesran JY & Jambou R(2006) High prevalence of placental malaria and low birth weight in sahelian periurban area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(1), 2006, pp. 171-177
- Demir R, Kaufmann P & Castellucci M (1989) Fetal Vasculogenesis and Angiogenesis in Human Placenta Villi. *Acta Anat* 136:190.
- Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R Asamo K, Brabin B & Newman RD (2007) Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* 7:93-104.
- Diagne N, Roger C& Sokhna CS (2000)Increased susceptibility to malaria during the early postpartum period. *N Engl J Med* 343(9):598-603.
- Dicko A, Mantel C, Aly Thera M, Doumbia S, Diallo M, Diakete M, Sagara I& Doumbo O (2003) Risk factors for malaria infection and anemia for pregnant women in the Sahel area of Bandiagara, Mali. *Acta Trop* 89:17-23.
- Dietz V, Galaski A, Van Loon F& Cochi S (1997) Factors affecting the immunogenicity and potency of tetanus toxoid: implications for the elimination of neonatal tetanus as public health problems. *Bulletin of World Health Organisation* 75:81–93.
- Donald J & Krogstad (2005) In Cecil Tratado de Medicina Interna/editado por Lee Goldman e Dennis Ausiello; [tradução de Ana Kemper...et.al.]. - Rio de Janeiro: Elsevier.
- Dorman E& Shulman C (2000) Malaria in pregnancy. *Curr Obstet Gynecol.* 10:183–189.
- Durand P, Michalakis Y, Cestier S, Oury B, Leclerc MC, Tibayrenc M& Renaud F (2003) Significant linkage disequilibrium and high genetic diversity in a population of *Plasmodium falciparum* from an area (Republic of the Congo) highly endemic for malaria. *Am J Trop Med Hyg* 68: 345–349.
- Edozien JC, Gilles HM& Udeozo IOK (1962) Adult and cord-blood gammaglobulin and immunity to malaria in Nigerians. *Lancet* 283:951–5.
- Embassy of the Republic of Angola. About Angola: Geography. Disponível em www.angola.org/geography.html.
- Enato EFO, Mens PF, Okhamafe AO, Okpere EE, Pogoso E & Schallig HJFE (2009) *Plasmodium falciparum* malária in pregnancy: Prevalence of peripheral parasitaemia, anaemia and malária care-seeking behaviour among pregnant women attending two antenatal clinics in Edo State, Nigeria. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, May 29(4): 301-306.

- Etard JF, Kodio B & Ronsman C (2003) Seasonal variation in direct obstetric mortality in rural Senegal: role of malaria? *Am J Trop Med Hyg.* 68:503–504.
- Farooq U & Mahajan RC (2004) Drug resistance in malaria. *J Vector Borne Dis* 41: 45-53.
- Feresu SA, Harlow SD & Woelk GB (2004) Risk factors for prematurity at Harare Maternity Hospital, Zimbabwe. *Int J Epidemiol* 33(6):1194-1201.
- Fievet N, Moussa M, Tami G, Maubert B, Cot M & Deloron P (2001) *Plasmodium falciparum* induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring Th1-type pathway, in human placenta. *Journal of Infectious Diseases* 183:1530–4.
- Fievet N, Tami G, Maubert B, Moussa M, Shaw IK & Cot M (2002) Cellular immune response to *Plasmodium falciparum* after pregnancy is related to previous placental infection and parity. *Malaria Journal* 1:16.
- Figuerero P, Benchimol C, Lopes D, Bernardino L, do Rosário VE, Varandas L, Nogueira F (2008) Prevalence of *pfmdr1*, *pfprt*, *pfdhfr* and *pfdhps* mutations associated with drug resistance, in Luanda, Angola. *Malar J* 7:236.
- Fischer PR (1997) Congenital malaria: an African survey. *Clinical Pediatrics* 36:411-3.
- Fleming AF (1989) Tropical obstetrics and gynaecology. 1. Anaemia in pregnancy in tropical Africa. Joint Meeting of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists and the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Manson House, London, 10 November 1988. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83:441–448.
- Flick K, Scholander C, Chen Q, Fernandez V, Puvelle B & Gysin J (2001) Role of non-immune IgG bound to PfEMP1 in placental malaria. *Science* 293:2098–100.
- Fox H (1975) The Pattern of Villous Variability in Normal Placenta. *Journal of Obstet. & Gynaec. of the British Commonwealth* 72. P.347-55.
- Fox H (1997) *Pathology of the placenta*: W.B. Saunders p. 23.
- Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ & Duffy PE (1998) Maternal antibodies block malaria. *Nature* 395:851–2.
- Fried M & Duffy PE (1996) Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science*, 272, 1502-1504.
- Galbraith RM, Fox H; Hsi B, Galbraith MP, Bray RS & Page Faulk W (1980) The human materno-foetal relationship in malaria II.
- Garner P & Gulmezoglu AM (2003) Drugs for preventing malaria-related illness in pregnant women and death in the newborn (Cochrane Review). *The Cochrane Library*. Oxford: Update Software, Issue 1.
- Garnham PCC (1938) The placenta in malaria with special reference to reticulo-endothelial immunity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Histological, ultrastructural and immunopathological studies of the placenta. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 32:13-35.
- Gilles HM (1996) Additional comments to 'Malaric Placenta'. *Pathology, Research and Practice*, 192, 900.
- Gilles HM, Lawson JB, Sibelas M, Voller A & Allan N (1969) Malaria, anaemia, and pregnancy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 63, 245-263.

