



Universidade Nova de Lisboa

Mediadores pró-inflamatórios como factores preditivos de malária grave em crianças

Anaxore Inhelder Cardoso Casimiro

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE
TROPICAL**

(JULHO DE 2012)



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Mediadores pró-inflamatórios como factores preditivos de malária grave em crianças

Anaxore Inhelder Cardoso Casimiro

(Licenciado)

Orientador:

Doutor Marcelo Sousa Silva

Co-orientador:

Professor Doutor Luís Varandas

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde Tropical, realizada sob a orientação científica de Marcelo Sousa Silva e Luís Varandas.

Dedicatória

Aos meus pais, que cedo me fizeram acreditar que o estudo e o trabalho compensam e por me terem dado todas as condições para sonhar e ser feliz.

À Ana e ao Lucas por serem parte de mim.

À Yara por ser uma irmã fantástica e à Jéssica.

Aos meus avós que estiveram presentes em todas as etapas da minha vida e que foram, muitas vezes, verdadeiros pais.

À minha família alargada pelo suporte permanente e por me terem ensinado a pensar, a discutir e a questionar permanentemente. Com todos, aprendi o valor da ciência, da cultura e da política como meios para resolver o problema das Pessoas. Destaco os meus tios Bernardino Cardoso e Carlos Casimiro pela preocupação e apoio permanente.

Aos amigos de ontem, hoje e sempre.

À Guiné-Bissau, que merece melhor sorte.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Doutor Marcelo Silva e Prof. Doutor Luís Varandas pelo apoio incansável e estímulo permanente em todos os momentos da realização deste trabalho. Ao Doutor Marcelo pelo apoio laboratorial fundamental para este estudo, suprindo as minhas deficiências enquanto clínico neste ramo. Ficarei eternamente grato.

À Karina pelo apoio na visualização das lâminas dos pacientes e a toda a equipa do laboratório coordenado pelo Doutor Marcelo Silva.

Ao Prof. Doutor Jorge Atouguia e a todos os professores, por me terem conseguido entusiasmar nesta aprendizagem da Medicina Tropical e pela capacidade em manter-me acordado nas aulas, mesmo nas saídas de urgência.

À Doutora Fátima Nogueira da Unidade de Parasitologia do IHMT/UNL pela cedência dos extractos proteicos de *Plasmodium falciparum*.

Ao Hospital São José de Bor, representado pelo Dr. Augusto Bidonga, por terem aberto as suas portas para a realização deste trabalho e ao Conselho de Administração, médicos, enfermeiros e auxiliares por todo o empenho. Foram todos de uma disponibilidade extraordinária.

Ao Instituto Nacional de Saúde Pública da Guiné-Bissau, representado pela sua presidente, Doutora Amábélia Rodrigues, por todo o apoio prestado na realização do estudo na Guiné-Bissau, nomeadamente pela autorização dada ao Laboratório Nacional de Saúde Pública para realização de análises dos pacientes do estudo e ao Projecto de Saúde de Bandim pela conservação das amostras.

Aos colegas e amigos do Hospital de Dona Estefânia pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao meu Director Dr. Gonçalo Cordeiro Ferreira e ao Director do Internato Médico Dr. João Estrada por me terem dado a possibilidade de ir três meses para a Guiné-Bissau e à Dra. Lurdes Ventura, coordenadora da UCIP pelo acesso às amostras de controlo.

À minha orientadora de formação e amiga, Dra. Conceição Neves, pelo apoio permanente ao longo destes anos de internato.

Aos amigos da equipa C1 chefiado pela Dra. Manuela Veiga, por me terem ensinado a ser melhor médico ao longo destes anos, não perdendo a capacidade de nos divertir e rirmo-nos de nós próprios.

Aos “amiguinhos” Inês, Gustavo e Telma por estarem sempre presentes e por funcionarmos na mesma onda, tendo feito com que esta caminhada do internato fosse menos dolorosa.

À Paula, à Patrícia e a todos que participaram no envio de medicamentos durante a minha estadia na Guiné-Bissau e à Ritinha porque sim!

Às funcionárias da Biblioteca do Hospital de Dona Estefânia, por todo o apoio.

À Sandra Azevedo da Divisão académica pela paciência.

Aos colegas deste IIº mestrado por terem conseguido manter-me acordado nas aulas e por me terem permitido trocar ideias e conhecimento em diferentes áreas.

RESUMO

MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS COMO FACTORES PREDITIVOS DE MALÁRIA GRAVE EM CRIANÇAS

ANAXORE INHELDER CARDOSO CASIMIRO

A malária é uma doença potencialmente fatal, causada pelo parasita *Plasmodium* e transmitida ao ser humano pela picada do mosquito *Anopheles*, sendo endémica em 106 países, principalmente dos trópicos. É responsável por uma grande mortalidade e morbidade em termos globais, principalmente em crianças com menos de cinco anos, continuando por esclarecer muitos dos mecanismos que contribuem para o seu espectro de gravidade.

O presente trabalho teve como objectivo geral o estudo do perfil de mediadores pró-inflamatórios como possíveis factores predictivos de malária grave, definida pelos critérios da OMS, numa amostra de crianças da vila de Bor, na Guiné-Bissau. Procedeu-se à determinação dos níveis de anticorpos totais e IgG e IgM anti- *P. falciparum*, determinação dos níveis de óxido nítrico (NO) e estudo do processo de activação do sistema complemento pela determinação dos níveis de anafilatoxina C5a e proteína C reactiva (CRP).

Cumpriram os critérios iniciais de inclusão no estudo, treze crianças, tendo para a fase final do mesmo, sido considerados doze crianças, com uma mediana de idades de cinco anos, oriundos na sua maioria de famílias com baixo nível socioeconómico. As principais manifestações clínicas de malária grave foram a prostração, icterícia e a dispneia e todas as crianças foram tratadas com quinino endovenoso. Verificou-se um óbito. Nesta amostra de doentes, observou-se na maioria dos casos, um aumento dos mediadores inflamatórios doseados, nomeadamente as IgGs totais, IgG e IgM anti- *P. falciparum*, CRP, C5a e NO. Apesar do reduzido tamanho da amostra, pretendeu-se com este estudo contribuir para uma

melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e clínicos da malária grave em crianças de uma zona endémica como é a Guiné-Bissau.

Palavras-chave: *Plasmodium falciparum*, Malária grave, Citocinas, Sistema complemento, Proteína C reactiva (CRP), Óxido nítrico (NO).

ABSTRACT

PRO-INFLAMMATORY MEDIATORS AS POTENTIAL PREDICTORS OF SEVERE MALARIA IN CHILDREN

ANAXORE INHELDER CARDOSO CASIMIRO

Malaria is a potentially fatal disease caused by the *Plasmodium* parasite and it is transmitted to humans by the bite of the Anopheles mosquito and is endemic in 106 countries, mainly in the tropics. It is responsible for a large mortality and morbidity worldwide, especially in children under the age of five, but we still need to understand many of the mechanisms that contribute to its spectrum of severity.

The present work had as a general objective to evaluate the profile of pro-inflammatory mediators as potential predictors of severe malaria, defined by WHO criteria, in a sample of children from the village of Bor in Guinea-Bissau. We were able to determine the levels of total and IgG and IgM anti-*P. falciparum* antibodies and nitric oxide. To study the process how the complement system is activated, we measured the levels of C5a anaphylatoxin and C-reactive protein (CRP).

Thirteen children met the initial criteria for inclusion in the study, but for the final phase, only twelve were considered, with a median age of five years old, mostly from families of low socioeconomic status. The main clinical manifestations of severe malaria were prostration, jaundice and dyspnea and all children were treated with intravenous quinine. One patient died. In our sample, we observed an increased level of the measured pro-inflammatory mediators, such as total, IgG and IgM anti-*P. falciparum* antibodies, nitric oxide, C5a anaphylatoxin and C-reactive protein (CRP).

Despite the small sample size, the intention of this study was to contribute to a better understanding of pathophysiological and clinical mechanisms of severe malaria in children from an endemic area such as Guinea-Bissau.

Key-words: *Plasmodium falciparum*, Severe malaria, Cytokines, Complement system, C-reactive protein (CRP), nitric oxide (NO)

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	2
1.1. Malária – introdução, aspectos históricos e epidemiologia	2
1.2. Ciclo de vida e biologia parasitária do <i>Plasmodium</i> spp.	5
1.3. Aspectos clínicos e imunopatológicos da malária.....	9
1.3.1 O papel da imunidade na fisiopatologia da malária.....	11
1.3.2 Aspectos clínicos da malária	14
1.4. Fisiopatologia e clínica da malária grave	16
1.5. Imunologia da malária grave.....	23
1.6. Medidas de controlo da malária	25
1.7. Diagnóstico laboratorial da malária – limitações e abordagens	27
1.8. Terapêutica da malária.....	30
1.9. Resistência aos antimaláricos.....	34
II. JUSTIFICAÇÃO E OBJECTIVOS	36
2.1 Local do estudo	36
2.2 OBJECTIVOS.....	39
III. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. População a estudar	41
3.2. Caracterização do processo de amostragem.....	41
3.3. Obtenção dos dados clínicos	43
3.3.1 Definição das variáveis	43
3.3.2 Formulário de recolha de dados	44
3.4. Obtenção dos dados laboratoriais.....	44
3.5. Tratamento, monitorização e critérios de alta	45
3.6. Tratamento e conservação das amostras	46
3.7. Microscopia óptica para a confirmação de malária	46
3.8. Teste rápido para o diagnóstico da malária.....	46
3.9. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	47
3.10. Tratamento das amostras de sangue para os ensaios imunoenzimáticos	47

