

**TÍTULO: O PAPEL DA HAPTOGLOBINA E HEMOPEXINA NA
PREVENÇÃO DO DANO NEUROLÓGICO CAUSADO POR
DOENÇAS HEMOLÍTICAS**

**SUBTÍTULO: O PAPEL DA HAPTOGLOBINA E HEMOPEXINA NA PREVENÇÃO
DO DANO NEUROLÓGICO CAUSADOS POR DOENÇAS HEMOLÍTICAS**

**AUTOR:
ANTONINO SAMBUNDO B. KAPITÃO**



Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em ciências biomoleculares
Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier | Universidade Nova de Lisboa

Oeiras, 2022



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

ITQB-UNL | Av. da República, 2780-157 Oeiras, Portugal
Tel (+351) 214 469 100 | Fax (+351) 214 411 277

www.itqb.unl.pt

Oeiras, Março., 2022

Título: O PAPEL DA HAPTOGLOBINA E/OU HEMOPEXINA NA PREVENÇÃO DO DANO NEUROLÓGICO CAUSADOS POR DOENÇAS HEMOLÍTICAS

AuthorAntonino
S. B. Kapitão



Universidade Nova de Lisboa

**O PAPEL DA HAPTOGLOBINA E
HEMOPEXINA NA PREVENÇÃO DO
DANO NEUROLÓGICO CAUSADO POR
DOENÇAS HEMOLÍTICAS**

ANTONINO SAMBUNDO B. KAPITÃO

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
BIOMOLECULARES

Oeiras, 2023

III



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

O PAPEL DA HAPTOGLOBINA E HEMOPEXINA NA PREVENÇÃO DO DANO NEUROLÓGICO CAUSADO POR DOENÇAS HEMOLÍTICAS

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
BIOMOLECULARES

Candidato: Antonino Sambundo B. Kapitão, MD
Assist. Estagiário da Faculdade de Medicina da
Universidade Katyavala Bwila

Supervisor: Raffaella Gozzelino, PhD
Laboratório de Inflamação e Neurodegeneração
Centro de Estudos de Doenças Crónicas
(CEDOC)/NOVA Medical School, NOVA
Universidade de Lisboa, Portugal.

Co-Supervisor: Carlos Penha Gonçalves, PhD
Laboratório de Doenças Genéticas
Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal.

Co-Supervisor: Maria do Rosário Bragança
Sambo, MD, PhD, Professora Catedrática da
Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho
Neto, Luanda, Angola.

*À Ariela, que despertou em mim novo
sonhos...*

*À minha mãe, que sempre me apoiou a
conquistar sonhos...*

*À memória daqueles que partiram, para
nunca, mas voltar...*

AGRADECIMENTOS

À Deus todo poderoso, por me manter firme nesta longa luta, cheia de altos e baixos, onde a fé é uma ferramenta valiosa, a luta incansável e a esperança são imprescindíveis.

Aos meus orientadore(a)s Dra. Raffaella Gozzelino, Dra. Maria do Rosário Sambo e Dr. Carlos Penha Gonçalves, que a pesar das falhas e das dificuldades não desistiram de mim, o meu eterno agradecimento, pelo apoio incondicional. Mostraram que está tese era o princípio e não o fim de uma parceria e amizade. Ainda sou pequeno e espero continuar a aprender convosco nesta longa caminhada.

À minha mãe, cuja as circunstâncias da vida não permitiram sonhar alto, mas ensinou-me a sonhar e a lutar pelos sonhos.

Esteve comigo, em todos os momentos desta longa caminhada. Ajudou-me a caminhar, quando os meus pés, já não podiam caminhar e mesmo distante, esteve sempre perto.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação Ciência para o Desenvolvimento (PGCD) sem exceção, convosco partilhei momentos que levarei comigo, onde ver que eu vá. Conto convosco no relançar da investigação científica em África.

As coordenadoras do PGCD, em especial a Joana Sá que incansavelmente trabalharam, para levar à bom porte o programa. Sacrificaram um pouco de vocês, para ajudar-nos a aprender e realizar, mas um sonho neste mar infinito de sonhos.

Aos meus colegas de laboratório, que

para mim foram todos especiais. Conhecer-vos, foi um prazer do qual não quero me desfazer. A vida a de separar-nos um dia, mas carregou-vos na alma, para onde quer que eu vá.

À direção da faculdade de medicina da Universidade Katyavala Bwila, especialmente ao Dr. Tomás João, Vice-Decano para a área científica, pelo apoio e incentivo para a realização do trabalho de campo.

À direção do Hospital Geral de Benguela (HGB), na pessoa do Dr. Eduardo Kedisobua e do Centro de Saúde da Graça (CSG), na pessoa do Dr. Eduardo Vilombo, por permitirem a realização do trabalho de campo, nas respectivas unidades.

Aos técnicos de laboratório da
IX

pediatria do HGB e do CSG, que sempre que possível me ajudaram na recolha de amostras de sangue, em crianças internadas que participaram no estudo. Sem vocês, este trabalho árduo que exige paciência e perícia não seria possível.

À Ariela, minha eterna princesa que surgiu no fim desta longa jornada, para dar cores a minha vida e reavivar as minhas forças. A quem quero ensinar que por, mas dura e longa que seja a caminhada é possível vencermos, se mantermos a fé e esperança em Deus e em nós mesmo.

**“O PAPEL DA HAPTOGLOBINA E
HEMOPEXINA NA PREVENÇÃO DO
DANO NEUROLÓGICO CAUSADO POR
DOENÇAS HEMOLÍTICAS”**

Candidato ao PhD:

Antonino Sambundo B. Kapitão

XI

Resumo

As doenças hemolíticas, correspondem a um grupo de doenças heterogêneo, cujo o denominador comum é a lise heritrocitária e de entre elas quais, destaca-se a malária cerebral (MC), que é uma emergência médica com alta taxa de morbidade e mortalidade a nível mundial que cursa com lise eritocitária. Constitui a forma, mais grave da infecção por *Plasmodium falciparum* (Pf) e cursa com complicações neurológicas, da retina e lise heritrocitária.

A compreensão da influência que componentes moleculares, exercem na fisiopatologia da doença, assim como, na evolução clínica da mesma, continua a ser um grande desafio da investigação científica, apesar dos avanços já alcançados. Assim que, esta tese pretendeu avaliar o papel da

libertação da Hemoglobina (Hb), Hemo e de proteínas que regulam o seu metabolismo, na evolução clínica da MC. As componentes genéticas na patofisiologia das lesões neurológicas e da retina não foram investigadas em crianças afetadas pela doença.

Realizou-se um estudo prospectivo analítico de caso-controles, onde se buscou correlacionar os níveis plasmáticos de Hb, plaquetas e da parasitemia e a severidade da doença. A coorte foi constituída por três grupos, incluindo 83 (27.2%) casos de MC, 124 (40.6%) casos de malária não complicada (MnC) e 98 (32.1%) casos de indivíduos não infectados (NIF), usados como controles.

Os resultados revelam que tivemos uma proporção entre os sexos masculino e feminino de 1:1 em todos os grupos. Os pacientes menores de 5 anos se confirmaram mais suscetíveis a doença, revelando a

existência de uma relação causal entre os níveis de Hb e a severidade da MC. O estudo permitiu também correlacionar a associação do risco de morte por malária com a retinopatia da malária (Ret+M) odds ratio (OR) = 3,25 (1,017-10,44), assim como, demonstrar o papel da Hp e da Hx na prevenção do dano neurológicos em ratinhos e humanos.

Todavia, essa pesquisa permitiu assim, extrapolar uma relação causal directa entre os níveis dos factores acima mencionados aos danos neurológicos e da retina, observados nestes pacientes. Claramente, estudos futuros serão necessários, para uma maior compreensão da MC e suas complicações, causadas pela libertação do Hemo.

Palavras-Chave: Hemolises, Hemoprotéínas, Haptoglobina, Hemopexina, Malária Cerebral.

Abstract

Hemolytic diseases correspond to a heterogeneous group of diseases, whose common denominator is erythrocyte lysis. Cerebral malaria (CM) is a medical emergency with a high rate of morbidity and mortality worldwide, which leads to erythrocyte lysis. It constitutes the most severe form of *Plasmodium falciparum* (Pf) infection and course with neurological and retinal complications.

Understanding the influence that molecular components exert on the pathophysiology of the disease, as well as on its clinical evolution, continues to be a major challenge for scientific investigation, despite

the advances already achieved. Therefore, it is in order to evaluate the role of the release of Hemoglobin (Hb), Heme and proteins that regulate its metabolism, in the clinical evolution of CM. Genetic components in the pathophysiology of neurological and retinal lesions have not been investigated in children with the disease.

A prospective analytical case-control study was carried out, which sought to correlate plasma levels of Hb, platelets and parasitemia and the severity of the disease. The cohort was attended by three groups, including 83 (27.2%) cases of MC, 124 (40.6%) cases of uncomplicated malaria

(MnC) and 98 (32.1%) cases of uninfected individuals (NIF), used as controls.

The results proved that we had a male to female ratio of 1:1 in all groups. Patients under 5 years of age confirmed the disease more, revealing the existence of a causal relationship between Hb levels and the severity of CM. The provided study also correlated the association between the risk of death from malaria and malarial retinopathy (Ret+M) odds ratio (OR) = 3.25 (1.017-10.44), as well as demonstrating the role of Hp and Hx in the prevention of neurological damage in rats and humans.

However, this research thus allowed extrapolating a direct causal relationship

between the levels of the factors mentioned above and the neurological and retinal damage observed in these patients. Clearly, future studies will be needed for a better understanding of CM and its complications caused by the release of Heme.

Keywords: Hemolysis, Hemoproteins, Haptoglobin, Hemopexin, Cerebral Malaria.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTs	Terapia Combinada a Base de Artemisina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AL	Arteméter + Lumefantrina
AQ	Amodiaquina
AS	Artesunato
ANOVA	Análise de variância
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BHE	Barreira Hemato Encefálica,
BHR	Barreira Hemato Retiniana
BU	Banco de Urgências
CD	Cluster de Diferenciação
CE	Comité de Ética
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
CO	Monóxido de carbono
CSG	Centro de Saúde da Graça
CXCL-10	C-X-C Motif Chemokine Ligand 10

CXCR3	Receptor da citocina CXCL-10
DDA	Doença Diarreica aguda
DHA	Dihidroartemisinina
Dif.	Dificuldade Respiratória
Resp	
DSP	Depressão Severa ao Nascer
DRA	Doença Respiratória Aguda
DV	Descoloração Vascular
EA	Exsudado algudonoso
ES	Esfregaço Sanguíneo
EP	Edema da Papila.
Fe²⁺	Ferro
FT	Febre Tifóide
GE	Gota Espessa
Hb	Hemoglobina
HIV	Vírus de Imunodeficiência Humana
Hg	Hemograma
HCB	Hemorragia de Centro Branco
HGB	Hospital Geral de Benguela

HO-1	Hemo-Oxigenasa 1
HTA	Hipertensão Arterial
Hp	Haptoglobina
Hpx	Hemopexina
IL	Interleucinas
IFNAR1	Recetor do Interferon Tipo 1
Int. Conf	Intervalo de Confiança
JNK	c-Jun NH2-terminal Kinase
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LI	Limite Inferior
LS	Limite Superior.
Mal	Malária
MC	Malária Cerebral
MCR+	Malária Cerebral e Retinopatia Positiva
MN	Má Nutrição
MnC	Malária não-Complicada
MSP1	Proteína 1 da Superfície do Merozoíto do <i>P. Falciparum</i>
NIF	Não Infetadas

NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds Ratio
PAV	Programa Alargado de Vacinação
PfEMP1	Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1
PI	Plasmodium
PNCM	Programa Nacional de Combate da Malária
PP	Pesquisa de Plasmodium
PPQ	Piperaquina
Ret+	Retinopatia Positiva
Ret-	Retinopatia Negativa
RM	Retinopatia da Malária
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SNC	Sistema Nervoso Central
TBP	Tuberculose Pulmonar
TCE	Traumatismo Cranioencefálico
TGFB2	Factor de Crescimento Transformador Beta 2

Lista de figuras

Nº da Figura	Título da figura
1	Representação de países com casos endógenos de malária em 2000 e seu estado em 2017
2	Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> e respectivos estágios (representados em caixas) no mosquito e no humano
3	Lesões da retina em um paciente com MC e RM; hemorragias de centro branco, descoloração vascular, palidez da retina e edema da papila
4	Representações da estrutura química da molécula de Hemoglobina humana no adulto
5	Representações da estrutura química e tridimensional do Hemo
6	A influência do desequilíbrio da hemostasia do Fe^{2+} em inúmeros processos patológicos.
7	Distribuição epidemiológica da

	malária em Angola
8	Principais causas de morte registadas no HGB em 2019. Fonte: Serviços de Estatística do HGB
9	Número de casos de internamentos por malária na pediatria do HGB em 2017
10	Número de casos de internamentos por malária na pediatria do HGB em 2018
11	Número de casos de internamentos por malária na pediatria do HGB em 2019
12	Gráfico de tendência do número de casos de internamentos por malária na pediatria do HGB, para o ano de 2020
13	Número total de participantes por grupos
14	Distribuição do número de casos dos três grupos de estudo por sexo
15	Distribuição do número de casos de MC com lesões da retina por sexo
16	Distribuição do número de casos de malária cerebral com complicações neurológicas por

	sexo
17	Distribuição da idade em meses nos diferentes fenótipos
18	Distribuição da idade em meses nos diferentes fenótipos de malária
19	Distribuição da idade em meses nos pacientes com o fenótipo de MC
20	Distribuição da média de idade em meses dos sub-fenótipos de MC agrupado pela presença ou não de convulsões
21	Distribuição da média de idade em meses dos sub-fenótipos de malária cerebral agrupado pela presença ou não de lesões da retina
22	Distribuição da parasitemia nos diferentes fenótipos de malária
23	Distribuição da parasitemia nos diferentes sub-fenótipos de MC agrupados pela presença ou não de lesões da retina
24	Distribuição da parasitemia nos diferentes sub-fenótipos de MC agrupados de acordo a presença ou não de convulsões
25	Distribuição da média do nível de plaquetas nos diferentes

	fenótipos
26	Distribuição da média do nível de plaquetas nos pacientes com malária
27	Distribuição da média das plaquetas nos diferentes sub-fenótipos de MC agrupados de acordo a presença ou não de convulsões
28	Distribuição média das plaquetas nos diferentes sub-fenótipos de MC agrupados de acordo a presença ou não de convulsões
29	Distribuição da hemoglobina nos diferentes fenótipos
30	Distribuição da parasitemia nos diferentes sub-fenótipos de MC, que apresentam ou não Hb patológica
31	Distribuição da idade nos diferentes sub-fenótipos de MC, agrupados pela presença ou não de Hb patológica
32	Distribuição do sexo nos diferentes sub-fenótipos de MC, agrupados pela presença ou não de Hb patológica
33	Distribuição da Hb nos diferentes sub-fenótipos, onde os pacientes foram agrupados

	de acordo a presença ou não de convulsões
34	Distribuição da Hb nos diferentes sub-fenótipos de MC, onde os pacientes foram agrupados de acordo a presença ou não de lesões da retina
35	Distribuição da Hb nos diferentes sub-fenótipos de MC, onde os pacientes foram agrupados de acordo com a presença ou não de convulsões
36	Distribuição da parasitemia nos diferentes sub-fenótipos de MC, onde os pacientes foram agrupados de acordo com a presença ou não de convulsões
37	Distribuição das plaquetas nos diferentes sub-fenótipos de MC, onde os pacientes foram agrupados de acordo com a presença ou não de convulsões
38	Comparação dos níveis de Hp em ratinhos C57BL/6 controlos ou induzidos com malária cerebral (CM) ou severa (SM).
39	Comparação dos níveis de Hx em ratinhos C57BL/6 controlos ou induzidos com malária

	cerebral (CM) ou severa (SM).
40	Comparação dos níveis de Hp em crianças com malária assintomática (), malária severa (MS), malária cerebral (CM) e respectivo controlo (Flu).
41	Comparação dos níveis de Hx em crianças com malária assintomática (), malária severa (SM), malária cerebral (CM) e respectivo controlo (Flu).

Lista de tabelas

Nº da tabela	Título da tabela
1	Distribuição das principais lesões da retina nos pacientes com MC, observadas durante a realização da Fundoscopia
2	Correlação das variáveis clínicas no grupo de pacientes com MC, subdivididos pela presença ou não de convulsões
3	Correlação das variáveis clínicas no grupo de pacientes com MC, subdivididos pela presença ou não de lesões da retina

ÍNDICE

CAPÍTULO.1.....	1
1.1. O impacto da malária no desenvolvimento social e económico.....	1
1.2. Etiologia e Imunopatogénese da malária.....	6
1.2.1. Agente causal (Plasmodium).....	6
1.2.2. Ciclo de vida do Plasmodium sp no homem e no mosquito.	9
1.3. Imunopatogénese da malária.	13
1.4. A clínica da malária.....	18
1.4.1. Malária não complicada.....	18
1.4.2. Malária grave.....	20
1.4.3. Malária cerebral.	21
1.4.3.a Complicações neurológicas da malária cerebral.	28
1.4.3.b. Lesões da retina na malária cerebral.	31
1.4.4. Anemia severa.....	36
1.4.5. Hipoglicemia.	37
1.4.6. Hiperparasitémia.....	39
1.4.7. Acidose metabólica e distres respiratório.....	40

1.4.8. Hipotensão e Choque.....	41
1.4.9. Insuficiência Renal.	42
1.4.10. Disfunção Hepática.....	43
1.4.11. Coagulopatias.....	44
1.5. Genética da malária grave.	45
1.5.1. Componente genética da malária grave.....	45
1.6. Os mecanismos moleculares e bioquímicos da malária.	48
O metabolismo da Hemoglobina no curso da malária.	48
1.6.1. O metabolismo do Hemo.....	54
1.7. O papel da haptoglobina e da Hemopexina como proteínas reguladoras da reactividade do Hemo.....	58
1.7.1. Hemopexina.....	58
1.7.2. Haptoglobina.	60
1.7.3. Os efeitos da acumulação de Ferro.	61
1.7.4. Os impactos negativos dos ensaios clínicos de suplementação do Ferro.	66
1.8. Tratamento da malária.....	68
1.8.1. Estratégias terapêuticas experimentais da malária.	71
CAPÍTULO 2.....	74

2.1. OBJECTIVOS:	75
2.1.1. Geral:	75
2.1.2. Específicos:	75
3.2. Hipóteses:	76
CAPÍTULO 3	
MATERIAIS E MÉTODOS	78
3.1. Materiais e métodos	79
3.1.1. Área de estudo.	79
3.1.2. Aspectos éticos	90
3.1.2.a. Aprovação ética.	90
3.1.2.b. Consentimento informado.	90
3.1.3. Desenho de estudo	92
3.1.4. População de estudo	93
3.1.4.a. Critérios de inclusão.	93
3.1.4.b. Critérios de exclusão.	94
3.1.5. Definição de casos e avaliação clínica:	95
3.1.5.a. Malária cerebral	95
3.1.5.b. Malária não complicada	98
3.1.5.c. Assintomáticos não infectados (NIF).	98
3.1.6. Colheita e processamento de amostras.	99
3.1.7. Detecção e quantificação das espécies de <i>Plasmodium</i> .	101

3.1.8. Doseamento plasmático das hemoproteínas.....	102
3.1.8.a. Hemoglobina.....	102
3.1.9. Cálculo do poder estatístico.....	103
3.1.9.a. Análise estatística.....	104
3.1.9.b. Registos de dados.....	105
3.1.10. Caracterização da amostra.....	105
3.1.11. Apresentação dos resultados ...	108
CAPÍTULO 4:	109
RESULTADOS	109
4.1. Resultados	110
4.1.1. Estudo analítico de caso-controlos	110
4.1.2. Análise descritiva das variáveis antropométricas e clínicas.....	112
4.1.4. Correlação de lesões neurológicas e/ou da retina com os níveis de hemoproteínas	140
4.1.5. Correlação entre a taxa de mortalidade e as variáveis clínicas e laboratoriais.	149
CAPÍTULO 5:	163
5.1. DISCUSSÃO	164
CAPÍTULO 6:	179
6.1. Conclusões	180
6.2. Limitações do estudo	183

6.3. Perspectivas futuras.....	184
CAPÍTULO 7:	188
Referências Bibliográficas.....	189
CAPÍTULO 7:	240
ANEXOS.....	241
APÊNDICE.....	247

CAPÍTULO.1

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1. O impacto da malária no desenvolvimento social e económico.

As doença hemolíticas, constituem um grupo específico de enfermidades, cujo o denominador comum é a lises eritocitária, destacando-se a malária que é uma doença infecciosa milenar, que cursa com hemolises e alta taxa de morbilidade-mortalidade, que afecta principalmente as regiões de clima trópica¹. De acordo com os dados divulgado pela Organizações Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2017, foram registrados 219 milhões de casos de malária, sendo que o continente africano foi o, mas atingido com 200 milhões de indivíduos infectados com a doença (92%). Por outro lado, os desfechos devidos a malária foram 435.000 casos. Destes, estima-se que 93% de casos ocorreram em África².

Em Angola, a malária constitui o principal problema de saúde pública, destacando-se como a principal causa de hospitalizações. Assim que, no ano de 2017 o país constava na lista dos 15 estados com maior taxa de mortalidade por malária no mundo².

Na busca de soluções que visam minimizar o impacto da doença, a OMS e parceiros têm sugerido planos pela busca de financiamentos, de forma a apoiar projectos de investigação que permitam desenvolver campanhas de consciencialização, adoptar medidas de prevenção e identificar estratégias terapêuticas que melhor se adaptam a realidade da doença no respectivo país de infecção. Estes planos se concretizaram no período de 2016 à 2017, quando a OMS juntamente a parceiros internacionais promoveu ações de erradicação da malária que beneficiaram de um incremento de orçamento num valor de 0,2 bilhões de dólares (7%)².

Entretanto, os esforços empreendidos no combate desta enfermidade têm contribuído para

diminuição da incidência da doença, alcançando a sua erradicação em alguns países, como por exemplo; o Paraguai, o Uzbequistão e a Argélia³. Deste modo, a OMS traçou o plano global técnico e estratégico para a eliminação e erradicação da malária 2016-2030 que assenta maioritariamente em três pilares fundamentais:

1. Garantir, o acesso universal à prevenção, diagnóstico e tratamento da malária.
2. Acelerar, os esforços para a eliminação e a obtenção do estado livre de malária.
3. Transformar, a vigilância da malária em uma intervenção central².

Por isso, os países têm adoptado planos estratégicos isolados ou em parcerias com a OMS, que visam alcançar os objectivos acima mencionados⁴⁻⁵.

Todavia, apesar dos esforços realizados para o controlo e a erradicação da malária, está continua a ser uma doença amplamente difundida e ligada a pobreza, constituindo um dos principais travões do

desenvolvimento social e económico de países que precisam reforçar financeiramente os próprios sistemas de saúde, para fazer frente as altas taxas de infecções e mortalidades pela doença². Esta situação é mais grave a nível das comunidades, onde as condições sociais, sobretudo o sistema sanitário precário, levam estas populações a investir somas avultadas de dinheiro na procura de cuidados de saúde que levam ao agravamento do seu nível de pobreza⁶. Por tanto, concordarmos com a citação de Carter e Mendis, ao afirmarem que “*A malária tem sido um dos maiores imponentes do desenvolvimento social e económico*”¹. Desde modo, a redução da incidência da malária, contribuirá na redução da taxa de morbilidade e mortalidade por malária, assim como, para o desenvolvimento social e económico dos países afectados pela doença⁷⁻⁸.

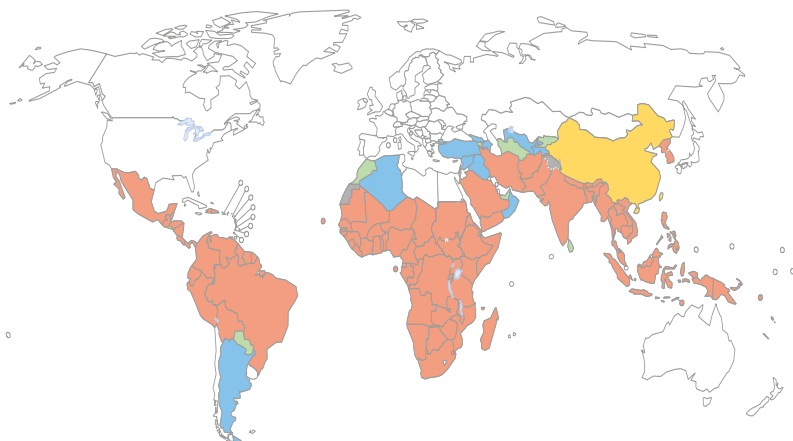


Figura 1. Representação de países com casos endógenos de malária em 2000 e seu estado em 2017. Em laranja estão representados os países com um ou mais casos de Malária em 2017, em amarelo com zero caso, em azul a mais de 3 anos registam zero caso, em verde não registam casos de malária desde 2000 e em branco países se malária. Fonte: Relatório da OMS sobre a malária de 2017.

1.2. Etiologia e Imunopatogênese da malária.

1.2.1. Agente causal (*Plasmodium*).

O agente causal da malária é um parasita unicelular, eucarionte do gênero *Plasmodium*, que possui um complexo apical, que lhe permite a invasão de eritrócitos do hospedeiro (organismo vertebrado ou invertebrado)⁹. É transmitido de um homem, para o outro, pela picada do mosquito *Anopheles fêmea*, e durante muito tempo, esteve na origem da alta taxa de morbidade e mortalidade, por malária da população mundial, sem que a sua existência fosse conhecida. Assim que, foi identificado pela primeira vez, em Novembro de 1880, por Charles Louis Alphonse Laveran, no sangue de um paciente na Argélia. Dez anos mais tarde, em 1890 Giovanni Batista Grassi e Raimondo Filetti atribuíram nomes as duas formas infectantes no homem, que chamaram de *Pl. vivax* e *Pl. malareae*, respectivamente¹.

O agente transmissor do parasita ao homem, só foi identificado no ano de 1897, pelo cientista norte americano Ronald Ross, razão pela qual lhe foi atribuído o prémio Nobel, no ano de 1902. Está descoberta, estabeleceu as bases para a compreensão do ciclo de vida do parasita no mosquito, que é hoje amplamente aceite como sendo um factor imprescindível na compreensão da epidemia da doença. Neste mesmo ano de 1897, William H. Welch nomeou a espécie do *Pl. falciparum* e no ano de 1922 John William Watson Stephens descreveu a quarta espécie, que chamou de *Pl. ovale*¹.

Actualmente, estão descritas cinco espécies do parasita responsável por causar a malária no homem, conhecidas com o nome de *Pl sp.* Essas são: *Pl. falciparum*, *Pl. vivax*, *Pl. malariae*, *Pl. ovale* e *Pl. Knowlesi*. Este último, foi identificado em 1932, por Knowles e Das Gupta que suspeitaram que o *Pl. Knowlesi* pudesse ser transmitido de macacos para o homem, facto que viria a ser provado três décadas,

mas tarde, isto é, no ano 1967 por Chin e colaboradores¹⁰⁻¹¹.

Entre as espécies de *Plasmodium* capazes de infectar o homem, destaca-se o *Pl. falciparum*, pela sua alta endemicidade, morbilidade e mortalidade a nível mundial². Diferenças, em termos de fenótipos e genótipos entre o *Pl. falciparum* e as outras espécies foram evidenciadas, assim como, as semelhanças no que concerne as manifestações clínicas da doença. Assim que, independentemente do parasita, os pacientes com malária podem apresentar episódios de febre paroxística, rigidez e sudorese. Por outro lado, algumas sintomatologias devidas à doença, assemelham-se as manifestações clínicas de outras patologias infecciosas, o que torna difícil o diagnóstico clínico da mesma¹.

Deste modo, conhecer a epidemiologia da doença, bem como, as espécies de *Pl* e os seus vectores predominantes em uma determinada região é imprescindível, para o desenvolvimento de políticas que

visam a redução da sua morbilidade-mortalidade, a erradicação da mesma ou a minimização do impacto da malária no desenvolvimento social e económico mundial.

1.2.2. Ciclo de vida do *Plasmodium sp* no homem e no mosquito.

O ciclo de vida do *Pl sp*, envolve obrigatoriamente dois hospedeiros (invertebrado e vertebrado). No hospedeiro invertebrado ocorre a fase sexuada do *Pl*, enquanto que no hospedeiro vertebrado, ocorrem as duas fases assexuada (pré-eritrocitária e eritrocitária). A primeira ocorre a nível dos hepatócitos, enquanto que a segunda ocorre nos eritrócitos¹²⁻¹³.

Assim que, ao picar um homem infectado, o mosquito contrai a infecção por gametócitos que correspondem as formas infectantes do parasita no mesmo, dando assim, início a fase sexuada do *Plasmodium*, cujo objectivo final é a reprodução e

maturação das formas infectantes para o homem. Uma vez ingeridos pelo mosquito, os gametócitos chegam ao intestino, onde dão origem ao zigoto. Este passa por fases de maturação e se transforma em “esporozoíto”. Os esporozoítos migram, a seguir, para as glândulas salivares do mosquito, onde se alojam e serão responsáveis de futuras transmissões da doença em humanos (Fig.2)¹².

No homem, a inoculação de esporozoítos, após a picada de mosquitos *Anopheles* fêmea infectados, permite aos mesmos alcançar a circulação sanguínea e migrarem para o fígado. Neste órgão, os esporozoítos proliferam e se diferenciam, dando assim, origem a fase hepática ou pré-eritrocitaria¹³.

Segundo M. Mota e colaboradores, o fenómeno de crescimento e multiplicação das esquizogonias nos hepatócitos, é precedido pela migração do parasita em vários hepatócitos¹⁴. Por outro lado, o tempo de proliferação e diferenciação do parasita, no fígado, varia de acordo com a espécie de

Plasmodium. Por exemplo, no caso do *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos podem transformar-se em hipnozoítos, que representam as forma dormentes do mesmo. Desta forma, podem permanecer nos hepatócitos por um longo período antes da sua conversão em esquizogonias, sendo assim, responsáveis pelos quadros repetidos de doença nos indivíduos infectados¹⁵.

Terminado o crescimento e multiplicação dos esporozoítos, e após sua transformação em esquizogonias nos hepatócitos, vesículas transportadoras de merozoítos são libertadas na circulação sanguínea e definidas como merossomas. A sua rotura trará como consequência a liberação dos merozoítos, que infectando os eritrócitos, iniciam a fase eritrocitária do parasita¹⁴. O processo de diferenciação do parasita, também ocorre no interior dos eritrócitos onde se formam os trofozoítos. Ao crescerem, estes se convertem em esquizogonias sanguíneas. A consequente lise dos eritrócitos dará início as primeiras

manifestações sintomáticas da doença com a liberação dos merozoítos, que são as formas sanguíneas de esquizogonias, responsáveis pela invasão dos eritrócitos. Enquanto alguns infectaram outros eritrócitos e se transformam em trofozoítos, perpetuando assim o ciclo eritrocitário, outros se converteram em novos veículos de infecção¹⁵. Ao picar um homem infectado, o mosquito contrai a infecção, voltando assim, a dar início a fase sexuada do *Plasmodium*, cujo objectivo final é a reprodução e a maturação das formas infectantes para o homem. Uma vez produzidos, os “esporozoítos” serão novamente responsáveis de futuras transmissões da doença ao homem (Fig. 2)¹⁴⁻¹⁵.