- Goudet J., 1995. FSTAT vers 1.2, a computer program to calculate F. Statistics. J Hered 8: 425-486.
- Greenwood B, Alonso P, Oter Kuile F, Hill J & Steketee RW (2007) Malaria in pregnancy: priorities for research. <http://infection.thelancet.com> Vol 7 February/07.
- Guerra CA, Gikandi PW & Tatem AJ (2008) The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. PLoS Med 5: 38.
- Guthmann JP, Ampuero J, Fortes F, van Overmeir C, Gaboulaud V, Tobback S, Dunand J, Saraiva N, Gillet P, Franco J, Denoncin A, van Herp M, Balkan S, Dujardin JC, D'Alessandro U, Legros D: Antimalarial efficacy of chloroquine, amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and the combinations of amodiaquine + artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine + artesunate in Huambo and Bie provinces, central Angola. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005, 99:485-492.
- Guyatt HL & Snow RW (2001) Malaria in pregnancy as an indirect cause of infant mortality in sub-Saharan Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95:569-576.
- Guyatt HL & Snow RW (2001) The epidemiology and burden of *Plasmodium falciparum* related anemia among pregnant in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 64:36-44.
- Guyatt HL & Snow RW (2004) Impact of malaria during pregnancy on low birth weight in sub-Saharan Africa. *Clin Microbiol Rev* 17(4):760-769.
- Harrington WE, Mutabingua TK, Muehlenbachs, Sorensen B, Bolla MC, Fred M & Duffy PE (2009) Competitive facilitation of resistant *P. falciparum* malaria parasites in pregnant women who receive preventive treatment. *PNAS* Vol 106, 22:9027-9032.
- Hinderaker SG, Olsen BE & Bergajo PB (2003) Avoidable stillbirths and neonatal deaths in rural Tanzania. *BJOG* 110:616-623.
- Hviid L & Staalsoe T (2004) Malaria immunity in infants: a special case of a general phenomenon? *Trends Parasitol* 20:66-72.
- Imamura T, Sugiyama T, Cuevas LE, Makunde R & Nakamura S (2002) Expression of tissue factor, the clotting initiator, on macrophages in *Plasmodium falciparum*-infected placentas. *The Journal of Infectious Diseases* 186:436-40.
- Inquérito de Indicadores de Malária em Angola 2006-07 (IIMA 2006-07) http://www.usaid.gov/ao/mis_pt.pdf acessado em Outubro de 2010
- Instituto Nacional de Estatística (INE) and UNICEF (2003) MICS Multiple Indicator Cluster Survey: Assessing the Situation of Angolan and Children and Women at the beginning of the Millennium. Analytica Rport. Luanda, Angola: INE and UNICEF. Disponível em www.unicef.org/angola/children.html.
- Ismail MR, Ordi J, Menendez C, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, Hirt R, Cardesa A & Alonso PL (2000) Placental pathology in malária: a hystological, immunohistochemical, and quantitative study. *Human Pathol* 31:85-93.
- Jackson AA (1997) Urinary excretion of 5-L-oxoproline (pyroglutamic acid) during early life in term and preterm infants. *Archives of Diseases in Childhood* 76:152-7.
- Jakobsen PH, Rasheed FN, Bulmer JN, Theisen M, Ridley RG & Greenwood BM (1998) Inflammatory reactions in placental blood of *Plasmodium falciparum*-infected

- women and high concentration of soluble E selectin and circulating *P. falciparum* protein in the cord sera. *Immunology* 93:264–9.
- Jane C, Cindy C, George M & François N (2010) Malaria in Children. *Lancet* 375: 1468–81).
- Jarne P & Lagoda P J L (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE* 11: 424–429.
- Jeliffe PEF (1968) Low birthweight and malaria infection of the placenta. *Bulletin of the World Health Organization*, 33, 69-78.
- Jilly P (1969) Anaemia in parturient women, with special reference to malaria infection of the placenta. *Ann Trop Med Parasitol* 63:109-36.
- Johnson AH, Leke RG & Mendell NR (2004) HLA class II alleles influence levels of antibodies to the *Plasmodium falciparum* asexual-stage apical membrane antigen 1 but not to merozoite surface antigen 2 and merozoite surface protein 1. *Infect Immun.* 72:2762–2771.
- Kamwendo DD, Dzinjalama FK & Snounou G (2002) *Plasmodium falciparum*: PCR detection and genotyping of isolates from peripheral, placental, and cord blood of pregnant Malawian women and their infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96:145-49.
- Kassberger F, Birkenmayer A, Khatab A & Kremsner PG (2002) PRC typing of *Plasmodium Falciparum* in matched peripheral, placental and umbilical cord. *Parasitol Res* 88:1073-1079.
- Kayentao K, Kodio M, Newman RD, Maiga H, Doumtabe D & Ongoiba A (2005) Comparison of intermittent preventive treatment with chemoprophylaxis for the prevention of malaria during pregnancy in Mali. *Journal of Infectious Diseases* 191:109-116.
- Keiser J, Utzinger J, Caldas de Castro M, Smith TA, Tanner M & Singer BH (2004) Urbanization in sub-saharan Africa and implication for malaria control. *Am J Trop Med Hyg* 71: 118-127.
- Kilb H (2001) Morphometrics in Single Pregnancy. *Rev Maternal Fetal* 2 (5):72-5.
- King CL, Malhotra I, Wamachi A, Kioko J, Mungai P & Abdel Wahab S (2002) Acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in the human fetus. *The Journal of Immunology* 168:356–64.
- Kurtzhals JA, Adabayeri V & Goka BQ (1998) Low plasma concentrations of interleucine 10 in severe malarial anaemia, compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 351:1768-72.
- Lander J, Leroy V, Simonon A, Karita E, Bogaerats J, Clercq AD, Van de Perre P & Dabis F (2002) HIV infection, malaria, and pregnancy: a prospective cohort study in Kigali, Rwanda. *Am J Trop Med Hyg* 66:56-60.
- Le Cessie S, Verhoeff FH, Mengistie G, Kazembe P, Broadhead R & Brabin BJ (2002) Changes in haemoglobin levels in infants in Malawi: effect of low birthweight and fetal anaemia. *Archives of Diseases of Childhood* 86:182–7. Fetal Neonatal Edition.
- Le Hesran JY, Cot M, Personne P, Fievet N, Dubois B & Beyeme M (1997) Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *American Journal of Epidemiology* 146:826–31.