3.11. Determinação de anticorpos totais anti- <i>Plasmodium</i> spp	49
3.12. Determinação de subclasses e subtipos de anticorpos anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	50
3.13. Determinação das proteínas solúveis C5a e CRP nas amostras de sangue	51
3.14. Determinação de óxido nítrico	52
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1. Características sociodemográficas	53
4.2 Caracterização clínica da população estudada	56
4.3. Caracterização laboratorial da população estudada.....	60
4.4. Malária grave	62
4.5. Microscopia óptica para o diagnóstico da malária	63
4.6. Teste rápido para o diagnóstico laboratorial da malária	64
4.7. PCR no diagnóstico da malária	67
4.8. Determinação de anticorpos totais anti- <i>Plasmodium</i> spp	69
4.9. Determinação de anticorpos anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	71
4.10. Determinação do componente C5a do sistema complemento nas amostras de sangue dos pacientes infectados com <i>Plasmodium falciparum</i>	74
4.11. Determinação do componente CRP nas amostras de sangue dos pacientes infectados com <i>Plasmodium falciparum</i>	75
4.12. Determinação do óxido nítrico (NO) nas amostras de sangue dos pacientes infectados com <i>Plasmodium falciparum</i>	77
V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	79
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT	Derivados de artemisinina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
IFN	Interferão
IFA	Immunofluorescence assay
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ILAP 2	Inquérito Ligeiro para a Avaliação da Pobreza
NO	Óxido nítrico
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
SIDA	Síndrome de imunodeficiência humana adquirida
TGF	Fator transformador de crescimento
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
VIH	Vírus de imunodeficiência humana

I. INTRODUÇÃO

1.1. Malária – introdução, aspectos históricos e epidemiologia

A malária é uma doença potencialmente fatal, causada pelo parasita protozoário *Plasmodium* spp. e transmitida ao ser humano pela picada de algumas espécies de mosquitos do género *Anopheles*. Trata-se de uma doença parasitária de grande importância em saúde humana, sendo responsável por uma grande mortalidade, morbidade e perdas importantes do ponto de vista económico e social, contribuindo para a manutenção do ciclo de pobreza e do subdesenvolvimento (OMS, 2011; Butler *et al.*, 2010).

A palavra “malária” deriva do italiano e significa “mau ar”. Este facto resulta do reconhecimento feito pelos romanos da relação entre a água estagnada nos pântanos ao redor de Roma e a presença de febre durante os meses de verão (Cunha *et al.*, 2008). Parece tratar-se de uma doença antiga, havendo referências do que seriam, aparentemente, descrições de malária em documentos chineses desde 2700 AC, tábuas de argila da Mesopotâmia desde 2000 AC, papiros egípcios desde 1570 AC e em textos Hindus desde o século VI AC (Cox, 2010). No entanto, as primeiras descrições da doença são atribuídas a Hipócrates, que fez a distinção dos vários padrões de febre na malária e que nos seus aforismos descreveu os paroxismos regulares e a periodicidade da doença (Cunha *et al.*, 2008). Os estudos científicos sobre a malária só se tornaram possíveis após a descoberta do parasita por Laveran em 1880, a que deu o nome de *Oscillaria malariae* (Capanna, 2006). Ross provou a existência de um ciclo de vida completo do parasita *Plasmodium* spp. no mosquito e identificou o mosquito *Anopheles* como vector da malária humana. A demonstração de esporogónias de *P. falciparum* no mosquito *Anopheles* foi feita por Bignami e Grassi (Capanna, 2006). Também foram os investigadores italianos a provar que apenas a fêmea do mosquito *Anopheles* era capaz de transmitir malária (Cox, 2010). A fase pré-eritrocitária da infecção só foi demonstrada experimentalmente em 1947 por Shortt e Garnham (Shortt e Garnham, 1948). Uma outra contribuição para o estudo da malária foi dada por Jauregg em 1922, que deu início à malarioterapia da sífilis, prática corrente da

época, até à invenção da penicilina e que permitiu compreender a forma como os humanos respondiam à doença (Langhorne *et al.*, 2008). Em 1820, Pelletier e Caventou anunciaram o isolamento de um alcalóide de estrutura complexa, a que denominaram quinino. Previamente utilizado no tratamento da malária pelos índios Peruvian, através de infusões de pó de cascas de cinchona, a sua descoberta foi disseminada pelos Jesuítas (Butler *et al.*, 2010) e, ao longo dos séculos, constituiu a base do tratamento da malária. Recentemente começaram a usar-se, no Ocidente, derivados de artemisinina, conhecidos na China há mais de 2000 anos (Butler *et al.*, 2010). Até ao século XIX, havia malária no Norte da Europa, América do Norte e Rússia e a transmissão em algumas zonas do Sul da Europa era intensa. Desde lá, assistiu-se à progressiva eliminação da doença nestas áreas (Najera, 1989). Existem cinco espécies de *Plasmodium* que infectam o ser humano, sendo eles *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. Knowlesi*. *P. knowlesi*, causador de malária em macacos, foi descrito como sendo causa de doença em humanos no Sudeste Asiático (Singh *et al.*, 2004; Van den Eede *et al.*, 2009).

A malária é endémica em 106 países (Figura 1), estimando-se em 3,3 mil milhões o número de pessoas em risco de contrair a doença (OMS, 2011). Em África, há um predomínio de *P. falciparum*, que é responsável pela maior parte das mortes por malária em termos globais, enquanto *P. vivax* é mais comum na América Central e em partes da América do Sul, Norte de África, Médio Oriente e subcontinente indiano, sendo a espécie mais prevalente fora de África (OMS, 2011). *P. ovale* é comum apenas na África Ocidental e *P. malariae* encontra-se em todas as áreas, mas é relativamente incomum fora de África (Cook e Zumla, 2009). Os casos de infecção por *P. knowlesi* têm sido descritos no Sudeste asiático (Singh *et al.*, 2004; Van den Eede *et al.*, 2009). As infecções mistas causadas por mais de uma espécie de *Plasmodium* são frequentes, mas são muitas vezes sub-diagnosticadas (Crawley *et al.*, 2010). Em 2010, estimava-se em 216 milhões o número de casos de malária no mundo, dos quais 91% por *P. falciparum* (OMS, 2011). A grande maioria dos casos (81%) ocorreu em África, seguida do Sudeste Asiático (13%) e região mediterrânica oriental (5%) (OMS, 2011). O número de mortes estimado por malária para 2010 foi de 655.000, dos quais 91% em África, seguido do Sudeste Asiático (6%) e região mediterrânica oriental (3%). Seis

países (Nigéria, República Democrática do Congo, Burkina Faso, Moçambique, Costa do Marfim e Mali) contribuíram com 60% das mortes por malária (390.000 casos).

Cerca de 86% das mortes em termos globais, ocorreram em crianças com menos de cinco anos de idade (OMS, 2011). No entanto, verificou um decréscimo de 25% nas taxas de morte por malária desde 2000, 33% dos quais na região africana da OMS (OMS, 2011).

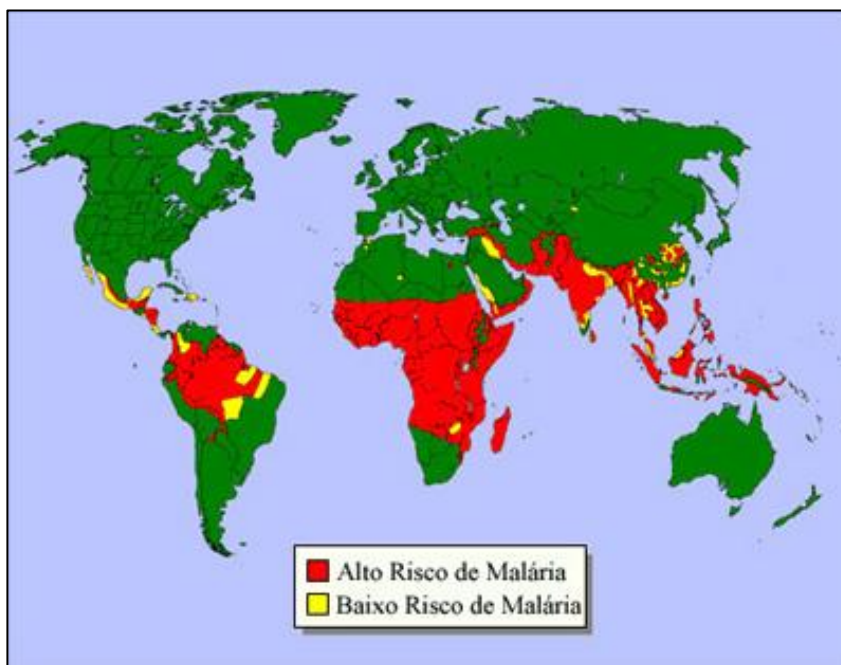


Figura 1: Distribuição mundial dos casos de malária. Adaptada de Topics in International Health – Malaria (Wellcome Trust – UK).

A malária é causa comum de infecções nos turistas e imigrantes, sendo estes, um grupo de risco para a aquisição de doença grave, podendo ocorrer casos potencialmente fatais (Leder *et al.*, 2004). Estima-se que 25 a 30 milhões de viajantes de áreas não tropicais visitem países em que a malária é endémica, reportando-se 10.000 casos de malária por ano em países industrializados não endémicos em malária (Loutan, 2003). Entre 65% a 95% dos viajantes não-imunes desenvolvem os sintomas de malária por *P. falciparum* um mês após o regresso da área endémica (OMS, 2000). No entanto, alguns poderão desenvolver a

doença até um ano depois do regresso, o que aumenta a dificuldade no rápido diagnóstico da doença, já que os sintomas iniciais de malária são inespecíficos.

1.2. Ciclo de vida e biologia parasitária do *Plasmodium* spp.

O *Plasmodium* spp. é um parasita esporozoário dos eritrócitos, transmitido ao homem pela picada de algumas espécies de mosquitos *Anopheles*. Também estão descritos casos de malária congénitos, casos transmitidos através de transfusões sanguíneas, transplante e através da partilha de agulhas em toxicod dependentes (Mali *et al.*, 2011; Falade *et al.*, 2007, Kitchen *et al.*, 2006).

Como todos os parasitas do Filo Apicomplexa, a que pertence, *Plasmodium* spp. é parasita intracelular obrigatório, contendo três elementos genéticos: o núcleo, o genoma mitocondrial e o ADN extra-cromossómico circular. O genoma de *P. falciparum* é constituído por cerca de 5300 genes em 14 cromossomas, desconhecendo-se a função de cerca de 60% das proteínas codificadas (Gardner *et al.*, 2002).

A intensidade da transmissão da doença depende de factores relacionados com o parasita, com o vector, com o hospedeiro humano e com o ambiente.