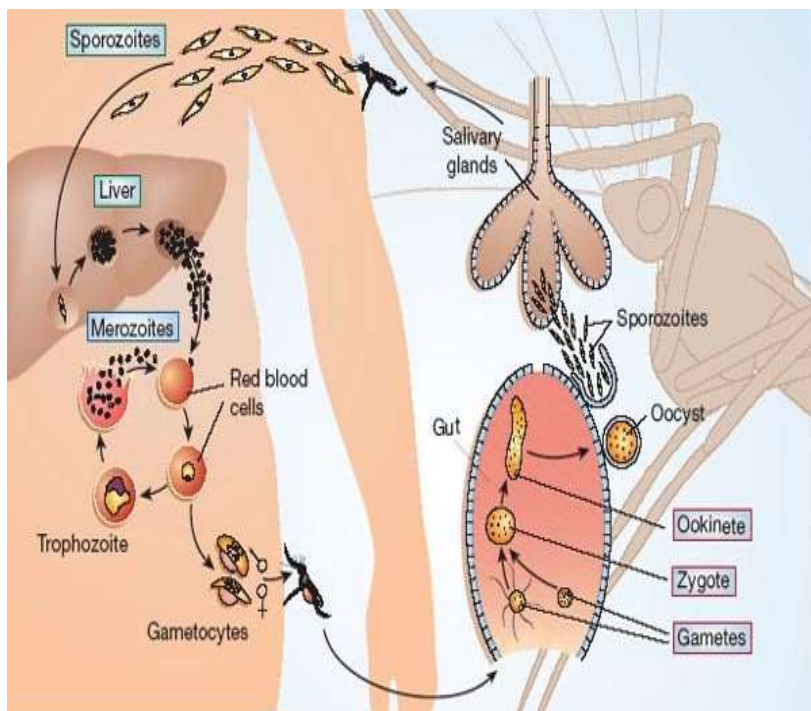


Figura 2. Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum* e respectivos estágios de diferenciação (representados em caixas) no mosquito e no hospedeiro. Retirado de R. Ménard.; 2005

1.3. Imunopatogénese da malária.

A malária é uma enfermidade que envolve

múltiplos factores imunológicos e patogénicos, causados pela interação do parasita com o hospedeiro¹⁸. O conhecimento desta relação causal, permite uma maior compreensão da doença e a elaboração de estratégias terapêuticas que visam melhorar a abordagem da mesma.

Sabe-se que os habitantes das zonas hiperendémicas podem desenvolver imunidade natural e temporal à doença¹⁹. Por outro lado, esta aquisição ocorre geralmente, nos indivíduos com idade maior de 9 anos e é devida à frequente exposição ao parasita. Entretanto, a imunidade pode ser observada também nos primeiros meses de vida, esta última deve-se a transferência de factores imunológicos da mãe para o filho²⁰⁻²¹. Os indivíduos que adquirem esta imunidade natural à doença, tem risco reduzido de desenvolver as formas graves de malária, quando comparados com os indivíduos não imunes. Por outro lado, o amplo espectro que caracteriza a sintomatologia da doença condiciona a suas manifestações clínicas, onde formas

assintomáticas ou graves estão intrinsecamente relacionadas com a imunidade do indivíduo. Deste modo, mecanismos humorais e celulares actuam na modulação de vários aspectos imunopatológicos da doença, as vezes de forma sinérgica a potenciar determinadas cascatas de sinalização²¹⁻²⁴.

A imunidade humoral, é mediada pela produção de anticorpos específicos contra a doença e tem influências no controlo de factores relacionados com o sequestro e a fagocitoses dos glóbulos vermelhos parasitados, assim como, a própria parasitemia. Esses anticorpos, actuam contra antígenos de superfícies específicos do parasita (exemplo: *PfEMP1*, *RIFIN-A* e *SURFIN*), interferindo assim, na ocorrência de processos fisiopatológicos (sequestro e formação de rosetes) e contribuindo para a fagocitose através da sua opsonização.²² Por outro lado, o sucesso da resposta imunológica humoral, mediada por anticorpos é influenciada por factores característicos do hospedeiro, como por exemplo, o grupo sanguíneo a

que o indivíduo pertence. Por exemplo, foi demonstrado em estudos anteriores, que indivíduos com grupo sanguíneo A tem uma maior susceptibilidade a formação de rosetes em comparação aos indivíduos com grupo sanguíneo O. Assim que, a eficácia da imunidade humoral no combate a formação de rosetes, será maior nos indivíduos com grupo sanguíneo O em comparação aos indivíduos com grupo sanguíneo A²⁵.

Por outro lado, a imunidade celular se baseia na função de células do sistema imunitário, capazes de promover a eliminação do parasita, devido a destruição dos eritrócitos infectados. Essenciais neste processo são a fagocitoses e a produção de citocinas anti-inflamatórias, como as interleucinas (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) e as imunoglobulinas²⁶⁻²⁷.

Estes aspetos imunológicos, são influenciados também pelo polimorfismo das populações parasitaria²⁸⁻³⁰, assim como, pelas suas diversidades antigénicas. Por exemplo, em um estudo realizado no Quênia, onde se analisaram pacientes com malária cerebral e retinopatia positiva (MCR+), se observou que o

sequestro de glóbulos vermelhos parasitados no cérebro é mediado pela *Proteína 1 do Plasmodium falciparum na Membrana do Eritrócito* (PfEMP1) subgrupo A²⁸. O polimorfismo das populações parasitárias foi visto capaz de influenciar a sua virulência, que varia de acordo a capacidade do parasita de aderir as células endoteliais. Consequentemente, a oclusão de vasos de pequenos calibres, assim como, a formação de rosetes com eritrócitos não infectados, induz fenómenos de coagulação que representam as complicações mais frequentes da doença²⁹.

Todavia, apesar do amplo conhecimento que se tem actualmente sobre a influência de factores imunológicos libertados em resposta a interação hospedeiro-parasita no curso da doença, ainda existem questões por esclarecer, como por exemplo, o papel de moléculas endógenas com a capacidade de promover respostas imunitárias que resultam em citotoxicidade. É o caso da Hb e do seu grupo prostético o Hemo, que

libertado e posto em circulação após a lises dos eritrócitos, compromete o funcionamento dos órgãos, levando a um agravamento do quadro clínico do paciente.

1.4. A clínica da malária.

Na maioria dos casos, a infecção induzida pelas cinco espécies de *Plasmodium sp.* são assintomáticas¹. Todavia, um elevado número de indivíduos desenvolve a forma leve da doença (Malária não complicada) e outros, as forma grave (Malária complicada), possivelmente devido a falhas no estabelecimento da resposta imune²⁴. Contudo, a severidade da doença depende também de outros factores como a idade, a própria genética dos indivíduos e o grau de endemidade da região onde o indivíduo reside²⁰.

1.4.1. Malária não complicada.

A sintomatologia da malária não complicada, se manifesta com quadros semelhantes à gripe e outras doenças infecciosas (como mencionamos anteriormente). Estes sintomas, aparecem entre 10 e 15 dias depois da picada do mosquito e se caracterizam pelo aparecimento de febre, dor de cabeça e dores articulares². Tendo em conta que esses casos apresentam manifestações inespecíficas, o erro no diagnóstico clínico da doença é elevado, sobre tudo nas regiões endémica, onde se verifica um sobre diagnóstico da malária. Isso deve-se também a falta de qualificação técnica e de meios laboratoriais específicos, que fazem com que se confunda a malária com outras doenças febris³³⁻³⁴.

O exame físico nestes pacientes pode revelar-se normal, sobretudo no período pré-patente da doença, definido como o período que transcorre entre a inoculação do parasita ao aparecimento de sintomas. Para além da febre, também a sudoração profusa, astenia, hepatomegalia, esplenomegalia e em alguns

casos ligeira icterícia, se identificam como sintomas da doença³⁴⁻³⁶. Nos casos onde não se procede o tratamento adequado e precoce, o paciente pode evoluir para as formas graves da malária³⁵.

1.4.2. Malária grave.

Actualmente, existem três espécies de *Plasmodium*, nomeadamente o *Pl. falciparum*, *Pl. vivax* e *Pl. Knowles*, capazes de causar malária grave nos humanos³⁷⁻³⁹. Todavia, existem diferenças notáveis, na taxa de morbilidade e mortalidade causadas pelas diferentes espécies. Assim que, entre elas, o *Pl. falciparum* é o principal responsável pelo elevado número de casos registados mundialmente². A endemicidade, o difícil acesso aos serviços de saúde, assim como, a gravidade da doença são causas determinantes para o aumento da incidência e taxa de morbilidade e mortalidade da mesma. Estes factores, podem actuar de forma sinérgica com outros factores

de risco, como por exemplo, a idade, e podem promover uma maior severidade da malária, como acontece com as crianças^{2,7}.

Entre as principais complicações, se destacam o comprometimento de funções cerebrais, a anemia severa, o distres respiratório, a acidoses metabólica , assim como, a disfunção múltipla de órgãos⁴⁰.

Claramente, a taxa de letalidade varia em função do tipo de complicação desenvolvida pelo paciente^{2,7,40}.

1.4.3. Malária cerebral.

A malária cerebral (MC), é a complicação mais grave da doença, com a maior taxa de morbidade e mortalidade no mundo². A Organização Mundial da Saúde (OMS), a define como sendo o “coma não despertável”, que ocorre uma hora após uma crise

convulsiva, na presença de espécies assexuadas de *Plasmodium* no sangue e na ausência de outras causas identificáveis de coma, tais como, hipoglicemia, a meningites, entre outras⁴². Todavia, esta definição da MC apresenta lacunas, relacionadas com a especificidade do diagnóstico, como facilmente constatado na prática clínica e em áreas de alta endemicidade. De facto, nestas regiões, existe um elevado risco de encontrar formas assexuadas de *Plasmodium* no sangue de pacientes em estado de coma, mesmo quando este é induzido por outras causas⁴³, como patologias que afectam o SNC³³.

Muitos estudos revelaram também que pacientes com MC, podem apresentar lesões na retina, caracterizadas por hemorragias de centro branco, palidez da retina, descoloração vascular da retina e o edema da papila. Actualmente, estes sinais têm sido utilizados, em associação com os critérios pré-estabelecidos pela OMS, com o intuito de melhorar a especificidade no diagnóstico da MC⁴³⁻⁴⁴.

Apesar das várias investigações já realizadas, as causas dos mecanismos fisiopatológicos da malária, envolvidos na sintomatologia dos pacientes ainda não estão totalmente esclarecidos. Exemplos são: a disfunção da barreira hemato-encefálica (BHE), a disfunção das células endoteliais, o acúmulo de células inflamatórias na microcirculação, a vasoconstrição e o edema cerebral⁴⁴. Isso levou a propor várias hipóteses que buscam explicar a etiologia dos mesmos, entre as quais realça-se a “*Hipóteses do Sequestro ou Mecânica*”. De acordo com esse postulado, o sequestro dos eritrócitos parasitados na microcirculação cerebral, resulta da interação entre moléculas de adesão do parasita expostas na superfície dos eritrócitos parasitados e células endoteliais do hospedeiro, que se identifica como o evento inicial da patogénese da MC. Entre as consequências, resultantes desta interação, destacam-se a obstrução do fluxo sanguíneo cerebral, hipoxia, disfunção da BHE, invasão de substância tóxicas no parênquima cerebral, edema, dano de tecidos cerebrais

e coma ou morte dos pacientes⁴⁵. Todavia, está hipótese não explica alguns eventos fisiopatológicos, observados no curso da doença, como por exemplo, o baixo nível de correlação existente entre a parasitemia e a mortalidade em indivíduos com MC, como demonstrado anteriormente, assim como, o sequestro de eritrócitos também em pacientes com malária não complicada⁴⁶.

Por outro lado, temos a “*Hipótese da Inflamação ou Citoquinas*” que se centra na resposta inflamatória de pacientes com MC. Está é causada pela exposição de tóxicas provenientes do parasita e de moléculas libertadas após a activação de células do sistema imunitário ou a lises de eritrócitos. Entre os factores endógenos que causam inflamação, o Hemo tem um papel preponderante. O Hemo é libertado após a rotura dos eritrócitos parasitados e se caracteriza por ter propriedade inflamatórias, entre outras como descrevemos abaixo. A sua capacidade de promover a activação das células com as quais interage é notória.

A subsequente libertação de citocinas pró-inflamatórias, tais como, o factor de necroses tumoral alfa, a IL-6 e o interferon-gama, promovem a activação e ulterior recrutamento de células pro-inflamatórias nos tecidos, comprometendo assim, a funcionalidade dos órgãos. O papel do Hemo nas lesões da retina é ainda pouco claro, mas sabe-se que essa molécula favorece o comprometimento vascular. Assim que, esse fenómeno poderia contribuir à retinopatia observada em casos de malária severa. Isso também acontece no cérebro, onde o Hemo não só danifica o endotélio dos capilares cerebrais, mas torna as células imunitárias residentes, as micróglias, pro-inflamatórias, facilitando a libertação de moléculas que contribuem para o agravamento da sintomatologia do paciente, levando-lhe num estado de coma⁴⁷.

Como demonstram os resultados de alguns estudos, a inibição da libertação do Hemo, depois da lise dos glóbulos vermelhos e da oxidação da hemoglobina, protege contra a MC. Em particular, o

aumento da expressão da enzima que degrada esta molécula, a Hemo-Oxigenase-1 (HO-1) e subsequente produção de monóxido de carbono (CO), previne o mal funcionamento dos tecidos e impede o desenvolvimento da MC, em modelos animais de ratinho. Deste modo, a enzima HO-1 evita a disfunção da BHE, a congestão da microcirculação cerebral, a inflamação de neurónios e o recrutamento de células pró-inflamatórias para o parênquima cerebral, que constituem as bases fisiopatológicas para o desenvolvimento da doença^{45,47,49}.

Todavia, constata-se que a apresentação clínica da doença difere muito entre adultos e crianças. Nessas últimas, a instalação do coma ocorre nos primeiros dois dias, após o início dos sintomas e acontece de forma súbita. A recuperação da consciência é rápida, contrariamente aos adultos. Para além disso, enquanto em crianças as convulsões, são sobre tudo multifocais motoras, assim como, o status epilético são eventos frequentemente registados, estes

sintomas são raros nos adultos. O exame neurológico destes pacientes pode expressar sinais e sintomas de encefalopatia difusa, mas dificilmente sinais de focalização neurológicas, como a hemiplegia, monoparesia ou paralisés dos pares cranianos⁵⁰⁻⁵¹.

A implementação precoce da terapêutica anti malárica, contribui para uma rápida reversão desse quadro neurológico. Todavia, em alguns pacientes essas complicações podem persistir e prolongar o estado de coma, déficit motor e/ou cognitivo, disartria, alterações do comportamento e epilepsia, como foi observado em alguns pacientes, onde as manifestações clínicas persistem após intervenção terapêutica⁵¹⁻⁵².

1.4.3.a Complicações neurológicas da malária cerebral.

Nos pacientes com MC, as complicações neurológicas dependem do grau de afectação cerebral e da localização da lesão. Como mencionado anteriormente, na fase inicial da doença, os pacientes podem apresentar manifestações clínicas como uma encefalopatia generalizada, observada sobre tudo em crianças. Para além do coma e convulsões tónico-clónicas generalizadas, alguns casos evoluem para um quadro de danos focais, tais como, a hemiplegia, monoparesia ou paralisés dos pares cranianos⁵¹. Contudo, na fase de recuperação, os pacientes podem apresentar uma remissão total dos sintomas, assim como, empiorar a sua sintomatologia, progredindo para um quadro de espasticidade, ataxia, hemiplegia e disartria. A médio e longo prazo, danos cognitivos e epilepsia foram também observados em indivíduos infectados com malária⁵²⁻⁵³. Para notar que, as crises convulsivas generalizadas e a repetição associadas ou

não ao coma prolongado, aumentam o risco de padecer de outras complicações neurológicas a médio e longo prazo⁵³.

Estudos realizados, demonstraram que os pacientes com idade inferior a 9 anos apresentam uma maior susceptibilidade do sistema nervoso central (SNC), aos danos causados pela doença. Possivelmente, isso é devido a impossibilidade de activar uma resposta inflamatória de proteção à malária, por ainda não ter um sistema imunitário capacitado e funcional⁵⁴⁻⁵⁵. Frequentemente, o agravamento desse quadro, pode resultar também da dificuldade de pacientes infectados em ter uma assistência médica adequada e precoce, devido a falta de meios para a deslocação das regiões rurais onde residem.

Algumas complicações neurológicas, podem até surgir após a remissão total das manifestações clínicas e da parasitemia, como observado na síndrome neurológica pós-malária, onde os pacientes apresentam

sinais e sintomas de complicações neurológica, semanas ou meses depois de contrair a infecção e desenvolver um quadro de malária não complicada ou complicada⁵⁵.

Os mecanismos patogénicos destas complicações, não são conhecidos na totalidade. Em modelos animais demonstrou-se que a malária é uma doença multifactorial, onde a libertação do Hemo tem um papel fundamental em determinar a severidade da infecção. Isso leva a expressão de proteínas, capazes de antagonizar os efeitos citotóxico dessa molécula, a conferir um certo grau de protecção contra a malária. Por outro lado, em modelos animais de ratinhos, demonstrou-se que a quantidade de Hemo em circulação é directamente proporcional aos danos causados por esta molécula nos vários tecidos afectados^{48,57}.

1.4.3.b. Lesões da retina na malária cerebral.

A retina e o cérebro, têm a mesma origem embrionária. Por isso, é comum considerar a retina como uma continuidade do SNC. De facto, esse tecido tem sido utilizado para o estudo de muitas patologias que afectam o cérebro e não só. A semelhança, é constituída por uma barreira altamente selectiva, que permite a separação do meio intravascular e dos tecidos que à compõe. Chama-se barreira hemato-retiniana (BHR)⁵⁸.

Em 1993, Lewellen e colaboradores identificaram pela primeira vez, lesões na retina em pacientes com MC, por meio do exame do fundo do olho. Estas são visíveis através de Fundoscopia Directa e Indirecta, realizada durante o exame de retina em pacientes acometidos pela doença. As lesões incluem: hemorragias de centro branco, descoloração vascular, palidez da retina e edema da papila, constituindo o que se identifica com o nome de Retinopatia da Malária

(RM)⁵⁹⁻⁶⁰. As hemorragias de centro branco e o edema da papila, podem ser observadas também em outras patologias que afectam o SNC. Entretanto, a descoloração vascular e a palidez da retina, são sinais clínicos observados unicamente em pacientes com MC⁶⁰.

Actualmente, a RM é tida como um dos critérios de diagnóstico da MC, associada aos critérios já estabelecido pela OMS, para o diagnóstico da doença em alguns países e se tem discutido a possibilidade de englobar a mesma dentro dos critérios de diagnóstico da doença da OMS⁶¹⁻⁶². Em África, o Maláui têm sido pioneiros na investigação clínica das lesões da retina nos pacientes com a MC e tem desenvolvido projectos de investigação científica que buscam aprimorar a avaliação das mesmas⁶³⁻⁶⁴.

Em Angola, a avaliação da retina em crianças com MC não tem merecido a devida atenção, razão pela qual, é imprescindível a realização de estudos que buscam avaliar as lesões da retina nos pacientes

acometidos pela doença, com o intuito de valorar a importância das mesmas, no diagnóstico e prognóstico da doença.

A patogénese da MC é fortemente associada a disfunção vascular, uma vez que, como demonstrado em estudos anteriores, a oclusão dos vasos cerebrais, pode ser o factor desencadeante da doença⁴⁵. Facto semelhante, ocorre na patogénese da RM. Assim que, alguns mecanismos fisiopatológicos, envolvidos na patogénese destas lesões, são conhecidos. Por exemplo, a palidez da retina é causada pela hipoxia da zona afectada pela oclusão vascular. Por outro lado, a descoloração dos vasos, é causada pelo comprometimento parcial ou total da circulação sanguínea nos vasos da retina, enquanto que as hemorragias de centro branco se devem a obstrução total dos vasos, induzida pela coagulação de eritrócitos parasitados e a consequente hemorragia que decorre a nível da retina, enquanto que o edema da papila resulta do aumento da pressão endocraniana^{63,65}.

Segundo White e colaboradores, existe uma correlação positiva entre o número de hemorragias observadas nos vasos da retina e no cérebro, facto que realça de per si a importância desses estudos para o diagnóstico da MC e do seu uso para o prognóstico da doença (Fig. 3)⁶⁵⁻⁶⁷. Assim que, é razoável afirmarmos que, a RM nos pacientes acometidos pela MC é também consequência de problemas vasculares que ocorrem no curso da doença. Todavia, desconhece-se o grau de associação de níveis de Hb e do Hemo libertados durante a lises eritrocitária dos vasos do olho, no curso da doença, assim como, das moléculas protectoras, responsáveis pelo seu metabolismo (hemopexina e haptoglobina), com a patogénese destas lesões.



Figura 3: Lesões da retina em um paciente com MC e RM; hemorragias de centro branco, descoloração vascular, palidez da retina e edema da papila. Retirado de *Birbeck, G. L.; et al. (2010)*.

1.4.4. Anemia severa.

A anemia severa, que ocorre no curso da malária, é uma das principais complicações^{2,67-68}. É definida pela OMS, como a condição onde a hemoglobina é inferior à 5g/dl ou o hematócrito é inferior à 15% em crianças menores de 12 anos. Em adultos, os mesmos parâmetros são: hemoglobina inferior à 7 g/dl e hematócrito inferior à 20%, associado a uma parasitemia maior que 10.000 parasitas/uL². Na maioria dos casos, a anemia induzida pela malária é normocítica e normocrômica, para além de ser reversível com a melhoria clínica do doente e é de etiologia multi-factorial⁷⁰⁻⁷¹. Todavia, a lise eritrocitária excessiva e a eritropoieses ineficaz, que ocorrem no curso da infecção, são consideradas como as principais causas desta manifestação. Com a lises dos eritrócitos parasitados, o Hemo é libertado na circulação sanguínea, juntamente a possíveis proteínas tóxicas, provenientes das esquizogonias.

As células imunes tentam circunscrever os danos associados a esse fenômeno, fagocitando e destruindo os eritrócitos parasitados, assim como, catucando como células que armazenam o Hemo, de forma a prevenir os seus efeitos citotóxicos. Assim que, por vezes a anemia é associada a uma desregulação da capacidade do sistema imune em produzir citocinas pró e anti-inflamatórias, agravando o quadro clínico dos pacientes⁷¹⁻⁷³. Em indivíduos onde a anemia está associada a outras complicações, a sintomatologia é sempre mais severa⁷⁵⁻⁷⁶.

1.4.5. Hipoglicemia.

A hipoglicemia é uma complicação frequente em crianças. É definida pela OMS, como a diminuição dos níveis de glicemia abaixo de 40 mg/dl (2.2 mmol/l)⁷⁶. A hipoglicemia pode ser provocada pelo aumento do consumo da glucose sanguínea pelo *Pl sp* ou dos

tecidos periféricos, assim como, pelo comprometimento da gluconeogenese hepática, causada pela proliferação e diferenciação do *Pl sp* no fígado⁷⁸. Esta complicação, pode também resultar do efeito hipoglicemiante de alguns fármacos utilizados para o tratamento da malária, como é o caso do Quinino⁷⁹.

Os pacientes afectados podem apresentar manifestações neurológicas, com comprometimento do sistema nervoso central (SNC). Em alguns indivíduos, a hipoglicemia está associada ao aparecimento de convulsões ou coma, mas ambas condições são reversíveis após a reposição dos níveis de glucose. Por esta razão, a hipoglicemia é um dos principais quadros clínicos a ser descartados para o diagnóstico da doença, de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS⁸⁰.

1.4.6. Hiperparasitemia.

Em concordância com as diretrizes da OMS, a hiperparasitemia é um critério de diagnóstico da malária grave². É definida, pela densidade parasitaria igual ou maior que 100.000 parasitas/uL de sangue (2% de eritrócitos parasitados) em zonas de baixa transmissão da doença e igual ou maior de 250.000 parasitas/uL (>5% de eritrócitos), em zonas de alta transmissão da doença⁴³. Todavia, na prática clínica, alguns pacientes parecem não obedecer a estes critérios, mesmo que em casos excepcionais. Entretanto, a hiperparasitemia constitui uma complicação grave, que pode agravar o prognóstico da infecção. Por exemplo, em pacientes com MC, uma parasitemia superior a 250.000 parasitas/uL (>5% de eritrócitos parasitados) contribuirá para um prognóstico desfavorável⁸¹.

1.4.7. Acidose metabólica e distres respiratório.

Outra complicação da MC é a acidose metabólica, associada a uma alta taxa de letalidade sobre tudo em pacientes em idades pediátricas. A mesma, constitui de per si ou em associação com outras complicações da malária grave, como por exemplo, o síndrome de distres respiratório agudo, um indicador de elevado risco de mortalidade dos pacientes acometidos pela doença, uma vez que, pode levar a desregulação da oxigenação dos tecidos, alteração do metabolismo celular e consequentemente a produção anaeróbica do ácido láctico, factores estes, que agravam o curso da doença⁸².

1.4.8. Hipotensão e Choque.

Os pacientes acometidos pela malária, apresentam frequentemente alterações a nível do aparelho cardiovascular, que podem manifestar-se com hipovolémia, hipotensão e em casos extremos o choque. Estas complicações podem coexistir com edema pulmonar, acidose metabólica e hemorragias massivas secundárias a rotura esplénica ou sangramento digestivo. Por outro lado, a desidratação, secundária ao reduzido aporte de líquidos e ao aumento da perda do mesmo, causada sobretudo pelo aumento das perdas insensíveis nestes pacientes, também podem contribuir para o agravamento do quadro⁸³.

1.4.9. Insuficiência Renal.

O dano renal é uma complicação da malária, que pode surgir de forma isolada ou no curso de uma disfunção multiorgânica. É observada, com maior frequência em adultos e os mecanismos fisiopatológicos não parecem totalmente esclarecidos. Todavia, alguns autores sugerem que a necroses tubular aguda, secundária a oclusão da microcirculação renal, o distúrbio metabólico, assim como, a resposta inflamatória desenvolvida no curso da doença, são responsáveis pelo dano renal⁸⁴. No estudo realizado por G. Michaca e colaboradores, em modelos animais, foi demonstrado que o aumento dos níveis plasmáticos do Hemo livre pode causar toxicidade no endotélio renal, provocando assim, a insuficiência desse órgão⁸⁵. Assim que, um dos principais mecanismos de proteção à doença, está dado pelo aumento da expressão de moléculas responsáveis pelo controlo do dano renal induzido pelo Hemo. Por exemplo, os mecanismos de desintoxicação do Hemo, através do aumento da

expressão dos genes reguladores da enzima HO-1 e da cadeia H da Ferritina, a nível das células epiteliais dos túbulos renais proximais, proposto por S. Ramos e colaboradores, confere maior tolerância a doença, constituindo assim, um mecanismo protetor de per si ou em associação com outros mecanismos que conferem protecção à doença⁸⁶.

1.4.10. Disfunção Hepática.

A icterícia é uma manifestação clínica da disfunção hepática, e é uma complicação frequente em adultos com malária. A hiperbilirrubinémia, observada no curso da MC é sobre tudo não conjugada, devido ao aumento da lise de eritrócitos na circulação sanguínea e pode estar acompanhada com a elevação das enzimas aminotransferasas, cuja a função está centrada em manter o equilíbrio dos níveis da bilirrubina no sangue. Por outro lado, a toxicidade, causada por moléculas resultantes da lise eritrocitária, como por

exemplo, o Hemo, nas células hepáticas. O dano causado pelo Hemo a nível hepático, está dado principalmente pelo stress oxidativo que esta molécula pode causar nos hepatócitos⁸⁷.

1.4.11. Coagulopatias.

A coagulação intravascular disseminada (CID), é a principal coagulopatia observada nos pacientes com MC. Geralmente, ocorre como consequência da exposição de factores pró-coagulantes na circulação sanguínea, como o factor tissular⁸⁸. Contudo, algumas moléculas liberadas durante a lise dos eritrócitos no curso da malária, como a hematina, podem inactivar factores de coagulação, como por exemplo; a plasma e a trombina, que participam no mantimento da hemóstase. Isto favorece a aparição de coagulopatias⁸⁹.

1.5. Genética da malária grave.

1.5.1. Componente genética da malária grave.

A genética do parasita e do hospedeiro influenciam significativamente o decurso da doença. Assim que, estudos realizados em modelos animais permitem uma maior compreensão da patogénese e dos mecanismos de progressão da infecção⁹⁰⁻⁹¹. Todavia, as diferenças de expressão clínica da malária não permitem extrapolar a mesma sintomatologia para todas as espécies de *Plasmodium*^{2,90}.

O estudo realizado por Sambo e colaboradores, em crianças angolanas, revelou que a susceptibilidade à MC é determinada por factores genéticos⁹². O mesmo estudo, revelou que um haplótipo do gene do Factor de Crescimento Transformador Beta 2 (TGFB2) aumenta o risco de progressão da MC. Por outro lado, o haplótipo do gene da Hemo Oxigenase 1 (HMOX1c) aumenta o risco de padecer de MC. Todavia, um outro haplótipo

do gene da Hemo Oxigenase 1 (HMOX1b) confere protecção a MC. Os autores atribuem esta reversão de efeitos relacionados ao mesmo gene, a substituição do alelo A do rs2071748 no HMOX1c pelo alelo G no HMOX1b. Um outro estudo, realizado em modelos animais, por Ball e colaboradores, revelou que ratos knockout do gene que codifica o receptor de Interferon Tipo 1 (IFNAR1), eram menos susceptíveis a desenvolver a MC⁹⁰. Por outro lado, apesar das revelações feitas, não podemos deixar de realçar a existência de possíveis sinais de associação existente entre dois genes localizados no mesmo loci ou com o genoma como um todo, que conferem protecção a doença. Este facto foi demonstrado num estudo realizado recentemente, em populações humanas de vários continentes, onde foram testadas, de forma a revelar a existência de uma correlação entre factores genéticos que condicionam a susceptibilidade de padecer da doença⁹³. Há associações genéticas que foram bem evidenciadas, como o caso do polimorfismo

de antígenos dos grupos sanguíneos (Sistemas sanguíneos ABO e Duffy).

No caso do grupo sanguíneo ABO, destaca-se a proteção que o grupo O confere as formas graves da doença, devido também a capacidade que o mesmo apresenta de limitar a formação de rosetes. Contrariamente, o grupo A confere maior susceptibilidade à doença, pelo facto de favorecer a formação de rosetes⁹⁴⁻⁹⁵. Por outro lado, estudos realizados sobre tudo em populações africanas, revelam que a ausência do antígeno Duffy confere proteção a infecção por *P. vivax*. Esta proteção é condicionada pelo facto de o merozoito do *P. vivax*, depender do receptor de citocinas do antígeno Duffy, para invadir o eritrócito e assim, dar continuidade ao seu ciclo de vida no interior do mesmo⁹⁵. Todavia, as recentes descobertas de casos de infeção por *P. vivax* em indivíduos com o genótipo Duffy-negativo em alguns países africanos, onde predomina o genótipo Duffy-negativo, abre um novo capítulo na forma como

observarmos a transmissão da infeção por *P. vivax*. Assim que, torna-se evidente o facto de que estejam a ocorrer transmissões activas no seio de populações com o genótipo Duffy-negativo, como afirma C. Mendes e Colaboradores⁹⁶.

1.6. Os mecanismos moleculares e bioquímicos da malária.

O metabolismo da Hemoglobina no curso da malária.