- Lea RG, Flanders, KC, Harley CB, Manuel J, Banwatt D & Clark DA (1992) Release of a transforming growth factor (TGF)-beta 2-related suppressor factor from postimplantation murine decidual tissue can be correlated with the detection of a subpopulation of cells containing RNA for TGF-beta 2. *J. Immunol* 148:778–87.
- Leclerc MC, Durand P, de Meeus T, Robert V & Renaud F (2002) Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal, investigated from microsatellite and antigen determinant loci. *Microbes Infect* 4:685–692.
- Leke RFG, Djokam RR, Mbu R, Leke RJ, Fogaco J, Egnkou R, Matenou S, Sama G, Zhou Y, Cadigan T, Parra M & Taylor DW (1999) Detection of the *Plasmodium falciparum* antigen histidine-rich protein 2 in blood of pregnant women: implication for diagnosing placental malaria. *J Clin Microbiol* 37: 2992-2996.
- Leopardi O, Naughten W, Salvia L, Colecchia A, Matteelli A, Zucchi A, Shein A, Muchi JA, Carosi G & Ghione M (1996) Malaric placentas: a quantitative study and clinico-pathological correlations. *Pathology, Research and Practice*, 192, 892-899.
- Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopiat S & Wegmann TG (1993) Synthesis of T helper 2 type cytokines at the maternal-fetal interface. *Journal of Immunology* 151: 4562–73.
- Lindsay S, Ansell J, Selman C, Cox V, Hamilton K & Walraven G (2000) Effects of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. *Lancet* 355(9219):1972.
- Longo LD (1972) Disorders of Placental Transfer, in *Pathophysiology of Gestation*, vol 2. Ed Assali, N.S., NY & London: Academic Press p. 1-76.
- Louis H, Miller, Dror I, Baruch, Kevin Marsh & Ogobara KD (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415, 673-679.
- Louis Schofield & Georges EG (2005) Immunological processes in malaria *pathogenesis*. *Nature Reviews Immunology* 5, 722-735.
- Luxemburger C, McGready R & Kham A (2001) Effects of malaria during pregnancy on infant mortality in an area of malaria transmission. *Am J Epidemiol* 154 (5):459-465.
- Lyall F (2005) Priming and remodeling of human placental bed spiral arteries during pregnancy – a review. *Placenta* 26 (suppl A):S31-36.
- Malhotra I, Mungai P, Muchiri E, Kwiek JJ, Meshnik SR & King CL (2006) Umbilical cord-blood infections with *Plasmodium falciparum* malaria are acquired antenatally in Kenya. *J Inf Dis* 194:176-83.
- Malhotra I, Mungai P & Muchiri E (2005) Distinct Th1 and Th2-type prenatal cytokine responses to *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion ligands. *Infect immune* 73:3462-70.
- Management Sciences for Health (MSH) and Consaúde (2002) *The State of Maternal and Child Health in the Districts of Cazenga, Cacuaco and Viana. Baseline Study.* Luanda, Angola: Carried out by the USAID/Strengthening Maternal and Child Health Services Project for the Republic of Angola Provincial Directorate of Health of Luanda.

- Mankhambo L, Kanjala M, Rudman S, Lema VM & Rogerson SJ (2002) Evaluation of the OptiMAL rapid antigen test and species-specific PCR to detect placental *Plasmodium falciparum* infection at delivery. *J Clin Microbiol* 40: 115-158.
- Marcelo Urbano Ferreira, Annette Silva Foronda e Terezinha Tizu Sato Schumaker (2003) Fundamentos Biológicos da Parasitologia Humana 1ª edição - Barueri,SP: Manole.
- Marchant T, Schellenberg JA& Nathan R (2004) Anaemia in pregnancy and infant mortality in Tanzania. *Trop Med Int Health* 9(2):262-266).
- Marcopito LF & Santos FRG (2006) Um Guia para o Leitor de Artigos Científicos na Área da Saúde. São Paulo: Editora Atheneu. Cap 15: 57-61.
- Marin JGG, Macias RIR& Serrano MA (2003) The hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *A review Placenta* 24:431–8.
- Marsh K& Howard RJ (1986) Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: expression of diverse and conserved determinants. *Science* 231:150–3.
- Matteelli A, Donato F, Shein A, Muchi JA, Abass AK, Mariani M, Leopardi O, Maxwell CA & Carosi G (1996) Malaria infection and birthweight in urban Zanzibar, Tanzania. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 90,125-134.
- Matteelli A, Donato F&Shein A (1994) Malaria and anemia in pregnant women in urban Zanzibar, Tanzania. *Ann Trop Med Parasitol*. 88:475–483.
- Maubert B, Fieffer, Tami G, Cot M, Boudin C & Deloron P (1999) Development of antibodies against chondroitin sulfate A-adherent *Plasmodium falciparum* in pregnant women. *Infection and Immunity* 67:5367–71.
- Mayengue PI, Rieth H, Khatab A, Issifou S, Kremsner PG, Klinkert MQ& Ntoumi F (2004) Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections and multiplicity of infections in matched peripheral, placental and umbilical blood samples from Gabonese women. *Trop Med Int Health* 9:949-958.
- McDermott JM, Wirima JJ, Steketee RW, Breman JG& Heymann DL (1996) The effect of placental malaria infection in perinatal mortality in rural Malawi. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55:61–5.
- McGread R, Davidson BB, Stepnicwska K, Cho T, Brockman A & Udomsangpetch R (2003) The effects of *P. falciparum* and *P. vivax* infections on placental histopathology in a very low transmission area. Submitted for publication.
- McGregor IA (1984) Epidemiology, malaria and pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 33:517-525.
- McGregor IA, Wilson ME & Billewicz WZ (1983) Malaria infection of the placenta in the Gambia, West Africa: its incidence and relationship of stillbirth, birthweight, and placental weight. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77:232–244.
- McLaren DS& Ward PG (1962) Malaria infection of the placenta and foetal nutrition. *East African Medical Journal* 39, 182-189.
- Menendez C (1995) Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. *Parasitology Today* 11, 178-183.
- Menendez C (2003) Anaemia in pregnancy in developing areas: its causes and consequences. In *Malaria and anaemia in pregnancy*. Amsterdam, PREMA-EU.

- Menendez C, Fleming AF & Alonso PL (2000) Malaria-related anaemia. *Parasitology Today* 16 (11): 469-476
- Menendez C, Ordi J& Ismail MR (2000) The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis* 181(5):1740-1745.
- Miller LH& Smith JD (1998) Motherhood and malaria. *Nat Med* 4:1244–1245.
- Ministry of Health of the Republic of Angola/National Direction of Public Health 2004b (2005) Strategic Plan for the Accelerated reduction of Maternal and Child Mortality in Angola 2004-2008, Luanda-Angola.
- Ministry of Planning of the Republic of Angola and UNICEF (2003) Multiple Indicators Community Survey, 2001. Novo Banco Angola. Annual Report 2004.
- Mockenhaupt FP, Bedu-Addo G& von Gaertner C (2006) Detection and clinical manifestation of placental malaria in southern Ghana. *Malar J.* 5:119.
- Mockenhaupt FP, Ulmen U, von Gaertner C, Bedu-Addo G& Bienzle U(2002)Diagnosis of placental malária. *J Clin Microbiol* 40:306-308.
- Moor JM, NahlenBL, Misore A, Lal AA& Udhayakumas V (1999) Immunity to placental malaria. I. Elevated production of interferon- γ by placental blood mononuclear cells is associated with protection in an area with high transmission of malaria. *Journal of Infectious Diseases*179:1218–25.
- Moorman AM, Sullivan AD, Rochford RA, Chensue SW, Bock PJ& Nyerenda TR (1999) Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intra-uterine growth retardation. *The Journal of Infectious Diseases* 180:1987–93.
- Muehlenbachs A, MutabingwaTK, Edmonds S, Fried M& Duffy PE (2006) Hypertension and maternal–fetal conflict during placental malaria. *PLoS Med.* 3:446.
- Mukhtar MY, Lesi, EEA, Iroba EU, Egri-Okwaji & Mafe AG (2006) Congenital malaria among inborn babies at a tertiary center in Lagos, Nigeria *Journal of Tropical Pediatrics*, vol. 52, no. 1, pp. 19-23.
- Nahlen BL (2000) Rolling Back Malaria. *N Eng J Med* 343:651-652.
- Naomi W, Lucchi, David S, Peterson, Julie M& Moore (2008) Immunologic activation of human syncytiotrophoblast by *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal* 7:42doi:10.1186/1475-2875-7-42.
- Neto CM & Tadini V (2002) *Obstetrícia & Ginecologia Manual para o residente – São Paulo: Roca*, pg 44.
- Netter FH (1965) *The Ciba collection of medical illustrations, vol 2 Reproductive System.*
- Newman RD, Hailmariam A, Jimma D, Degefe A, Kebede D, Rietveld AC, Nahlen BL, Barnwell JW, Steketee RW& Parise ME (2003) Burden of malaria during pregnancy in areas of stable and unstable transmission in Ethiopia during a nonepidemic year. *J InfectDis* 187:1765-1772.
- Nokes C, van den Bosch C& Bundy DAP (1998) The effects of iron deficiency and anemia on mental and motor performance, educational achievement and behaviour in children: an annotated bibliography. Washington, D.C.: International Nutritional Anemia Consultative Group.