Existem cerca de 70 espécies de mosquitos *Anopheles* que são potenciais causadores de malária, mas apenas cerca de 20 são vectores importantes e eficientes (Cunha e Cunha, 2008.). No caso de *P. Knowlesi*, a transmissão está restringida ao vector do grupo *Anopheles leucosphyrus* (Cox-Singh *et al.*, 2008). A transmissão da infecção é mais intensa em locais em que a semi-vida do mosquito é mais longa e com comportamento antropofílico (OMS, 2011). A transmissão da malária também depende das condições climáticas, não ocorrendo com temperaturas inferiores a 16°C e em altitudes superiores a 2000 m. Assim, as condições óptimas para a transmissão da doença são a humidade elevada e uma temperatura entre os 20°C e os 30°C (Cook e Zumla, 2009).

A infecção pela malária humana tem início com a inoculação na pele de centenas de esporozoítos do *Plasmodium* pela fêmea infectada do mosquito *Anopheles* na altura da sua alimentação. Após a inoculação, os esporozoítos entram na circulação através de movimentos de deslizamento “*gliding*” (Lindner *et al.*, 2012), atingindo rapidamente as

células parenquimatosas hepáticas, enquanto alguns se mantêm na pele ou migram até aos gânglios linfáticos regionais ou o baço (Schwenk e Richie, 2011).

Ao chegar ao fígado, os esporozoítos atravessam o endotélio e, em alguns casos, passam através das células de Kupffer (Schwenk e Richie, 2011), estabelecem-se nos hepatócitos após passagem prévia por vários hepatócitos (Mota *et al.*, 2001) e iniciam a fase de reprodução assexuada (esquizogonia exoeritrocitária). Reportou-se que os esporozoítos que atravessam as células são mais infecciosos do que os que não o fazem, provavelmente devido à indução da exocitose dos organelos apicais dos esporozoítos necessários para a invasão (Mota *et al.*, 2002). A invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos é mediada pelos co-receptores dos domínios de trombospondina no circunsporozoíto e pelas proteínas de adesão relacionados com trombospondina (TRAP), que se ligam ao sulfato de heparina proteoglicano dos hepatócitos (Lindner *et al.*, 2012). Dentro dos hepatócitos, cada esporozoíto desenvolve-se em milhares de merozoítos. Esta fase dura entre 5,5 (*P. falciparum*) e os 15 dias (*P. malariae*) antes da rotura dos esquizontes hepáticos e a libertação dos merozoítos na circulação sanguínea. A fase pré-eritrocitária costuma ser assintomática (Lindner *et al.*, 2012). Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* uma parte dos parasitas hepáticos têm a capacidade de se manterem inertes, como hipnozoítos, podendo “acordar” semanas ou meses mais tarde e causar recaídas, que caracterizam as infeções por estas duas espécies (Greenwood *et al.*, 2008). *P. malariae* não forma hipnozoítos, mas pode persistir durante décadas como formas sanguíneas infecciosas assintomáticas (Greenwood *et al.*, 2008). Os merozoítos libertados para a circulação sanguínea invadem rapidamente os eritrócitos, dando início à esquizogonia eritrocitária. O processo de invasão é caracterizado pela ligação à superfície dos eritrócitos, orientação para que o complexo apical se encoste aos eritrócitos e, finalmente, a interiorização acontece por um movimento de perfuração dentro do vacúolo composto por membranas eritrocitárias invaginadas (Miller *et al.*, 2002). Existem três organelos na porção terminal do parasita (róprias, micronemas e grânulos densos) que definem o filo apicomplexa (Morrissette e Sibley, 2002.). A junção do merozoíto aos eritrócitos é mediada pela união de uma ou mais proteínas de ligação aos eritrócitos, localizadas nos micronemas do complexo apical dos merozoítos a um receptor eritrocitário específico. Em *P. vivax*, esta está relacionada com o antigénio do grupo

sanguíneo Duffy (Srinivasan *et al.*, 2011). A ausência deste fenótipo em populações da África Ocidental ou com origem nestas regiões, explica a sua resistência à infecção por *P. vivax* (Miller *et al.*, 1976), onde é responsável por menos de 1% dos casos de malária (Mendis *et al.*, 2001). Para *P. falciparum* as proteínas EBA-175 (Sim *et al.*, 1994) e BAEBL (Mayer *et al.*, 2001) são claramente importantes. A ligação está associada à activação do motor actina do parasita que fornece a energia mecânica necessária para o processo (Miller *et al.*, 2002). Os receptores de superfície dos eritrócitos para *P. malariae* e *P. ovale* são desconhecidos. O crescimento dos parasitas nos eritrócitos leva ao consumo do conteúdo eritrocitário, fundamentalmente a hemoglobina.

P. falciparum começa a exibir após algumas horas nos eritrócitos, a proteína *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1)*, no exterior da superfície dos eritrócitos infectados, que medeia a ligação dos eritrócitos ao endotélio vascular e que está associado às formas mais graves da malária (Normark *et al.*, 2007; Pasternak e Dzikowski, 2009). Aproximadamente 36 horas após invasão pelos merozoítos, acontecem múltiplas divisões nucleares, levando à formação do esquizonte. Após isto, há a rotura dos eritrócitos, com saída de seis a 36 merozoítos, e subsequente destruição dos eritrócitos restantes. Os merozoítos libertados, reinvadem rapidamente outros eritrócitos e começam um novo ciclo assexuado. No entanto, apenas uma subpopulação de eritrócitos pode ser invadido. O ciclo assexuado é de aproximadamente 24h para *P. knowlesi*, 48h para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e 72 h para *P. malariae*, causando um aumento rápido do número de parasitas até 10^{13} por hospedeiro (Greenwood *et al.*, 2008).

Após uma série de ciclos assexuados em *P. falciparum*, uma subpopulação de parasitas desenvolve formas sexuadas (gametócitos) que são móveis. O processo de gametogonia leva entre sete a 10 dias em *P. falciparum*. É necessário um gâmeta masculino (contendo oito micro gâmetas) e um feminino (macro gâmeta) para que a infecção ocorra (Baker, 2010). Após a ingestão do sangue pela fêmea do mosquito *Anopheles*, os gametócitos masculinos e femininos ficam activos no intestino do mosquito (Aly *et al.*, 2009). Existe a fusão e a meiose, levando à formação do zigoto. Dentro de 24h, o zigoto adquire mobilidade (oocineto) e penetra a parede do estômago do mosquito, onde enquistado (ooquisto). O ooquisto rompe-se finalmente, libertando uma miríade de esporozoítos na

cavidade celômica do mosquito. Os esporozoítos migram para as glândulas salivares, esperando a inoculação na próxima alimentação pelo mosquito (Aly *et al.*, 2009; Cox, 2010) (Figura 2). O mosquito torna-se infeccioso para o seu próximo hospedeiro duas semanas após a ingestão dos gametócitos, período de tempo que é influenciado pela temperatura externa (Greenwood *et al.*, 2008). O desenvolvimento de *P. vivax* dentro do mosquito, pode ocorrer a temperaturas mais baixas do que as requeridas para o desenvolvimento de *P. falciparum*, o que explica a preponderância das infecções por *P. vivax* fora das regiões tropicais e subtropicais (Greenwood *et al.*, 2008).

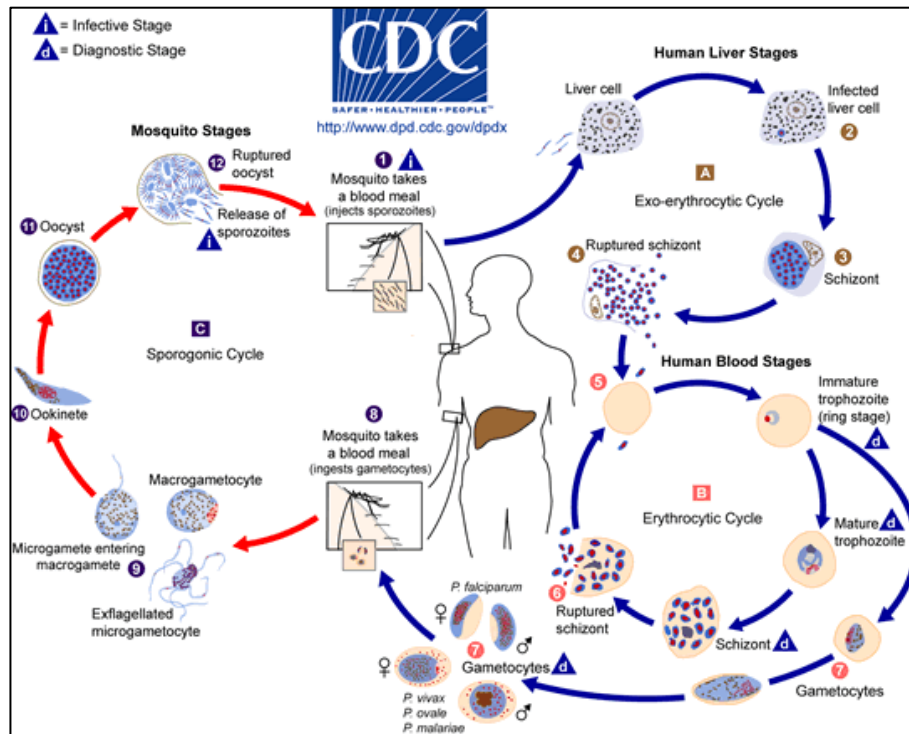


Figura 2: Ciclo de vida do parasita da malária. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>

1.3. Aspectos clínicos e imunopatológicos da malária

A malária é responsável por uma enorme mortalidade, principalmente em crianças com menos de cinco anos de idade que vivem, predominantemente, na África Subsaariana (OMS, 2011). No entanto, a grande maioria das infecções ou são assintomáticas, devido à aquisição de imunidade clínica após exposições múltiplas, ou dão origem à doença sem complicações letais (Penman e Gupta, 2008; Langhorne *et al.*, 2008). O conhecimento existente em relação aos mecanismos patológicos que estão na base das formas não complicadas e complicadas da malária são limitados, principalmente na criança, tendo em conta que a maior parte dos estudos disponíveis são de adultos (Crawley *et al.*, 2010).