A fase eritrocítica do ciclo de vida do *Plasmodium sp*, é marcada principalmente pela excessiva lise de eritrócitos infectados e não infectados pelo parasita. A lise de eritrócitos infectados, pode ser causada directamente, pelo dano causada pela proliferação intracelular de parasita (merozoito)⁹⁶ ou indirectamente por danos causados pelo sistema imune, levado a cabo por grânulos citolíticos que

libertam enzimas, tais como, a Granulysin e a Perforina, de células imunológicas citotóxicas, como por exemplo, as Natural Killer (NK) e os Linfócitos T CD8⁹⁷⁻⁹⁸. Isso resulta na ocorrência de múltiplos eventos moleculares e bioquímicos que contribuem à patogênese da MC, assim como, outras complicações da malária grave, como por exemplo, a anemia e a disfunção multiorgânica. Entre eles, destaca-se a libertação da Hb na circulação sanguínea, que é sequestrada pela Haptoglobina (Hp), para o seu metabolismo ou é oxidada em caso de circular livre no plasma.

Em casos de hemólise excessiva, a capacidade de sequestro da Hp, fica reduzida, rompendo-se assim, o normal equilíbrio entre a quantidade de Hb e da Hp circulante, o que vai favorecer a acumulação de Hb livre na circulação sanguínea. Assim que, o eixo Hemoglobina-Hemo, bem como, as moléculas responsáveis pelo seu metabolismo (Hp e Hemopexina), tem um papel fundamental na patogênese da MC⁹⁹.

A Hb é uma molécula que participa em vários processos biológicos fundamentais, tais como, o transporte e o armazenamento de oxigénio, sinalização, metabolismo (reprogramação metabólica, metabolismo de drogas), regulação do pH, participando assim, no mantimento da hemostasia do meio interno⁹⁹. Em humanos a molécula de Hb é constituída por duas cadeias de alfa globina e outras duas de beta-globina (fig.4). Ambas são codificadas por dois genes de alfa globina (HBA1 e HBA1) e um outro gene da beta-globina (HBB). O transporte de oxigénio dos pulmões, para os tecidos representa a principal função desta molécula¹⁰⁰⁻¹⁰¹.

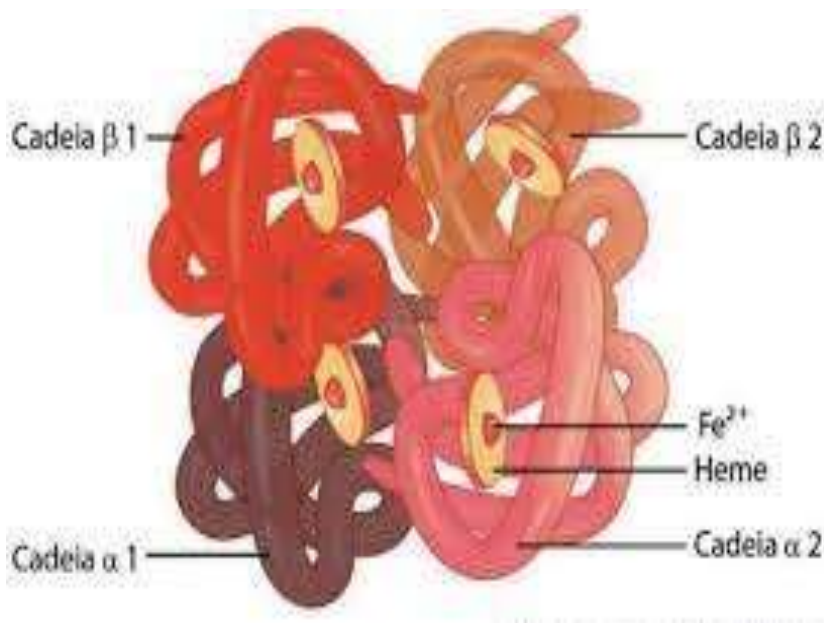


Figura 4: Representações da estrutura química da molécula de Hemoglobina humana no adulto. Fonte: Open Star College (CC-BY-AS 3.0) / via CNX.org.

A sobrevivência de parasitas intracelulares obrigatórios, capazes de infectar o homem, como por exemplo; o *Plasmodium sp* é fortemente condicionada pela quantidade e qualidade da molécula de Hb, disponível no interior das células. Assim que, existe

uma relação directamente proporcional, entre os níveis (quantitativos e qualitativos) de Hb intracelular e a proliferação do *Plasmodium sp*, no interior da célula. Este facto, deve-se a participação da Hb, em funções vitais do ciclo de vida do parasita, tais como, a síntese de ADN, a síntese de proteínas, a respiração e outras

102-104

Em condições normais, a molécula de Hb circula no interior do eritrócito onde exerce as suas funções. Todavia, em casos de doenças hemolítica infecciosa, como é o caso da malária, onde ocorre a lises excessiva de eritrócitos, a Hb é liberada para a circulação sanguínea¹⁰⁵. Livre, a molécula de Hb é rapidamente oxidada, por indução do stress oxidativo e converte-se na molécula de meta hemoglobina. A reação de oxidação é catalisada pela enzima meta hemoglobina redutase, que tem a missão de adicionar um ião no átomo de ferro (Fe^{2+}), levando-o na forma oxidada (Fe^{3+}) na estrutura de Hb desoxigenada, convertendo-a em meta hemoglobina. A molécula de meta hemoglobina, apresenta alta afinidade pela

molécula de oxigénio, e estabelece ligações irreversíveis com a mesma, o que causa como consequência a hipóxia dos tecidos e produção de ácido láctico, agravando assim, a severidade da doença¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Por outro lado, a molécula de Hb é um potencial recurso, para a formação de espécies reactivas de oxigénio, uma vez que, o parasita usa a mesma, para o seu metabolismo e crescimento e consequentemente ocorre a libertação de radicais livres. Estas espécies reactivas de oxigénio, resultantes deste processo, são libertadas na circulação sanguínea após a lise dos eritrócitos, e são responsáveis pelo agravamento do stress oxidativo, que pode ser considerado como factor chave na patogénese da malária¹⁰⁹⁻¹¹¹. Assim que, a severidade da doença é fortemente influenciada pelo metabolismo da molécula de Hb.

1.6.1.O metabolismo do Hemo.

O Hemo é uma molécula complexa, constituída por um átomo de ferro inserido numa protoporfirina IX. Constitui o grupo prostético de muitas proteínas, chamadas hemoproteínas, como a Hemoglobina, o Citocromos, a Mioglobina, entre outras. A síntese do Hemo ocorre entre a mitocôndria e o citoplasma. Segundo Richard S. A e colaboradores, o Hemo é gerado pela inserção do ião ferroso em um tetra pirrol macro cíclico, conhecido como protoporfirina IX (Fig. 4). Essa reação é catalisada pela ferroquelatase, uma enzima que exerce a sua função na matriz mitocondrial¹¹²⁻¹¹³.

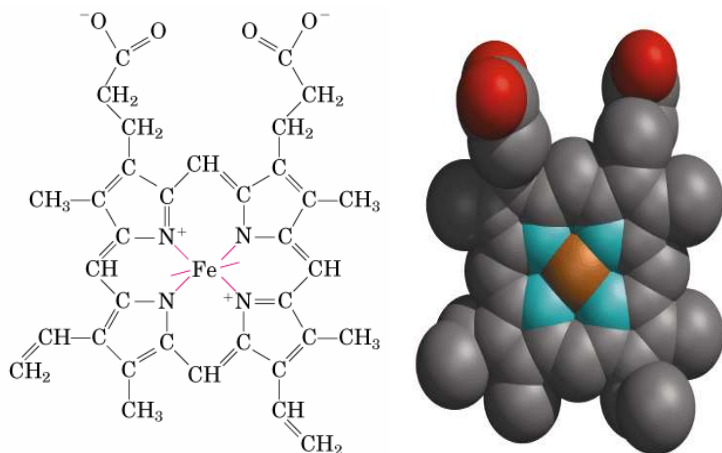


Figura 5: Representações da estrutura química e tridimensional do Hemo. Retirado e adaptado de Nelson e Cox, 2004.

O Hemo participa em vários processos biológicos fundamentais para a sobrevivência dos organismos vivos, tais como; a respiração celular, a oxigenação dos tecidos, o metabolismo de fármacos, entre outras funções imprescindíveis, para a manutenção da hemostasia dos tecidos¹¹⁴. Em condições patológicas onde existe um desequilíbrio no

metabolismo do Hemo, como por exemplo, nas doenças infecciosas hemolíticas como a malária, o excesso de Hemo libertado na circulação sanguínea é prejudicial. O Hemo catalisa a formação de espécies reactivas de oxigénio, causando stress oxidativo e morte celular¹¹⁵. Por exemplo, está evidência científica, ficou demonstrado em um estudo realizado por M. Liu e colaboradores, onde provou-se que o Hemo causava a morte de células da micro vasculatura endotelial do cérebro mediante a proteína tumoral p73, constituindo assim, um factor contribuinte para a severidade da patogénese da malária¹¹⁶.

Em modelos animais de MC experimental, demonstrou-se que quando o Hemo não está ligado a uma proteína, mas é livre dentro da célula ou na circulação sanguínea, causa inflamação, activando não só as células com as quais interage, mas provocando também um dano endotelial que acaba por aumentar a permeabilidade da BHE. A sua acumulação no SNC

compromete seu funcionamento e contribui para o agravamento da severidade da doença¹¹⁷.

Adriana H. e colegas, demonstraram em modelos humanos ex vivo, usando organoides do córtex cerebral que moléculas pro-inflamatórias participam no dano cerebral induzido pelo Hemo¹¹⁸. Este dano induzido pelo Hemo livre no cérebro, podem causar hemorragias petequiais disseminadas, edema generalizado, dano neuronal, hemiparesia e morte em jovens adultos acometidos pela doença¹¹⁸. Por outro lado, em estudos realizados no continente africano, evidenciou-se que as crianças com MC apresentam níveis plasmáticos de Hemo superiores às crianças que desenvolveram outras formas da doença¹²⁰. De forma similar, essas observações foram também demonstradas em um estudo realizado em pacientes com mesmo quadro clínico. Neste caso, os autores demonstraram a existência de uma relação directamente proporcional entre os níveis de Hemo e a severidade do coma¹²¹.

1.7. O papel da haptoglobina e da Hemopexina como proteínas reguladoras da reactividade do Hemo.

1.7.1.Hemopexina.

A Hemopexina (Hx), é uma glicoproteína plasmática que apresenta uma alta afinidade de ligação ao Hemo e é responsável pela remoção plasmática do mesmo. A Hx é uma proteína de fase aguda, cujos níveis plasmáticos aumentam após a activação de processos inflamatórios¹²². Esta proteína é sintetizada principalmente no fígado e parcialmente nos rins, retina, músculos esqueléticos e sistema nervoso. A sua principal função é de transporte do Hemo para o fígado, onde irá ser degradado e neutilizado para síntese de Hemoproteínas¹²³. Este processo, contribui para a manutenção da hemostasia, permitindo manter níveis fisiológicos do Hemo circulante no plasma, prevenindo

os efeitos pró-inflamatórios e oxidante do mesmo devido a liberação de Fe^{2+} , após a degradação do anel protoporfirínico¹²⁴.

Em condições normais, existe um equilíbrio entre os níveis plasmáticos da Hx e do Hemo, mantendo-se assim a hemostasia. Todavia, nas doenças hemolíticas infecciosas, como por exemplo, a malária ocorre a perturbação deste sistema, agravando a sintomatologia clínica da doença, como demonstrado em um estudo realizado no Uganda. Os autores observaram que os níveis de Hx em crianças hospitalizadas por malária, estão directamente associados com a sua evolução, devido a participação do mesmo, em processos patológicos, tais como, dano vascular e dos órgãos em pacientes acometido pela doença¹²⁵⁻¹²⁶. Assim que, o estudo demonstrou a existência de uma grande associação a severidade da doença e a concentração plasmática da Hx.

1.7.2. Haptoglobina.

Avaliar o nível de Hb em circulação e da molécula responsável pelo seu sequestro, após a destruição dos glóbulos vermelhos, a Haptoglobina (Hp), permite uma maior compreensão da doença, assim como, das suas complicações¹²⁷⁻¹²⁸. A Hp actua como sequestrador plasmático da Hb, em caso de hemólises intra ou extra vascular. Em humanos, foram identificadas três variantes genotípicas, nomeadamente a Hp1-1, Hp2-1 e a Hp2-2¹²⁹. Em estudos realizados no Sudão, Gana, e Camarões, se constatou que os pacientes com polimorfismo Hp1-1, eram mais susceptíveis a desenvolver as formas graves da doença¹³⁰⁻¹³¹. Contudo, investigações realizadas na Gambia não revelaram nenhuma associação entre as variantes do genótipo da Hp e as diferentes severidades da doença¹³². Assim que, torna-se necessário a realização de estudos futuros que buscam clarificar esta problemática.

1.7.3. Os efeitos da acumulação de Ferro.

Como descrito por R. Gozzelino e P. Arosio, o Ferro (Fe^{2+}) é necessário para funções vitais e é potencialmente tóxico para o organismo. Esta dualidade de funções revela simultaneamente a importância de manter o metabolismo do Fe^{2+} estritamente controlado, para evitar a sua toxicidade. Sendo um metal, o Fe^{2+} possui uma alta capacidade de transferência de elétrons entre diferentes substratos, o que lhe confere a habilidade de participar em vários processos fisiológicos essenciais para os organismos vivos, tais como, transporte de oxigénio, sínteses de ADN, respiração celular e na produção de energia metabólica¹³³.

Em condições fisiológicas, os níveis de Fe^{2+} são mantidos pelo controlo de mecanismos reguladores ligados à absorção, transporte, armazenamento e reciclagem. Todavia, estes mecanismos, não estão

totalmente esclarecidos, apesar dos avanços que se tem registado actualmente no estudo dos mesmos¹³⁴. Estes mecanismos de controlo, têm como finalidade a manutenção da hemostasia do Fe^{2+} , para evitar a sua participação na reacção de fotões e a geração de stress oxidativo. A produção de radicais livres de oxigénio, é prejudicial ao normal funcionamento dos organismos vivos, porque podem danificar as proteínas, os lípidos e o ADN, causando assim, a morte celular programada. A rotura da hemostasia do Fe^{2+} , também está associada a outros inúmeros processos patológicos, como mostra a figura abaixo¹³⁵.

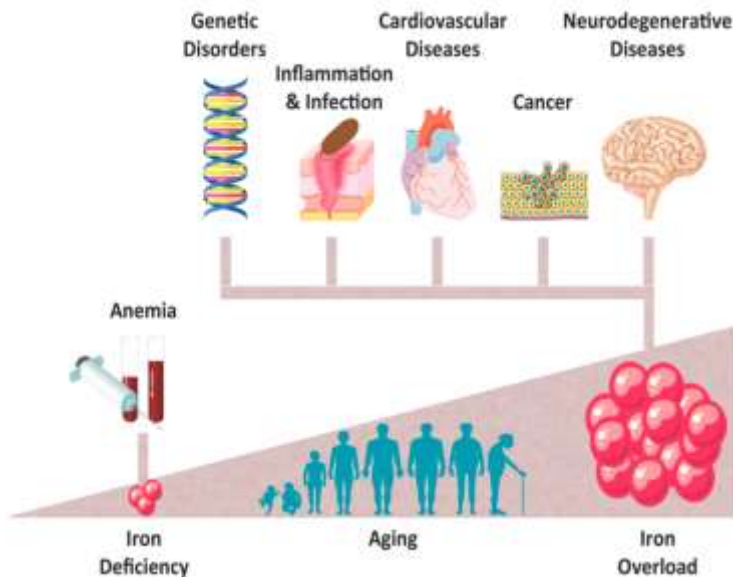


Figura 6: A influência do desequilíbrio da hemostasia do Fe^{2+} em inúmeros processos patológicos. A insuficiência de Fe^{2+} causa anemia, enquanto o excesso está associado a múltiplos processos patológicos (doença genéticas, inflamação/infecção, doenças cardiovasculares, cancro e doenças neurodegenerativas). *Retirado de R. Gozzelino e P. Arosio; 2016.*

Em humanos, a rotura da hemostasia do Fe^{2+} assume particular importância nos processos inflamatórios e infecciosos, onde a sua restrição é um dos principais mecanismos de defesa, adoptado pelo hospedeiro para impedir o crescimento de microrganismos patógenos invasores, prevenindo assim, a progressão de processos patológicos¹³⁶. No caso particular da malária, os níveis de Fe^{2+} estão interligados com vários aspectos, capazes de influenciar de forma negativa a relação entre parasita e hospedeiro e, em consequência, o curso da doença. As alterações no metabolismo do Fe^{2+} observadas no curso da malária, devem-se também a supressão da hematopoiese a nível da medula óssea, que pode ser causa de anemia ferropénica, induzida pela mesma malária¹³⁷. Por outro lado, é importante realçar a

associação existente entre os níveis de Fe^{2+} e o crescimento/proliferação do parasita, uma vez que, esse é um nutriente essencial para a sobrevivência, crescimento e proliferação do mesmo¹³⁸.

Estudos observacionais realizados em áreas endêmicas da malária, tem evidenciado uma grande associação entre o estado nutricional, deficiente em Fe^{2+} , e a supressão da doença. Por outro lado, a adição de suplementos de Fe^{2+} , tem sido associado ao agravamento da doença¹³⁹.

1.7.4. Os impactos negativos dos ensaios clínicos de suplementação do Ferro.

O metabolismo do ferro (Fe^{2+}), assume um papel importante na evolução das doenças infecciosas. Como mencionado no capítulo anterior, o Fe^{2+} participa em vários processos fisiopatológicos ligados ao parasita/hospede que promovem a progressão da doença, pelo que, a supressão do mesmo, tem sido um dos mecanismos de proteção adoptado, por alguns organismos vivos, face a agressão de microrganismos^{135,137}. Assim que, o mesmo tem sido o foco de investigação, na busca de soluções que mitigam o impacto de doenças infecciosas, como por exemplo, a malária. Por outro lado, tem se realizados ensaios clínicos em modelos animais e em humanos, que buscam avaliar o papel que a suplementação do Fe^{2+} desempenha na evolução dessas patologias¹⁴⁰⁻¹⁴¹.

Os países africanos, tem sido os mais visados com a realização de ensaios clínicos de suplementação de Fe^{2+} , devido a alta taxa de anemia ferropénica

registada nas populações africanas, com maior incidência nos indivíduos em idades pediátricas. Associado a isto, está o elevado número de casos da anemia secundária a infecções parasitárias, como é o caso da malária, o que tem contribuído para a alta taxa de morbilidade e mortalidade causadas pela doença¹⁴². Estudo realizados na população nómada do Mali, por M. J. Murray e colaboradores, revelaram que a suplementação do Fe^{2+} , aumenta a incidência de doenças infecciosas. Este facto foi comprovado por uma series de estudos realizados em vários países africanos, entre os quais um ensaio realizado na Gambia, onde registou-se um aumento da incidência das doenças infecciosas e letalidade após a administração de suplementos de Fe^{2+} . Assim que, a imunidade contra as doenças infecciosas nestes indivíduos é maior na presença da deficiência de Fe^{2+} ¹⁴³⁻¹⁴⁴. Ademais, a intensificação de manifestações clínicas e laboratoriais (parasitemias), após a suplementação do Fe^{2+} , tem sido reportada em alguns países do continente africano¹⁴⁵⁻¹⁴⁶.

1.8. Tratamento da malária.

A alta taxa de morbidade e mortalidade, causada pela malária nos países endêmicos, fez com que em parceria com a OMS, os mesmos adotassem protocolos de cooperação que visam melhorar as formas de abordagem terapêuticas da doença. Os vários países têm adotado política de tratamento da malária, que buscam melhorar o quadro clínico da doença¹⁴⁷.

A implementação de protocolos de tratamento efectivos da malária, como é o caso da terapia combinada a base de artemisina (ACTs), associado ao treinamento e capacitação de profissionais de saúde, tem contribuído para o melhoramento no manuseamento da doença e para a redução da sua taxa de morbidade-mortalidade. A alta eficácia da ACTs no tratamento da malária, fez com que muitos países endêmicos colocassem essa abordagem como primeira escolha para o combate a doença. Por isso, no

ano de 2017, um total de 206 milhões de ATCs foram distribuídos mundialmente através de programas nacionais e a África subsaariana recebeu o 99% dessa produção². Por outro lado, a aparição de espécies de *Plasmodium* com mutações no gene Kelch (K13), assim como, no gene *PGB*, *EXO*, *P23-BP* e *PfMDR1* confere resistência aos ACTs. No caso particular do gene Kelch (K13), que é actualmente um dos genes, mas bem estudado no que tange a resistência aos ACTs, estão descritas várias mutações, como por exemplo; *K13 M476I*, *Y493H*, *R539T*, *I543T* e *C580Y*, cuja a prevalência varia de uma região a outra e podem conferir ao *Pf* a capacidade de resistir aos ACTs. Por exemplo; em alguns países africano predomina a mutação *K13 M476I* e as demais variantes são predominantes em alguns países asiáticos. Assim que, na grande região de Mekong (Camboja, Tailândia, Vietnam, Laos e Myanmar), na Ásia, e no continente africano, isso constitui um dos maiores desafios actuais para o tratamento da doença¹⁴⁴⁻¹⁴⁸. Mesmo se um certo grau de resistência aos derivados de Artemesinina, já

foi identificado, os casos graves da doença ainda podem ser tratados com doses altas de Artesunato, ou por outros fármacos cuja a eficácia já foi comprovada, como por exemplo, o Quinino¹⁴⁹.

Actualmente, estão em estudos outros medicamentos contra a doença. Assim que, com o objetivo de melhorar as formas de prevenção, no ano de 2018 teve início a quarta fase de implementação de vacina RTS, S/AS01 em sete países africanos. A sua eficácia em reduzir casos clínicos de malária, após a administração de quatro doses da vacina, ficou demonstrada, apesar da variabilidade observada na sua eficácia, dependentes do sítio da sua implementação¹⁵⁰. Entre outros ensaios clínicos de vacinas promissoras para o controlo da doença, destaca-se a vacina baseada na *proteína 1 da superfície do Merozoíto do P. falciparum* (MSP1), que tem como finalidade o bloqueia do desenvolvimento do parasita no sangue¹⁵¹.

1.8.1. Estratégias terapêuticas experimentais da malária.

Em modelos animais, estão a ser experimentadas ulteriores abordagens terapêuticas, direccionadas não só na eliminação do parasita, mas também na minimização do impacto da toxicidade de moléculas libertadas durante o curso da infecção, conhecidas para determinar a severidade da doença, como é o caso da Hb e do Hemo⁴⁸. Este último, por sua vez, tem merecido especial atenção devido a sua alta toxicidade quando liberada da molécula de Hb, por razões mencionadas anteriormente. Assim que, alguns autores têm realizado estudos que buscam utilizar moléculas responsáveis pelo metabolismo do Hemo, para contrariar a toxicidade do mesmo¹⁵¹. Possivelmente, em associação com o uso de drogas anti maláricas, possa constituir uma aposta promissora para o tratamento da malária. Por outro lado, tem se buscado formas de potenciar os organismos com o objectivo de estes desenvolverem tolerância a doença.

Por exemplo, a indução da expressão de genes capazes de aumentar o funcionamento de determinadas proteínas, como é o caso da Ferritina que é responsável pelo armazenamento do Fe^{2+} , nos tecidos do hospedeiro confere tolerância a doença. Segundo R. Gozzelino e colaboradores; 2012, este facto está dado pelo papel que a mesma desempenha, em aspectos ligados ao sequestro do Fe^{2+} , actividade da ferroxidase e a inibição do dano oxidativo, pela modulação da via de sinalização pró-apoptose *c-Jun NH2-terminal Kinase* (JNK)¹⁵². Como afirmamos no capítulo anterior, o Fe^{2+} , é importante para a sobrevivência dos organismos patogénicos (microrganismos) para o homem, por isso, o desenvolvimento de técnicas que limitem a sua biodisponibilidade, poderá vir a ser um factor de protecção as doenças infecciosas, como a malária. Contudo, a comprovação destas estratégias terapêuticas em humanos está longe de ser verificada.

Dado o progresso tecnológico actual, alguns investigadores buscam a implementação das novas

tecnologias no tratamento da doença¹⁵³⁻¹⁵⁶. Por exemplo, em estudos realizados em modelos animais, se tem utilizado a nanotecnologia, com o intuito de melhorar a distribuição e a utilização de drogas anti maláricas no interior das células, assim como, os mecanismos envolvidos na eliminação eficaz do parasita, por meio da utilização de nano carregadores de fármacos ¹⁵⁷. Por outro lado, a nanotecnologia, também tem se mostrado eficaz no controlo vectorial, o que pode vir a ser útil na erradicação da doença¹⁵⁸.

CAPÍTULO 2

OBJECTIVOS

2.1. OBJECTIVOS:

2.1.1. Geral:

Caracterizar a MC e avaliar, o papel das hemoproteínas e das moléculas responsáveis pelo seu metabolismo, na patofisiologia das lesões neurológicas e da retina em crianças angolanas com MC.

2.1.2. Específicos:

1. Quantificar, os níveis de Hb, Hemo, Hpx e Hp em crianças internadas com MC que apresentem lesões neurológicas e/ou da retina, malária não complicada (MnC) e não infectadas (NIF).
2. Analisar, comparativamente os níveis de Hb, Hemo, Hpx e Hp entre os três grupos de estudo.

3. Relacionar, os níveis encontrados de Hb, Hemo, Hpx e Hp com a patofisiologia das lesões neurológicas e da retina em crianças com MC e respectivos controlos.

3.2. Hipóteses:

A escassez de estudos prévios, realizados na província de Benguela em particular e em Angola de modo geral, que visam analisar o papel das hemoproteínas na patofisiologia das lesões neurológicas e da retina em crianças com MC, levou-nos a realizar um estudo centrado nesta problemática. Deste modo, com esta tese, pretendemos identificar possíveis sinais de associação entre as hemoproteínas, com a patofisiologia das lesões neurológicas e/ou da retina em crianças com MC, por isso, propusemo-nos a testar a seguinte hipótese:

- ✓ Existe uma relação causal, entre o desequilíbrio do metabolismo das hemoproteínas (Hb), com a

severidade do dano neurológico e/ou da retina
em crianças com MC.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e métodos

3.1.1. Área de estudo.

O estudo foi realizado na província de Benguela (seta azul), situada no litoral sul de Angola (Latitude/longitude: 12° 51' 14' S / 13° 55' 42" E)¹⁵⁹. Possui uma população de 2,6 milhões de habitantes, composta maioritariamente pela etnia Ovimbundu e tem uma superfície de 39.826,83 Km². Limitada a Norte pela província do Kwanza-Sul, a Leste pela província do Huambo, a Sudoeste pelas províncias do Namibe e da Huíla e a Oeste pelo oceano Atlântico. Conta atualmente com 10 municípios; Benguela (a capital), Lobito, Catumbela, Baía Azul, Baía Farta, Balombo, Cubal, Ganda, Chongoroi, Bocoio e Caimbambo. Possui um clima bastante variável, quente e seco na faixa litoral e do tipo "mesotérmico" na faixa interior sub planáltica. A pluviosidade é moderada, com precipitação média anual de 268 mm e uma

temperatura máxima aproximada de 35°C, a média ronda aos 24,2°C e a mínima cerca de 12,4°C com humidade relativa de 79,0% ¹⁶⁰.

Do ponto de vista epidemiológico, a província situa-se na lista das províncias com um quadro de transmissão mesoendémica estável da malária (**Fig. 3**).

Macro.

As colheitas de amostras de sangue, foram realizadas no município sede da província, na pediatria do Hospital Geral de Benguela (HGB) e no Centro de Saúde da Graça (CSG).

O HGB é uma unidade hospitalar de nível terciário, localizado no centro urbano da cidade de Benguela que presta serviços nas diferentes especialidades nomeadamente, pediatria, neonatologia, ginecologia e obstetrícia, medicina interna, endocrinologia, dermatologia, cardiologia, cuidados intensivos, oftalmologia, psiquiatria, urologia, cirurgia geral, cirurgia plástica e ortopedia. É a maior unidade hospitalar da província.

Segundo os dados fornecidos pelos serviços de estatística da mesma unidade, em 2019 registou-se um total de 2117 mortos e a malária foi a segunda maior causa de mortes, causando um total de 285 (13.4%)

mortes, superada somente pela Tuberculose Pulmonar, que foi responsável por 360 (17%) mortes (**Fig. 7**).

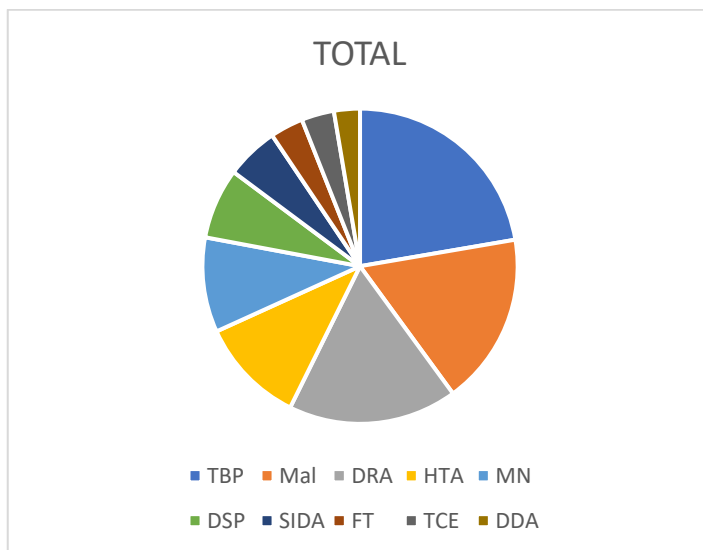


Figura 8. Principais causas de morte registadas no HGB em 2019. **Fonte:** Serviços de Estatística do HGB. Abreviaturas: TBP, tuberculose pulmonar; Mal, malária; DRA, doença respiratória aguda; HTA, hipertensão arterial; MN, má nutrição, DSP; depressão severa ao nascer; SIDA, síndrome de imunodeficiência adquirida; FT, febre tifoide; TCE, traumatismo cranioencefálico, DDA, doença diarreica aguda.

No quadro de internamentos registados nos serviços de pediatria no período compreendido entre 2017 a 2019, a malária foi a principal causa de internamentos e a faixa etária compreendida entre 1 a 4 anos foi a, mais afectada pela doença. Todavia, devido a variação sazonal da doença na província de Benguela, o quadro de internamentos anual pela doença não obedeceu a um padrão uniforme, verificando-se uma alternância no mesmo. Deste modo, no mês de Abril, registou-se o maior número de casos da doença, neste período (**Fig.9 e 11**).

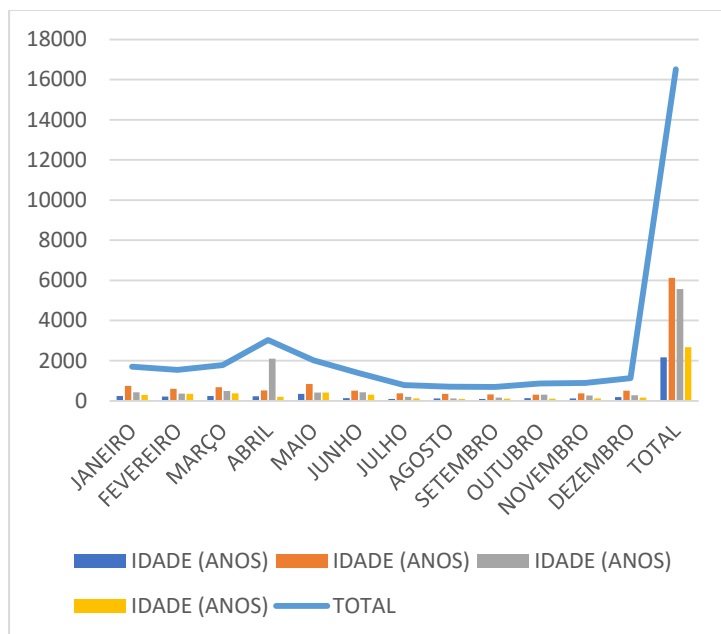


Figura 9. Número de casos de internamentos por malária na pediatria do HGB em 2017. **Fonte:** Serviços de Estatística do HGB.