- Nosten F, Ter Kuile FO, Maelankirri L, Decludt B & White NJ (1991) Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85:424-429.
- O'neil-dunne I, Achur RN, Agbor-Enoh ST, Valiyaveettil M, Naik RS & Ockenhouse CF (2001) Gravidity-dependent production of antibodies that inhibit binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to placental chondroitin sulphate proteoglycan during pregnancy. *Infection and Immunity* 69:7487-92.
- Oeuvray C, Theisen M, Rogier C, Trape JF, Jepsen S & Druilhe P (2000) Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infect Immun.* 68:2617-2620.
- Okoko BJ, Ota MO & Yamuah LK (2002) Influence of placental malaria infection on foetal outcome in the Gambia: twenty years after Ian McGregor. *J Hlth Pop Nutr.* 20:4-11.
- Okoko BJ, Wesuperuma LH & Ota MO (2001) Influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinaemia on materno-foetal transfer of measles and tetanus antibodies in a rural West Africa population. *J Health Popul Nutr* 19:59-65.
- Okoko BJ, Wesuperuma LH & Ota MO (2001) The influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinaemia on transplacental transfer of antibodies and IgG subclasses in a rural west Africa population. *J Health Popul Nutr* 184:627-32.
- Ordi J, Menéndez C, Ismail MR, Ventura PJ, Palacin A & Kohigwa E (2001) Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence of natural killer cells. *The Journal of Infectious Diseases* 183:1100-7.
- Parise ME, Ayisi JG, Nahlen BL, Schultz LJ, Roberts J M., Misore A, Muga R, Oloo AJ & Steketee RW (1998) Efficacy of sulfadoxinepyrimethamine for prevention of placental malaria in an area of Kenya with a high prevalence of malaria and human immunodeficiency virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 59(5):813-822.
- Pavia CS & Niederbuhl CJ (1991) Immunity and protection against malaria during murine pregnancy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44:176-82.
- Piccini MP; Giudizi MG; Biagiotti R, Beloni L, Giannarin L & Sampognaro S (1995) Progesterone favours the development of human T helper cells producing Th 2-type cytokine and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th2 cell clones. *Journal of Immunology* 155:128-33.
- Pinheiro L, Franco S, Adagu IS, Rosa R, Rosário VE & Warhurst DC (2003) Detecção da Mutação Dupla 86^{TYR} e E1246^{TYR} no gene *pfmdr1* em Clones de uma Amostra de *Plasmodium falciparum* da África Ocidental, Resistente à Cloroquina. *Acta Médica Portuguesa*; 16: 229-233.
- Pleban PA, Mumerof BS & Wirth FH (1985) Trace element metabolism in the fetus and neonate. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* p. 545-66.
- Pouvelle B, Buffet PA, Lepolard C, Scherf A & Gysin J (2000) Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum* ring-stage-infected erythrocytes. *Nat Med* 6:1264-1268.
- President's Malaria Initiative (PMI) (2009). Angola Malária Operational Plan FY09. Acessado em http://www.fightingmalaria.gov/countries/mops/angola_mopfy.pdf. Acessado Nov 9.

- President's Malaria Initiative (PMI)(2005)Five Year Strategy and Plan FY06-FY10, ANGOLA. Washington, DC: United States Agency for International Development (USAID).
- Programa Nacional de Controlo da Malária (PNCM) (2005) Plano Estratégico Nacional para o Controlo da Malária em Angola 2005-2009, Luanda-Angola.
- Ramharter M, Grobush MP& Kiessling G (2005) Clinical and parasitological characteristics of puerperal malaria. *J Infect Dis* 191:1005-09.
- Rasheed FN, Bulmer JN, Dunn DT, Menendez C, Jawala MFB& Jepson A (1993) Suppressed peripheral and placental blood lymphoproliferative responses in first pregnancies: relevance to malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48:154-60.
- Raymond M& Rousset F (1995)Genopop version 1.2. Population genetics software for exact test and ecumenism. *J. Hered* 86:248-249
- Redman CW& Sargent IL (2005) Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 308:1592-94.
- Regnault TR, de Vrijer B& Battaglia FC (2002) Transport and metabolismo of amino acids in placenta. *Endocrine* 19:23-41.
- Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (2000) 33:163-168, mar-abr.
- Rich SM & Ayala FJ (2000) Population structure and recent evolution of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6994-7001).
- Ricke CH,Staalsoe T,Koram K,Akanmori BD,Riley EM &Theander TG (2000) Plasma antibodies from malaria exposed pregnant women recognise variant surface antigens on *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes in a parity dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate. *Journal of Immunology* 165:309-16.
- Riley EM, Schneider G, Sambou I& Greenwood BM (1989) Suppression of cell-mediated immune responses to malaria antigens in pregnant Gambian women. *Am J Trop Med Hyg.* 40:141-144.
- Riley EM, Wagner GE, Akanmori BD& Koram KA (2001)Do maternally acquired antibodies protect infants from malaria infection? *Parasite Immunology* 23:51-9.
- Robert V, Macintyre K, Keating J, Trape JF, Duchemin JB, Warren M& Beier JC(2003) Malaria transmistion in urban sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 68:169-176.
- Rogerson SJ, Brown HC, Polina E, Abrams ET, Radese E& Lema VM (2003b) Placental tumour necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women. *Infection and Immunity* 71:267-70.
- Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RFG& Taylor DW (2007) Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis* 7:105-117.
- Rogerson SJ, Mkundika P& Kanjala MK (2003) Diagnosis of plasmodium falciparum at delivery: comparison of blood film preparation methods and of blood films with histology. *J Clin Microbiol* 41(4):1370-1374.
- Rogerson SJ, Polina E, Getachew A, Tadesse E, Lema VM & Molyneux ME (2003a) Placental monocyte infiltrates in response to Plasmodium falciparum malaria