No que diz respeito a *P. falciparum*, a principal característica da sua biologia, parece ser a sua capacidade em promover a adesão de eritrócitos infectados ao endotélio vascular (Miller *et al.*, 2002). Os eritrócitos contendo formas maduras de *P. falciparum* aderem ao endotélio microvascular, processo também chamado de citoaderência, e desaparecem da circulação, causando obstrução à perfusão dos tecidos (Ho e White, 1999). Este processo é conhecido como sequestração (Sherman *et al.*, 1992).

A citoaderência é mediada pela proteína PfEMP1, codificada pela família do gene *var* (Penman e Gupta, 2008) que se liga a receptores expressos na superfície do endotélio vascular, entre os quais o ICAM1, moléculas de adesão celular vascular (CAM), CD36, trombospondina, E-selectina, condroitina sulfato A, ácido hialurónico e CD31 (Schofield, 2007). Existe evidência que sugere que a expressão de subgrupos particulares de genes *var* poderá estar associada a diferentes resultados da doença (Normark *et al.*, 2007). A proteína PfEMP1 está envolvida na evasão imune, pela variação antigénica clonal que poderá levar à infecção crónica (Hughes *et al.*, 2010).

O sequestro ocorre principalmente em vénulas de órgãos vitais, sendo maior no cérebro, particularmente na substância branca, no coração, olhos, fígado, rins, intestinos, adipócitos, pele e placenta (Sherman *et al.*, 1992; Turner *et al.*, 1994). Outro fenómeno que caracteriza a fisiopatologia da malária é a formação de rosetas, que resulta da ligação de eritrócitos não infectados a eritrócitos infectados pelo parasita da malária. Até à data, foram identificados

cinco receptores da formação de rosetas nos eritrócitos: os antigénios do grupo sanguíneo A e B, CD36, o receptor do complemento 1 (CR1) e *HS-like GAGs* (Chen *et al.*, 2000).

A citoaderência, a formação de rosetas, a agregação plaquetária e a aglutinação levam à obstrução da microcirculação na malária por *P. falciparum*. A citoaderência tem como consequência a activação do endotélio vascular, a disfunção endotelial, que em conjunto com a redução do substrato em oxigénio, levam a glicólise anaeróbica, acidose láctica e disfunção celular (Dondorp *et al.*, 2004). Por exemplo, o sequestro de eritrócitos infectados na placenta, mediado principalmente pelo receptor sulfato de condroitina A (CSA), é responsável por partos prematuros, baixo peso à nascença, aumento da mortalidade do recém-nascido, assim como anemia na mãe (Andrews e Lanzer, 2002).

Outro factor a ter em conta na fisiopatologia da malária é a destruição eritrocitária que é também parte fulcral na doença, sendo que, a anemia compromete, ainda mais, o fornecimento de oxigénio e consequentemente as funções celulares (Perkins *et al.*, 2011). A flexibilidade dos eritrócitos não infectados está extremamente reduzida na malária, e foi proposto como um dos parâmetros importantes que predizem a gravidade da doença (Dondorp *et al.*, 1997). A redução da deformabilidade dos eritrócitos parece ser explicada pela acidose devido à glicólise anaeróbica e à adsorção de antigénios derivados do parasita na membrana dos eritrócitos não infectados (Chen *et al.*, 2000).

Uma das principais características do hospedeiro, que afecta a gravidade da doença, é a presença de distúrbios genéticos dos eritrócitos, nomeadamente anemia de células falciformes, talassémia e défice de glicose-6-fosfato desidrogenase, que conferem protecção contra a malária grave (Fortin *et al.*, 2002). A alta frequência destas hemoglobinopatias encontrada em áreas endémicas de malária, comprovam a sua importância na modulação do desfecho da infecção e a vantagem que transmite aos hospedeiros (Weatherall, 2008). Outro factor protector contra a malária parece estar associado ao grupo sanguíneo 0, pela sua menor capacidade em formar rosetas (Weatherall, 2008).

1.3.1 O papel da imunidade na fisiopatologia da malária

Os mecanismos imunes na malária continuam em estudo e a sua natureza é complexa. A imunidade inata, a celular e a humoral, parecem ter um papel importante na patogénese e controlo da doença.

A imunidade inata contribui para a destruição dos parasitas, através do baço, dos macrófagos e monócitos, principalmente os macrófagos da zona marginal do baço, através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os Toll-like receptors (TLRs) e NOD-like receptors (NLRs), que reconhecem padrões moleculares associados ao patogénio altamente conservados e ainda pelo papel activo do sistema complemento (Angulo e Fresno, 2011; Silver *et al.*, 2010; Takeuchi, 2010).

Tanto a resposta celular como humoral da imunidade adaptativa são elementos primordiais na erradicação do *Plasmodium spp.* do organismo e os dois dependem dos linfócitos CD4⁺ α/β (Angulo e Fresno, 2011).

Existe uma aquisição rápida da imunidade aos parasitas homólogos, demonstrado pelo mais rápido controlo das infecções sucessivas para parasitemias baixas e doença clínica menos severa ou mesmo ausência de doença (Langhorne *et al.*, 2008).

Do ponto de vista teórico, a resposta imune pode ser direccionada para qualquer ponto do ciclo de vida do parasita, desde a altura da entrada dos esporozoítos (Langhorne *et al.*, 2008). No entanto, estudos longitudinais sugerem que a resposta imune à fase pré-eritrocitária tem, provavelmente, um envolvimento limitado (Owusu-Agyei *et al.*, 2001).

Dado o facto das moléculas HLA classe I ou II estarem ausentes da superfície do parasita ou dos eritrócitos infectados, assume-se que as respostas humorais são a chave da imunidade na fase sanguínea (Langhorne *et al.*, 2008). Após uma infecção natural, há uma resposta humoral transitória aos antigénios dos esporozoítos. A aquisição de imunidade natural à malária é lenta e requer exposição repetida para a sua manutenção (Leoratti *et al.*, 2008). Esta imunidade reduz o risco tanto de malária grave como da não grave, mas não elimina a parasitemia (Leoratti *et al.*, 2008). Os anticorpos anti-esporozoítos têm uma semi-vida de três a quatro semanas. Existe evidência que mecanismos dependentes de anticorpos têm um papel importante na redução da parasitemia e podem diminuir os

sintomas clínicos em humanos (Plebanski *et al.*, 2000). Os mecanismos através do qual os anticorpos são efectivos incluem o bloqueio da invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, a morte celular dependente de anticorpos mediado pelos anticorpos citofílicos e pela ligação do anticorpo às moléculas induzidas pelo parasita na superfície dos eritrócitos, levando a um maior grau de eliminação dos eritrócitos infectados (Langhorne *et al.*, 2008). Os anticorpos produzidos em resposta à infecção têm particular importância, já que os isotipos, conhecidos como anticorpos citofílicos, podem cooperar com os monócitos via receptores Fc γ RI e Fc γ RII na opsonização e fagocitose ou participam tanto na inibição celular dependente de anticorpos como na citotoxicidade celular dependente dos anticorpos (Bouharoun-Tayoun e Druilhe, 1992; Garraud *et al.*, 2003). A protecção contra estádios sanguíneos da infecção por *P. falciparum* parece estar dependente da proporção entre anticorpos citofílicos e não citofílicos (Aribot *et al.*, 1996). O predomínio dos anticorpos citofílicos de IgG1 e IgG3 em áreas endémicas foi associado à parasitemia baixa (Shi *et al.*, 1996) ou a um baixo risco de adquirir malária (Tangteerawatana *et al.*, 2001). Por outro lado, anticorpos não citofílicos como IgG4, poderá inibir os mecanismos efectores, competindo com anticorpos citofílicos e é considerada não protectora (Garraud *et al.*, 2003).

Os níveis de IgE e anticorpos IgE anti-*Plasmodium* estão aumentados na malária, mas o seu papel na protecção e/ou na patogénese não está completamente estabelecida, embora haja estudos que associem o seu aumento à malária cerebral (Perlmann *et al.*, 1994) e outros que consideram que IgE específicos para *P. falciparum* parecem contribuir para o controlo dos parasitas, tendo maior actividade em formas não complicadas de malária (Duarte *et al.*, 2007).

Os resultados também são contraditórios em relação aos anticorpos IgM, existindo dados epidemiológicos que sugerem que anticorpos IgM não participam na protecção contra a malária (Branch *et al.*, 1998) e outros estudos que dão importância ao papel de anticorpos IgM, nomeadamente na resposta à vacina da malária, o que poderá contribuir para aumentar o potencial efeito protector da mesma (Boudin *et al.*, 1993; Czajkowsky *et al.*, 2010) e à possível correlação dos seus níveis com a diminuição da parasitemia em indivíduos de

áreas hiperendémicas de malária (Boudin *et al.*, 1993). Quanto aos anticorpos IgA, ainda não se encontrou nenhuma função específica na malária (Leoratti *et al.*, 2008).

A malária é uma síndrome complexa, envolvendo muitas respostas inflamatórias que poderão aumentar a interacção célula à célula e estimulação celular envolvendo antigénios da malária (ou toxinas) e factores derivados do hospedeiro como as citocinas (Chen *et al.*, 2000). As toxinas da malária incluem moléculas derivadas do parasita que são secretadas ou libertadas dos parasitas em estádios terminais (trofozoítos e especialmente esquizontes) e que induzem o hospedeiro humano a produzir citocinas, como por exemplo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferão gama (IFN- γ), Interleucina-1 (IL-1) e outras citocinas (Chen *et al.*, 2000; Langhorne *et al.*, 2008).

As citocinas são responsáveis por muitos dos sintomas e sinais da malária, particularmente a febre e distúrbios do sistema imunitário (Clark *et al.*, 2006). Quantidades moderadas de citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-1 são necessários para que o hospedeiro combata o parasita, enquanto o seu excesso poderá ser deletério para o próprio hospedeiro (Chen *et al.*, 2000). A produção precoce de IFN- γ parece ser um requisito para a aquisição da resistência contra a infecção (Angulo e Fresno, 2011). Também podem ser mediadores da morte do parasita pela activação de leucócitos e possivelmente outras células, pela libertação de espécies tóxicas de oxigénio, óxido nítrico e pela geração de peróxidos lipídicos parasiticidas. Os anticorpos e a resposta pró-inflamatória protegem contra as formas assexuadas sanguíneas. A protecção mediada pela resposta pro-inflamatória poderá estar relacionada com as citocinas como o TNF- α e IFN- γ e com a libertação de mediadores como o óxido nítrico (NO) (Miller *et al.*, 2002).