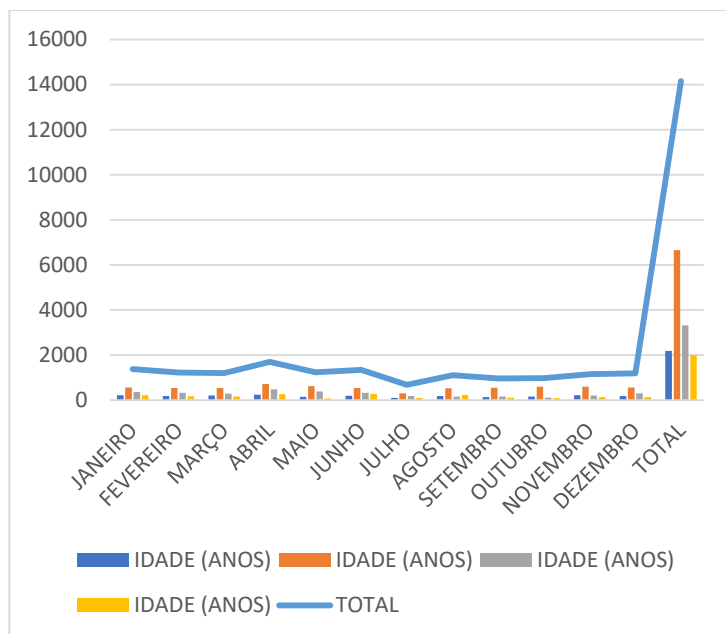


Figura 10. Número de casos de internamentos por malária na pediatria do HGB em 2018. **Fonte:** Serviços de Estatística do HGB.

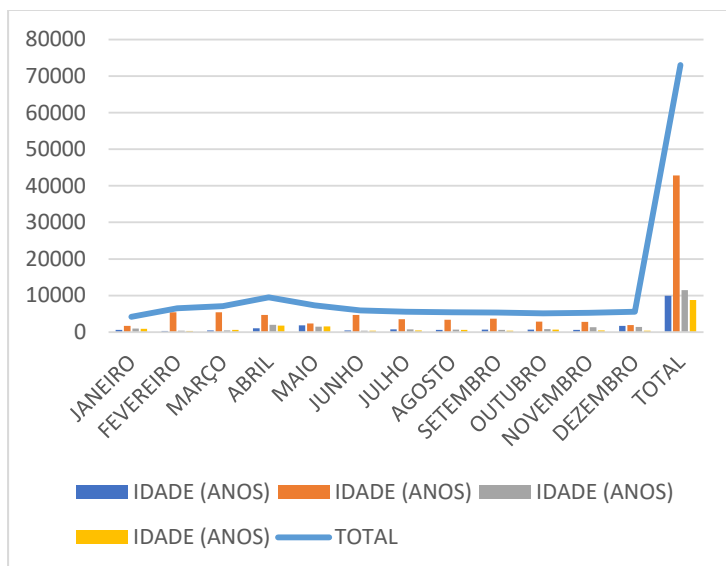


Figura 11. Número de casos de internamentos por malária na pediatria do HGB em 2019. **Fonte:** Serviços de Estatística do HGB.

O gráfico de tendência para o ano de 2020, calculado a partir dos dados do ano de 2018 e 2019, revela uma tendência crescente do número de casos para o ano de 2020 (**Fig.12**).

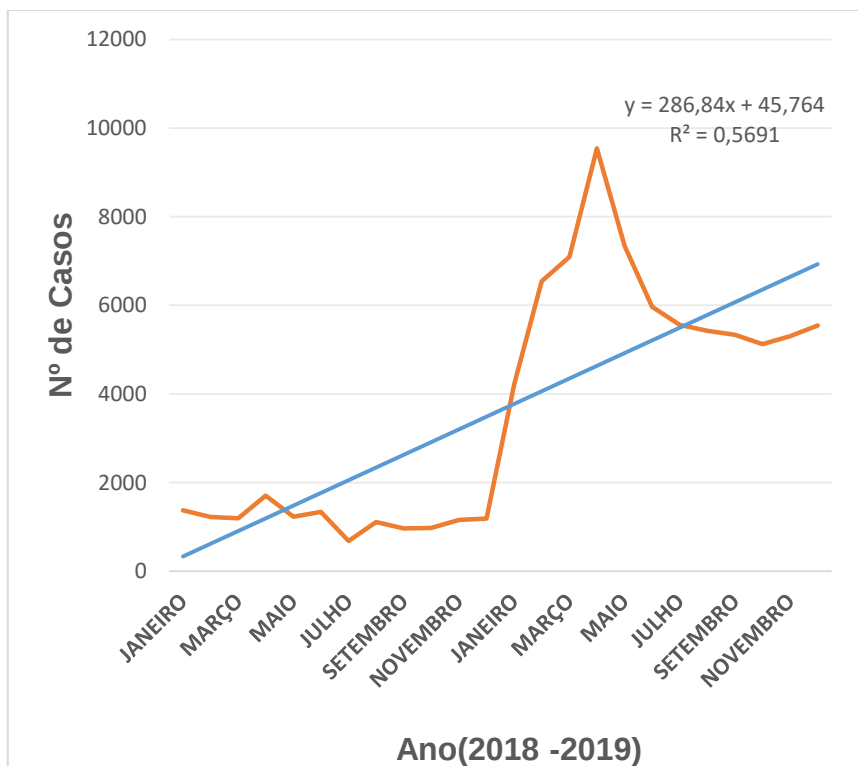


Fig.12: Gráfico de tendência do número de casos de internamentos por malária na pediatria do HGB, para o ano de 2020. A linha de tendências (representada em castanho), foi calculada, a partir dos dados do ano de 2018 e 2019. **Fonte:** Serviços de Estatística do HGB.

O CSG é uma unidade hospitalar de nível primário, localizado na zona periférica da cidade de Benguela, presta serviços nas áreas de pediatria, puericultura e clínica geral.

O recrutamento e seleção dos participantes nestas unidades, decorreu no período de Junho de 2018 à Agosto de 2019. No recrutamento dos participantes, pertencentes aos grupos de crianças com malária (MC e MnC), registou-se maior número de casos no período compreendido entre Outubro de 2018 à Maio de 2019, sendo Abril o mês de maior pico epidemiológico da doença e consequentemente o mês de inclusão do maior número de participantes. Por outro lado, o recrutamento de participantes do grupo de crianças não infectadas (NIF), obedeceu a um padrão aleatório, facto que dificultou a determinação do período de maior recrutamento de casos.

3.1.2. Aspectos éticos.

3.1.2.a. Aprovação ética.

A realização deste estudo, foi precedida pela submissão e aprovação pelo Comité de Ética (CE) do HGB e do Director Geral do CSG (**Anexos 1**), visto que a mesma unidade, não apresenta até ao momento um CE. Deste modo, a avaliação dos participantes, bem como a colheita de amostras de sangue nos participantes, só foi possível após a aprovação do CE e da direcção das respectivas unidades hospitalares.

3.1.2.b. Consentimento informado.

Elaborou-se uma ficha de consentimento informado (**Apêndices 1 e 2**), assinada pelo participante ou representante legal (pai, mãe e outros). No caso de representantes legais com baixo nível de literacia, que se mostraram incapazes de assinar os respectivos documentos (consentimento informado), usamos as impressões digitais dos mesmos, para

certificar que os mesmos tomaram conhecimento e concordaram em participar no estudo. Paralelamente, prestou-se esclarecimentos, com o objectivo de explicar os procedimentos realizados a todos os participantes, assim como, os eventuais desconfortos que poderiam manifestar durante a avaliação clínica e a colheita de amostra de sangue. Os benefícios do estudo foram também ilustrados.

Por envolver crianças, o presente estudo teve em conta, os princípios da ética médica e bioética aceites internacionalmente, nomeadamente na Declaração de Helsínquia¹⁶¹.

3.1.3. Desenho de estudo.

A alta taxa de crianças com MC, assim como, a escassez de pesquisas na província de Benguela em particular e Angola no geral, que abordam este problema, levou-nos a realizar um estudo prospectivos, analítico, de caso-controlos.

Este trabalho, permitiu-nos extrapolar possíveis associações entre os diferentes níveis de anemia e a severidade da hemólise induzida pela malária, influenciando assim, a expressão de moléculas responsáveis pelo metabolismo plasmático do Hemo e da Hb. De facto, a Hp e a Hpx poderiam estar associadas a diferentes manifestações clínicas observadas nos grupos de estudo, isto é, na patofisiologia das lesões neurológicas e/ou da retina nos pacientes com MC, que diferem entre os indivíduos. Estas diferenças, observadas sobretudo nas manifestações clínicas a nível do SNC e da retina permitem agrupar os pacientes em sub-fenótipos, de acordo com a presença de determinado sintoma. Para

além de comparar os respectivos sub-fenótipos entre si, e os relacionar com grupos controlos, os níveis de Hb (anemias), plaquetas e parasitemia foram avaliados e associados a severidade da doença.

3.1.4. População de estudo.

3.1.4.a. Critérios de inclusão.

Realizamos uma amostragem estratificada, onde os participantes foram divididos em 3 grupos, nomeadamente: MC, MnC e NIF. No grupo de crianças com MC, incluímos todos os pacientes com critérios diagnósticos da doença pré-estabelecidos pela OMS. No grupo de crianças com MnC, incluímos todos os pacientes com critério de diagnóstico da doença¹⁶². Por último, no grupo de NIF incluímos todas as crianças que, na consulta de puericultura, não apresentaram nenhum sinal ou sintoma clínico da doença, assim como, a *PP* positiva no momento da avaliação. As crianças deste último grupo, acodem ao centro de

saúde para o cumprimento do Plano Nacional de Vacinação e avaliação do peso.

3.1.4.b. Critérios de exclusão.

Os critérios de exclusão, usados no estudo, não obedeceram a um padrão linear, variando em dependência do grupo a que o participante pertence. Deste modo, do grupo de pacientes com MC, excluímos todos os indivíduos com patologias que podem causar sintomas neurológicos, cuja manifestações clínicas se assemelham a doença (como por exemplo: HIV, Meningites, Hipoglicemia, Neurocriptococoses, Neurocistocircoses, Traumatismo craniano, etc.)¹⁶³⁻¹⁶⁵, e patologias oculares que podem comprometer ou dificultar a avaliação da retina (como por exemplo: retinites, descolamento da retina, cataratas, etc.)¹⁶³. Paralelamente, para os casos de MnC, excluímos todos os participantes com comorbilidade ou critérios clínicos e laboratoriais de severidade da doença (disfunção orgânica, Hb <7 mg/dl, etc.)¹⁶⁰. No

caso dos participantes no grupo de NIF, excluímos todos as crianças que na consulta de puericultura apresentaram um ou mais sintomas, sinais clínicos da doença, ou PP positiva.

3.1.5. Definição de casos e avaliação clínica:

3.1.5.a. Malária cerebral.

Neste grupo, incluímos todos os pacientes com critérios de diagnóstico de MC, pré-definidos pela OMS, suportado por exames complementares parasitológicos (PP ou Teste Rápido). Deste modo, valoramos o coma, definido clinicamente pela incapacidade de localizar um estímulo doloroso e ausência de outras causas de encefalopatia (como por exemplo: infecção por HIV, hipoglicemia, meningites, entre outros) e laboratorialmente pela presença de espécies assexuadas de *Plasmodium* no sangue periférico¹⁶⁷⁻¹⁶⁸. Para a avaliação do estado de coma, baseamo-nos nas seguintes escalas de avaliação:

- ✓ Escala de Blantyre (<12 anos) - Pontuação igual ou inferior a dois (**Apêndice 3**).
- ✓ Escala de Glasgow (>12 anos) - Pontuação inferior a onze (**Apêndice 4**).

Por outro lado, sempre que possível e em concordância com a equipa médica, realizou-se a avaliação da glicemia capilar, o estudo do líquido cefalorraquidiano (LCR) e o teste de HIV, com o intuito de descartar outras possíveis causas de encefalopatia. Deste modo, excluíram-se os pacientes com glicemia capilar igual ou inferior a 40 mg/dL ou com sinais laboratoriais sugestivos de meningites, tais como: pleocitoses (igual ou inferior a 8 Linfócitos/mm³), hipoglicorraquia (glucose do LCR igual ou inferior a 50% da glicemia)¹⁷⁰⁻¹⁷¹, assim como, aqueles pacientes que testaram positivo para o exame de HIV/SIDA.

Em seguida, realizamos o exame físico que determina o tipo de convulsão apresentada pelo

participante, se manifestarem uma crise convulsiva no momento da avaliação clínica e/ou deficit neurológico (sensitivo e/ou motor). Por outro lado, realizamos a avaliação da retina, prévia dilatação pupilar com Tropicamida (10 mg/ml), na dose de 1 gotas em cada olho, num intervalo de quinze minutos, entre uma dose e outra, durante quarenta e cinco minutos, mediante Fundoscopia Indirecta com Oftalmoscópio Indirecto (Modelo Nº.0015/2030 II, JAPAN). Isto, permitiu-nos classificar os pacientes com MC em dois sub-fenótipos, de acordo com a presença ou não de lesões na retina, nomeadamente:

- a) Retinopatia Positiva (Ret+): Foram todos os pacientes que apresentaram um ou mais sinais clínicos, pré-definidos de retinopatia da malária, tais como: hemorragias de centro branco, palidez da retina, descoloração vascular e edema da papila.

- b) Retinopatia Negativa (Ret-): Foram todos os pacientes, cujo estudo do fundo do olho revelou-se normal¹⁶⁷⁻¹⁶⁸.

3.1.5.b. Malária não complicada.

Os pacientes deste grupo apresentaram manifestações clínicas e laboratoriais sugestiva da doença, que evolui geralmente de forma inespecífica. Estes indivíduos apresentaram PP positiva, sem sinais clínicos e laboratoriais de severidade da doença¹⁷², assim como, sem manifestações clínicas e/ou laboratoriais sugestivas de patologias similares.

3.1.5.c. Assintomáticos não infectados (NIF).

Este grupo, esteve constituído por todos os participantes que não apresentavam sinais ou sintomas sugestivos da doença, e PP negativo, após sua realização em amostras de sangue periférico, extraídas

por punção capilar. Basicamente, tratou-se de crianças saudáveis que acudiram ao centro, por razões mencionadas anteriormente.

3.1.6. Colheita e processamento de amostras.

A colheita de amostras biológicas foi efectuada por punção capilar, para a realização da PP, e punção venosa periférica, para a realização do Hemograma (Hg) e de outros procedimentos, tais como: a quantificação do Hemo, Hpx, Hp. Infelizmente, devido aos constrangimentos financeiros causados pela pandemia de COVID-19, não foi possível conduzir as três últimas análises. Para a realização da PP colhemos amostras que foram mantidas separadas em uma lâmina, para cada participante. Estas serviram simultaneamente para a realização da análise qualitativa, através do esfregaço sanguíneo (ES) e quantitativa pela gota espeça (GE). Por outro lado, para a realização do Hg, as amostras colhidas foram

mantidas em tubo de ensaio com EDTA K2, um anticoagulante utilizado para a conservação das amostras (BD Vacutainer® CPT™-Ref.368857), antes de conduzir o respectivo exame. Estes procedimentos foram realizados após a obtenção do consentimento informado, como referido anteriormente. A seguir o Hg, o plasma foi isolado de acordo com o protocolo pré-estabelecido (**Apêndice 5**), e as amostras foram conservadas em Ependorfs secas, de 1.5 ml e 2 ml, respectivamente, a uma temperatura de -80 °C, para que se realizar o seu processamento.

Nos participantes dos grupos de malária (MC e MnC), a PP e o Hg foram realizados quando o paciente foi admitido nos serviços de urgência, no quadro do atendimento geral, que foi prestado pela mesma unidade que atendeu os pacientes acometidos pela doença, de acordo com as normas de assistência médica vigentes nos Serviços de Saúde Pública Nacional. Todavia, com o intuito de minimizar o viés do estudo, vimo-nos obrigado a oferecer um tratamento especializado aos nossos participantes. Isto é,

repetimos os mesmos exames, após avaliação clínica, e no caso dos pacientes reunirem os critérios de inclusão do estudo. A escolha dos participantes do grupo NIF, por se tratar de indivíduos que acodem ao centro médico somente para avaliação de puericultura e a realização dos exames acima mencionados, foi da nossa inteira responsabilidade.

3.1.7. Detecção e quantificação das espécies de *Plasmodium*.

A detecção e quantificação das espécies de *Plasmodium sp*, em todos os participantes, foi realizada nos laboratórios das unidade hospitalares em que se conduziu a avaliação clínica dos participantes e a colheita das suas amostras, mediante a técnica de PP, segundo o protocolo recomendado, pela Organização Mundial da Saúde (OMS)¹⁷⁰. Esta técnica, consiste basicamente na detecção da espécie assexuada de *Plasmodium sp*, em gota espessa (GE) corada com

Giemsas e quantificadas pelo número de parasitas/ por campo de avaliação, mediante a técnica de esfregaço sanguíneo (ES). Nesta última, a quantificação da parasitemia foi realizada a partir do número de eritrócitos parasitados, contados em 100 campos microscópicos (ampliação 100 X). A densidade parasitária foi calculada a partir deste valor.

3.1.8. Doseamento plasmático das hemoproteínas.

3.1.8.a. Hemoglobina.

A quantificação dos níveis de hemoglobina obedeceu aos padrões pré-estabelecidos pela OMS¹⁷². Basicamente, após a colheita de amostras de sangue em tubos de ensaio com EDTA K2, homogeneizou-se as amostras mediante a inversão lenta e frequente dos mesmos. Em seguida, realizou-se o hemograma completo. Dada a importância clínica das plaquetas nos pacientes com malária, vimos-nos obrigados a incluir

este parâmetro como factor de comparação entre os diferentes grupos.

3.1.9. Cálculo do poder estatístico.

Este estudo envolveu crianças, com idades compreendidas entre 6 meses à 18 anos, por isso, cálculos de poder estatístico indicam que uma amostra de 50 indivíduos em cada grupo de crianças infectadas e que manifestaram a forma grave (MC) ou simples da malária (MnC), mais 50 indivíduos não infectados (NIF), admitindo que 50% das crianças com MC manifestaram deficits neuro-cognitivos e/ou lesões da retina relevantes, constituiu um tamanho de amostra suficientes para a realização do estudo de caso e controlos.

3.1.9.a. Análise estatística.

A análise estatística referente a caracterização da amostra, assim como, a associação entre as variáveis qualitativas e quantitativas foi realizada com o programa estatísticos IBM SPSS versão 21.0. Para a análise univariada, os resultados das variáveis qualitativas se expressaram em frequências e percentagens, enquanto as variáveis quantitativas em médias e desvio padrão. Para a análise bivariada se utilizou o teste t de Student e ANOVA para as variáveis quantitativas com distribuição normal. O teste de Mann-Whitney foi usado para a análise de variáveis que não seguem uma distribuição normal. Os rácios (ou o estudo de associações de variáveis), foram comparadas mediante o teste Chi-quadrado (χ^2) ou o teste exato de Fisher. A estimação de associação se realizou calculando o coeficiente de correlação de Spearman. Se consideraram significativos os valores de $p < 0,05$.

3.1.9.b. Registos de dados.

Para cada doente, foram recolhidos parâmetros (clínicos e laboratoriais) durante o internamento ou consulta médica. A informação colhida foi refletida de forma sistemática e estruturada num modelo/formulário de recolha de dados, em forma impressa. Os mesmos foram posteriormente introduzidos em base de dados, em formato de folha de cálculo anónima através do programa Excel[®] (Microsoft). Os dados foram assim convertidos em um ficheiro, para o estudo de caso-controles.

3.1.10. Caracterização da amostra.

O recrutamento dos pacientes do grupo de MC, foi realizado na Unidade de Cuidados Intensivos (UCI), dos serviços de pediatria do HGB, enquanto que os pacientes do grupo de MnC, foram selecionados nos Serviços de Urgências da mesma unidade hospitalar.

Salienta-se que, os participantes do grupo de MC foram doentes internados, enquanto os participantes do grupo de MnC foram doentes tratados em ambulatórios. Isto é, o recrutamento foi realizado nas primeiras 24 horas no caso de participantes do grupo de MC e em menos de 12 horas no caso de participantes com MnC. Todavia, é de realçar que no caso dos pacientes do primeiro grupo, a avaliação clínica do estado dos pacientes foi realizada diariamente durante o seu internamento, em parceria com a equipa médica de serviço, com o objectivo de dar maior seguimento a evolução clínica dos mesmo. Por outro lado, os participantes do grupo de NIF foram recrutados nos serviços pediátricos de puericultura na unidade do Programa Alargado de Vacinação (PAV). Neste último, seleccionamos todas as crianças sem sinais e sintomas de doença, cuja os pais levaram-lhes ao hospital, para o cumprimento do Programa Nacional de Vacinação, assim como, aquelas crianças trazidas ao centro para avaliação do seu estado nutricional, sempre que, os

mesmos reuniram os critérios de inclusão acima mencionados.

A Figura 13, ilustra o número total de participantes no estudo, agrupados de acordo com o fenótipo clínico e laboratorial.

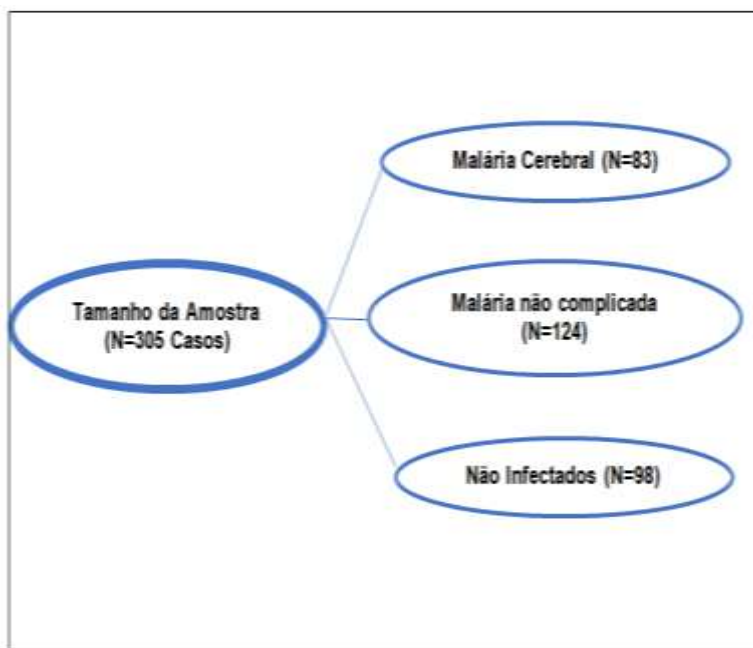


Figura 13: Diagrama representativo do número total de participantes por grupos.

3.1.11. Apresentação dos resultados

Dada a complexidade dos programas eletrónicos existentes no mercado, vimo-nos obrigados a trabalhar com vários softwares com o intuito de encontrar a melhor forma de apresentação dos resultados obtidos no nosso estudo. Assim, a tese foi redigida usando o programa da Microsoft Word 2010, enquanto que os gráficos foram elaborados usando os programas estatísticos IBM SPSS versão 21.0 e Microsoft Excel 2010.

CAPÍTULO 4:

RESULTADOS

4.1. Resultados

4.1.1. Estudo analítico de caso-controles

O presente estudo realizou-se no departamento pediátrico do HGB e no CSG na província de Benguela, Angola, sendo está considerada uma área de transmissão mesoendêmica estável¹⁷⁴. Participaram um total de 305 (100%) crianças, dos quais 83 (27.2%) participantes desenvolveram malária cerebral (MC), 124 (40.6%) malária não complicada (MnC) e 98 (32.1%) pacientes foram não infectados (NIF). O recrutamento dos participantes com MC e MnC foi realizado na unidade de UCI e no banco de urgências (BU) da pediatria do HGB, respectivamente, enquanto que, os participantes do grupo de NIF foram recrutados nos serviços do Programa Amplo de Vacinação (PAV) do CSG. Os pacientes pertencentes ao grupo de MnC que não apresentaram sinais de gravidade (vômitos,

intolerância farmacológica por via oral e parasitemia elevada), que justificam o seu internamento, foram tratados em regime de ambulatório, com os derivados de ACTs (Arteméter + Lumefantrina (AL), Artesunato + Amodiaquina (AS + AQ), o Dihidroartemisinina + Piperaquina (DHA + PPQ), sendo os dois primeiros, mas utilizados. Por outro lado, os pacientes do grupo de MC mereceram internamento na UCI e foram tratados com Artesunato por via parenteral, segundo o Programa Nacional de Combate da Malária (PNCM)¹⁷⁴. Os participantes recrutados nos serviços do PAV do CSG e que apresentaram o exame da pesquisa do *Plasmodium sp* positiva, apesar de terem sido excluídos do estudo, mereceram tratamento e seguimento em regime ambulatório, como descrito para o grupo de MnC.

4.1.2. Análise descritiva das variáveis antropométricas e clínicas

Sexo

A Figura 14, mostra a distribuição dos participantes dos três grupos de acordo com o próprio sexo. A proporção entre os sexos masculino e o feminino foi de 1:1 em quase todos os Grupos, e o teste de χ^2 não revelou diferenças significativas entre ambos os sexos ($p=0.781$).

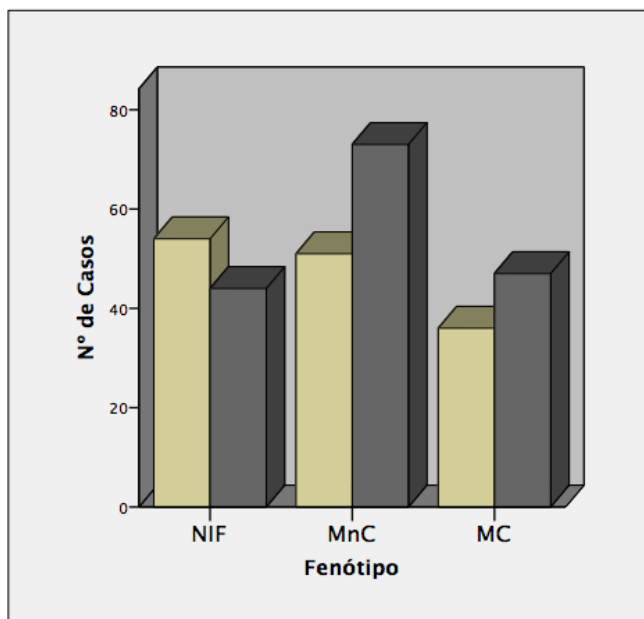


Fig.14: Distribuição do número de casos dos três grupos de estudo por sexo. Os histogramas representam o número de casos em cada grupo: as barras amarelas representam o sexo feminino e as cinzentas o sexo masculino. Abreviaturas: NIF; Assintomáticos não Infectados; MnC; Malária não Complicada e MC; Malária Cerebral. O resultado obtido pela comparação da distribuição do sexo por grupos, é expresso em frequências.

A análise comparativa dos sub-fenótipos de MC (MC Ret+ e MC Ret-), pelo teste de X^2 , não revela diferenças significativas ($p=0.81$). Por outro lado, o teste de X^2 revela uma associação entre o género masculino ($p=0.071$) e as complicações neurológicas (Fig. 15). Assim que, os pacientes do sexo masculino, apresentaram maior número de complicações neurológicas em comparação com o sexo feminino (Fig.16).

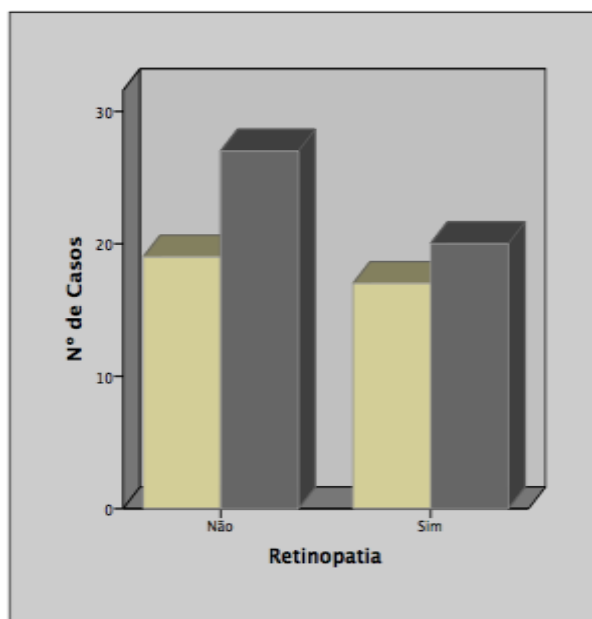


Fig.15: Distribuição do número de casos de MC com lesões da retina por sexo. Os histogramas representam o número de casos em cada subgrupo, as barras amarelas representam o sexo feminino e as cinzentas o sexo masculino.

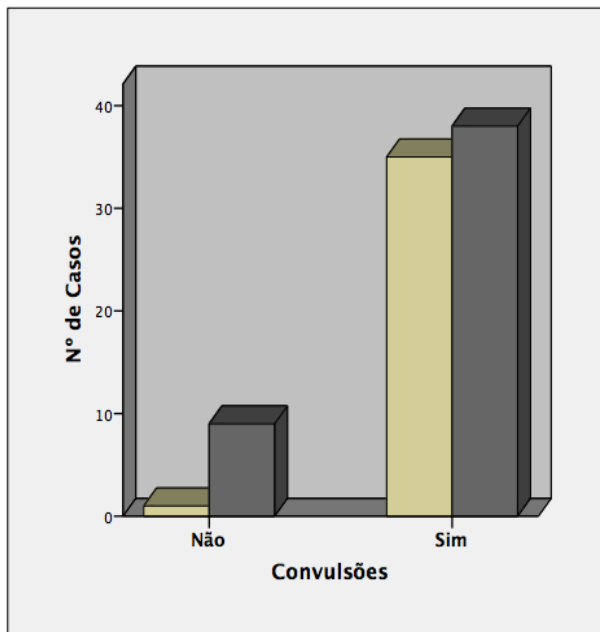


Fig.16: Distribuição do número de casos de MC com complicações neurológicas por sexo. Os histogramas representam o número de casos em cada subgrupo, as barras amarelas representam o sexo feminino e as cinzentas o sexo masculino.

Idade

A análise comparativa da média de idade dos três grupos de estudo, pelo teste de ANOVA um factor, revelou diferenças significativas ($p=0.04$). O grupo de participantes com MC, apresentou uma média de idades superior 75.1 meses em comparação com os grupos controlos (MnC e NIF), que apresentaram uma média de 74.5 e 47 meses respectivamente (Fig. 17). Este resultado, está condicionado pelo viés observado na amostragem do nosso estudo. Uma vez que, registou-se uma ligeira diferença no momento de avaliação dos participantes de cada um dos grupos, sendo que, os participantes do grupo NIF, foram maioritariamente indivíduos em idades inferiores em comparação com os demais grupos. Por outro lado, não se observou diferenças significativas ($p=0.92$), na análise da média de idade em meses pelo mesmo teste, nos pacientes com malária subdivididos em dois grupos de acordo com a severidade da doença (Fig.18).