- infection and their association with adverse pregnancy outcomes. *Am J Trop Med and Hyg* 68:115–9.
- Rogerson SJ, Van den Broek NR, Chaluluka E, Qongwane C, Mhango CG & Molyneux ME (2000) Malaria and anaemia in antenatal women in Blantyre, Malawi: a twelve-months survey. *Am J Trop Med Hyg* 62:335-340.
- Sahli H (1984) *Lehrbuch der Klinischen unter Suchungsmethoden* Leipzig: Deuticke.
- Said HM (2002) Biotin: the forgotten vitamin. *American Journal of Clinical Nutrition* 75:179–80.
- Sartelet H, Milko-Sartelet I, Garraud O & Picot S (1997) *Plasmodium falciparum* persists in the placenta after three days' treatment with quinine. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 91:431.
- Sartelet H, Rogier C, Milko-Sartelet I, Angel G & Michel G (1996) Malaria associated pré-eclampsia in Senegal. *Lancet* 347:1121.
- Sattler MA, Mtasiwa D, Kiama M, Premji Z, Tanner M, Killeen GF & Lengeler C (2005) Habitat characterization and spatial distribution of *Anopheles* sp mosquito larvae in Dar es Salaam (Tanzania) during an extended dry period. *Malar J* 4:4.
- Saute F, Menendez C, Mayor A, Aponte J, Gomez-Olive X, Dgedge M & Alonso P. (2002) Malaria in pregnancy in rural Mozambique: the role of parity, submicroscopic and multiple *Plasmodium falciparum* infections. *Trop Med Int Health*. 7(1):19-28.
- Schellenberg D, Amstrong-Schellenberg JRM, Mushi A, Savigny D de, Mbuya C & Victora CG (2003) The silent burden of anaemia in Tanzanian children: a community based study. *Bulletin of the World Health Organization* 81:581-590.
- Scherf A, Pouvelle B, Buffet PA & Gysin J (2001) Molecular mechanisms of *Plasmodium falciparum* placental adhesion. *Cell Microbiol*. 3:125.
- Schleiermacher D, Le Hesran JY, Ndiaye JL, Perraut R, Gaye A & Mercereau-Puijalon O. (2002) Hidden *Plasmodium falciparum* parasites in human infections: different genotype distribution in the peripheral circulation and in the placenta. *Infect Genet Evol*. 2(2):97-105.
- Schultz LJ, Steketee RW, Chitsulo L & Wirima JJ (1995) Antimalarials during pregnancy: a cost-effectiveness analysis. *Bull WHO* 73(2):207-214.
- Schultz LJ, Steketee RW, Macheso A, Kazembe P, Chitsulo L & Wirima JJ (1994) The efficacy of antimalarial regimens containing sulfadoxine-pyrimethamine and/or chloroquine in preventing peripheral and placental *Plasmodium falciparum* infection among pregnant women in Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 51(5):515-522.
- Shi YP, Sayed U & Qarh SH (1995) Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Infect Immun*. 64:2716–2723.
- Shulman CE (1999) Malaria in pregnancy: its relevance to safe motherhood programmes. *Ann Trop Med Parasitol*. 93:59–66.
- Shulman CE, Dorman EK & Blumer JN (1999) Intermittent sulphadoxine-pyrimethamine to prevent severe anaemia secondary to malaria in pregnancy: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 353 (9153): 632-636.

- Shulman CE, Dorman EK & Blumer JN (2002) Malaria as a cause of severe anaemia in pregnancy. *Lancet*, 360 (9331): 494.
- Shulman CE, Marshal T & Dorman EK (2001) Malaria in pregnancy: adverse effects on haemoglobin levels and birthweight in primigravidae and multigravidae. *Trop Med Int Health* 6(10); 6(10):770-778.
- Shulman CE & Dorman EK (2003) Importance and prevention of malaria in pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97:30-35.
- Shute GT (1988) The microscopic diagnosis of malaria. In: Wernersdorfer WH, McGreogor I, editors. *Malaria: principles and practice of malariology*. Vol I Edinburgh: Churchill Livingstone. p 718-814
- Sibley CP, Birdsey TJ, Bronbill P, Clarson LH, Doughty I & Glazier JD (1998a) Mechanisms of maternofetal exchange across the human placenta. *Biochemical Society Transactions* 26(part 2):86-90.
- Sibley CS, D'Souza S, Glazier J & Greenwood S (1998b) Mechanisms of solute transfer across the human placenta: effects of intrauterine growthrestriction. *Fetal and Maternal Medicine Review* 10:197-206.
- Simister NE & Story CM (1997) Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to foetus. *Journal of Reproductive Immunology* 37:1-23.
- Smith NC (1996) An immunological hypothesis to explain the enhanced susceptibility to malaria during pregnancy. *Parasitology Today*, 12,4-6.
- Snounou G (1996) Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification in *Methods in Molecular Biology*, vol. 50: Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods. Clapp J.P. (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ: 263-291.
- Snow RW, Hay SI (2006) Comparing methods of estimating the global morbidity burden from *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*; 74:189-90. 5.
- Staalsoe T, Megnekou R & Fievet N (2001) Acquisition and decay of antibodies to pregnancy-associated variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes that protect against placental parasitemia. *J Infect Dis*.184:618-626.
- Steketee RW (1996) Mangochi Malaria Research Project. Washington, D.C.: United States Agency for International Development. Malaria prevention in pregnancy: the effects of treatment and chemoprophylaxis on placental malaria infection, low birth weight, and fetal, infant, and child survival.
- Steketee RW, Nahlen BL; Parise ME & Menendez C (2001) The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg*. 64:28-35.
- Steketee RW, Wirima JJ, Hightower AW, Slutsker L, Heiman DL & Breman JG (1996a) The effect of malaria and malaria prevention in pregnancy on offspring birthweight, prematurity, and intrauterine growth retardation in rural Malawi. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55(Suppl.), S33-S41.
- Steketee RW, Wirima JJ, Slutsker L, Roberts JM, Khoromana CO, Heiman DL & Breman JG (1996b) Malaria parasite infection during pregnancy and at delivery in mother, placenta, and newborn: efficacy of chloroquine and mefloquine in rural Malawi. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55(Suppl.), S24-S32.