A fisiopatologia da malária pode resumir-se, genericamente, na rápida expansão dos eritrócitos infectados, na destruição de eritrócitos infectados e não infectados, na obstrução microvascular e nas respostas inflamatórias, que, combinadas, levam à redução da perfusão dos tecidos (Miller *et al.*, 2002).

1.3.2 Aspectos clínicos da malária

As manifestações clínicas da malária não grave são comuns nas cinco espécies e dependem do estado imunitário prévio dos pacientes e da idade. A maioria dos casos graves de malária ocorre em crianças entre os seis meses e os três anos de idade. Os sintomas mais leves ocorrem em crianças mais velhas e adultos, cuja parasitemia é, geralmente, mais baixa (OMS, 2000). As pessoas em maior risco para desenvolver malária são crianças pequenas, que ainda não tenham desenvolvido imunidade protectora, grávidas não imunes, grávidas parcialmente imunes em áreas de transmissão estáveis, grávidas parcialmente imunes com VIH, doentes com VIH/SIDA, viajantes provenientes de áreas não endémicas e imigrantes de áreas endémicas vivendo em áreas não endémicas, aquando do seu regresso ao país de origem (OMS, 2011).

O período de incubação na maioria dos casos de infecções por *P. falciparum* é de cerca 10 a 15 dias em indivíduos não imunes (OMS, 2011). O período de incubação poderá ser prolongado pelos níveis de imunidade adquirida através de exposições múltiplas, pela profilaxia contra a malária ou pelo tratamento parcial prévio, que poderá mitigar mas não prevenir a doença (Trampuz *et al.*, 2003). No que diz respeito aos *Plasmodium* não *falciparum*, o período de incubação é de 15 a 16 dias e tanto *P. vivax* como *P. ovale* poderão recrudescer meses ou anos após a exposição (Trampuz *et al.*, 2003).

Os sintomas da malária também estão associados à rotura de eritrócitos e à libertação de resíduos dos eritrócitos e do parasita, incluindo o pigmento da malária (hemozoína) e glicosilfosfatidilinositol (GPI), a suposta “toxina da malária” (Clark e Cownden, 2003). A consequente activação de células mononucleares no sangue periférico estimula a libertação de citocinas inflamatórias e sugeriu-se que o balanço das citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias poderá ser um determinante na gravidade da doença (Crawley *et al.*, 2010).

Os primeiros sintomas da malária costumam ser inespecíficos, sendo que a febre é a manifestação clínica mais comum. Esta inespecificidade na apresentação, poderá levar a erros de diagnóstico.

A doença apresenta-se com cefaleias, mialgias, desconforto abdominal, letargia e disforia, que costuma preceder a febre. A subida da temperatura é errática, podendo atingir um pico de 39-41,5° C, acompanhado de tremores e arrepios de frio, agravamento da cefaleia, do mal-estar e anorexia. Outros sintomas comuns são as náuseas, o mal-estar e os vômitos. O desconforto abdominal é comum e a diarreia ou obstipação podem ocorrer. A tosse também foi descrita nos casos de malária, principalmente em crianças, sendo um sintoma comum e precoce (OMS, 2000). Ao exame objectivo pode observar-se febre, taquicardia, icterícia, palidez e hipotensão ortostática. A febre dura entre 10 a 30 minutos, seguida de um período de defervescência de quatro a oito horas. À medida que a doença evolui, verifica-se esplenomegalia e hepatomegalia e o desenvolvimento de anemia.

Na criança, a malária também se apresenta com febre e mal-estar, com frequência associadas a irritabilidade e letargia. Os vômitos são frequentes, principalmente quando a temperatura corporal é alta, acompanhada de cefaleias, arrepios, dor muscular e anorexia (Crawley *et al.*, 2010). Os vômitos, a diarreia e a dor abdominal podem ser interpretados como gastroenterite, enquanto a taquipneia, a tosse e a dificuldade respiratória poderão ser sugestivas de pneumonia.

Na gravidez, a doença é comum, sendo a sua prevalência em determinadas áreas superiores a 50% (Desai *et al.*, 2007), mas geralmente as suas manifestações são oligossintomáticas ou assintomáticas, embora a anemia possa ser grave e aumentar o risco de mortalidade materna. O feto e o recém-nascido poderão ser seriamente afectados pela doença, havendo um risco aumentado de morbidade e mortalidade (Hartman *et al.*, 2010). O peso ao nascimento dos recém-nascidos filhos de primíparas costuma ser afectado, com uma maior proporção de recém-nascidos com baixo peso à nascença e um aumento de casos de prematuridade (OMS, 2000), facto que é explicado pela restrição de crescimento intra-uterino associado à insuficiência placentar, devido, provavelmente, ao sequestro dos eritrócitos parasitados (Hartman *et al.*, 2010).

Também estão descritos casos de malária congénita, definido pela presença no sangue do cordão ou sangue periférico durante a primeira semana de vida de formas assexuadas de *Plasmodium* com ou sem sintomas (Kothare *et al.*, 1987). Pensava-se que a malária congénita era uma forma de apresentação rara. No entanto, existem estudos que consideram

que até um terço dos recém-nascidos nascidos em áreas endêmicas podem ser afectados pelo parasita (Ndyomugenyi e Magnussen, 2000; Hartman *et al.*, 2010).

P. vivax e *P. ovale* têm tendência para causar recaídas após a resolução da infecção primária, mesmo que o doente abandone a área de malária (OMS, 2011). As recaídas resultam da persistência dos hipnozoítos no fígado, podendo ocorrer meses a anos após a infecção inicial (Mali *et al.*, 2011).

1.4. Fisiopatologia e clínica da malária grave

A maioria dos casos graves e complicações potencialmente fatais da malária, tanto em adultos, como em crianças, estão associadas à infecção por *P. falciparum* e foram propostos critérios para o seu diagnóstico (OMS 1990 e 2000), como pode ser observado na tabela 1. No entanto, estão descritos casos de doença grave associados à infecção por *P. vivax* e *P. knowlesi* (Miller *et al.*, 2002). Actualmente, existem dados crescentes a confirmar que *P. vivax* é responsável por uma morbidade e mortalidade substancial, especialmente em crianças (Poespoprodjo *et al.*, 2009) e o aumento da sua resistência à cloroquina, levanta novos problemas na sua abordagem (Crawley *et al.*, 2010). O controlo da infecção por *P. vivax* não é fácil de ser feito, pela dificuldade na erradicação dos hipnozoítos. O parasita é mais facilmente transmissível do que *P. falciparum*, dado que as suas formas sexuadas (gametócitos) são produzidas mais precocemente no ciclo de vida, muitas vezes antes do tratamento (Crawley *et al.*, 2010). As infecções por *P. Knowlesi*, uma zoonose encontrada no Sudeste Asiático, é frequentemente confundida com as infecções por *P. malariae*, sendo também responsável por casos de malária grave e mortes (Cox-Singh *et al.*, 2008). A parasitemia alta é um achado comum nos casos de malária grave por *P. Knowlesi* e a forma de apresentação é caracterizada por dor abdominal severa e uma história de febre e calafrios (Cox-Singh *et al.*, 2008).

Tanto o homem como o parasita parecem contribuir para o processo que leva às formas graves da doença e muita dessa interacção continua por explicar. Em partes do mundo em que a endemicidade da malária é estável, a malária grave é predominantemente uma doença

da criança, dos primeiros meses de vida até aos cinco anos (OMS, 2000), até à aquisição de imunidade protectora. Em áreas de baixa endemicidade, a malária grave ocorre tanto em adultos como em crianças (OMS, 2000).

Os lactentes com menos de seis meses não desenvolvem com frequência malária grave. Este facto relaciona-se com a imunidade passiva transferida pela mãe, através de anticorpos do subtipo IgG, pelo alto nível de hemoglobina F que compõem os eritrócitos que atrasam o desenvolvimento parasitário e pelo facto do leite materno conter ácido *p*-aminobenzóico que confere protecção contra a malária (Sehgal *et al.*, 1989; Amaratunga *et al.*, 2011; Ndyomugenyi e Magnussen, 2000).

A malária grave é um distúrbio que afecta diversos órgãos e sistemas, mesmo quando as principais manifestações parecem envolver apenas um órgão, como o cérebro (Miller *et al.*, 2002). A gravidade da doença parece resultar de desarranjos funcionais sistémicos que resultam da interacção entre o parasita e o hospedeiro (Marsh, 1999).

As complicações da malária grave são múltiplas, indo desde a malária cerebral e o coma, hipoglicemia, anemia grave, acidose metabólica e alterações hidroelectrolíticas, insuficiência renal, edema pulmonar, síndrome de dificuldade respiratória, coagulopatia e trombocitopenia, esplenomegalia, disfunção hepática, alterações gastrointestinais e febre de urina negra. A forma de apresentação da doença e a sua gravidade varia na criança e no adulto como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 1: Definição clínica e laboratorial dos casos de malária grave.

Manifestações clínicas	Alterações laboratoriais
Alteração do estado de consciência ou coma	Hipoglicemia (Glicémia < 40mg/dL)
Prostração	Acidose metabólica (Bicarbonato < 15mmol/L ou BE > -10)
Impossibilidade na alimentação	Anemia normocítica grave (< 5g/dL ou hematócrito < 15%)
Convulsões múltiplas	Hiperparasitemia (>5% ou > 250000/ μ L em áreas de alta intensidade de transmissão de malária)
Dificuldade respiratória, respiração profunda (respiração acidótica)	Lactato >5 mmol/L
Choque ou colapso circulatório	Insuficiência renal (Diurese <12 ml/kg/24 e creatinina sérica > 3 mg/dl, apesar de aporte hídrico adequado)
Icterícia e evidência de disfunção de outro órgão vital	Hemoglobinúria macroscópica
Hemoglobinúria	
Hemorragia/Coagulação intravascular disseminada	
Edema pulmonar (radiológico)	

Fonte: Adaptado da OMS (2000).