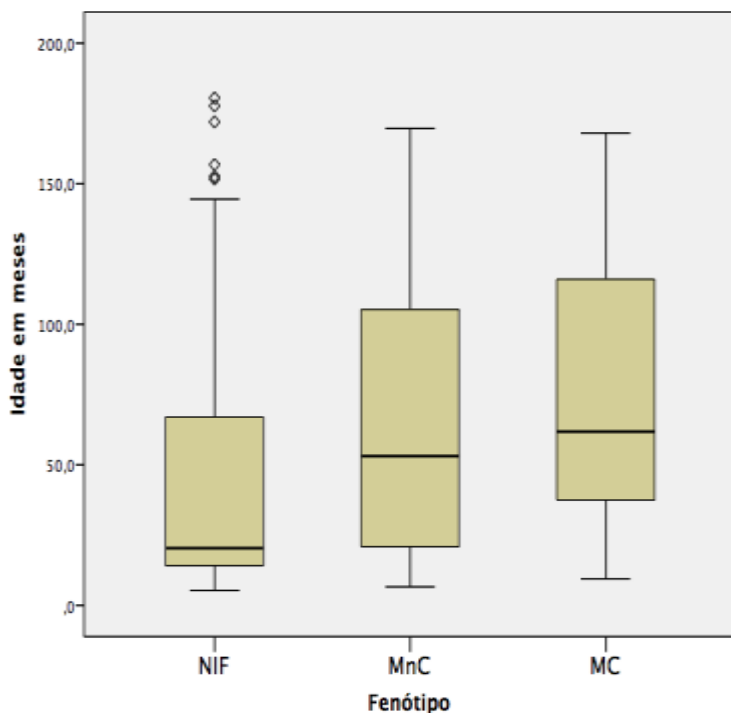


Fig.17: Distribuição da idade em meses nos diferentes fenótipos. As idades estão representadas em meses. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados. Abreviaturas: NIF; Assintomáticos não Infectados, MnC; Malária não Complicada e MC; Malária Cerebral.

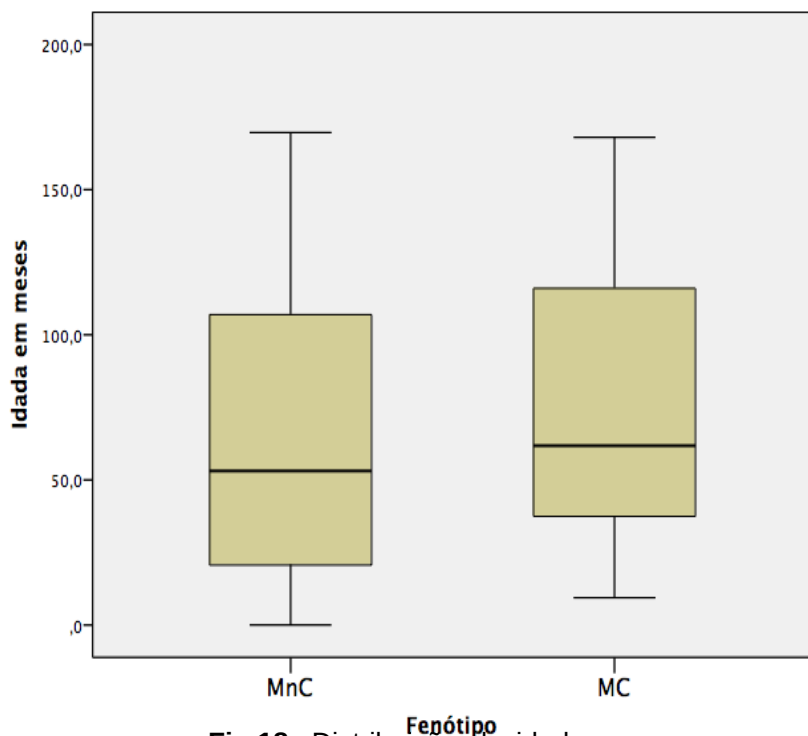


Fig.18: Distribuição da idade em meses nos diferentes fenótipos de malária. As idades estão representadas em meses. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados. Abreviaturas: MnC; Malária não Complicada; MC; Malária Cerebral.

Todavia, a análise isolada da distribuição da idade em meses dos pacientes com o fenótipo de MC, revela que os pacientes em idades inferiores a 59 meses foram os mais afectados (Fig. 19).

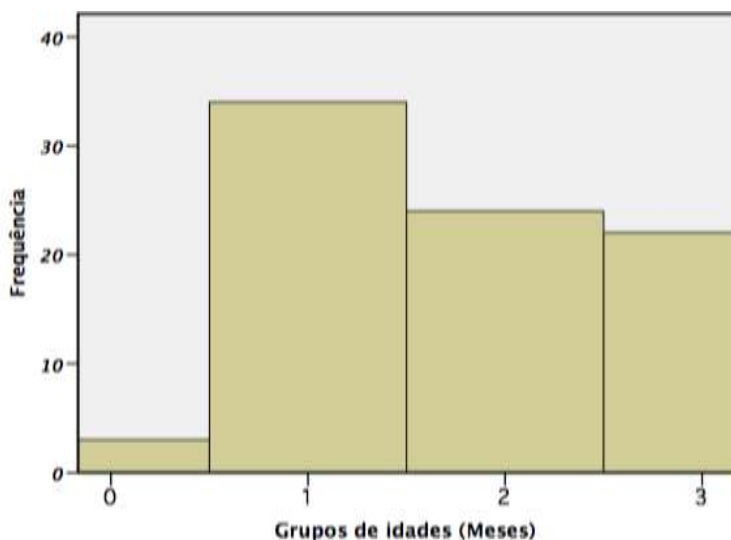


Fig.19: Distribuição da idade em meses nos pacientes com o fenótipo de MC. (N=83). Os histogramas representam o número de casos em cada grupo de idade. Os números representados no eixo dos X, representam os grupos de idade (0 = <12 Meses; 1 = 12-59 Meses; 2 = 60-108 Meses e 3 = >108 Meses).

Ao analisarmos o grupo de pacientes com MC, como duas amostras independentes, pela presença ou não de lesões causadas pela retinopatia da malária, através do teste de *Mann-Whitney*, não se encontraram diferenças significativas ($p=0,261$), na comparação da média de idade. Por outro lado, a mesma análise revela diferenças significativas ($p=0,047$), entre a média de idade, quando analisamos os pacientes pela presença ou não de convulsões. (Fig. 20 e 21).

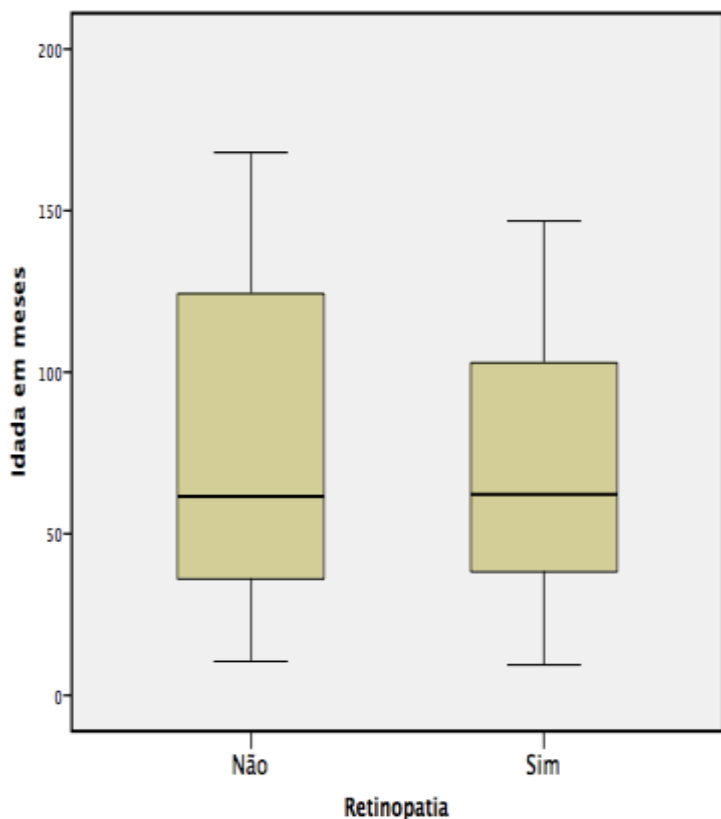


Fig.20: Distribuição da média de idade em meses dos sub-fenótipos de malária cerebral agrupado pela presença ou não de lesões da retina. As idades estão representadas em meses. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados.

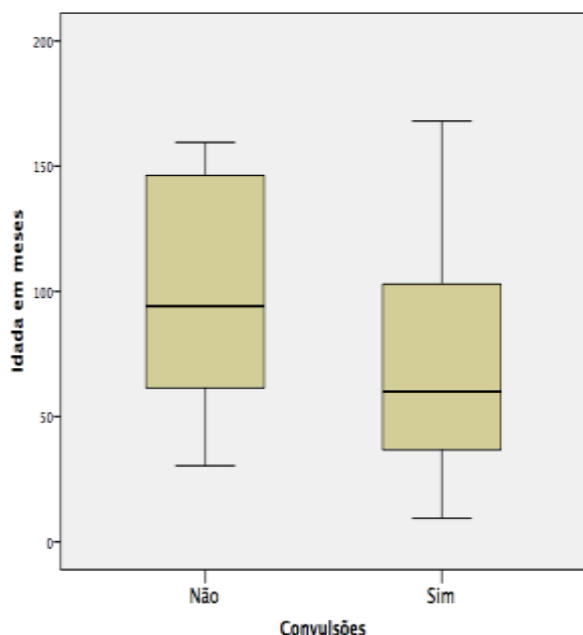


Fig.21: Distribuição da média de idade em meses dos sub-fenótipos de MC agrupado pela presença ou não de convulsões. As idades estão representadas em meses. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados.

As hemorragias de centro branco, foram as lesões da retina, mas frequentes com um total de 19 casos (51.4%), seguidas pela descoloração vascular, observada em 13 casos (35.1%) como nos mostra a abaixo (Tabela 1). Todavia, as restantes lesões encontradas durante a avaliação da retina nos pacientes com MC, apresentaram-se em menor número. Avaliação da retina, foi realizada nas primeiras 24 horas, após o internamento na UCI, como descrito no capítulo anterior. É de salientar, que os pacientes com retinopatia da malária podem apresentar uma ou mais lesões na retina.

Tabela 1: Distribuição das principais lesões da retina nos pacientes com MC, observadas durante a realização da Fundoscopia.

Tipo de Lesão da Retina	Frequência
HCB	19
DV	13
EA	11
EP	5

Abreviaturas: HCB (Hemorragia de centro branco); DV (Descoloração vascular); EA (Exsudado algudonoso) e EP (Edema da papila).

4.1.3. Associação de variáveis clínicas.

A análise da relação entre as principais variáveis clínicas (convulsões e lesões da retina) e outros sintomas, registados no momento de internamento dos pacientes do grupo de MC, pelo teste de χ^2 , não evidenciou sinais de associação entre a presença de convulsões e outras variáveis clínicas ($p=0,076$), como nos mostra a tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2: Associação das variáveis clínicas no grupo de pacientes com MC, subdivididos pela presença ou não de convulsões.

Variáveis Clínicas		Convulsões		X2	p<0,05	OR	Int. Conf. 95%	
		N	S				LI	LS
Febre	Não	1	2	1,331a	0,249	3,944	0,324	47,987
	Sim	9	71					
Dificuldade Respiratória	Não	9	71	1,331a	0,294	0,254	0,021	3,084
	Sim	1	2					
Tosse	Não	10	70	0,426a	0,514	1,043	,994	1,095
	Sim	0	3					
Dor de Cabeça	Não	5	55	2,820a	0,093	0,327	0,085	1,261
	Sim	5	18					
Astenia	Não	8	66	0,986a	0,321	0,424	0,075	2,403
	Sim	2	7					
Vómitos	Não	10	55	3,149a	0,076	1,327	1,164	1,513
	Sim	0	18					
Dor Abdominal	Não	8	61	0,080 ^a	0,778	0,787	0,148	4,174
	Sim	2	12					

Abreviaturas: OR (Odds Ratio); Int. Conf. (Intervalo de Confiança); LI (Limite Inferior); LS (Limite Superior).

Por outro lado, não se evidenciaram sinais de associação entre as lesões da retina e outras variáveis clínicas ($p=0,49$), avaliadas no momento de internamento dos pacientes. De forma resumida, apresentamos os resultados da correlação entre a retinopatia da malária e outras variáveis clínicas na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3: Associação das variáveis clínicas no grupo de pacientes com MC, subdivididos pela presença ou não de lesões da retina.

Variáveis Clínicas		MC Ret+		X ²	p<0,05	OR	Int. Conf. 95%	
		N	S				LI	LS
Febre	Não	1	2	0,615a	0,433	389	0,34	4,465
	Sim	45	35					
Dificuldade Respiratória	Não	44	46	0,159a	0,690	0,611	0,53	7,015
	Sim	2	1					
Tosse	Não	45	0	3,870a	0,49	1,088	0,989	1,198
	Sim	34	3					
Dor de Cabeça	Não	31	29	1,236a	0,266	0,570	0,211	1,544
	Sim	15	8					
Astenia	Não	43	31	1,993a	0,158	2,774	,644	11,955
	Sim	3	6					
Vômito	Não	38	27	1,121a	0,290	1,759	0,614	5,040
	Sim	8	10					
Dor Abdominal	Não	39	20	0,200a	0,614	1,300	0,411	4,109
	Sim	7	7					

Abreviaturas: OR (odds ratio); Int. Conf. (intervalo de confiança); LI (limite inferior); LS (limite superior).

Correlação de variáveis clínicas e laboratoriais.

Parasitemia

A análise comparativa da média do nível de parasitemia nos pacientes com malária (MnC e MC), avaliada através do teste *t Student*, revela diferenças significativa ($p=0.001$). Os resultados demonstraram que, os pacientes que apresentaram maior gravidade da doença (MC), tiveram um maior número de parasitas em circulação, em comparação com os pacientes com as formas mais leve da doença (MnC).

A Figura 22, mostra a distribuição da média da parasitemia em ambos grupos de pacientes com malária, subdivididos de acordo com a forma de apresentação da doença.

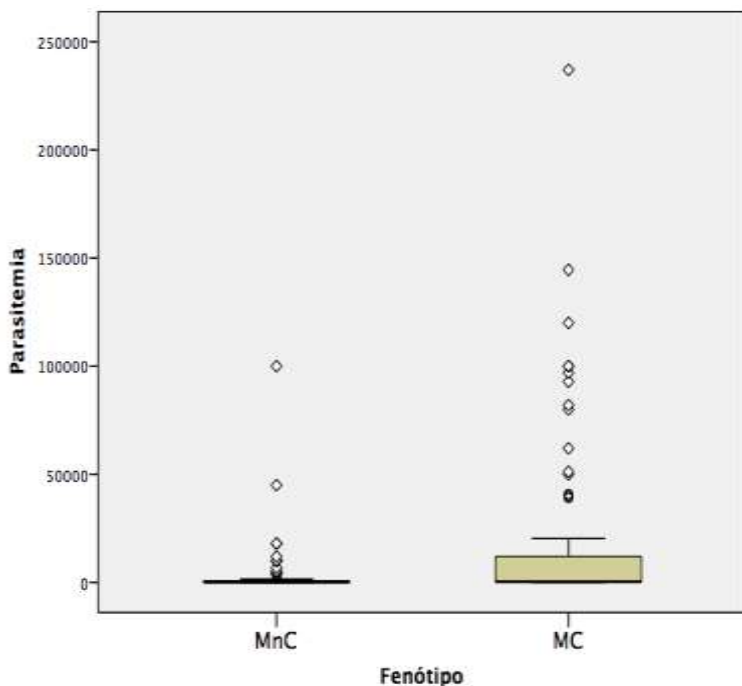


Fig. 22: Distribuição da parasitemia nos diferentes fenótipos de malária. A parasitemia foi calculada a partir do número de eritrócitos parasitados por campo de avaliação. Cada caixa de bigodes representa 50% dos valores obtidos. As linhas horizontais correspondem às médias, o limite superior ao quartil 75% e o limite inferior ao quartil 25%. Os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados. Abreviatura: MnC (Malária não Complicada); MC (Malária

Cerebral).

Ao analisarmos a média da parasitemia nos subgrupos de pacientes com MC, como duas amostras independentes, agrupadas pela presença ou não de lesões causadas pela retinopatia da malária, pelo teste de *Mann-Whitney*, não se observaram diferenças significativas ($p=0.092$), como nos mostra a figura abaixo (Fig. 23). Apesar de já se ter comprovada a relação directa e indirecta entre as convulsões e a infecção por *Pf* em pacientes com MC em estudos anteriores¹⁸⁴, o teste de *Mann-Whitney* não revelou diferenças significativas no nível de parasitemia entre os pacientes internados com MC, agrupados por apresentar ou não convulsões durante o seu internamento (Fig. 24).

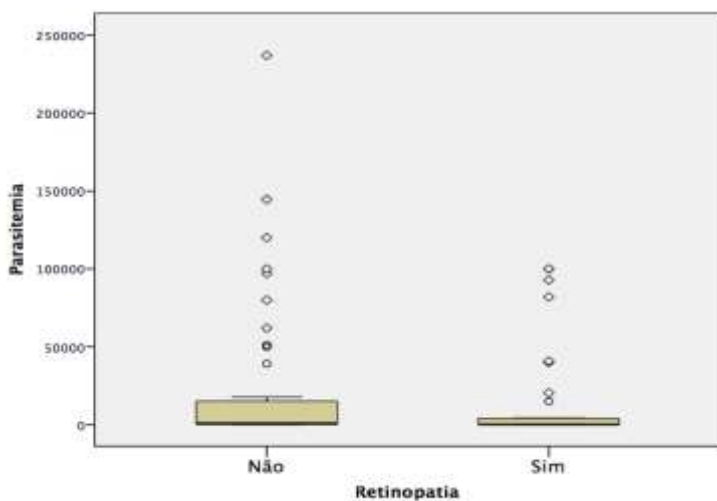
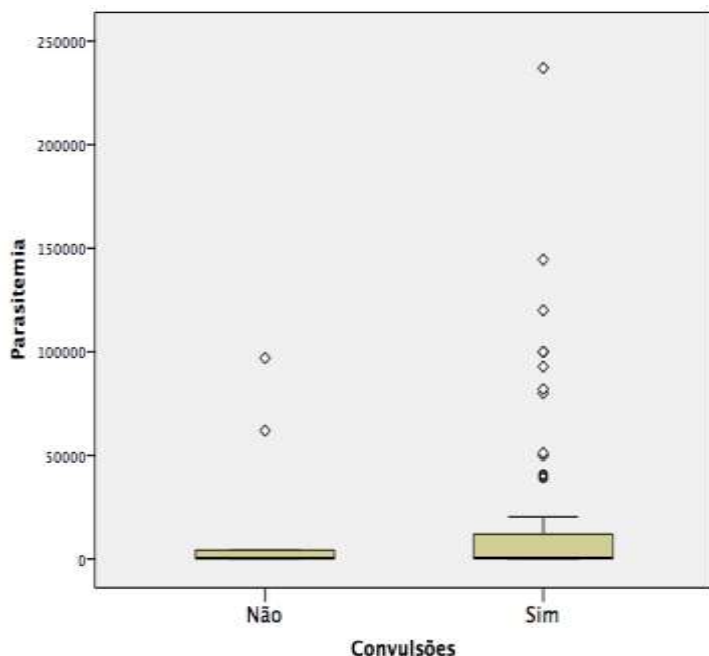


Fig. 23: Distribuição da parasitemia nos diferentes sub-fenótipos de MC agrupados pela presença ou não de lesões da retina (N=83). A parasitemia foi calculada a partir do número de eritrócitos parasitados por campo de avaliação. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados.



A análise comparativa da média do nível de plaquetas, entre o grupo de MC e os respectivos grupos controlos (MnC e NIF) pela ANOVA, revela diferenças significativas ($p=0.027$), como nos mostra a figura abaixo (Fig.25). Por outro lado, ao subdividir os pacientes com malária em dois grupos, de acordo com a severidade da doença apresentada, pelo teste *t de Student* não se evidenciou diferenças significativas ($p=0.196$). Não obstante, também neste caso, se observou uma ligeira tendência aos níveis de plaquetas serem inversamente proporcionais a severidade da doença (26).

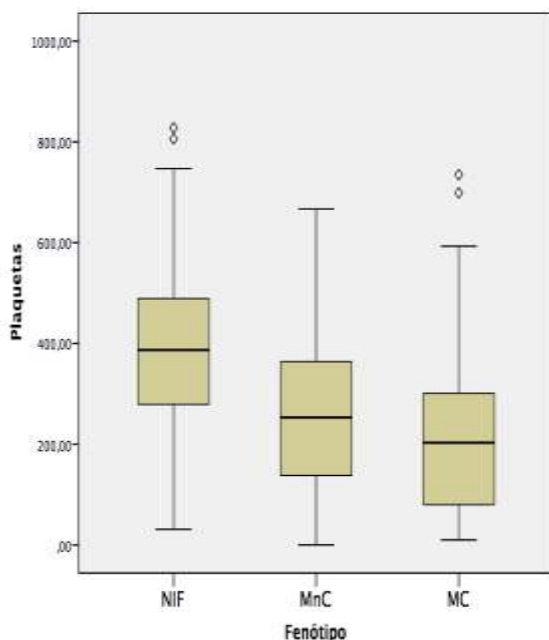


Fig. 25: Distribuição da média do nível de plaquetas nos diferentes fenótipos. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados. Abreviaturas: NIF (Assintomáticos não Infectados), MnC (Malária não Complicada) e MC (Malária Cerebral).

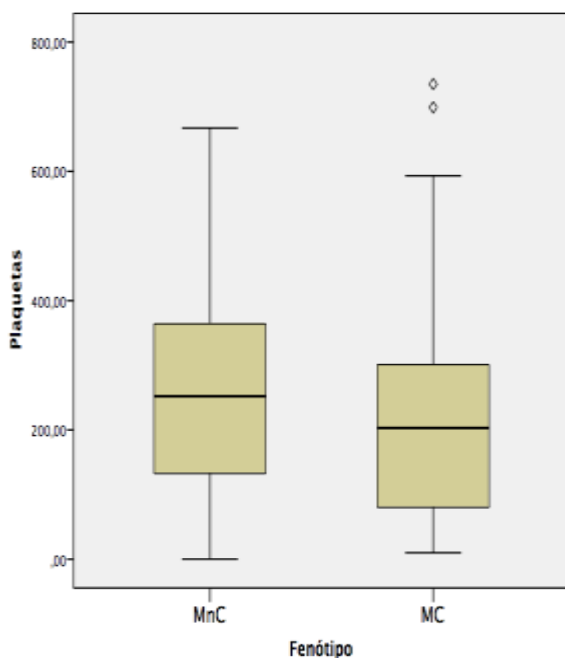


Fig. 26: Distribuição da média do nível de plaquetas nos pacientes com malária. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados. Abreviaturas: MnC (Malária não Complicada) e MC (Malária Cerebral).

A análise da relação entre os níveis de plaquetas e as crises convulsivas, não revelou diferença significativa ($p=0,257$), pelo teste de Mann-Whitney, entre pacientes agrupados em sub-fenótipos de MC, de acordo com a presença ou não de crises convulsivas durante o internamento (Fig.27). De forma similar, a análise da relação entre o nível de plaquetas e a presença ou não de lesões da retina não revelou diferença significativa ($p=0,673$), pelo mesmo teste, entre os pacientes agrupados em sub-fenótipos de MC, de acordo com a presença ou não de lesões da retina (Fig.28).

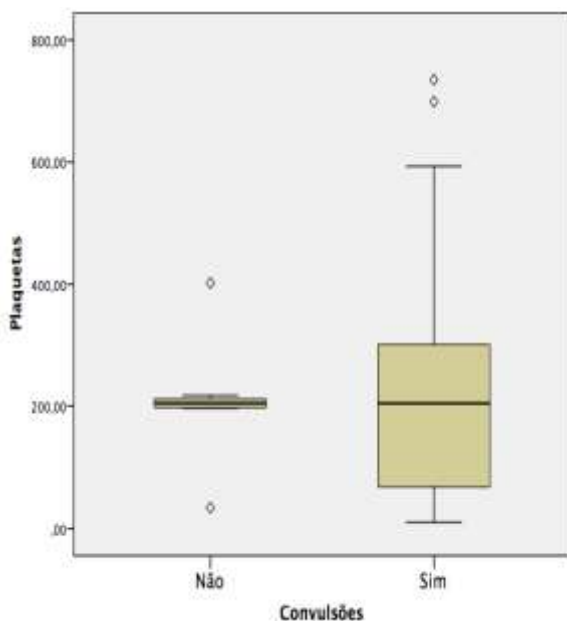


Fig. 27: Distribuição da média das plaquetas nos diferentes sub-fenótipos de MC agrupados de acordo a presença ou não de convulsões. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados.

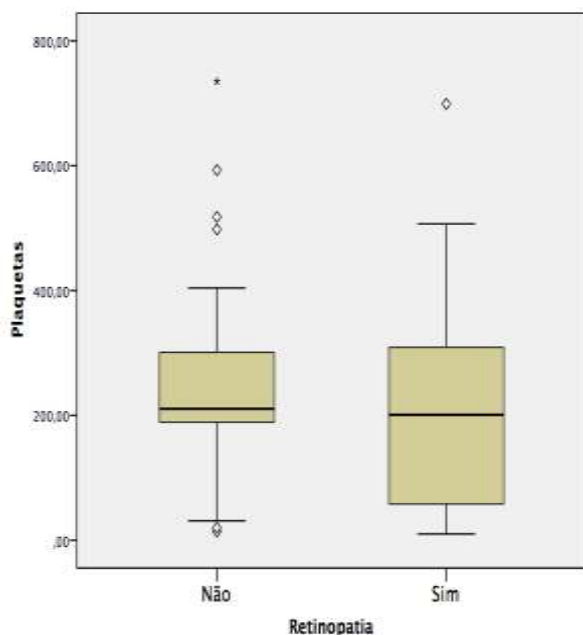


Fig. 28: Distribuição média das plaquetas nos diferentes sub-fenótipos de MC agrupados de acordo a presença ou não de convulsões. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados.

4.1.4. Correlação de lesões neurológicas e/ou da retina com os níveis de hemoproteínas

Hemoglobina

A análise comparativa da média dos níveis de Hb, nos três grupos de estudo (MC, MnC e NIF), pela ANOVA, revelou a existência de diferenças significativas ($p=0.000$) na distribuição das mesmas nos diferentes grupos (Fig. 29).

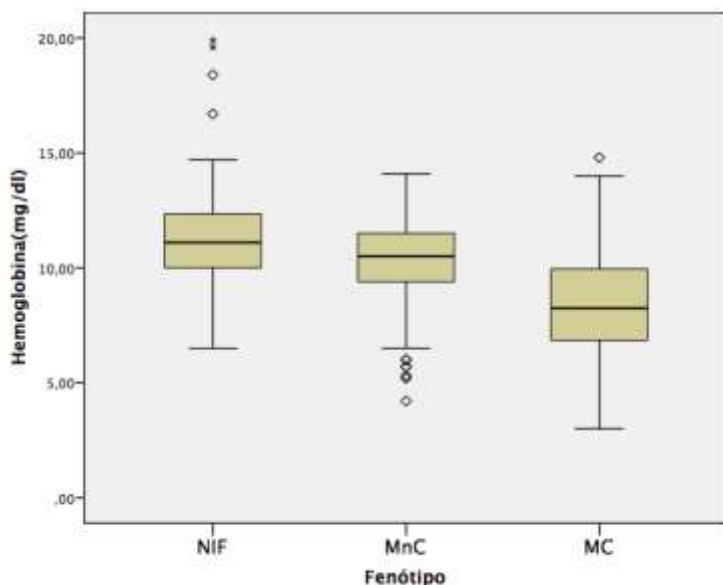


Fig. 29: Distribuição da hemoglobina nos diferentes fenótipos. As idades estão representadas em meses. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e o limite superior o quartil 75%; os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados. NIF; (Assintomáticos não infectados), MnC (Malária não Complicada) MC (Malária Cerebral).

Por outro lado, o teste *t* de Student não revelou diferenças significativas ($p=0.26$), no nível de parasitemia, na comparação entre o grupo de crianças com MC que apresentam ou não Hb patológica (Fig. 30).

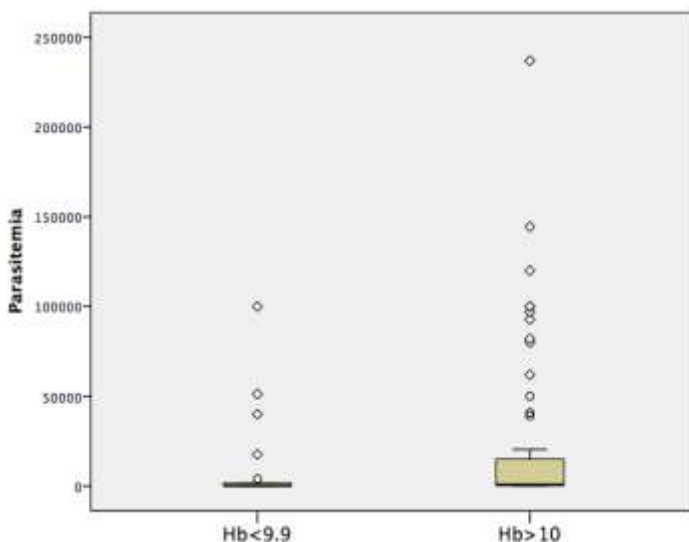


Fig. 30: Distribuição da parasitemia nos diferentes sub-fenótipos de MC, que apresentam ou não Hb patológica. A parasitemia foi calculada a partir do número de eritrócitos parasitados por campo. Por outro lado, a Hb foi quantificada em mg/dL e considerou-se patológica a Hb < 9.9. Cada caixa de

bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados.

Comparando a média de idade nos pacientes com MC, como duas amostras independentes de acordo com a presença ou não de anemia, pelo teste *t de Student*, foi possível evidenciar sinais de associação ($p=0,013$), entre a menor idade e a anemia. Assim que, com este resultado é razoável concluirmos que os níveis de Hb nos pacientes com MC, são inversamente proporcionais a idade, como nos mostra a figura abaixo (Fig.31).