- Steketee RW, Wirima JJ, Slutsker L; Breman JG & Heymann DL (1996) Comparability of treatment groups and risk factors for parasitemia at the first antenatal clinic visit in a study of malaria treatment and prevention in pregnancy in rural Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 55:17–23.
- Suguitan AI Jr, Cadigan TJ & Nguyen TA (2003) Malaria-associated cytoquine changes in the placenta of women with pre-term deliveries in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 69:574-81.
- Sullivan AD, Nyerenda T & Cullinan T (1999), *et al.*, Malaria during pregnancy: intrauterine growth retardation and preterm delivery in Malawi. *J Infect Dis* 179:1580-83.
- Tako EA, Zhou A, Lohoue J, Leke R, Taylor DW & Leke RF (2005) Risk factors for placental malaria and its effect on pregnancy outcome in Yaoundé, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 72:236–242.
- Taylor DW, Zhou A, Marsillio LE, Thuita LW, Leke EB, Branch O, Gowda DC, Long C & Leke RF (2004) Antibodies that inhibit binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A and to the C terminus of merozoite surface protein 1 correlate with reduced placental malaria in Cameroonian women. *Infect Immun* 72:1603-1607.
- Tazuke SI, Mazure NM & Sugawara J (1998) Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG cells: a possible model in fetal hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10188-93
- ter Kuile FO, Terlouw DJ & Phillips-Howard PA (2003) Reduction of malaria during pregnancy by permethrin-treated bed nets in an area of intense perennial malaria transmission in western Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 50-60.
- Thwing JI, Mihigo J, Fernandes AP, Saute F, Ferreira C, Fortes F, de Oliveira AM & Newman RD (2009) How much malaria occurs in urban Luanda, Angola? A health facility-based assessment. *Am J Trop Med Hyg*, 80(3):487-491.
- Tibayrenc M, Kjellberg F & Ayala FJ (1990) A clonal theory of parasitic protozoa: the population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma*, and its medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2414–2418.348.
- Tobian AA, Mehlotra RK, Malhotra I, Wamach A, Mungai P & Koech D (2000) Frequent umbilical cord-blood and maternal-blood infection with *Plasmodium falciparum*, *P. malariae* and *P. ovale* in Kenya. *Journal of Infectious Diseases* 182:558–63.
- Trape JF, Pison G, Spiegel A, Enel C & Rogier C (2002) Combating malaria in Africa. *Trends Parasitol* 18: 224–230.
- Uddenfeldt Wort U, Hastings I, Bergstrom S, Massawe S, Lipingu C & Brabin BJ (2007) Increased postpartum blood loss in pregnancies associated with placental malaria. *Int J Gyn & Obst* 96:171-175.
- Udomsangpetch R, Todd J, Carlson J & Greenwood BM (1993) The effects of haemoglobin genotype and ABO blood group on the formation of rosettes by *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 48:149–53.

- Udupa KB& Sharma BG (1996) Possible role of tumor necrosis factor (TNF α) in erythropoietic suppression by endotoxin and granulocyte/macrophage colony-stimulatory factor. *Am J Hematol.* 52, 178.
- Uneke CJ (2007) Impact of Placental *Plasmodium falciparum* Malaria on Pregnancy and Perinatal Outcome in Sub-Saharan Africa. *Yale J Biol Med.* 80:39-50.
- Uneke CJ (2008) Impact of Placental *Plasmodium falciparum* Malaria on Pregnancy and Perinatal Outcome in Sub-Saharan Africa Part III: Placental Malaria, Maternal Health, and Public Health. *Yale J Biol Med.* March; 81(1): 1–7.
- USAID, Africa Bureau (2005) Strategic Framework for Africa. Draft. Washington DC (June).
- Valente B, Campos P, Rosário B, Varandas L& Silveira H (2010 in press) Prevalence and risk factors of *Plasmodium falciparum* infections in pregnant women of Luanda, Angola.
- Vallely A, Vallely L, Changalucha J, Greenwood B& Chandranohan D (2007) Intermittent preventive treatment for malaria in pregnancy in Africa: What's new, what's needed?. *Malaria Journal* 6:16.
- van den Broek NR, White SA& Neilson JP (1988) The relationship between asymptomatic human immunodeficiency virus infection and the prevalence and severity of anemia in pregnant Malawian women. *Am Trop Med Hyg* 59:1004-07
- van den Broek NR& Letsky EA (2000) Etiology of anemia in pregnancy in south Malawi. *Am J Clin Nutr* 72:2478-565.
- VanderJagt TA, Ike EI, Ujah IO, Belmonte J, Glew RH& VanderJagt DJ (2005) Comparison of the OptiMal, rapid test and microscopy for detection of malaria in pregnant women in Nigeria. *Trop Med Int Health* 10(1):39-41.
- Verhoeff FH, Brabin BJ, Chimsuku L, Kazembe P, Russel WB& Broadhead RL (1998) An evaluation of intermittent sulfadoxine-pyrimethamine treatment in pregnancy on parasite clearance and risk of low birth weight in rural Malawi. *Ann Trop Med Parasitol* 92:141-150.
- Verhoeff FH, Brabin BJ, Hart CA, Chimsuku L, Kazembe P& Broadhead R (1999) Increased prevalence of malaria in HIV infected pregnant women and its implications for malaria control. *Tropical Medicine and International Health* 4:5–12.
- Vleugels MPH, Brabin B, E Ling WMC& Deg Raaf R (1989) Cortisol and *Plasmodium falciparum* infection in pregnant women in Kenya. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83, 173-177.
- Wahlgren M (1992) Amino acid nutrition across the placenta. *Nutrition Reviews* 50:13–24.
- Wahlgren M, Treutiger CJ& Gysin J (1999) Cytoadherence and rosetting in the pathogenesis of severe malaria. In: Wahlgren, M. e Perlmann, P (ed). *Malaria: Molecular and Clinical Aspects*. Amsterdam: Harwood Academic Press, p. 289-327.
- Walker-Abbey A, Djokam RR, Eno A, Leke RF, Titanji VP, Fogako J, Sama G, Thuita LH, Beardslee E, Snounou G, Zhou A & Taylor DW (2005) Malaria in pregnant Cameroonian women: the effect of age and gravidity on submicroscopic and mixed-species infections and multiple parasite genotypes. *Am J Trop Med Hyg.* 72(3):229-35.