Tabela 2: Frequência relativa das principais manifestações de malária grave em adultos e crianças e respectivos valores de mau prognóstico.

Valor prognóstico*		Manifestações clínicas ou resultados laboratoriais	Frequência	
Crianças	Adultos		Crianças	Adultos
+	?	prostração	+++	+++
+++	++	alteração de consciência	+++	++
+++	+++	dificuldade respiratória	+++	+
+	++	convulsões múltiplas	+++	+
+++	+++	colapso circulatório	+	+
+++	+++	edema pulmonar	+/-	+
+++	++	hemorragia anormal	+/-	+
++	+	icterícia	+	+++
+	+	hemoglobinúria	+/-	+
+	+	anemia grave	+++	+

*Com uma escala de + a +++; +/- significa achado infrequente. Fonte: Organização Mundial de Saúde 2000 e adaptada de Varandas, 2001.

Nas crianças, a progressão da doença por *P. falciparum* pode ser rápida, sendo ainda pouco compreendidos os mecanismos que levam à transformação de formas simples de doença em formas de malária grave. A maior parte das mortes nas crianças internadas no hospital por malária grave ocorrem nas primeiras 24h de doença (Newton e Krishna, 1998).

O principal mecanismo fisiopatológico para a malária grave parece ser a obstrução mecânica dos pequenos vasos, através da citoaderência e do sequestro dos eritrócitos, principalmente dos eritrócitos parasitados (Dondorp *et al.*, 2000).

Além da citoaderência e do sequestro dos eritrócitos parasitados na microcirculação, a malária grave é caracterizada pela redução marcada na deformidade dos eritrócitos, principalmente dos parasitados (Dondorp *et al.*, 2000).

A acidose metabólica foi reconhecida como principal determinante fisiopatológico da doença e de sobrevivência, sendo causa da síndrome de dificuldade respiratória (Miller *et al.*, 2002; Maitland e Marsh, 2004). Na maior parte das vezes é resultante do metabolismo defeituoso de ácidos orgânicos e do aumento da produção de ácido láctico pela febre, anemia, hipovolémia e convulsões. Por outro lado, as alterações da função hepática e da sua vascularização contribuem para a acidose, pela diminuição da eliminação de ácido láctico (Newton e Krishna, 1998).

Assim como no choque séptico e na síndrome da resposta inflamatória sistémica (SRIS), existem manifestações potencialmente mediadas por endotoxinas que incluem o dano do endotélio, que pode levar ao aumento da permeabilidade vascular, saída de colóides do espaço intravascular, vasodilatação patológica e depressão miocárdica, que resulta, em última linha, em hipovolémia e alterações da perfusão dos órgãos (Kumar *et al.*, 2001). Na malária grave, estas alterações hemodinâmicas contribuem para o agravamento das outras alterações fisiopatológicas como a obstrução microvascular, a citoaderência, a formação de rosetas e as alterações da deformabilidade dos eritrócitos, que em conjunto levam a alterações da perfusão dos órgãos e tecidos (Maitland e Marsh, 2004).

O coma, convulsões, acidose, hipoglicemia e anemia grave são formas comuns de apresentação de malária grave na criança (OMS, 2000). As convulsões generalizadas estão associadas à febre e são mais comuns na malária por *P. falciparum* do que por *P. vivax*. A prostração é uma forma frequente de apresentação de malária grave na criança (OMS, 2011).

A malária cerebral é uma das complicações mais temíveis da malária, sendo responsável por uma grande mortalidade, sendo definida pela incapacidade na localização de estímulos dolorosos (OMS, 2000). Está associada a alterações do estado de consciência e algumas vezes a convulsões e coma, podendo deixar nos doentes afectados complicações neurológicas a longo prazo. Uma punção lombar deverá ser efectuada para excluir meningite bacteriana (Trampuz *et al.*, 2003). O coma parece resultar do sequestro dos parasitas, do edema cerebral, das alterações da permeabilidade da barreira cerebrovascular (Maitland e Marsh, 2004) e de aumentos locais de óxido nítrico (Miller *et al.*, 2002). Quanto mais profundo é o coma, pior é o prognóstico da doença (Trampuz *et al.*, 2003). No

entanto, em muitos destes doentes, o coma parece ser uma resposta transitória a uma série de insultos metabólicos, que recupera rapidamente após uma terapêutica apropriada (Miller, 2002). Embora a maioria das crianças recupere a consciência em aproximadamente 48h e pareçam ter uma recuperação neurológica total, cerca de 20% morrem e cerca de 10% apresentam sequelas neurológicas (Maitland e Marsh, 2004; Crawley *et al.*, 2010). Alguns défices neurológicos são transitórios enquanto outros resolvem em meses ou poderão não se resolver completamente (Newton *et al.*, 2000).

A retinopatia é comum em crianças com malária cerebral (Crawley *et al.*, 2010), sendo caracterizada por três componentes principais, nomeadamente o branqueamento da retina, alterações dos vasos e hemorragias retinianas, sendo os dois primeiros exclusivos da malária (Beare *et al.*, 2011), realçando a importância da fundoscopia na avaliação destes doentes.

A anemia é outra complicação frequente da malária grave em crianças e a sua natureza é multifactorial. Resulta da destruição de eritrócitos parasitados e não parasitados e da redução da sua deformabilidade, da diminuição de reticulocitose por disfunção da resposta da medula óssea por uma eritropoiese ineficaz e produção inadequada de eritropoietina, dos efeitos sistémicos da inflamação na eritropoiese e das infecções bacterianas concomitantes e anormalidades nutricionais prévias (Dondorp *et al.*, 2000; Biamba *et al.*, 2000; Maitland e Marsh, 2004). Em áreas de alta transmissão da doença, a anemia grave é a principal manifestação da malária grave e ocorre principalmente em crianças com menos de três anos de idade (OMS, 2000). Um hematócrito inferior a 13% (hemoglobina inferior a 4g/dL), está associado a um aumento significativo de mortalidade nas crianças com malária (OMS, 2000). A mortalidade das crianças com anemia grave assintomática é de cerca de 1%, percentagem que sobe para cerca de 30% quando a anemia é complicada por dificuldade respiratória e acidose metabólica (Crawley *et al.*, 2010).

Outras alterações laboratoriais podem ser encontradas na malária, nomeadamente a trombocitopenia, hiperbilirrubinémia, e elevação das transaminases (Trampuz *et al.*, 2003). A contagem de leucócitos costuma ser normal ou baixa, mas a neutrofilia está presente na maioria dos casos. Na maior parte dos doentes, observa-se um aumento da proteína C reactiva, da procalcitonina e da velocidade de sedimentação (Trampuz *et al.*, 2003).

As crianças afectadas por malária grave, costumam apresentar esforço respiratório importante, que resulta da hipovolémia, desidratação e da acidose metabólica que caracterizam a doença (English *et al.*, 1996; Maitland e Marsh, 2004). Outras formas de apresentação da acidose são a letargia e a prostração que se associam à respiração acidótica (English *et al.*, 1996).

A hipoglicemia é encontrada frequentemente, sobretudo na criança com menos de três anos de idade e na grávida com malária grave. Com frequência é acompanhada de acidose láctica (Ogetii *et al.*, 2010) e está associada a pior prognóstico e ao aumento da mortalidade, principalmente em crianças (Elusiyan *et al.*, 2006). A natureza da hipoglicemia também é multifactorial, resultando de uma alteração na neoglicogénese hepática e do tratamento com quinino que induz hiperinsulinemia (Ogetii *et al.*, 2010).

A insuficiência renal, que é uma complicação comum nos adultos com malária grave, é rara na idade pediátrica (Crawley *et al.*, 2010). No adulto, a insuficiência renal é geralmente oligúrica ou anúrica e poderá necessitar de diálise temporária (Trampuz *et al.*, 2003). As lesões resultam principalmente da necrose tubular aguda e de uma glomerulopatia proliferativa ligeira e estes doentes geralmente não progridem para a insuficiência renal crónica (Mishra e Das, 2008).

A icterícia e o edema pulmonar são formas de apresentação pouco usuais em crianças pequenas, ao contrário do que acontece nos adultos (OMS, 2000). A icterícia resulta da hemólise severa ou do envolvimento hepático na doença (Bhalla *et al.*, 2006). O edema pulmonar é outra complicação grave da malária, com níveis altos de mortalidade e o excesso de fluidos contribui para o seu desenvolvimento. Outro factor que contribui para o edema pulmonar é a Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda (ARDS), que parece resultar de um aumento da permeabilidade capilar (Mishra *et al.*, 2006).

Conclui-se, portanto, que a malária é uma patologia multissistémica, com uma fisiopatologia complexa. A melhoria da compreensão e da explicação dos mecanismos da doença, tem efeitos na melhoria do diagnóstico das complicações e de um melhor tratamento dos doentes, prevenindo a morbi-mortalidade.

É importante salientar que qualquer doente com malária com intolerância oral, e que tenha qualquer evidência de disfunção de um órgão vital, ou com alta parasitemia, apresenta um

risco acrescido de morte e deverá ser tratado precocemente e de forma correcta (OMS, 2000).

1.5. Imunologia da malária grave

Na malária grave, a libertação de uma variedade de toxinas estimulam a activação de factores imunes pelo hospedeiro, que incluem a libertação de citocinas, radicais livres de oxigénio e óxido nítrico (Maitland e Marsh, 2004). Pensa-se que as citocinas pro-inflamatórias do tipo Th1, tais como o TNF- α e o IFN- γ , bem como a libertação de mediadores como o NO, têm um papel importante na patogénese da doença, particularmente na malária cerebral, aumentando a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais (Miller *et al.*, 2002), nomeadamente ICAM1 e promovem a redistribuição de outros receptores como CD31 no endotélio (Chen *et al.*, 2000), promovendo assim a citoaderência, a disfunção endotelial e o sequestro (Maitland e Marsh, 2004). Além disso, níveis aumentados no plasma de TNF- α , juntamente com a produção IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, quimiocinas CCL3 (MIP-1 α) e CCL4 (MIP-1 β) e níveis reduzidos de IL-4 e factor transformador de crescimento (TGF) - β , foram reportados em doentes com malária grave (Peyron *et al.*, 1994; Kossodo *et al.*, 1993; Crawley *et al.*, 2010; Ochiel *et al.*, 2005).