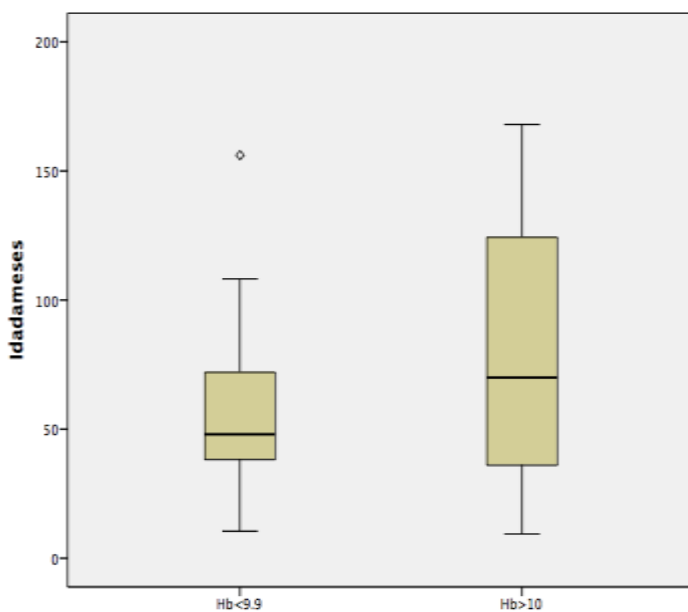


Fig.31: Distribuição da idade nos diferentes sub-fenótipos de MC, agrupados pela presença ou não de Hb patológica. A idade foi calculada em meses. Por outro lado, a Hg foi quantificada em mg/dl e considerou-se patológica à Hb<9.9. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados.

Por outro lado, analisando o grupo de MC, como duas amostras independente, agrupados pela presença ou não de Hb patológica, pelo teste de *Mann-Whitney* não se evidenciou diferenças significativas($p=0,575$). Assim que, como nos mostra a figura abaixo (Fig.32), a anemia afetou de igual modo os pacientes de ambos sexos acometidos pela MC.

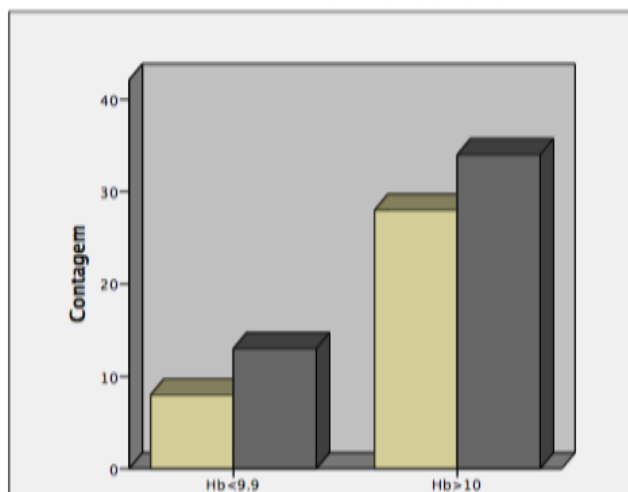


Fig.32: Distribuição do sexo nos diferentes sub-fenótipos de MC, agrupados pela presença ou não de Hb patológica. A Hb foi medida em mg/dL. Considerou-se Hb patológica >10. Os histogramas representam o número de casos em cada

subgrupo. As barras amarelas representam o sexo feminino e as de cor cinzentas representam o sexo masculino. Abreviaturas: Hb (Hemoglobina).

Anemia e Convulsões

As convulsões foram as principais manifestações clínica sugestivas de um comprometimento do SNC, detetadas durante a avaliação clínica de pacientes com MC. Foram analisados 73 casos (87,9%), de acordo com a descrição a seguir. Este grupo foi dividido em duas amostras independente, de acordo com a presença ou não de convulsões e da correlação existente entre as mesmas e o nível de Hb. O teste *Mann-Whitney* não evidenciou sinal de associação entre a presença ou não de anemia e as convulsões ($p=0.66$), como nos mostra a figura abaixo (Fig. 33).

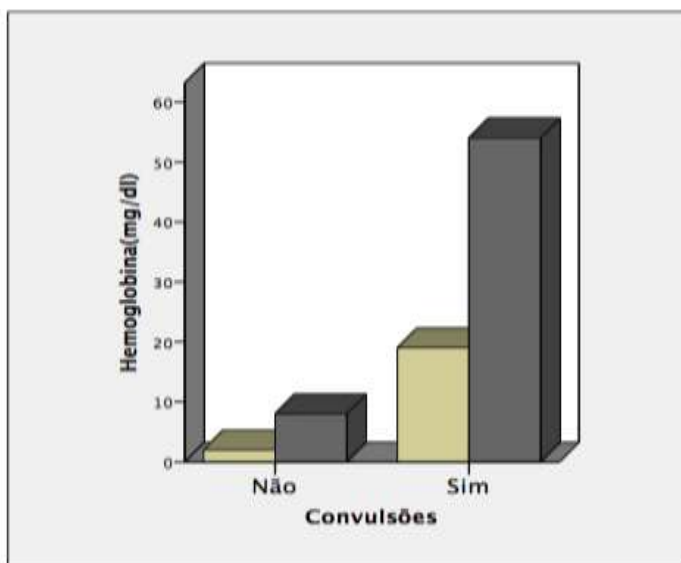


Fig. 33: Distribuição da Hb nos diferentes sub-fenótipos, onde os pacientes foram agrupados de acordo a presença ou não de convulsões. A Hb foi medida em mg/dL. Considerou-se Hb patológica >10. Os histogramas representam o número de casos em cada subgrupo. As barras amarelas representam o sexo feminino e as de cor cinzentas representam o sexo masculino. Abreviaturas: Hb (Hemoglobina).

Anemia e Retinopatia da Malária

A análise da correlação dos níveis de Hb nos sub-fenótipos da MC, onde os pacientes foram agrupados de acordo com a presença ou não de lesões da retina, não revela sinais de associação entre a anemia e a retinopatia da malária ($p=0.40$), pelo teste de χ^2 (Fig. 34).

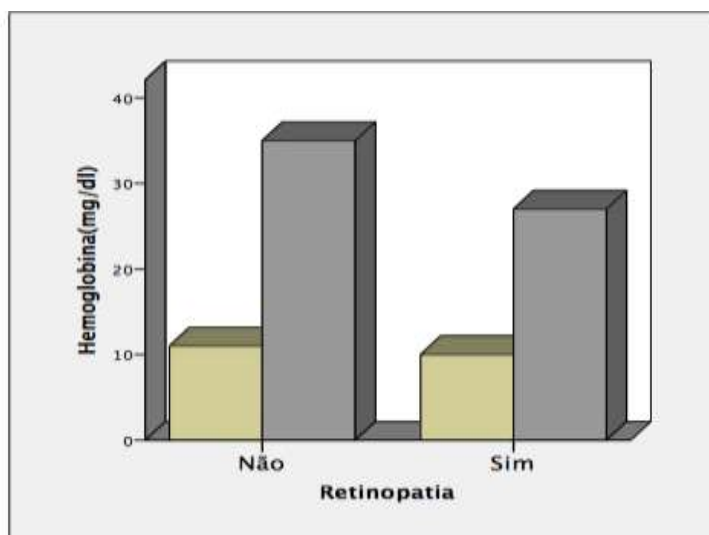


Fig. 33: Distribuição da Hb nos diferentes sub-fenótipos de MC,

onde os pacientes foram agrupados de acordo a presença ou não de lesões da retina. A Hb foi medida em mg/dL. Considerou-se Hb patológica >10. Os histogramas representam o número de casos em cada grupo. As barras amarelas representam o sexo feminino e as de cor cinzentas representam o sexo masculino. Abreviaturas: Hb (Hemoglobina).

4.1.5. Correlação entre a taxa de mortalidade e as variáveis clínicas e laboratoriais.

Verificou-se uma taxa de mortalidade de 18% (15 casos) nos participantes com fenótipo de MC, destes 12% (10 casos) foram pacientes com sub-fenótipos MC Ret+ e 6% (5 Casos) pacientes com sub-fenótipos MC Ret-. O teste de X^2 revelou sinal de associação significativa ($p=0.040$), entre a taxa de mortalidade e o sub-fenótipos de MC Ret+. Por outro lado, a estimação do risco revela que os pacientes com retinopatia da malária, têm triplicado o risco de mortalidade por MC, em comparação com o risco encontrado nos pacientes com sub-fenótipos MC Ret-, OR (odds ratio) = 3,25 (1,017-10,44). Entretanto este

resultado, está em concordância com as evidências encontradas em estudos realizados no Maláui e na Índia, que revelaram uma forte associação entre a retinopatia da malária e a mortalidade nos pacientes acometidos pela doença. Todavia, apesar do viés observado na nossa amostragem, condicionados pela falta de meios para efetuar o diagnóstico de algumas patologias clínicas e laboratoriais relacionadas, como por exemplo: a acidoses (metabólica e/ou respiratória), a malformação do SNC e outras, os resultados acima mencionados confirmam o valor prognóstico da retinopatia da malária nos pacientes com MC¹⁷⁵⁻¹⁷⁹.

A análise comparativa da média da Hb não revelou sinal de associação, pelo teste *t de Student*, com a taxa de mortalidade, no grupo de pacientes com MC ($p=0.40$), como podemos observar na figura abaixo (Fig.35). De igual modo, a análise comparativa da média da parasitemia, no grupo de pacientes com MC, não evidenciou diferenças significativas, entre os subgrupos de pacientes falecidos e não falecidos pela doença ($p=0.56$), quando avaliados pelo mesmo teste

(Fig.36). Observações similares foram obtidas, aplicando o mesmo teste ($p=0.42$), quando a média do nível de plaquetas foi também comparado entre os dois subgrupos (Fig.37).

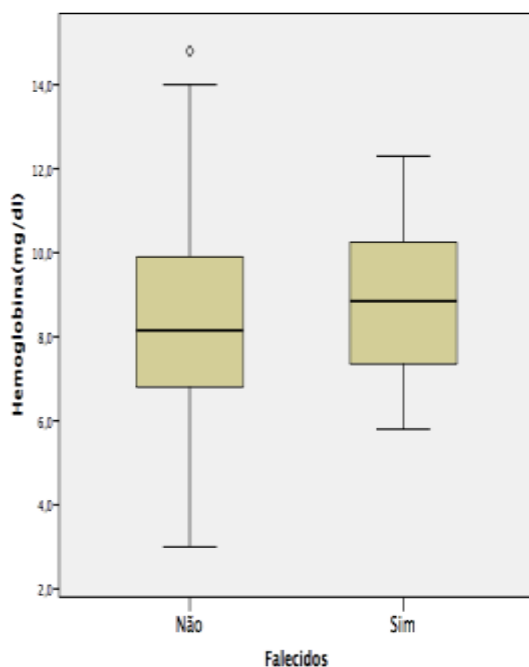


Fig.35: Distribuição da parasitemia nos pacientes falecidos ou não com MC. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados.

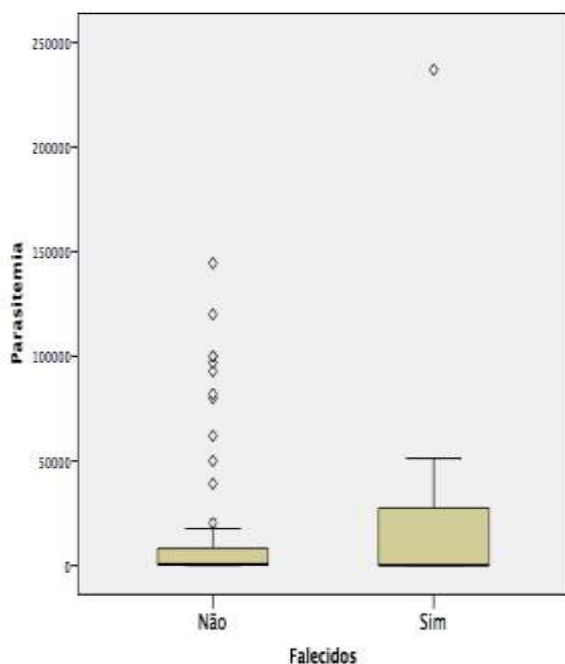


Fig. 36: Distribuição da parasitemia nos pacientes falecidos ou não com MC. A parasitemia foi calculada a partir do número de eritrócitos parasitados por campo de avaliação. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados.

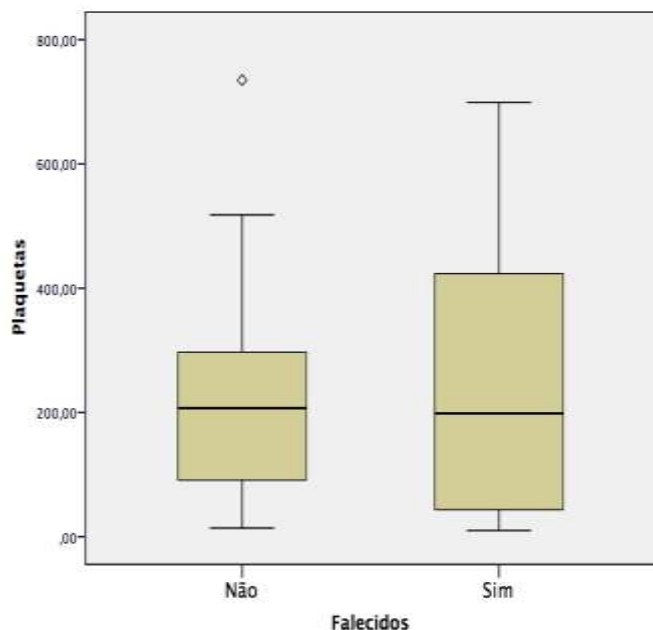


Fig. 37: Distribuição das plaquetas nos pacientes falecidos ou não com MC. Cada caixa de bigodes representa 50% dos dados; as linhas horizontais de cada caixa correspondem às médias; o limite superior ao quartil 75%; o limite inferior de cada caixa representa o quartil 25% e os bigodes representam a variação dos dados para além dos quartis mencionados.

No intuito de verificar se modelos animais de ratinhos podem ser utilizados para corroborar as hipóteses do estudo, os níveis de haptoglobina (Hp) e a hemopexina (Hx) foram medidos em ratinhos C57BL/6, induzidos com diferentes tipos de malária severa. Os resultados obtidos demonstram que, tanto a Hp como Hx representam marcadores de diagnóstico para a severidade da malária. Os ratinhos foram injectados com glóbulos vermelhos infectados com *Plasmodium berghei* Anka e *Plasmodium chabaudi chabaudi*, usados para induzir malária cerebral e malária severa, respectivamente.

Tendo em conta a hemólises causada pela proliferação dos parasitas nos globulos vermelhos, foi observado um aumento dos níveis de Hp durante a infecção. Os dados

demonstram que ratinhos induzidos com malária cerebral apresentaram uma libertação maior de Hp, possivelmente devido ao facto de que, ratinhos induzidos com malária severa ainda não tinham desenvolvido sintomas graves no momento da colheita. Embora cursos temporais são necessários para confirmar esta hipótese, os resultados obtidos demonstram que a Hp está directamente correlacionada com os sintomas da doença, precisamente sintomas neurológicos como aqueles encontrados em ratinhos induzidos com malária cerebral (Fig.38).

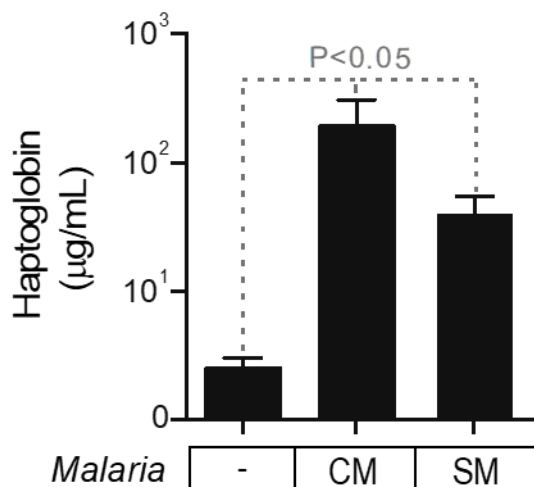


Figura 38: Comparação dos níveis de Hp em ratinhos C57BL/6 controlos ou induzidos com malária cerebral (CM) ou severa (SM). Em ambos os casos as medições foram feitas 7 dias após a indução da doença, quando ratinhos infectados com PI. Berghei Anka apresentam sintomas neurológicos severo, enquanto os ratinhos injectados com PI. Chabaudi Chabaudi ainda não manifestam sinais da doença. Os níveis de Hp são expressos em ng/ml e o nível de significância é <0.05 de acordo com Mann–Whitney U test.

Analogamente, os níveis de Hx foram medidos, encontrando correlações que indicam que esta proteína também pode ser considerada como um marcador da severidade da doença. A diminuição dos níveis de Hx com a evolução dos sintomas e gravidade da doença foi analisada, seguindo os mesmos moldes previamente mencionados (Fig.39).

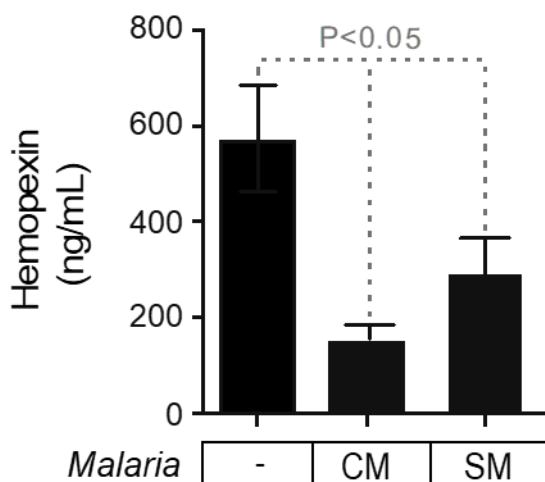


Figura 39: Comparação dos níveis de Hx em ratinhos C57BL/6 controles ou induzidos com malária cerebral (CM) ou severa (SM). Em ambos os casos as medições foram feitas 7 dias após a indução da doença, quando ratinhos infectados com PI. Berghei Anka apresentam sintomas neurológicos severo, enquanto os ratinhos injectados com PI. Chabaudi Chabaudi ainda não manifestam sinais da doença. Os níveis de Hx são expressos em ng/ml e o nível de significância é <0.05 de acordo com Mann–Whitney U test.

Infelizmente, devido a pandemia não nos foi possível medir os níveis de Hp e Hx no sangue periférico das crianças participantes no estudo. Contudo, os dados obtidos em ratinho e os resultados encontrados em pesquisas anteriores(dados não publicados) indicam que a tendência teria que ser a mesma.

Está hipótese é suportada pelos resultados analisados em amostras humanas de malária assintomática, malária severa e malária cerebral, onde a semelhança dos

resultados obtidos em modelos animais, foi possível demonstrar que existe uma correlação directamente proporcional entre os níveis de Hp e a severidade da doença. Assim que, os pacientes com MC apresentaram níveis altos de Hp quando comparados com os grupos controlos (fig.40).

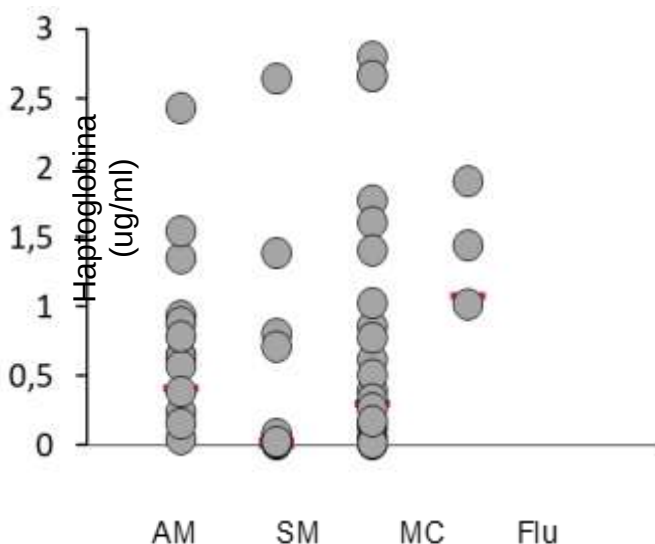


Figura 40: Comparação dos níveis de Hp em crianças com malária assintomática (), malária severa (MS), malária cerebral (CM) e

respectivo controlo (Flu). O resultado foi obtido através da quantificação da Hpx no plasma dos participantes. As linhas vermelhas, representam a média, enquanto que cada círculo representa o valor absoluto da Hp presente nos pacientes. Os níveis de Hp são expressos em ng/ml e o nível de significância é <0.05 de acordo com Kruskal-Wallis test.

Paralelamente, foi possível demonstrar em crianças afectadas pela doença, que os níveis de Hx, são inversamente proporcionais à severidade da doença, uma vez que, as crianças com MC, apresentaram níveis inferiores da molécula de Hx em comparação com os grupos controlos. Deste modo, fica uma vez, mas demonstrado o papel da Hx como marcador prognóstico da severidade da doença (Fig.41).

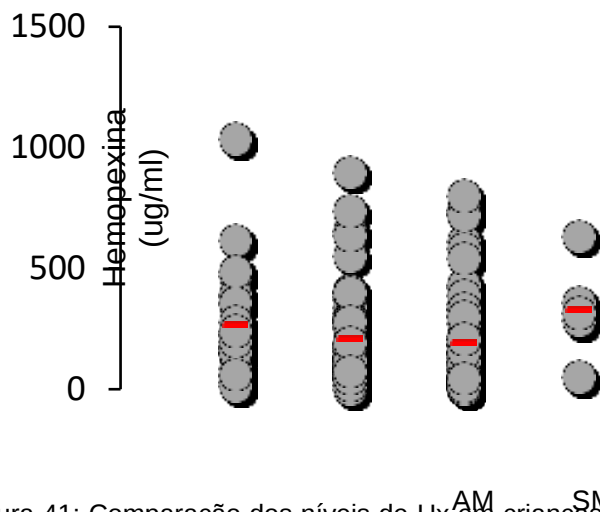


Figura 41: Comparação dos níveis de Hx em crianças com malária assintomática (AM), malária severa (SM), malária cerebral (MC) e respectivo controlo (Flu). O resultado foi obtido através da quantificação da Hpx no plasma dos participantes. As linhas vermelhas, representam a média, enquanto que cada círculo representa o valor absoluto da Hx presente nos pacientes. Os níveis de Hp são expressos em ug/ml e o nível de significância é <0.05 de acordo com Kruskal-Wallis test.

CAPÍTULO 5:

DISCUSSÃO

5.1. DISCUSSÃO

Os nossos resultados, revelam que os pacientes em idades inferiores a 59 meses foram os, mas afectados pela MC. Assim que, mas uma vez, ficou demonstrada a evidência científica que revela que a maior frequência da MC, ocorre em crianças menores de 59 meses¹⁷⁸⁻¹⁷⁹. Todavia, algumas variações na frequência da doença, podem ser observadas e para isto, contribuem vários factores, como por exemplo; os descritos por, A. M. Mutombo e colaboradores, tais como, o grau de exposição endémica, a qualidade de recursos humanos e do material de laboratório, e o tipo de estudo¹⁷⁹. Estes factores, tem uma maior relevância no contexto de alguns países africanos e associado a isso, está a aquisição da imunidade a malária com a idade.

Por outro lado, observou-se diferenças significativas entre a media de idade em meses, quando subdividimos os pacientes com MC, pela

presença ou não de convulsões. Este resulta está em perfeita concordância, com a evidência de que as complicações neurológicas, como por exemplo, as convulsões são, mas frequentes em crianças menores, facto demonstrado em estudos anteriores e que pode estar associado a aquisição da imunidade à malária, com a idade e a maior suscetibilidade do SNC nesta fase da vida ¹⁸⁰⁻¹⁸¹. Por outro lado, em um estudo realizado na população do Quênia, S. M. Kariuki e colaboradores, associam outros factores que podem justificar a maior susceptibilidade as convulsões em criança menores, tais como, o nível de parasitemia e a intensidade de transmissão da região em que se está inserido, na patogénese das convulsões em pacientes com MC¹⁸¹. Todavia, os dois últimos factores não são muito específicos, porque alguns pacientes residentes em áreas de baixa transmissibilidade da doença, podem apresentar episódios convulsivos com baixos níveis de parasitemia.

Lewallen e colaboradores, descreveram pela primeira vez um padrão de lesões da retina, típicas em

pacientes com MC⁵⁹. Os processos fisiopatológicos, envolvidos na gênese das mesmas, tem sido fortemente associado a patogênese da MC. Assim que, alguns autores sugerem existir associação entre as mesmas e a severidade da doença¹⁸². Este facto, tem levado alguns autores a definirem a RM como um possível biomarcador para o diagnóstico e prognóstico da doença.

No nosso estudo, não evidenciamos sinais de associação entre as lesões da retina e outras variáveis clínicas. Este último, não está em concordância com os resultados obtidos em um estudo comparativo realizado em Malabo no Uganda, onde foi possível evidenciar sinais de associação entre as manifestações respiratórias e a RM¹⁸³. Apesar de que, durante a realização do estudo, foi possível constatar *in locus*, que um elevado número de participantes falecidos durante o estudo, que reuniram os critérios de diagnóstico de RM, apresentou manifestações clínicas sugestivas da síndrome de Distres Respiratório Agudo,

facto que carece de estudos futuros para melhor esclarecimento.

Em relação a análise comparativa da média do nível de parasitemia, nos participantes com malária (MnC e MC), encontrou-se diferenças significativas, sendo que os pacientes que apresentaram maior gravidade da doença, apresentaram maior número de parasitas em comparação ao grupo de pacientes com a forma leve da doença. Este resultado, está em concordância com os resultados obtidos em estudos realizados no Paquistão, por *H. ali e colaboradores*, onde se evidenciou que a elevação da densidade parasitaria, está fortemente associada a severidade da doença¹⁸³. Todavia, a relação causal directa entre o nível de parasitemia e a patogénese da severidade da malária não está totalmente esclarecida. Este facto, pode ser facilmente constatado na prática clínica, onde é frequente observar-se pacientes que apresentam as formas graves da doença com baixos níveis de parasitemia, quando comparados com pacientes com as formas leves da doença. Por outro lado, estudos

baseados em autopsias em pacientes com MC, associam a severidade da doença com o grau de sequestro de eritrócitos parasitados e não com o grau de densidade parasitaria em si¹⁸⁵⁻¹⁸⁶. Assim que, fica evidenciada a necessidade da realização de estudos futuros, que visam dar maior esclarecimento a esta problemática.

Os nossos resultados, não revelam diferenças significativas na comparação da média da parasitemia nos subgrupos de pacientes com MC, subdivididos em duas amostras independentes, agrupados pela presença ou não das lesões da retinopatia da malária. Este resultado, está em concordância, com os resultados de estudos realizados em alguns países da África subsaariana, como por exemplo, o Quênia e o Maláui, onde não se evidenciou diferenças significativas do nível de parasitemia entre os dois subgrupos¹⁸⁷⁻¹⁸⁹.

Em um estudo de autopsia V. Barrera e colaboradores, observaram que o grau de severidade da retinopatia, está associado ao grau de sequestro de eritrócitos parasitados, na retina e no cérebro em

crianças com MC¹⁷⁰. Este facto, permitiu aos autores estabelecer bases histopatológicas, para correlacionar o grau de severidade da retinopatia com a disfunção cerebral em pacientes acometidos pela doença. Assim que, hipoteticamente é razoável afirmamos que a diferença entre as manifestações clínicas existente entre os dois grupos, está dada pelo grau de sequestro e não pelo nível de parasitemia. Todavia, resultados diferentes foram obtidos em um outro estudo, realizado no Maláui, onde encontrou-se diferenças significativas no nível de parasitemia entre os dois grupos¹⁹⁰.

Apesar de já comprovada, a relação directa e indirecta entre as convulsões e a infecção por *Pl sp* nos pacientes com MC¹⁹¹, os nossos resultados, não revelam diferenças significativas no nível de parasitemia entre os pacientes internados com MC, agrupados pela presença ou não convulsões durante o seu internamento. Em um estudo realizado no Uganda, por R. Ogwang e colaboradores, observou-se uma correlação positiva entre a densidade parasitaria e o número de convulsões¹⁹². Todavia, o facto de o mesmo

estudo ter sido feito em pacientes acometidos pelo Síndrome de Nodding, pode constituir de per si, um viés uma vez que, pode ser um factor de risco de crises convulsivas em casos de pacientes com elevada parasitemia. Assim que, torna-se imprescindível a realização de estudos futuros, que buscam dar uma maior compreensão da relação causal entre a parasitemia e as convulsões em pacientes acometidos com a MC.

Por outro lado, não se evidenciou diferenças significativas no nível de parasitemia, entre o grupo de crianças com MC, agrupados pela presença ou não de Hb patológica. Este resultado, não está em concordância com os resultados obtidos em estudos realizados em alguns países endêmicos, onde ficou demonstrado a existência de sinais de associação entre a parasitemia e o nível de hemoglobina em pacientes acometidos pela doença¹⁹³⁻¹⁹⁴.

A análise comparativa da média do nível de plaquetas entre o grupo de MC e os controlos (MnC e NIF), revelou diferenças significativas. Este resultado,

está em concordância com os resultados obtidos em estudos realizados que associam a morbidade da malária com a trombocitopenia. Todavia, os mecanismos fisiopatológicos que explicam a relação causal existente entre a trombocitopenia e morbidade da malária não estão bem esclarecidos¹⁹⁴⁻¹⁹⁵. Deste modo, ficou mais uma vez demonstrada a associação da trombocitopenia com a malária. Por outro lado, ao compararmos os pacientes com malária, subdivididos em dois grupos, de acordo com a severidade da doença, não se observou diferenças significativas, apesar da ligeira diferença observada, que revelam que os níveis de plaquetas foram inversamente proporcionais a severidade da doença.

A análise da relação entre os níveis de plaquetas e as crises convulsivas, nos pacientes com MC, não revelou diferença significativas, entre os pacientes com sub-fenótipos de MC, agrupados de acordo a presença ou não de crises convulsivas durante o internamento. Por outro lado, a análise da relação entre o nível de plaquetas e a presença ou não de lesões da retina em

pacientes com MC, pelo mesmo teste, não revelou diferença significativa, entre os pacientes com sub-fenótipos de MC, agrupados de acordo a presença ou não de lesões da retina. Este resultado, não está em concordância com os resultados obtidos em estudos realizados no Maláui, em que se evidenciou uma associação entre a retinopatia da malária e a trombocitopenia¹⁹⁶.

Comparativamente a média dos níveis de Hb, nos três grupos de estudo (MC, MnC e NIF), revela diferenças significativas na distribuição da média da mesma nos diferentes grupos. Este resultado, está em concordância com o resultado obtido em um estudo de caso-controlos, realizados em uma área de transmissão mesoendémica, como é o caso de Kampala no Uganda, onde se evidenciou diferenças significativas, na comparação dos níveis de Hb, entre as crianças com MC e MnC¹⁹⁷. Assim que, é razoável formular a hipótese de que está diferença observada nos níveis de Hb, entre os indivíduos com MC e os indivíduos dos

grupos controlos (MnC e NIF), constituem a base dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença da malária. Este facto, pode ser suportado pela capacidade que a molécula de Hb tem de causar danos as células endoteliais, participando em reações de oxidação, e agravando a doença através de um comprometimento vascular. Por outro lado, podemos afirmar que os pacientes com MC apresentem um maior grau de hemólises dos glóbulos vermelhos parasitados e consequentemente maior liberação da Hb. Uma vez oxidada, a instabilidade química desta molécula levaria a libertação do seu grupo prostético, o Hemo, que exercendo o seu efeito pro-oxidante, contribuiria para criar um dano vascular que resultaria ao agravamento do quadro clínico do paciente^{194,198}.

Outro facto curioso, está dado a associação da comorbilidade da anemia e a menor idade no grupo de pacientes com MC. Assim que, os nossos resultados revelam sinal de associação entre as variáveis acima mencionadas (menor idade e anemia). Este resultado, está em concordância com os resultados obtidos em

um estudo realizado anteriormente em crianças angolana, por de, onde foi possível M.R. Sambo e colaboradores evidenciar que os pacientes com menor idade infectados pelo *P.falciparum*, apresentam maior susceptibilidade a anemia, independentemente de estes apresentarem ou não a malária cerebral⁹⁴. Na base desta relação inversamente proporcional, entre a idade e os níveis de Hb, observada em crianças acometidas pela malária, podem estar factores relacionados com o elevado número de infecções parasitárias registados em alguns países africanos, associado a maior susceptibilidade a doença nesta fase da vida¹⁷⁹. Todavia, estudos futuros são necessários, para o melhor esclarecimento desta relação entre a menor idade e a anemia em crianças com malária em crianças angolanas.