- Walter PR, Garin JF, Blot P & Philippe E (1981) Placenta et paludisme. Etude morphologique, parasitologique et clinique. *Journal de Gyneologie Obstetrique et Biologie Reproductive* 10, 535-542.
- Walter PR, Garin Y & Blot P (1982) Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. *American Journal of Parasitology* 109:330-42.
- Watkinson M, Rushton DI & Lunn PG (1985) Placental malaria and foeto± placental function: low plasma oestradiols associated with malaria pigmentation of the placenta. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 79,448-450.
- Watkinson M & Rushton DI (1983) Plasmodial pigmentation of placenta and outcome of pregnancy in West African mothers. *Br Med J (Clin Res Ed)* 287:251–254.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L & Mosman TR (1993) Bi-directional cytokine interaction in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunology Today* 14:353–6.
- Weinberg FD (1984) Pregnancy associated depression of cell mediated immunity. *Reviews of Infectious Diseases* 6, 814± 831.
- WHO (1992) The prevalence of Anemia in women: A Tabulation of Available Information. Geneva: World Health Organization (WHO/MCH/MSM/92.2).
- WHO (1994) Antimalarial drug policies: Data requirements, treatment of uncomplicated malaria and management of malaria in pregnancy. Report of an informal consultation. WHO/MAL/ 94.1070. Geneva: World Health Organization.
- WHO (2003) Available from http://www.afro.who.int/amd_2003/mainreport.pdf.
- WHO (2004) A Strategic Framework for Malaria Prevention and Control during Pregnancy in the Africa Region. World Health Organization Regional Office for Africa.
- WHO (2009) World Malaria Report 2009. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html (accessado em 20 de 12 de 2010).
- WHO/AFRO (2004) A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the African region. Brazzaville: World Health Organization Regional Office for Africa. AFR/MAL/04.01.
- Wickramasuriya GAW (1935) Some observations on malaria occurring in association with pregnant woman. *J Obstet Gynaecol Br Empire* 42:816-34.
- Wickramasuriya GAW (1937) Clinical features of malaria in pregnancy. In: Wickramasuriya GAW, editor. *Malaria and ankylostomiasis in the pregnant women*. London: Oxford University Press; p. 5–90.
- Xi G, Leke RG, Thuita LW, Zhou A, Leke RJ & Mbu R (2003) Congenital exposure to *Plasmodium falciparum* antigens: prevalence and antigenic specificity of in-utero produced antimalarial immunoglobulin M antibodies. *Infection and Immunity* 71:1242–6.
- Yamada M, Stechetee R, Abramowsky C, Kida M, Wirima J, Heymann D, Rabbege J, Breman J & Aikawa M (1989) *Plasmodium falciparum* associated placental pathology: a light and electron microscopic and immunohistologic study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41,161-168.

- Yang SL, Chin-ChuL, River P&Moawad AH (1983) Immunoglobulin concentration in newborn infants associated with intrauterine growthretardation. *Obstetrics and Gynaecology* 62:561-4.
- Zhou A, Megnekou R, Leke R, Fogato J, Metenou S, Trock B, Taylor DW & Leke RF (2002) Prevalence of *Plasmodium falciparum* infection in pregnant Cameroonian women. *Am J Trop Med Hyg* 67:566-570.

ANEXOS

Anexo 1- Desequilíbrio de *linkage* (por população)

População	Locus#1	Locus#2	P-Value	Nºtestes	Bonferroni
SP	TA102	TA1	0.00000	108	0.000474825
CU	TA81	PfPK2	0.00000	107	0.000479262
CU	TA109	TA102	0.00000	106	0.000483782
CU	ARA2	TA1	0.00000	105	0.000488388
PL	Pfg377	TA87	0.00000	104	0.000493083
PL	Pfg377	TA81	0.00000	103	0.000497869
PL	Pfg377	TA109	0.00000	102	0.000502749
PL	Pfg377	PfPK2	0.00000	101	0.000507725
PL	Pfg377	TA42	0.00000	100	0.000512801
PL	TA81	TA42	0.00000	99	0.00051798
PL	TA109	TA42	0.00000	98	0.000523264
PL	ARA2	TA102	0.00000	97	0.000528657
PL	Pfg377	TA1	0.00000	96	0.000534162
PL	ARA2	TA1	0.00000	95	0.000539784
CU	Pfg377	TA81	0.00117	94	0.000545524
PL	TA87	ARA2	0.00177	93	0.000551389
SP	Pfg377	TA42	0.00204	92	0.00055738
SP	ARA2	TA1	0.00369	91	0.000563504
PL	TA109	PfPK2	0.00512	90	0.000569763
PL	TA81	TA1	0.00550	89	0.000576163
SP	TA109	PfPK2	0.00694	88	0.000582709
PL	TA42	ARA2	0.00709	87	0.000589404
PL	TA102	TA1	0.00905	86	0.000596256
PL	TA109	ARA2	0.01279	85	0.000603268
PL	TA81	TA109	0.01304	84	0.000610448
SP	ARA2	TA102	0.01356	83	0.000617801
SP	TA109	TA42	0.01479	82	0.000625332
CU	TA87	TA109	0.01494	81	0.00063305
PL	PfPK2	TA42	0.01545	80	0.000640961
PL	TA42	TA1	0.01556	79	0.000649071
PL	Pfg377	TA102	0.02601	78	0.00065739