Por outro lado, a angiopoetina 2 tem sido envolvida na sensibilização do endotélio vascular para a acção de TNF- α e, concentrações aumentadas, em adultos e crianças com malária grave estão associados a um pior prognóstico (Crawley *et al.*, 2010). Concentrações aumentadas de angiopoetina 2 poderão também comprometer a integridade da barreira hemato-encefálica, levando à saída das proteínas plasmáticas, edema perivascular e lesões neuronais (Crawley *et al.*, 2010).

O papel das citocinas anti-inflamatórias é controverso na malária grave, isto porque existem estudos reportando altas concentrações de IL-10 como estando associadas a malária grave (Peyron *et al.*, 1994, Iriemenam *et al.*, 2009) e outros que a consideram factor protector de malária grave (Kurtis *et al.*, 1999). Níveis baixos de IL-10 estão associados a anemia grave

da malária (Kurtzhals *et al.*, 1998). Também foi demonstrado que o equilíbrio entre as concentrações de IL-10 e TNF- α determinam a gravidade da anemia em crianças afectadas (Othoro *et al.*, 2009). Dentro da mesma linha de evidência, níveis plasmáticos de TGF- β , que actua em altas concentrações como uma citocina anti-inflamatória, são inversamente correlacionadas com a gravidade da malária em modelos murinos, bem como em humanos (Prakash *et al.*, 2006).

Alguns autores propõem que citocinas como as IL-1 β , IL-12 e IFN- γ discriminam malária cerebral de malária grave não cerebral, estando os níveis de IL-1 β mais associados à malária cerebral e níveis aumentados de IL-12 e IFN- γ associados à malária grave não cerebral (Prakash *et al.*, 2006). Neste estudo, a severidade da doença era independente da parasitemia, sexo ou idade (Prakash *et al.*, 2006).

Por outro lado, tem-se discutido o papel dos *toll-like receptor* (TLR) como iniciadores do processo pró-inflamatório, havendo autores que sugerem que TLR9 e MyD88 são essenciais para iniciar as respostas da IL-12 e IFN- γ e favorecem a hiper-resposta do hospedeiro aos agonistas dos TLR, resultando na hiperprodução de citocinas e nos sintomas *sepsis-like* da malária aguda (Franklin *et al.*, 2009).

Em resumo, a contribuição das citocinas na malária grave incluem a supra-regulação da expressão de receptores do endotélio e a sua redistribuição na superfície endotelial, distúrbios físicos do hospedeiro, como a febre alta, a supra-regulação da produção de óxido nítrico, que poderá causar dano local no sítio da sequestração e a supressão da produção de eritrócitos na medula óssea (Chen *et al.*, 2000).

O sistema complemento, serve como activador da imunidade inata, sendo componente central neste tipo de resposta e desempenha um papel crítico na neutralização do parasita. É activado maioritariamente pelas vias clássica, alternativa e a das lectinas, que convergem no C3, resultando na geração de produtos de activação C3a, C5a, C3b e o complexo terminal de ataque à membrana [MAC (C5b-C9)]. Existem outras vias de activação do complemento independentes do C3: a via mediada pela trombina, em que a trombina funciona como C5 convertase (Humer-Lang *et al.*, 2006) e a possibilidade de neutrófilos e macrófagos activados secretarem serina proteases capazes de clivar o componente C5 (Humer-Lang *et al.*, 2002). Foram descritos níveis aumentos de C1rs-C1inh em infecções

experimentais por *P. falciparum*, dando suporte a um possível papel da via clássica na malária (Roestenberg *et al.*, 2007). Também se observou a supra-regulação de C1q nas placentas de primíparas infectadas com *P. falciparum* (Muehlenbachs *et al.*, 2007). À medida que *P. falciparum* se desenvolve em formas maduras de trofozoítos, a superfície dos eritrócitos infectados torna-se propícia para a activação espontânea de C3 (Silver *et al.*, 2010). A activação adicional da via alternativa é feita pela hematina (Kaca, Roth, 1995), que resulta da hemólise dos eritrócitos induzidos por *P. falciparum*, e através do factor D derivado das plaquetas nos locais de lesão endotelial (Peerschke *et al.*, 2008).

Outras formas de activação do complemento na malária continuam em estudo, nomeadamente o papel dos *Toll-like receptor* (TLR) e do *mannose-binding lectin* (MBL) (Silver *et al.*, 2010).

A activação excessiva do sistema complemento tem o potencial de mediar a patogénese da doença, contribuindo para a inflamação sistémica, a activação endotelial e para um bloqueio da microvasculatura, estando todos associados à disfunção de órgãos associados à malária (Rogerson *et al.*, 2007; Schofield, 2007)

Os polimorfismos nos genes do hospedeiro, como aqueles que codificam o IFN- γ , factores reguladores dos interferões, TNF- α , IL-10 e IL-4, foram associados à maior susceptibilidade à doença (Langhorne *et al.*, 2008).

Assim, o prognóstico de uma infecção por *P. falciparum* poderá depender de um equilíbrio estreito entre a indução apropriada ou inapropriada dos factores reguladores imunes, necessitando de mais estudos para a sua compreensão.

A reversão dos efeitos deletérios do excesso de produção de citocinas poderá, no futuro, ter um efeito importante no tratamento da malária grave.

1.6. Medidas de controlo da malária

O controlo vectorial é a principal forma de redução da transmissão da malária ao nível da comunidade, sendo a única intervenção capaz de reduzir a transmissão da malária de níveis

altos a quase zero (OMS, 2011). Existem duas formas efectivas de controlo vectorial, que são, o uso de mosquiteiros tratados com insecticidas e a pulverização do interior das habitações com insecticidas. A OMS recomenda a utilização de ambos como medidas de protecção de todos os indivíduos em risco de contrair malária (OMS, 2011). O sucesso desta estratégia de controlo da malária dependerá de uma alta e sustentada taxa de cobertura das redes mosquiteiras e dos insecticidas, do tempo adequado das pulverizações (que deverá ocorrer antes do início do período de transmissão da doença) e da susceptibilidade contínua dos vectores aos insecticidas usados (Crawley *et al.*, 2010).

O número de mosquiteiros impregnados com insecticidas fornecidos a países com malária endémica na África subsaariana aumentou de 88,5 milhões em 2009 para 145 milhões em 2010 (OMS 2011). No entanto, 45 países (27 dos quais na África Subsaariana) identificaram resistências a pelo menos uma das quatro classes de insecticidas usados no controlo da malária (OMS, 2011). O aumento das resistências aos insecticidas pelos vectores da malária, particularmente aos piretroides, que é o insecticida usado para tratar as redes mosquiteiras, põe um sério problema à pulverização residual do interior das habitações e os programas das redes mosquiteiras tratadas com insecticida, enquanto a resistência cruzada entre as quatro classes de insecticidas recomendadas para a pulverização dos interiores estão bem reconhecidos (Greenwood *et al.*, 2010). O desenvolvimento de insecticidas pertencendo a classes diferentes, é uma prioridade da saúde pública. Outra das dificuldades no controlo de infecções crónicas por malária é a existência de picos flutuantes de parasitemia ao longo do tempo, chamadas de recrudescência, com o aparecimento de diferentes antigénios do parasita e que constitui uma das suas estratégias de sobrevivência (Chen *et al.*, 2000). O parasita da malária desafia o sistema imunitário em pelo menos duas formas: através da recombinação genética no mosquito e através da existência de várias famílias de genes com variabilidade (a família *var*, a família *rosettin/rif* e a família Pf60) no genoma do parasita (Chen *et al.*, 2000).

A busca por uma vacina contra a malária continua em curso. Após 30 anos da primeira demonstração da primeira vacina contra a malária, o seu uso efectivo como parte de um programa nacional de controlo da malária continua a ser uma meta ilusória (Crawley *et al.*, 2010). Até recentemente, as estratégias de desenvolvimento das vacinas tinham como

objectivo a prevenção da doença. Actualmente, e dada a redução substancial dos casos de malária reportados em zonas endémicas, a grande ênfase deverá ser colocada no desenvolvimento de vacinas que interrompam a transmissão (Crawley *et al.*, 2010).

As vacinas pré-eritrocitárias bloqueiam a entrada dos esporozoítos no hepatócito ou destroem os hepatócitos infectados, prevenindo assim as formas clínicas de doença. As vacinas contra as fases sanguíneas assexuadas patogénicas do *Plasmodium* spp. são desenhadas com o objectivo principal de prevenir a doença clínica (Crawley *et al.*, 2010). Os polimorfismos das proteínas de superfície de *P. falciparum* e a variabilidade nos caminhos da invasão do parasita, levam a pensar que a produção de vacinas contra fases sanguíneas de malária nesta espécie será um verdadeiro desafio (Crawley *et al.*, 2010). As vacinas que bloqueiam a transmissão da doença não estão concebidas para proteger os indivíduos vacinados de contrair malária, mas para reduzir o número de vectores infecciosos e a população de parasitas circulantes. Trabalhos mais recentes têm como alvo os antigénios no intestino médio ou saliva do mosquito que facilitam a invasão do parasita no vector e no hospedeiro, respectivamente (Dinglasan *et al.*, 2008).

Existe um interesse crescente no desenvolvimento de vacinas contra diferentes alvos nos vários estágios do ciclo de vida do parasita e contra múltiplos antigénios, que poderá conferir maior protecção do que as vacinas que se baseiam em antigénios únicos e evitar a falência causada pela variabilidade holomórfica de populações parasitárias (Butler, 2009).

1.7. Diagnóstico laboratorial da malária – limitações e abordagens

O diagnóstico precoce e tratamento da malária é essencial para a redução da doença, prevenção da morte e para a prevenção de resistências (OMS,2011; Wongsrichanalai *et al.*, 2007). O diagnóstico clínico é impreciso, mas continua a ser a base da terapêutica para a maioria de doentes febris com malária em áreas endémicas, onde o suporte laboratorial frequentemente não está disponível (Wongsrichanalai *et al.*, 2007). No entanto, o diagnóstico clínico apresenta uma grande limitação, pela sobreposição dos sintomas de

malária com outras doenças tropicais, o que leva muitas vezes a um uso indiscriminado de antimaláricos (Wongsrichanalai *et al.*, 2007).