A análise do grupo de pacientes com MC, como duas amostras independentes, agrupados pela presença ou não de convulsões durante o seu internamento e da correlação existente entre o nível de Hb, não evidenciou sinal de associação entre a

presença ou não de Hb patológica e as convulsões. Por outro lado, a análise da correlação dos sub-fenótipos da MC, agrupados de acordo com a presença ou não de lesões da retina e o nível de Hb, também não evidenciou diferenças significativas. Entretanto este resultado, não está em concordância com o estudo realizado no Uganda, que evidenciou sinal de associação entre a anemia e o sub-fenótipos MC Ret+¹⁸⁰. Esta diferença, pode estar condicionada pelo viés observado na amostragem do nosso estudo, assim que, ulteriores avaliações poderiam esclarecer melhor este tema.

No nosso estudo, verificou-se uma taxa de mortalidade de 18% (15 casos) nos participantes com fenótipo de MC, destes 12 % (10 casos) foi dos pacientes com sub-fenótipos MC Ret+ e 6% (5 Casos) dos pacientes com sub-fenótipos MC Ret-. Assim que, evidenciamos sinais de associação, entre a taxa mortalidade e o sub-fenótipos de MC Ret+. Por outro lado, a estimação do risco revela que os pacientes com RM, têm triplicado o risco de falecer, OR (oddis ratio)

=3,25 (1,017-10,44). Este resultado, está em concordância com as evidências encontradas em estudos realizados no Malawi e na Índia, onde se evidenciou uma forte associação entre a RM e a mortalidade. Todavia, apesar do viés observado na nossa amostragem, condicionados pela falta de meios para o diagnóstico de algumas patologias clínicas e laboratoriais, como por exemplo; a acidoses (metabólica e/ou respiratória) malformação do SNC e outras, os resultados acima mencionados, revelam o valor prognóstico, já descrito da RM nos pacientes com MC¹⁹⁹.

Em crianças africanas acometidas pela MC, a comorbilidade com anemia, é frequentemente associada a alta taxa de mortalidade²⁰⁰. Todavia, não se evidenciou diferenças significativas na taxa de mortalidade entre o grupo de pacientes com MC e comorbilidade com anemia ou não.

No nosso estudo, foi possível demonstrar em modelos animais, o papel que a Hp e Hx desempenham

na prevenção do dano neurológico induzida pela infecção por Plasmodium. Por outro lado, apesar das limitações impostas pela COVID-19, que impossibilitaram a quantificação da Hp e Hx nas amostras de sangue colhidas nos pacientes incluídos no nosso estudo, os resultados obtidos em estudos anteriores (não publicados), realizados em crianças angolanas com malária demonstraram a mesma tendência, facto que nos permite inferir que nos nossos participantes sucederia o mesmo. Este facto, está em perfeitas concordância, com os resultados encontrados no estudo realizado no estado de Odisha na Índia, onde encontrou-se sinal de associação entre os níveis de Hx e a severidade da doença. Assim que, os pacientes com maior gravidade da doença, apresentam níveis inferiores de Hx. Este facto, pode ser justificado pelo aumento da concentração plasmática do Hemo, causada pela hemólise de globulos vermelhos infectado pelo Plasmodium¹²¹.

Outro facto curioso, constitui o aumento da concentração plasmática Hp, em uma relação

directamente proporcional a gravidade da doença. Assim que, quando maior a severidade da doença, maior é a concentração plasmática da mesma. Este resultado está em concordância com os resultados obtidos em outros estudo, onde foi possível demonstrar a associação entre o aumento dos níveis da Hp com a severidade da doença²⁰¹.

CAPÍTULO 6:

***CONCLUSÕES E
LIMITAÇÕES DO ESTUDO***

PERSPECTIVAS FUTURAS

6.1. Conclusões

A alta taxa de morbidade e mortalidade causada pela malária a nível mundial é influenciada pela toxicidade de moléculas libertadas durante esta doença. Deste modo, a valoração das mesmas poderia esclarecer a patofisiologia da malária. Entre estas moléculas, sabemos que as hemoproteínas libertadas durante a lise eritrocitária, causada pelo *Plasmodium sp*, contribuem a uma maior severidade da infecção.

A realização deste estudo, surgiu da necessidade de aprofundar o conhecimento do papel de moléculas responsáveis pelo seu metabolismo do Hemo e Hb, nomeadamente a Hp e Hpx na prevenção do dano neurológico em crianças com malária cerebral. Enquanto que esta última parte, aguarda o levantamento das restrições para a circulação de amostras biológicas de Angola para o exterior do país, impostas pela COVID-19, os parâmetros bioquímicos e a severidade das lesões neurológicas e da retina em pacientes acometidos pela doença foram avaliados.

As diferenças significativas, entre os níveis de Hb no grupo de estudo e nos respectivos grupos controlos, confirmam a implicação da mesma na patofisiologia das lesões neurológicas e da retina. Está associação foi evidente em pacientes com MC, e demonstrado em estudos anteriores, que a elevação dos níveis de Hb livre circulantes contribui para o agravamento da doença¹⁷⁷. Por outro lado, não podemos deixar de mencionar, a associação entre a menor idade e os níveis de Hb, uma vez que, nos pacientes com MC a menor idade, é também um factor de risco para o agravamento do dano neurológico nestes pacientes, facto já demonstrados em estudos anteriores⁵²⁻⁵³. Assim que, é razoável propormos a hipóteses de que a Hb possa vir a ser usada como um biomarcador da severidade da MC, sobretudo quando associada a menor idade. Todavia, são necessários a realização de estudos futuros que busquem evidenciar esta situação.

As diferenças detectadas em outros indicadores laboratoriais (plaquetas e parasitemia), durante a comparação entre o grupo de estudo e os controlos.

Relativamente a associação entre a presença de lesões da retina, nos pacientes com MC e a taxa de mortalidade, os nossos resultados revelam que pacientes com MC que apresentam lesões de RM têm uma maior mortalidade pela malária, como comprovado em outros estudos realizados⁶⁷⁻⁶⁸.

Esta investigação representa o primeiro trabalho, realizado na província de Benguela, sobre o papel da Hp e da Hx, na patogénese da malária, identificando a associação existente entre as mesmas e as lesões neurológicas e da retina registada durante a doença. Isso permitiu valorizar o papel de algumas componentes endógenas, que uma vez libertadas, contribuem para um desfecho desfavorável da MC. Todavia, não podemos deixar de realçar a necessidade da realização de outros estudos, mais detalhados e com um maior número de pacientes, que visam consolidar os resultados alcançados.

6.2. Limitações do estudo

Com este estudo pretendeu-se avaliar o papel da Hb e do Hemo, assim como, das moléculas responsáveis pelo seu metabolismo (Hpx e Hp) na patofisiologia das lesões neurológicas e da retina em crianças com MC.

O imprevisível estado actual da pandemia da COVID-19, assim como, as consequências que a mesma acarreta, no que tange a morbilidade de pessoas e amostras biológicas entre países, não nos permitiu concluir algumas análises inicialmente prevista. Assim que, não foi possível transportar amostras de sangue de Luanda para Lisboa, destinadas a quantificação do Hemo e das moléculas responsáveis pelo seu metabolismo. Associado a isto, a falta de financiamento para a realização do trabalho de campo limitou o número de participantes no estudo.

Por outro lado, a escassez de meios de diagnósticos sofisticados, para a detecção de lesões neurológicas microscópicas nas unidades hospitalares,

onde decorreu o estudo, impediu a correcta identificação das mesmas, constituindo assim, um viés da nossa amostragem. Por isso, não descartamos a existência de eventuais lesões neurológicas microscópicas assintomáticas, não detectadas durante a avaliação clínica destes pacientes.

Assim que, a realização de estudos futuros, que visam melhorar a abordagem científica dos resultados alcançados, permitirá consolidar os resultados obtidos.

6.3. Perspectivas futuras

O fim de uma longa caminhada, abri sempre portas para futuras caminhadas. Assim que, apesar das limitações impostas pelo actual quadro epidemiológico mundial, devido a pandemia da COVID-19, pretendemos a curto prazo dar continuidade aos projectos de investigação científica inacabados. Por exemplo, pretendemos continuar a realizar estudos

relacionados, com as complicações neurológicas e da retina em crianças angolanas com MC.

Dada a importância das condicionantes genéticas, já demonstrada em estudos anteriores no curso da MC⁹⁰⁻⁹², pretendemos dar continuidade a avaliação de marcadores genéticos, relacionados com a protecção e a susceptibilidade às lesões neurológicas e da retina nos pacientes com MC. Deste modo, mantemos aceso o desejo de dar continuidade ao projecto traçado inicialmente, assim que houver melhoria do estado epidemiológico actual e financeiro.

As lesões da retina em crianças com MC na província de Benguela, Angola, foram pela primeira vez, por nós estudadas e dada a importância das mesmas, para o diagnóstico e prognóstico da doença pretendemos implementar um projecto de formação e capacitação de médicos e outros técnicos de saúde, sobre as técnicas de diagnóstico correcto das mesmas, na região centro e sul do país. Por outro lado, pretendemos realizar a curto e médio prazo estudos analíticos prospetivos com o intuito de avaliar a

evolução a curto e médio prazo das lesões neurológicas e da retina em crianças com MC. Deste modo, estão em curso negociações de futuras parcerias em projectos de investigação científica com o Centro Oftalmológico Internacional de Benguela, Angola, cuja os objectivos estão centrados em:

- a) Promover, cursos de capacitação dos profissionais de saúde, em técnicas de diagnóstico e tratamento das lesões da retina resultantes da infecção por *Plasmodium sp.*
- b) Avaliar, as principais lesões da retina resultantes da infecção por *Plasmodium sp.* em crianças angolanas.
- c) Prestar, assistência médica e medicamentosa, as crianças diagnosticadas com lesões da retina, resultantes da infecção por *Plasmodium sp.*

De modo geral, os resultados encontrados no nosso estudo, relacionados com as lesões neurológicas

e da retina em crianças com MC, na província de Benguela, Angola, podem vir a ser um factor motivacional, para a realização de futuros estudos em indivíduos que padecem da doença, buscando sempre a melhoria na compreensão de factores relacionados com a abordagem clínica e laboratorial da mesma.

CAPÍTULO 7:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

1. Carter, R., & Mendis, K. N. (2002). Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), 564-594.
2. WHO(org).world malaria report 2018"*Estimated burden of malaria in 2017*".
3. World Health Organization. (2019). world malaria report 2019. Geneva. 2019.
4. <https://www.afro.who.int/sites/default/files/2017-06/ccs-angola-2015-2019-p.pdf>
5. World Health Organization. (2019). The E-2020 initiative of 21 malaria-eliminating countries: 2019 progress report. In *The E-2020 initiative of 21 malaria-eliminating countries: 2019 progress report*.

6. Morel, C. M., Thang, N. D., Xa, N. X., Hung, L. X., Van Ky, P., Erhart, A., ... & D'Alessandro, U. (2008). The economic burden of malaria on the household in south-central Vietnam. *Malaria Journal*, 7(1), 166.
7. Sarma, N., Patouillard, E., Cibulskis, R. E., & Arcand, J. L. (2019). The Economic Burden of Malaria: Revisiting the Evidence. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, tpmd190386.
8. Morel, C. M., Thang, N. D., Xa, N. X., Hung, L. X., Van Ky, P., Erhart, A., ... & D'Alessandro, U. (2008). The economic burden of malaria on the household in south-central Vietnam. *Malaria Journal*, 7(1), 166.
9. Aikawa, M., & Seed, T. M. (1980). Morphology of plasmodia. *Morphology of plasmodia.*, 285-344.
10. White, N. J. (2008). *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite

11. Chin, W., Contacos, P. G., Collins, W. E., Jeter, M. H., & Alpert, E. (1968).
12. Experimental mosquito-transmission of *Plasmodium knowlesi* to man and monkey. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 17(3), 355-358.
13. Malaria parasite development in mosquitoes. *Annual review of entomology*, 43(1), 519-543.
14. EKPENYONG, E. A., & EYO, J. E. (2006). *Plasmodium* infection in man: a review. *Animal Research International*, 3(3), 573-580.
15. Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., ... & Rodríguez, A. (2001). Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, 291(5501), 141-144.
16. Venugopal, K., Hentzschel, F., Valkiūnas, G., & Marti, M. (2020). *Plasmodium* asexual growth and sexual

development in the haematopoietic niche of the host. *Nature Reviews Microbiology*, 1-13.

17. Ménard, R. (2005). Knockout malaria vaccine?. *Nature*, 433(7022), 113-114.
18. Gupta, S., Snow, R. W., Donnelly, C., & Newbold, C. (1999). Acquired immunity and postnatal clinical protection in childhood cerebral malaria. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1414), 33-38.
19. Perlmann, P., & Troye-Blomberg, M. (2002). Malaria and the immune system in humans. *Malaria Immunol*, 80, 229-242.
20. Schofield, L., & Grau, G. E. (2005). Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, 5(9), 722.

21. Buçsan, A. N., & Williamson, K. C. (2020). Setting the stage: The initial immune response to blood-stage parasites. *Virulence*, 11(1), 88-103.
22. Kurtis, J. D., Raj, D. K., Michelow, I. C., Park, S., Nixon, C. E., McDonald, E. A., ... & Kabyemela, E. R. (2019). Maternally-derived Antibodies to Schizont Egress Antigen-1 and Protection of Infants From Severe Malaria. *Clinical Infectious Diseases*, 68(10), 1718-1724.
23. Ryg-Cornejo, V., Ly, A., & Hansen, D. S. (2016). Immunological processes underlying the slow acquisition of humoral immunity to malaria. *Parasitology*, 143(2), 199-207.
24. del Pilar Quintana, M., Ch'ng, J. H., Moll, K., Zandian, A., Nilsson, P., Idris, Z. M., ... & Wahlgren, M. (2018). Antibodies in children with malaria to PfEMP1, RIFIN and SURFIN expressed at the Plasmodium falciparum parasitized red blood cell surface. *Scientific reports*, 8(1), 3262.

25. Marsh, K., Otoo, L., Hayes, R. J., Carson, D. C., & Greenwood, B. M. (1989). Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(3), 293-303.
26. Travassos, M. A., Niangaly, A., Bailey, J. A., Ouattara, A., Coulibaly, D., Lyke, K. E., ... & Berry, A. A. (2018). Children with cerebral malaria or severe malarial anaemia lack immunity to distinct variant surface antigen subsets. *Scientific reports*, 8(1), 6281.
27. Vigan-Womas, I., Guillotte, M., Juillerat, A., Hessel, A., Raynal, B., England, P., ... & Lewit-Bentley, A. (2012). Structural basis for the ABO blood-group dependence of *Plasmodium falciparum* rosetting. *PLoS Pathog*, 8(7), e1002781.

28. Kurup, S. P., Butler, N. S., & Harty, J. T. (2019). T cell-mediated immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology*, 19(7), 457-471.
29. Clark, I. A. (1987). Cell-mediated immunity in protection and pathology of malaria. *Parasitology Today*, 3(10), 300-305.
30. Abdi, A. I., Kariuki, S. M., Muthui, M. K., Kivisi, C. A., Fegan, G., Gitau, E., ... & Bull, P. C. (2015). Differential *Plasmodium falciparum* surface antigen expression among children with Malarial Retinopathy. *Scientific reports*, 5, 18034.
31. Newbold, C. I., Craig, A. G., Kyes, S., Berendt, A. R., Snow, R. W., Peshu, N., & Marsh, K. (1997). PfEMP1, polymorphism and pathogenesis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 91(5), 551-557.
32. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf,

33. Keeling, P. J., & Rayner, J. C. (2015). The origins of malaria: there are more things in heaven and earth.... *Parasitology*, 142(S1), S16-S25.
34. Chandramohan, D., Jaffar, S., & Greenwood, B. (2002). Use of clinical algorithms for diagnosing malaria
1. *Tropical Medicine & International Health*, 7(1), 45-52.
35. Olaleye, B. O., Williams, L. A., D'alessandro, U., Weber, M. M., Mulholland, K., Okorie, C., ... & Greenwood, B. M. (1998). Clinical predictors of malaria in Gambian children with fever or a history of fever. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(3), 300-304.
36. Arévalo-Herrera, M., Lopez-Perez, M., Medina, L., Moreno, A., Gutierrez, J. B., & Herrera, S. (2015). Clinical profile of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections in low and unstable malaria transmission settings of Colombia. *Malaria journal*, 14(1), 154.

37. Mathews, S. E., Bhagwati, M. M., & Agnihotri, V. (2019). Clinical spectrum of Plasmodium vivax infection, from benign to severe malaria: A tertiary care prospective study in adults from Delhi, India. *Tropical parasitology*, 9(2), 88.
38. Cox-Singh, J., Davis, T. M., Lee, K. S., Shamsul, S. S., Matusop, A., Ratnam, S., ... & Singh, B. (2008). Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical infectious diseases*, 46(2), 165-171.
39. Kumar, R., & Saravu, K. (2017). Severe vivax malaria: a prospective exploration at a tertiary healthcare centre in Southwestern India. *Pathogens and global health*, 111(3), 148-160.
40. Rajahram, G. S., Cooper, D. J., William, T., Grigg, M. J., Anstey, N. M., & Barber, B. E. (2019). Deaths from Plasmodium knowlesi malaria: case series and systematic review. *Clin Infect Dis*, 1-36.

41. Mohanty, S., Mishra, S. K., Pati, S. S., Pattnaik, J., & Das, B. S. (2003). Complications and mortality patterns due to *Plasmodium falciparum* malaria in hospitalized adults and children, Rourkela, Orissa, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(1), 69-70.
42. <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/who-severe-malaria-tmih-supplement-2014.pdf>.
43. Beare, N. A., Taylor, T. E., Harding, S. P., Lewallen, S., & Molyneux, M. E. (2006). Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75(5), 790-797.
44. Lewallen, S., Taylor, T. E., Molyneux, M. E., Wills, B. A., & Courtright, P. (1993). Ocular fundus findings in Malawian children with cerebral malaria. *Ophthalmology*, 100(6), 857-861.

45. Berendt, A. R., Tumer, G. D. H., & Newbold, C. I. (1994). Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. *Parasitology Today*, 10(10), 412-414.
46. Von Seidlein, L., Olaosebikan, R., Hendriksen, I. C., Lee, S. J., Adedoyin, O. T., Agbenyega, T., ... & Fanello, C. I. (2012). Predicting the clinical outcome of severe falciparum malaria in african children: findings from a large randomized trial. *Clinical infectious diseases*, 54(8), 1080-1090.
47. Clark, I. A., & Rockett, K. A. (1994). The cytokine theory of human cerebral malaria. *Parasitology Today*, 10(10), 410-412.
48. Pamplona, A., Ferreira, A., Balla, J., Jeney, V., Balla, G., Epiphanio, S., ... & Portugal, S. (2007). Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nature medicine*, 13(6), 703-710.

49. Yusuf, F. H., Hafiz, M. Y., Shoaib, M., & Ahmed, S. A. (2017). Cerebral malaria: insight into pathogenesis, complications and molecular biomarkers. *Infection and drug resistance*, 10, 57.
- 50.x Idro, R., Jenkins, N. E., & Newton, C. R. (2005). Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *The Lancet Neurology*, 4(12), 827-840.
51. Garg, R. K., Karak, B., & Misra, S. (1999). Neurological manifestations of malaria: an update. *Neurology India*, 47(2), 85.
52. Leslie, K. A. (2019). Neurological sequelae of pediatric Plasmodium falciparum cerebral malaria in sub-Saharan Africa: A brief overview. *University of Toronto Medical Journal*, 96(3), 57-61.
53. Mergani, A., Khamis, A. H., Hashim, E. F., Gumma, M., Awadelseed, B., Elwali, N. E. M., & Haboor, A. B.

- (2015). Pattern and predictors of neurological morbidities among childhood cerebral malaria survivors in central Sudan. *Journal of vector borne diseases*, 52(3), 239.
54. Kariuki, S. M., Ikumi, M., Ojal, J., Sadarangani, M., Idro, R., Olotu, A., ... & Newton, C. R. (2011). Acute seizures attributable to falciparum malaria in an endemic area on the Kenyan coast. *Brain*, 134(5), 1519-1528.
55. Dalko, E., Das, B., Herbert, F., Fesel, C., Pathak, S., Tripathy, R., ... & Pied, S. (2015). Multifaceted role of heme during severe Plasmodium falciparum infections in India. *Infection and immunity*, 83(10), 3793-3799.
56. Idro, R., Kakooza-Mwesige, A., Asea, B., Ssebyala, K., Bangirana, P., Opoka, R. O., ... & Nalugya, J. (2016). Cerebral malaria is associated with long-term mental health disorders: a cross sectional survey of a long-term cohort. *Malaria journal*, 15(1), 184

57. Tamzali, Y., Demeret, S., Haddad, E., Guillot, H., Caumes, E., & Jauréguiberry, S. (2018). Post-malaria neurological syndrome: four cases, review of the literature and clarification of the nosological framework. *Malaria journal*, 17(1), 387.
58. Ghazanfari, N., Mueller, S. N., & Heath, W. R. (2018). Cerebral malaria in mouse and man. *Frontiers in immunology*, 9, 2016.
59. Paquet-Durand, F., Beck, S. C., Das, S., Huber, G., Chang, L., Schubert, T., ... & Hoffmann, W. (2019). A retinal model of cerebral malaria. *Scientific reports*, 9(1), 3470.
60. Lewallen, S., Taylor, T. E., Molyneux, M. E., Wills, B. A., & Courtright, P. (1993). Ocular fundus findings in Malawian children with cerebral malaria. *Ophthalmology*, 100(6), 857-861.
61. Beare, N. A., Glover, S. J., & Molyneux, M. (2009). Malarial retinopathy in cerebral malaria. *The American*

journal of tropical medicine and hygiene, 80(2), 171-171.

62. Lewallen, S., Bronzan, R. N., Beare, N. A., Harding, S. P., Molyneux, M. E., & Taylor, T. E. (2008). Using malarial retinopathy to improve the classification of children with cerebral malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(11), 1089-1094
63. Birbeck, G. L., Beare, N., Lewallen, S., Glover, S. J., Molyneux, M. E., Kaplan, P. W., & Taylor, T. E. (2010). Identification of malaria retinopathy improves the specificity of the clinical diagnosis of cerebral malaria: findings from a prospective cohort study. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82(2), 231-234.
64. Barrera, V., MacCormick, I. J. C., Czanner, G., Hiscott, P. S., White, V. A., Craig, A. G., ... & Milner, D. A. (2018). Neurovascular sequestration in paediatric P.

falciparum malaria is visible clinically in the retina. *Elife*, 7, e32208.

65. Kurup, A., Soliz, P., Nemeth, S., & Joshi, V. (2020, March). Automated Detection of Malarial Retinopathy Using Transfer Learning. In *2020 IEEE Southwest Symposium on Image Analysis and Interpretation (SSIAI)* (pp. 18-21). IEEE.
66. Lewallen, S., White, V. A., Whitten, R. O., Gardiner, J., Hoar, B., Lindley, J., ... & Mwenechanyana, J. (2000). Clinical-histopathological correlation of the abnormal retinal vessels in cerebral malaria. *Archives of Ophthalmology*, 118(7), 924-928.
67. White, V. A., Lewallen, S., Beare, N., Kayira, K., Carr, R. A., & Taylor, T. E. (2001). Correlation of retinal haemorrhages with brain haemorrhages in children dying of cerebral malaria in Malawi. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(6), 618-621

68. Beare, N. A., Southern, C., Chalira, C., Taylor, T. E., Molyneux, M. E., & Harding, S. P. (2004). Prognostic significance and course of retinopathy in children with severe malaria. *Archives of Ophthalmology*, 122(8), 1141-1147.
69. Haldar, K., & Mohandas, N. (2009). Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology*, 2009(1), 87-93.
70. Hawkes, M. T., Opoka, R. O., Conroy, A. L., Elphinstone, R. E., Hume, H. A., Namasopo, S., & Kain, K. C. (2020). Anemia and transfusion requirements among Ugandan children with severe malaria treated with intravenous artesunate. *Pediatric Hematology and Oncology*, 37(2), 140-152.
71. Perkins, D. J., Were, T., Davenport, G. C., Kempaiah, P., Hittner, J. B., & Ong'echa, J. M. (2011). Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *International journal of biological sciences*, 7(9), 1427.

72. Obonyo, C. O., Vulule, J., Akhwale, W. S., & Grobbee, D. E. (2007). In-hospital morbidity and mortality due to severe malarial anemia in western Kenya. In *Defining and Defeating the Intolerable Burden of Malaria III: Progress and Perspectives: Supplement to Volume 77 (6) of American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
73. Dormechele, W., Wak, G. P., & Zotor, F. B. (2020). Prevalence and trend of malaria with anaemia among under-five children in Jasikan District, Ghana. *BioRxiv*.
74. Ssemata, A. S., Opoka, R. O., Ssenkusu, J. M., Nakasujja, N., John, C. C., & Bangirana, P. (2020). Socio-emotional and adaptive behaviour after severe anaemia in pre-schoolers at Lira Regional Referral Hospital, Uganda: a cross sectional study.

75. Thuma, P. E., Van Dijk, J., Bucala, R., Debebe, Z., Nekhai, S., Kuddo, T., ... & Gordeuk, V. R. (2011). Distinct clinical and immunologic profiles in severe malarial anemia and cerebral malaria in Zambia. *Journal of Infectious Diseases*, 203(2), 211-219.
76. Papaioannou, I., Utzinger, J., & Vounatsou, P. (2019). Malaria-anemia comorbidity prevalence as a measure of malaria-related deaths in sub-Saharan Africa. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.
77. <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/who-severe-malaria-tmih-supplement-2014.p.11>.
78. World Health Organization. (2013). *Pocket book of hospital care for children: guidelines for the management of common childhood illnesses*. World Health Organization, p.201.

79. Davis, T. M. E., Looareesuwan, S., Pukrittayakamee, S., Levy, J. C., Nagachinta, B. N. J. W., & White, N. J. (1993). Glucose turnover in severe falciparum malaria. *Metabolism*, 42(3), 334-340.
80. Looareesuwan, S., White, N. J., Karbwang, J., Turner, R. C., Phillips, R. E., Kietinun, S., ... & Warrell, D. A. (1985). Quinine and severe falciparum malaria in late pregnancy. *The Lancet*, 326(8445), 4-8.
81. Taylor, T. E., Molyneux, M. E., Wirima, J. J., Fletcher, K. A., & Morris, K. (1988). Blood glucose levels in Malawian children before and during the administration of intravenous quinine for severe falciparum malaria. *New England journal of medicine*, 319(16), 1040-1047.
82. Wilairatana, P., Tangpukdee, N., & Krudsood, S. (2013). Definition of hyperparasitemia in severe falciparum malaria should be updated. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(7), 586.

83. Hanson, J., Lee, S. J., Hossain, M. A., Anstey, N. M., Charunwatthana, P., Maude, R. J., ... & Piera, K. (2015). Microvascular obstruction and endothelial activation are independently associated with the clinical manifestations of severe falciparum malaria in adults: an observational study. *BMC medicine*, 13(1), 122.
84. Patel, D. N., Pradeep, P., Surti, M. M., & Agarwal, S. B. (2003). Clinical manifestations of complicated malaria—an overview. *J Indian Acad Clin Med*, 4(4), 323-331.
85. Brown, D. D., Solomon, S., Lerner, D., & Del Rio, M. (2019). Malaria and acute kidney injury. *Pediatric Nephrology*, 1-6.
86. Tabibzadeh, N., Estournet, C., Placier, S., Perez, J., Bilbault, H., Girshovich, A., ... & Lionnet, F. (2017). Plasma heme-induced renal toxicity is related to a capillary rarefaction. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.

87. Ramos, S., Carlos, A. R., Sundaram, B., Jeney, V., Ribeiro, A., Gozzelino, R., ... & Ademolue, T. W. (2019). Renal control of disease tolerance to malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(12), 5681-5686.
88. Mölzer, C., Wallner, M., Kern, C., Tosevska, A., Zadnikar, R., Doberer, D., ... & Wagner, K. H. (2017). Characteristics of the heme catabolic pathway in mild unconjugated hyperbilirubinemia and their associations with inflammation and disease prevention. *Scientific reports*, 7(1), 1-15.
89. Sailo, L., Pradhan, D., Nongthombam, R., & Bhattacharyya, P. (2014). Disseminated intravascular coagulation in malaria: a case report. *Nigerian medical journal: journal of the Nigeria Medical Association*, 55(2), 171.
90. Gajra, A., Vajpayee, N., Singh, M., Coyle, T. E., & Wright, J. (2000). Hematin induced coagulopathy in

acute intermittent porphyria: A case report. *Blood*, 96(11 PART II), 82b.

91. Ball, E., & Gonçalves, C. P. (2010). Uncovering the role of IFNAR1 in experimental cerebral malaria. *Malaria journal*, 9(S2), P3.
92. López, C., Saravia, C., Gomez, A., Hoebeke, J., & Patarroyo, M. A. (2010). Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. *Gene*, 467(1-2), 1-12.
93. de Alva, M. D. R. T., & Sambo, S. B. SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA À MALÁRIA CEREBRAL EM CRIANÇAS ANGOLANAS.
94. Network, M. G. E. (2019). Insights into malaria susceptibility using genome-wide data on 17,000 individuals from Africa, Asia and Oceania. *Nature Communications*, 10.
95. Méndez, D., Hernáez, M. L., Kamali, A. N., Diez, A., Puyet, A., & Bautista, J. M. (2012). Differential

- carbonylation of cytoskeletal proteins in blood group O erythrocytes: potential role in protection against severe malaria. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1780-1787.
96. Langhi, D. M., & Orlando Bordin, J. (2006). Duffy blood group and malaria. *Hematology*, 11(5-6), 389-398.
97. Mendes, C., Dias, F., Figueiredo, J., Mora, V. G., Cano, J., de Sousa, B., ... & Arez, A. P. (2011). Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax*—molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS neglected tropical diseases*, 5(6), e1192.
98. Wintrobe, M. M. (1961). Clinical hematology, 5th edit. *Philadelphia: Lea & Febiger*.
99. Ahmed, M. H., Ghatge, M. S., & Safo, M. K. (2020). Hemoglobin: structure, function and allostery. *Sub-cellular biochemistry*, 94, 345.

100. Hsia, C. C. (2021). Respiratory Function of Hemoglobin: From Origin to Human Physiology and Pathophysiology. *Cardiopulmonary Monitoring*, 635-651.
101. Goheen, M. M., Campino, S., & Cerami, C. (2017). The role of the red blood cell in host defence against falciparum malaria: an expanding repertoire of evolutionary alterations. *British journal of haematology*, 179(4), 543-556.
102. Hsia, C. C. (2021). Respiratory Function of Hemoglobin: From Origin to Human Physiology and Pathophysiology. *Cardiopulmonary Monitoring*, 635-651.
103. Goheen, M. M., Campino, S., & Cerami, C. (2017). The role of the red blood cell in host defence against falciparum malaria: an expanding repertoire of

evolutionary alterations. *British journal of haematology*, 179(4), 543-556.