População	Locus#1	Locus#2	P-Value	Nºtestes	Bonferroni
SP	PfPK2	TA42	0.02645	77	0.000665925
PL	TA87	PfPK2	0.02801	76	0.000674684
PL	TA81	PfPK2	0.03114	75	0.000683677
CU	TA87	TA102	0.03472	74	0.000692912
SP	TA87	PfPK2	0.03492	73	0.000702401
CU	Pfg377	TA87	0.03632	72	0.000712153
CU	TA102	TA1	0.03908	71	0.00072218
SP	TA81	TA42	0.04389	70	0.000732493
CU	TA109	TA1	0.04693	69	0.000743105
CU	TA109	ARA2	0.05786	68	0.000754029
PL	TA87	TA81	0.06058	67	0.000765279
CU	TA87	TA1	0.06927	66	0.000776869
SP	Pfg377	TA81	0.06966	65	0.000788816
PL	TA87	TA1	0.07098	64	0.000801137
SP	TA81	PfPK2	0.07243	63	0.000813848
CU	ARA2	TA102	0.07263	62	0.000826969
CU	Pfg377	TA109	0.08234	61	0.00084052
SP	Pfg377	TA87	0.08331	60	0.000854523
SP	TA109	TA1	0.12318	59	0.000869
SP	Pfg377	ARA2	0.14562	58	0.000883976
SP	TA109	TA102	0.17085	57	0.000899478
PL	TA109	TA1	0.17212	56	0.000915532
PL	TA87	TA42	0.17627	55	0.000932171
CU	TA87	TA81	0.17746	54	0.000949425
SP	PfPK2	TA1	0.18034	53	0.00096733
CU	TA87	ARA2	0.18094	52	0.000985923
SP	Pfg377	TA109	0.20178	51	0.001005245
CU	TA81	TA109	0.20537	50	0.00102534
PL	PfPK2	TA102	0.22509	49	0.001046254
CU	TA42	ARA2	0.22572	48	0.00106804
PL	TA81	ARA2	0.22671	47	0.001090751
PL	PfPK2	TA1	0.22869	46	0.00111445
PL	TA81	TA102	0.23288	45	0.001139202
CU	TA87	TA42	0.24027	44	0.001165077
SP	TA42	ARA2	0.24084	43	0.001192156
PL	PfPK2	ARA2	0.27052	42	0.001220523
CU	TA42	TA102	0.27264	41	0.001250274
CU	Pfg377	TA102	0.29196	40	0.001281511
PL	TA87	TA109	0.31211	39	0.001314348
PL	TA109	TA102	0.31240	38	0.001348913

População	Locus#1	Locus#2	P-Value	Nºtestes	Bonferroni
SP	TA109	ARA2	0.33012	37	0.001385345
SP	TA87	TA102	0.33356	36	0.001423799
SP	Pfg377	PfPK2	0.33545	35	0.001464449
CU	Pfg377	TA1	0.33584	34	0.001507489
SP	TA81	TA109	0.33971	33	0.001553135
CU	PfPK2	TA42	0.34002	32	0.001601631
CU	TA109	PfPK2	0.34644	31	0.001653254
SP	PfPK2	ARA2	0.37924	30	0.001708316
PL	TA87	TA102	0.37958	29	0.001767171
SP	TA42	TA1	0.40477	28	0.001830226
CU	Pfg377	PfPK2	0.43369	27	0.001897948
CU	PfPK2	TA102	0.44179	26	0.001970874
SP	Pfg377	TA102	0.46593	25	0.002049628
PL	TA42	TA102	0.48794	24	0.002134938
SP	TA87	TA81	0.48986	23	0.002227658
SP	TA87	TA42	0.49801	22	0.002328798
CU	Pfg377	ARA2	0.50029	21	0.002439557
SP	TA87	TA1	0.51286	20	0.002561379
CU	Pfg377	TA42	0.52243	19	0.002696006
CU	TA109	TA42	0.58821	18	0.002845571
PL	Pfg377	ARA2	0.61213	17	0.003012705
SP	Pfg377	TA1	0.62350	16	0.003200698
SP	TA81	ARA2	0.63310	15	0.003413713
CU	TA81	TA42	0.64444	14	0.003657103
SP	TA81	TA1	0.69995	13	0.003937864
SP	TA87	TA109	0.71094	12	0.004265319
CU	PfPK2	ARA2	0.72236	11	0.004652172
CU	TA81	TA1	0.74826	10	0.005116197
SP	TA87	ARA2	0.75999	9	0.005683045
CU	TA42	TA1	0.78379	8	0.006391151
SP	TA42	TA102	0.82922	7	0.007300832
SP	PfPK2	TA102	0.83746	6	0.008512445
CU	TA81	TA102	0.86609	5	0.010206218
CU	PfPK2	TA1	0.89008	4	0.012741455
SP	TA81	TA102	0.93342	3	0.016952428
CU	TA81	ARA2	0.94343	2	0.025320566
CU	TA87	PfPK2	0.99903	1	0.05

Anexo 2- Desequilíbrio de *linkage* (todas as populações)

Parde locus		Chi2	df	P-value	Nºtestes	Bonferroni
Pfg377	TA87	Infinity	6	0.000000	36	0.001423799
Pfg377	TA81	Infinity	6	0.000000	35	0.001464449
Pfg377	TA109	Infinity	6	0.000000	34	0.001507489
Pfg377	PfPK2	Infinity	6	0.000000	33	0.001553135
TA81	PfPK2	Infinity	6	0.000000	32	0.001601631
Pfg377	TA42	Infinity	6	0.000000	31	0.001653254
TA81	TA42	Infinity	6	0.000000	30	0.001708316
TA109	TA42	Infinity	6	0.000000	29	0.001767171
TA109	TA102	Infinity	6	0.000000	28	0.001830226
ARA2	TA102	Infinity	6	0.000000	27	0.001897948
Pfg377	TA1	Infinity	6	0.000000	26	0.001970874
ARA2	TA1	Infinity	6	0.000000	25	0.002049628
TA102	TA1	Infinity	6	0.000000	24	0.002134938
TA109	PfPK2	22.6102006	6	0.000938	23	0.002227658
PfPK2	TA42	17.7627926	6	0.006853	22	0.002328798
TA87	ARA2	16.6416316	6	0.010695	21	0.002439557
TA109	ARA2	16.6342396	6	0.010726	20	0.002561379
TA42	ARA2	15.7223056	6	0.015325	19	0.002696006
TA81	TA109	14.0046776	6	0.029584	18	0.002845571
TA87	PfPK2	13.8617196	6	0.031220	17	0.003012705
TA109	TA1	13.8255406	6	0.031647	16	0.003200698
TA87	TA1	11.9657066	6	0.062738	15	0.003413713
TA81	TA1	11.6995176	6	0.069018	14	0.003657103
TA87	TA109	11.4185606	6	0.076270	13	0.003937864
Pfg377	TA102	11.2882656	6	0.079865	12	0.004265319
TA87	TA102	10.8541246	6	0.092991	11	0.004652172
TA42	TA1	10.6222046	6	0.100778	10	0.005116197
TA87	TA81	10.4928726	6	0.105372	9	0.005683045
TA87	TA42	7.7177316	6	0.259521	8	0.006391151
PfPK2	TA1	6.6094866	6	0.358475	7	0.007300832
Pfg377	ARA2	6.2202656	6	0.398974	6	0.008512445
PfPK2	ARA2	5.2044546	6	0.517871	5	0.010206218
PfPK2	TA102	4.9711156	6	0.547523	4	0.012741455
TA42	TA102	4.4088716	6	0.621525	3	0.016952428
TA81	ARA2	3.9988876	6	0.676827	2	0.025320566
TA81	TA102	3.3397976	6	0.765147	1	0.05