104. Gordeuk, V. R., Shah, B. N., Zhang, X., Thuma, P. E., Zulu, S., Moono, R., ... & Prchal, J. T. (2020). The CYB5R3 c. 350C> G and G6PD A alleles modify severity of anemia in malaria and sickle cell disease. *American journal of hematology*, 95(11), 1269-1279.
105. Allison, A. C. (2009). Genetic control of resistance to human malaria. *Current opinion in immunology*, 21(5), 499-505.
106. Mooney, J. P., Galloway, L. J., & Riley, E. M. (2019). Malaria, anemia, and invasive bacterial disease: A neutrophil problem?. *Journal of leukocyte biology*, 105(4), 645-655.

107. Chikezie, P. C. A study of erythro-cyte methaemoglobin concentration for diagnosis and monitoring of therapeutic events in malarial disease.
108. Iolascon, A., Bianchi, P., Andolfo, I., Russo, R., Barcellini, W., Fermo, E., ... & SWG of red cell and iron of EHA and EuroBloodNet. (2021). Recommendations for diagnosis and treatment of methemoglobinemia. *American Journal of Hematology*.
109. Plewes, K., Kingston, H. W., Ghose, A., Maude, R. J., Herdman, M. T., Leopold, S. J., ... & Dondorp, A. M. (2017). Cell-free hemoglobin mediated oxidative stress is associated with acute kidney injury and renal replacement therapy in severe falciparum malaria: an observational study. *BMC infectious diseases*, 17(1), 1-12.
110. Ebrahim, A., Gnanasekaran, N., & Genet, S. (2019). Oxidative stress and diminished total antioxidant capacity in malaria patients correspond to increased

parasitemia and severity of the disease. *ROS*, 8, 287e96.

111. DOTIWALA, Farokh, et al. Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nature medicine*, 2016, 22.2: 210.
112. Elphinstone, R. E., Riley, F., Lin, T., Higgins, S., Dhabangi, A., Musoke, C., ... & Kain, K. C. (2015). Dysregulation of the haem-haemopexin axis is associated with severe malaria in a case-control study of Ugandan children. *Malaria journal*, 14(1), 511.
113. Ajioka, R. S., Phillips, J. D., & Kushner, J. P. (2006). Biosynthesis of heme in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7), 723-736.
114. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2004). *Overhead Transparency Set for Lehninger Principles of Biochemistry 4th Ed.* WH Freeman.

115. Beri, R., & Chandra, R. (1993). Chemistry and Biology of Heme Effect of Metal Salts, Organometals, and Metalloporphyrins on Heme Synthesis and Catabolism, with Special Reference to Clinical Implications and Interactions with Cytochrome P-450. *Drug metabolism reviews*, 25(1-2), 49-152.
116. Petrillo, S., Chiabrando, D., Genova, T., Fiorito, V., Ingoglia, G., Vinchi, F., ... & Merlo, G. R. (2018). Heme accumulation in endothelial cells impairs angiogenesis by triggering paraptosis. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 573.
117. Liu, M., Dickinson-Copeland, C., Hassana, S., & Stiles, J. K. (2016). Plasmodium-infected erythrocytes (pRBC) induce endothelial cell apoptosis via a heme-mediated signaling pathway. *Drug design, development and therapy*, 10, 1009.

118. Hunt, N. H., & Stocker, R. (2007). Heme moves to center stage in cerebral malaria. *Nature medicine*, 13(6), 667.
119. Harbuzariu, A., Pitts, S., Cespedes, J. C., Harp, K. O., Nti, A., Shaw, A. P., ... & Stiles, J. K. (2019). Modelling heme-mediated brain injury associated with cerebral malaria in human brain cortical organoids. *Scientific reports*, 9(1), 1-14.
120. Taiaa, O., Amil, T., & Darbi, A. (2015). Hemiparesis post cerebral malaria. *Pan African Medical Journal*, 20(1).
121. Dalko, E., Das, B., Herbert, F., Fesel, C., Pathak, S., Tripathy, R., ... & Pied, S. (2015). Multifaceted role of heme during severe Plasmodium falciparum infections in India. *Infection and immunity*, 83(10), 3793-3799.
122. Delanghe, J. R., & Langlois, M. R. (2001). Hemopexin: a review of biological aspects and the role

- in laboratory medicine. *Clinica chimica acta*, 312(1-2), 13-23.
123. Tolosano, E., & Altruda, F. (2002). Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA and cell biology*, 21(4), 297-306.
124. Tolosano, E., Fagoonee, S., Morello, N., Vinchi, F., & Fiorito, V. (2010). Heme scavenging and the other facets of hemopexin. *Antioxidants & redox signaling*, 12(2), 305-320.
125. Sears, D. A. (1968). Plasma heme-binding in patients with hemolytic disorders. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 71(3), 484-494.
126. Elphinstone, R. E., Conroy, A. L., Hawkes, M., Hermann, L., Namasopo, S., Warren, H. S., ... & Kain, K. C. (2016). Alterations in systemic extracellular heme and hemopexin are associated with adverse clinical

outcomes in Ugandan children with severe malaria. *The Journal of infectious diseases*, 214(8), 1268-1275.

127. Smith, A., & McCulloh, R. J. (2015). Hemopexin and haptoglobin: allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders. *Frontiers in physiology*, 6, 187.
128. Lim, S. K., Ferraro, B., Moore, K., & Halliwell, B. (2001). Role of haptoglobin in free hemoglobin metabolism. *Redox Report*, 6(4), 219-227.
129. Quaye, I. K. (2008). Haptoglobin, inflammation and disease. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 102(8), 735-742.
130. Elagib, A. A., Kider, A. O., Åkerström, B., & Elbashir, M. I. (1998). Association of the haptoglobin phenotype (1—1) with falciparum malaria in Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(3), 309-311.

131. Quaye, I. K., Ekuban, F. A., Goka, B. Q., Adabayeri, V., Kurtzhals, J. A., Gyan, B., ... & Akanmori, B. D. (2000). Haptoglobin 1-1 is associated with susceptibility to severe Plasmodium falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(2), 216-219.
132. Minang, J. T., Gyan, B. A., Anchang, J. K., Troye-Blomberg, M., Perlmann, H., & Achidi, E. A. (2004). Haptoglobin phenotypes and malaria infection in pregnant women at delivery in western Cameroon. *Acta tropica*, 90(1), 107-114.
133. Aucan, C., Walley, A. J., Greenwood, B. M., & Hill, A. V. (2002). Haptoglobin genotypes are not associated with resistance to severe malaria in The Gambia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(3), 327-328.

134. Gozzelino, R., & Arosio, P. (2015). The importance of iron in pathophysiologic conditions. *Frontiers in pharmacology*, 6, 26.
135. CRICHTON, Robert R.; WARD, Roberta J.; HIDER, Robert C. The Efficacy of Iron Chelators for Removing Iron from Specific Brain Regions and the Pituitary—Ironing out the Brain. *Pharmaceuticals*, 2019, 12.3: 138.
136. Martins, A. C., Almeida, J. I., Lima, I. S., Kapitão, A. S., & Gozzelino, R. (2017). Iron metabolism and the inflammatory response. *IUBMB life*, 69(6), 442-450.
137. Prentice, A. M., Ghattas, H., Doherty, C., & Cox, S. E. (2007). Iron metabolism and malaria. *Food and nutrition bulletin*, 28(4_suppl4), S524-S539.
138. ATKINSON, Carter T., et al. Stage-specific ultrastructural effects of desferrioxamine on

Plasmodium falciparum in vitro. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 1991, 45.5: 593-601.

139. MURRAY, M. J., et al. Diet and cerebral malaria: the effect of famine and refeeding. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1978, 31.1: 57-61.
140. Oppenheimer, S., Gibson, F. D., Macfarlane, S., Moody, J., & Hendrickse, R. (1984). Iron supplementation and malaria. *The Lancet*, 323(8373), 389-390.
141. Richard, S. A., Zavaleta, N., Caulfield, L. E., Black, R. E., Witzig, R. S., & Shankar, A. H. (2006). Zinc and iron supplementation and malaria, diarrhea, and respiratory infections in children in the Peruvian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75(1), 126-132.
142. Koram, K. A., Owusu-Agyei, S., Utz, G., Binka, F. N., Baird, J. K., Hoffman, S. L., & Nkrumah, F. K.

- (2000). Severe anemia in young children after high and low malaria transmission seasons in the Kassena-Nankana district of northern Ghana. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 62(6), 670-674.
143. Murray, M. J., Murray, A. B., Murray, M. B., & Murray, C. J. (1978). The adverse effect of iron repletion on the course of certain infections. *Br Med J*, 2(6145), 1113-1115.
144. SMITH, A. W., et al. The effects on malaria of treatment of iron-deficiency anaemia with oral iron in Gambian children. *Annals of tropical paediatrics*, 1989, 9.1: 17-23.
145. Oppenheimer, S. J., Gibson, F. D., Macfarlane, S. B., Moody, J. B., Harrison, C., Spencer, A., & Bunari, O. (1986). Iron supplementation increases prevalence and effects of malaria: report on clinical studies in

Papua New Guinea. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(4), 603-612.

146. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2010, p. 35.
147. Arieu, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A. C., Khim, N., ... & Lim, P. (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 505(7481), 50-55.
148. Bwire, G. M., Ngasala, B., Mikomangwa, W. P., Kilonzi, M., & Kamuhabwa, A. A. (2020). Detection of mutations associated with artemisinin resistance at k13-propeller gene and a near complete return of chloroquine susceptible *falciparum* malaria in Southeast of Tanzania. *Scientific Reports*, 10(1), 1-7.

149. Hanboonkunupakarn, B., & White, N. J. (2016). The threat of artemisinin resistant malaria in Southeast Asia. *Travel medicine and infectious disease*, 14(6), 548.
150. Han, L., Hudgens, M. G., Emch, M. E., Juliano, J. J., Keeler, C., Martinson, F., ... & Hoffman, I. F. (2017). RTS, S/AS01 malaria vaccine efficacy is not modified by seasonal precipitation: results from a phase 3 randomized controlled trial in Malawi. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
151. Blank, A., Fürle, K., Jäschke, A., Mikus, G., Lehmann, M., Hüsing, J., ... & Lanzer, M. (2020). Immunization with full-length *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 is safe and elicits functional cytophilic antibodies in a randomized first-in-human trial. *npj Vaccines*, 5(1), 1-15.
152. Lechuga, G. C., Pereira, M. C., & Bourguignon, S. C. (2019). Heme metabolism as a therapeutic target

- against protozoan parasites. *Journal of drug targeting*, 27(7), 767-779.
153. Gozzelino, R., Andrade, B. B., Larsen, R., Luz, N. F., Vanoaica, L., Seixas, E., ... & Barral-Netto, M. (2012). Metabolic adaptation to tissue iron overload confers tolerance to malaria. *Cell host & microbe*, 12(5), 693-704.
154. Santos-Magalhães, N. S., & Mosqueira, V. C. F. (2010). Nanotechnology applied to the treatment of malaria. *Advanced drug delivery reviews*, 62(4-5), 560-575.
155. Panda, B. B., & Hazra, R. K. (2020). Nanotechnology and Its Role in Malaria Treatment. In *Green Nanoparticles* (pp. 347-358). Springer, Cham.
156. Memvanga, P. B., Coco, R., & Préat, V. (2013). An oral malaria therapy: Curcumin-loaded lipid-based drug delivery systems combined with β -

- arteether. *Journal of controlled release*, 172(3), 904-913.
157. http://mapnall.com/pt/Mapa-Benguela_1105360.html.
158. Rahman, K., Khan, S. U., Fahad, S., Chang, M. X., Abbas, A., Khan, W. U., ... & Khan, D. (2019). Nano-biotechnology: a new approach to treat and prevent malaria. *International journal of nanomedicine*, 14, 1401.
159. World Medical Association. (2000). Declaration of Helsinki, ethical principles for medical research involving human subjects. 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland.
160. World Health Organization. (2008). World malaria report 2008. Geneva: WHO; 2008. *the text*.
161. González-Scarano, F., & Martín-García, J. (2005). The neuropathogenesis of AIDS. *Nature reviews immunology*, 5(1), 69.

162. Gwer, S., Kazungu, M., Chengo, E., Ohuma, E. O., Idro, R., Birch, T., ... & Newton, C. R. (2015). Abnormal intra-aural pressure waves associated with death in African children with acute nontraumatic coma. *Pediatric research*, 78(1), 38.
163. Page, A. L., Boum II, Y., Kemigisha, E., Salez, N., Nanjebe, D., Langendorf, C., ... & Charrel, R. (2017). Aetiology and outcomes of suspected infections of the Central Nervous System in Children in Mbarara, Uganda. *Scientific reports*, 7(1), 2728.
164. Auer, R. N. (2018). Hypoglycemic brain damage. In *Acute Neuronal Injury* (pp. 175-188). Springer, Cham.
165. Aoki, M., Abe, T., Saitoh, D., & Oshima, K. (2019). Epidemiology, patterns of treatment, and mortality of pediatric trauma patients in japan. *Scientific reports*, 9(1), 917.

166. Jabs, D. A., Martin, B. K., Forman, M. S., Hubbard, L., Dunn, J. P., Kempen, J. H., ... & Viral Resistance Study Group. (2003). Cytomegalovirus resistance to ganciclovir and clinical outcomes of patients with cytomegalovirus retinitis. *American journal of ophthalmology*, 135(1), 26-34.
167. Miura, M., Makita, S., Yasuno, Y., Azuma, S., Mino, T., Yamaguchi, T., ... & Goto, H. (2020). Objective evaluation of retinal pigment epithelium change in retinal pigment epithelium detachment with multi-contrast OCT. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61(7), 5289-5289.
168. Luo, Y., Chen, K., Liu, L., Liu, J., Mao, J., Ke, G., & Sun, M. (2020). Dehaze of Cataractous Retinal Images using an Unpaired Generative Adversarial Network. *IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics*.
169. Yang, J. J., Li, J., Shen, R., Zeng, Y., He, J., Bi, J., ... & Wang, Q. (2016). Exploiting ensemble learning

for automatic cataract detection and grading. *Computer methods and programs in biomedicine*, 124, 45-57.

170. Price, R. N., Simpson, J. A., Nosten, F., Luxemburger, C., Hkirjaroen, L., ter Kuile, F. E. I. K. O., ... & White, N. J. (2001). Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 65(5), 614-622.
171. World Health Organization. (2000). Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster.
172. World Health Organization. (2008). Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster.
173. Lewallen, S., Taylor, T. E., Molyneux, M. E., Wills, B. A., & Courtright, P. (1993). Ocular fundus

- findings in Malawian children with cerebral malaria. *Ophthalmology*, 100(6), 857-861.
174. Beare, N. A., Taylor, T. E., Harding, S. P., Lewallen, S., & Molyneux, M. E. (2006). Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75(5), 790-797.
175. Organización Mundial de la Salud. Medios Auxiliares para el Diagnóstico de las Infecciones Palúdicas. 2da. Edición; 2000. Pág. 8.
176. Bases da Política Nacional de Tratamento da Malária em Angola (2005-2009), PNCM – Ministério da Saúde)
177. Normas de Tratamento da Malária em Angola(2017), (PNCM – Ministério da Saúde)
178. Chiabi, A., Obadeyi, B., Nguiefack, S., Zafack, J., Kouam, W., Tchokoteu, P. F., ... & Mbonda, E. (2011).

Seizures in Severe Malaria: Is there Direct Brain Involvement?. *The Open Area Studies Journal*, 4(1).

179. Mutombo, A. M., Mukuku, O., Tshibanda, K. N., Swana, E. K., Mukomena, E., Ngwej, D. T., ... & Lutumba, P. (2018). Severe malaria and death risk factors among children under 5 years at Jason Sendwe Hospital in Democratic Republic of Congo. *Pan African Medical Journal*, 29(1), 1-8.
180. Lyke, K. E., Dicko, A., Kone, A., Coulibaly, D., Guindo, A., Cissoko, Y., ... & Doumbo, O. K. (2004). Incidence of severe *Plasmodium falciparum* malaria as a primary endpoint for vaccine efficacy trials in Bandiagara, Mali. *Vaccine*, 22(23-24), 3169-3174.
181. Doolan, D. L., Dobano, C., & Baird, J. K. (2009). Acquired immunity to malaria. 455 *Clin Microbiol Rev* 22: 13-36. Table of Contents, 456.

182. Kariuki, S. M., Ikumi, M., Ojal, J., Sadarangani, M., Idro, R., Olotu, A., ... & Newton, C. R. (2011). Acute seizures attributable to falciparum malaria in an endemic area on the Kenyan coast. *Brain*, 134(5), 1519-1528.
183. Villaverde, C., Namazzi, R., Shabani, E., Opoka, R. O., & John, C. C. (2017). Clinical comparison of retinopathy-positive and retinopathy-negative cerebral malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 96(5), 1176-1184.
184. Ali, H., Ahsan, T., Mahmood, T., Bakht, S. F., Farooq, M. U., & Ahmed, N. (2008). Parasite density and the spectrum of clinical illness in falciparum malaria. *J Coll Physicians Surg Pak*, 18(6), 362-368.
185. Abdi, A. I., Kariuki, S. M., Muthui, M. K., Kivisi, C. A., Fegan, G., Gitau, E., ... & Bull, P. C. (2015). Differential Plasmodium falciparum surface antigen expression among children with Malarial Retinopathy. *Scientific reports*, 5, 18034.

186. Seydel, K. B., Fox, L. L., Glover, S. J., Reeves, M. J., Pensulo, P., Muiruri, A., ... & Taylor, T. E. (2012). Plasma concentrations of parasite histidine-rich protein 2 distinguish between retinopathy-positive and retinopathy-negative cerebral malaria in Malawian children. *The Journal of infectious diseases*, 206(3), 309-318.
187. Hossain, N., & Scott-Villiers, P. (Eds.). (2017). *Food Riots, Food Rights and the Politics of Provisions*. Routledge.
188. Hanisch, B. R., Bangirana, P., Opoka, R. O., Park, G. S., & John, C. C. (2015). Thrombocytopenia May Mediate Disease Severity in *Plasmodium Falciparum* Malaria Through Reduced Transforming Growth Factor Beta-1 Regulation of Pro-and Anti-Inflammatory Cytokines. *The Pediatric infectious disease journal*, 34(7), 783.

189. Abdalla SH, 1990. Hematopoiesis in human malaria infection. *Blood Cells* 16: 401–416.
190. Chimalizeni, Y., Kawaza, K., Taylor, T., & Molyneux, M. (2010). The platelet count in cerebral malaria, is it useful to the clinician?. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 83(1), 48-50.
191. Elphinstone, R. E., Riley, F., Lin, T., Higgins, S., Dhabangi, A., Musoke, C., ... & Kain, K. C. (2015). Dysregulation of the haem-haemopexin axis is associated with severe malaria in a case–control study of Ugandan children. *Malaria journal*, 14(1), 511.
192. Pamplona, A., Hanscheid, T., Epiphanio, S., Mota, M. M., & Vigário, A. M. (2009). Cerebral malaria and the hemolysis/methemoglobin/heme hypothesis: shedding new light on an old disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(4), 711-716.

193. Cunningham, A. J., Kendrick, S. F., Wamola, B., Lowe, B., & Newton, C. R. (2004). Carboxyhemoglobin levels in Kenyan children with *Plasmodium falciparum* malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 71(1), 43-47.
194. Ferreira, A., Balla, J., Jeney, V., Balla, G., & Soares, M. P. (2008). A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link?. *Journal of molecular medicine*, 86(10), 1097-1111.
195. Schaer, C. A., Deuel, J. W., Bittermann, A. G., Rubio, I. G., Schoedon, G., Spahn, D. R., ... & Schaer, D. J. (2013). Mechanisms of haptoglobin protection against hemoglobin peroxidation triggered endothelial damage. *Cell death and differentiation*, 20(11), 1569.
196. Villaverde, C., Namazzi, R., Shabani, E., Opoka, R. O., & John, C. C. (2017). Clinical comparison of retinopathy-positive and retinopathy-negative cerebral

- malaria. The American journal of tropical medicine and hygiene, 96(5), 1176-1184.
197. Lemoine, A., & Tounian, P. (2020). Childhood anemia and iron deficiency in sub-Saharan Africa—risk factors and prevention: A review. *Archives de Pédiatrie*.
198. Beare, N. A., Southern, C., Chalira, C., Taylor, T. E., Molyneux, M. E., & Harding, S. P. (2004). Prognostic significance and course of retinopathy in children with severe malaria. *Archives of Ophthalmology*, 122(8), 1141-1147.
199. MacCormick, I. J., Beare, N. A., Taylor, T. E., Barrera, V., White, V. A., Hiscott, P., ... & Harding, S. P. (2014). Cerebral malaria in children: using the retina to study the brain. *Brain*, 137(8), 2119-2142.
200. Singh, J., Verma, R., Tiwari, A., Mishra, D., & Singh, H. P. (2016). Retinopathy as a prognostic marker in cerebral malaria. *Indian pediatrics*, 53(4), 315-317.

201. Naryzny, S. N., & Legina, O. K. (2021). Haptoglobin as a Biomarker. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 15(3), 184-198.

CAPÍTULO 7:

ANEXOS E APÊNDICE

ANEXOS

PUBLICAÇÕES DO AUTOR:

- ❖ Martins, A. C., Almeida, J. I., Lima, I. S., Kapitaio, A. S., & Gozzelino, R. (2017). Iron metabolism and the inflammatory response. *IUBMB life*, 69(6), 442-450.

COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS EM CONGRESSOS DO AUTOR:

- ❖ II CEDOC PHD Students Retreat, Lousã, Portugal, 22 à 24 de Setembro de 2017. Apresentação de Poster; Kapitão A. S. B., Gozzelino R., Martins, A. C., Almeida, and J. I., Lima, - *The role of Haptoglobin and/or Hemopexin in preventing blood-driven neurological damage.*

- ❖ V Jornadas científicas do Centro Oftalmológico Internacional de Benguela, Angola, 15 de Agosto de 2018. Comunicação oral; Kapitão A. S. B., Gozzellino R., de Alva M., Gonçalves. C.P, Chiambe S.- *Caracterização clínica das lesões da retina em crianças com malária cerebral em Benguela de Janeiro à Agosto de 2018(dados preliminares)*

- ❖ II Meeting científico do Programa de Pós-Graduação Ciência para o Desenvolvimento, Lisboa, Portugal, 14 de Novembro de 2018. Comunicação **oral**; Kapitão A. S. B., Gozzellino R., de Alva M., Gonçalves. C.P.- *Characterization of neurological and/or retinal damage in children with cerebral malaria in Benguela-Angola January to Outuber of 2018.*

- ❖ I Congresso internacional de ciências médicas da Faculdade de Medicina, Benguela, Angola, 17 à 19 de Abril de 2019. Comunicação oral; Kapitão A. S. B., Gozzellino R., de Alva M. e Penha G. C.-

Caracterização clínica das lesões da retina em crianças com malária cerebral em Benguela de 2018 à 2019.



T.O. Antunes
- Ao D.P.C. para o
devido acompanhamento
CEDOC
 3.09.18
 CERCORIC NOVA
 DIAPYSES

Lisboa, 23 de fevereiro de 2018.

Exmo. Sr. Director Geral do Hospital Geral de Benguela
 Eduardo Kadisobus Djomaly

Assunto: Solicitação para a realização de estudo de investigação clínica

Eu Antonino Sambundo B. Kapitão, estudante de doutoramento do Centro de Controlo de Doenças Crónicas de Lisboa, no laboratório de Inflamação e Neurodegeneração, venho mui respeitosamente, requerer a direção do Hospital Geral de Benguela, que nos conceda a permissão para realização do estudo de investigação clínica intitulado "O papel do heme na fisiopatologia da lesão neurológica em crianças com doenças hemolíticas".

Prevenimos que o mesmo estudo, terá a duração de 12 meses e envolverá uma componente retrospectiva onde se fará a avaliação dos processos clínicos de pacientes com doenças hemolíticas, atendidas no período de 2017-2018 e prospectiva, onde se fará a avaliação neurológica e oftalmológica das crianças com doenças hemolíticas atendidas nos serviços de pediatria do Hospital Geral de Benguela.

Exmo. Sr. Director Eduardo Kadisobus Djomaly, conhecendo o plano de formação em curso no Hospital Geral de Benguela acreditamos que esse estudo será um excelente contributo para o pensamento conjunto acerca da investigação científica e busca de soluções que visam melhorar a qualidade de vida dos pacientes afectados por doenças hemolíticas.

Desde já grato, por toda a atenção dispensada e ansioso por uma resposta positiva, subscricvo-me com os melhores cumprimentos,

Antonino Sambundo B. Kapitão



Antunes
15-10-18
10/04/18

TC
- sem impedimento
- para o estudo
14/04/18



República de Angola
Governo Provincial de Benguela
Direcção Municipal de Saúde
Centro de Saúde da Graça

AO
CENTRO DE CONTROLO
DE DOENÇAS CRÓNICAS
DE LISBOA

BENGUELA

Nota Nº 77 CSG/DG/2018

,ASSUNTO: Resposta

Em resposta ao vosso ofício, datado aos 23/02/2018, temos a informar que teve o parecer favorável do Director do Centro de Saúde da Graça.

Sem mais outro assunto de momento, queiram aceitar as nossas saudações laborais.

Centro de Saúde da Graça, 05 de Abril de 2018.



APÊNDICE

Apêndice 1



HOSPITAL GERAL DE BENGUELA

CONSENTIMENTO ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO CLÍNICO

Serviço: Pediatria

**Título: O papel da haptoglobina e/ou hemopexina na
prevenção do dano neurológico causado por doenças
hemolíticas.**

Fundamento:

Muitas vezes são observadas alterações do sistema nervoso em crianças com malária ou com anemia. Mas não sabemos porque razão estas crianças são afectadas por estas alterações. Este estudo tem o objectivo de procurar causas de alterações do sistema nervoso nestas crianças.

Procedimentos principais:

As crianças seleccionadas, para participar no estudo, serão submetidas a avaliação neurológica e será colhida uma amostra de sangue.

Uma vez colhida a amostra de sangue, mediremos os níveis de diversos componentes do sangue e de componentes genéticos. Será garantida a confidencialidade e privacidade dos doentes no procedimento de análise de dados e na apresentação dos resultados do estudo.

Está prevista a divulgação dos resultados em eventos e publicações de carácter científico.

A criança ou o seu representante legal podem decidir não participar no estudo ou em qualquer momento abandonar o estudo e retirar a informação individual, sem qualquer penalização na continuidade do acesso aos cuidados de saúde a que tem direito ou na relação médico-doente.

Confirmo que expliquei ao participante, aos progenitores ou ao seu representante legal, de forma adequada e inteligível, os procedimentos, assim como os potenciais riscos e inconvenientes.

Assinatura do investigador:

Data: |_|_|_|.|_|_|_|.|_|_|_|_|_|

A assinar pelo representante legal do participante ou por médico/enfermeiro do Hospital Geral de Benguela.

Declaro que me foram explicados de forma adequada o objectivo e natureza da investigação e os procedimentos. Foram-me explicados potenciais riscos e inconvenientes dos procedimentos propostos, que foram compreendidos e aceites, concordando na participação no estudo.

Nome do
Participante:.....
.....

..... Qualidade:

Date: / /

Apêndice 2

CENTRO DE SAÚDE DA NOSSA Sra. DA GRAÇA

CONSENTIMENTO ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO CLÍNICO

Serviço: Pediatria-Programa Ampliado de Vacinação (PAV)

**Título: O papel da haptoglobina e/ou hemopexina na
prevenção do dano neurológico causado por doenças
hemolíticas.**

Fundamento:

Muitas vezes são observadas alterações do sistema nervoso em crianças com malária ou com anemia. Mas não sabemos porque razão estas crianças são afectadas por estas alterações. Este estudo tem o objectivo de procurar causas de alterações do sistema nervoso nestas crianças.

Procedimentos principais:

As crianças seleccionadas, para participar no estudo, serão submetidas a avaliação neurológica e será colhida uma amostra de sangue.

Uma vez colhida a amostra de sangue, mediremos os níveis de diversos componentes do sangue e de componentes genéticos. Será garantida a confidencialidade e privacidade dos doentes no procedimento de análise de dados e na apresentação dos resultados do estudo.

Está prevista a divulgação dos resultados em eventos e publicações de carácter científico.

A criança ou o seu representante legal podem decidir não participar no estudo ou em qualquer momento abandonar o estudo e retirar a informação individual, sem qualquer penalização na continuidade do acesso aos cuidados de saúde a que tem direito ou na relação médico-doente.

Confirmo que expliquei ao participante, aos progenitores ou ao seu representante legal, de forma adequada e inteligível, os procedimentos, assim como, os potenciais riscos e inconvenientes.

Assinatura do investigador:

Data: |_|_|_|_|.|_|_|_|_|.|_|_|_|_|_|

A assinar pelo representante legal do participante ou por médico/enfermeiro do Centro de Saúde da Nossa Sra. Da Graça.

Declaro que me foram explicados de forma adequada o objectivo e natureza da investigação e os procedimentos. Foram-me explicados potenciais riscos e inconvenientes dos procedimentos propostos, que foram compreendidos e aceites, concordando na participação no estudo.

Nome do
Participante:.....
.....

Representante Legal*:
..... Qualidade:
.....

Assinatura:
.....

Documento:

Data: |_|_|_|_|.|_|_|_|_|.|_|_|_|_|_| * O representante legal deverá fazer prova dos seus poderes para representar do participante

Apêndice 3

BLANTYRE COMA SCALE

The Blantyre coma scale is a modification of the Glasgow coma scale suitable to use in preverbal children. The scale uses motor and crying responses to pain and includes the ability to watch. It can be used to assess young children with cerebral malaria.

Response	Findings	Score
best motor response	localizes painful stimulus (pressure with blunt end of pencil on sternum or supraorbital ridge)	2
	withdraws limb from painful stimulus (pressure with horizontal pencil on nail bed of finger or toe)	1
	no response or inappropriate response	0
best verbal response	cries inappropriately with painful stimulus, or, if verbal, speaks	2
	moan or abnormal cry with painful stimulus	1
	no vocal response to painful stimulus	0
eye movement	watches or follows (e.g., mother's face)	1
	fails to watch or follow	0

Blantyre coma scale =

= (best motor response score) + (best verbal response score) + (eye movement score)

Interpretation:

- minimum score: 0 (poor)
- maximum score: 5 (good)
- abnormal: score ≤ 4

References:

Krishna WS, Crawley J, et al. Clinical features and outcome of severe malaria in Gambian children. Clin Infect Dis. 1995; 21: 577-587.

Apêndice 4

Category		Best Response
Eye opening		
Spontaneous		4
To speech		3
To pain		2
None		1
Verbal	(Modified for Infants)	
Oriented	Babbles	5
Confused	Irritable	4
Inappropriate words	Cries to pain	3
Moans	Moans	2
None	None	1
Motor		
Follows commands		6
Localizes to pain		5
Withdraws to pain		4
Abnormal flexion		3
Abnormal extension		2
None		1
Glasgow Coma Scale		
Best possible score		15
Worst possible score		3
If tracheally intubated then verbal designated with "T"		
Best possible score while intubated		10T
Worst possible score while intubated		2T

Apêndice 4: Escala de Glasgow, para avaliação do coma em maiores de 12 anos de idade. Atribui uma pontuação de 1 à 15, considerámos coma profundo uma pontuação igual ou menor que 8 pontos, coma moderado uma pontuação de 9 à 11 e coma superficial uma pontuação maior que 12 pontos.