O diagnóstico definitivo da malária é estabelecido pela demonstração do parasita no sangue periférico. Desde a introdução por Gustav Giemsa em 1904 da mistura de azul de metileno e eosina, o exame microscópico de esfregaços corados com Giemsa tem sido utilizado como teste padrão no diagnóstico da malária (Wongsrichanalai *et al.*, 2007). Devem ser examinados esfregaços em gota fina e em gota espessa. A gota espessa permite um diagnóstico rápido. A gota fina permite a identificação do parasita, a contagem de eritrócitos infectados e é útil no seguimento da resposta ao tratamento. O diagnóstico só deve ser excluído após um mínimo de três pesquisas negativas, com intervalo de 12 horas, na suspeita de malária. Trata-se de um método relativamente barato, necessitando, no entanto, de treino dos microscopistas, manutenção das infraestruturas e controlo de qualidade (Moody, 2002; OMS, 2011). Poderá existir uma grande variabilidade no diagnóstico da doença, entre diferentes laboratórios e técnicos, com a utilização deste método, pelo que é necessário insistir no treino de microscopistas, principalmente nos países em vias de desenvolvimento. A existência de falsos positivos e falsos negativos é frequente, tendo muito a ver com a preparação das lâminas e com a própria densidade parasitária (Moody, 2002; Wongsrichanalai *et al.*, 2007). Outra desvantagem da gota espessa é a hemólise dos eritrócitos durante a fase da coloração.

No que diz respeito a *P. knowlesi* é importante referir que os estádios de trofozoítos, de esquizonte e de gametócitos, são morfológicamente indistinguíveis da infecção por *P. malariae* pela microscopia (Singh *et al.*, 2004).

Nos últimos 50 anos, foram sendo pesquisados métodos alternativos de diagnóstico da malária, como por exemplo a detecção de anticorpos da malária através da imunofluorescência indirecta (IFA) e do imunoensaio enzimático (ELISA) (Lima *et al.*, 2011). A detecção de anticorpos não parece ter grande valor em termos de diagnóstico na malária aguda (Trampuz *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2011). É usada fundamentalmente em estudos epidemiológicos. Mais tarde, foram desenvolvidos métodos para a detecção de antígenos da malária, sendo o mais significativo a imunocromatografia, que é a base dos testes de diagnóstico rápido comerciais disponíveis actualmente. Também estão

disponíveis métodos moleculares, nomeadamente as provas de ADN e métodos para a detecção do parasita através da fluorescência (Wongsrichanalai *et al.*, 2007). Testes baseados na PCR para o genoma específico da espécie *Plasmodium* spp. são mais sensíveis e específicos que outros testes e têm como vantagem a detecção de menos de cinco parasitas/ μ L, o diagnóstico de infecções mistas por malária, a detecção de casos assintomáticos e a triagem de doadores de sangue (Barker *et al.*, 1994; Kitchen e Chiodini, 2006). A PCR em tempo real é uma técnica eficiente quando aplicada a um número grande de amostras, com altos níveis de sensibilidade e especificidade, quando comparado com a microscopia e permite obter resultados mais rápidos que a PCR convencional (Lima *et al.*, 2011; Swan *et al.*, 2005).

Os testes rápidos permitem a detecção de antígenos de malária em pequenas quantidades de sangue, usualmente 5-15 μ L. São fáceis de executar e apresentam sensibilidade e especificidade elevadas, o que tem permitido o aumento da sua utilização principalmente em países em vias de desenvolvimento (OMS, 2010). Foi estipulado que estes testes devem ter a capacidade de detectar 100 parasitas/ μ L de todos os *Plasmodium* spp. e a possibilidade de efectuar medições semi-quantitativas para monitorização do resultado dos tratamentos e deverão ser comparados contra métodos aceites como testes padrão (Moody, 2002). A maioria dos testes utilizados detecta, apenas, *P. falciparum* (Wongsrichanalai *et al.*, 2007). Deverá ter-se em atenção as condições ambientais, dos locais onde os diferentes testes rápidos poderão ser utilizados, já que existem algumas condições técnicas que deverão ser respeitadas, nomeadamente a temperatura ou a humidade, já que podem ser causa de resultados falso-negativos (OMS, 2010).

1.8. Terapêutica da malária

A escolha do antimalárico depende da espécie de *Plasmodium* suspeito ou confirmado, da gravidade do quadro clínico, do padrão de resistência da área onde a infecção foi adquirida e da realização de quimioprofilaxia ou tratamentos anteriores.

O tratamento da malária não complicada tem três objectivos. O primeiro é a cura da infecção, já que a previne a progressão para a doença grave e a morbidade adicional associada à falência do tratamento. O segundo objectivo, é a prevenção do desenvolvimento de resistências e o terceiro é a redução da transmissão da doença (Crawley *et al.*, 2010).

A base do tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* são as combinações dos derivados da artemisinina (ACT), como pode ser observado na tabela 3, nomeadamente artemeter mais lumefantrina, artesunato mais amodiaquina, artesunato mais mefloquina e artesunato mais sulfadoxina-pirimetamina (OMS, 2010). A artemisinina e os seus derivados não deverão ser usados em monoterapia (OMS,2010). A segunda linha para o tratamento da malária não complicada são os ACT conhecidos como sendo efectivos na região, artesunato mais tetraciclina ou doxiciclina ou clindamicina durante sete dias, ou ainda quinino mais tetraciclina ou doxiciclina ou clindamicina durante sete dias. Os ACT são geralmente bem tolerados. É importante ter em conta que a tetraciclina ou a doxiciclina só deverão ser utilizados em crianças com mais de oito anos de idade. A sulfadoxina-pirimetamina deverá ser evitada nas primeiras semanas de vida, porque desloca de uma forma competitiva a bilirrubina, podendo agravar a hiperbilirrubinémia. Finalmente, a primaquina também deverá ser evitada no primeiro mês de vida.

Na malária grave, e tendo em conta que a maior parte das mortes ocorrem nas primeiras 24h (Newton, Krishna, 1998), ainda antes dos doentes poderem beneficiar do efeito total da terapêutica com quinino, torna-se necessário uma terapêutica de suporte eficaz, que permita o tratamento das complicações (Maitland e Marsh, 2004). Uma avaliação rápida e estruturada das funções cardiopulmonar e neurológica é de suma importância antes do tratamento da malária grave. As terapêuticas de suporte incluem a administração de fluidos endovenosos, o tratamento da hipoglicemia, da hiperpirexia e das convulsões e, na malária

cerebral, a prevenção da aspiração através da introdução da sonda nasogástrica e da aspiração de secreções (OMS, 2000; Miller *et al.*, 2002).

Após uma rápida avaliação e confirmação do diagnóstico, deve-se iniciar o tratamento com doses totais de antimaláricos parentéricos, nomeadamente em crianças com artesunato endovenoso ou intramuscular, quinino ou artemeter. O artemeter deverá ser usado apenas se não houver outra alternativa, já que a sua absorção poderá ser errática (OMS, 2010). O tratamento deverá ser completado com artemeter mais lumefantrina, artesunato mais amodiaquina, dihidroartemisinina mais piperaquina, artesunato mais sulfadoxina-pirimetamina, artesunato mais clindamicina ou doxiciclina (acima dos oito anos) ou quinino mais clindamicina ou doxiciclina (OMS, 2010), como pode ser observado na tabela 4.

Nos casos muito graves com hiperparasitemia é lícito considerar a possibilidade de realização de exsanguíneo-transfusão de acordo com alguns critérios (SIP, 2006). O efeito benéfico da exsanguíneo-transfusão pode ser interpretado como resultando da substituição de eritrócitos não deformáveis por outros deformáveis (Dondorp *et al.*, 2000).

O tratamento de escolha da malária por *P. vivax* é feito com cloroquina durante três dias (numa dose total de 25 mg/kg), combinado com primaquina durante 14 dias (0.25 mg/kg/dia), nas infecções sensíveis à cloroquina. Os ACT combinados com primaquina são utilizados na malária por *P. vivax* resistente à cloroquina (OMS, 2010). O tratamento dos casos graves de malária por *P. vivax* deverá ser feito da mesma forma que na malária por *P. falciparum*. As infecções causadas por *P. ovale* e *P. malariae* são geralmente consideradas sensíveis à cloroquina (OMS, 2010).

Tabela 3: Fármacos utilizados no tratamento da malária por *Plasmodium falciparum* não complicada

Fármaco	Dose e número de tomas
1ª linha	
Artemeter + lumefantrina	1.7/12 mg/kg/dose de artemeter e lumefantrina, 2id, 3 dias
Artesunato+ amodiaquina	4 mg/kg/dia de artesunato e 10 mg/kg/dia de amodiaquina, 1id, 3 dias
Artesunato+ mefloquina	4 mg/kg/dia de artesunato, 1id, 3 dias e 25 mg/kg de mefloquina, que poderá ser dividido em 2 dias em 15mg/kg e 10mg/kg ou em 3 dias com 8.3 mg/kg/dia, 1id, 3 dias
Artesunato+sulfadoxina-pirimetamina	4 mg/kg/dia de artesunato, 1id, 3 dias e uma administração única de 25/1.25 mg/kg sulfadoxina-pirimetamina em D1
2ª linha	
Artesunato+ tetraciclina ou doxiciclina ou clindamicina	Artesunato (2 mg/kg, 1id) Tetraciclina (4 mg/kg, 6/6h) Doxiciclina (3.5 mg/kg, 1id) Clindamicina (10 mg/kg, 2id) Tempo de tratamento: 7 dias
Quinino + tetraciclina ou doxiciclina ou clindamicina	Tetraciclina (4 mg/kg, 6/6h) Doxiciclina (3.5 mg/kg, 1id) Clindamicina (10 mg/kg, 2id) Tempo de tratamento: 7 dias

O melhor tratamento para as infecções por *P. knowlesi* ainda não é conhecido (William *et al.*, 2011). Tem-se utilizado a cloroquina e o quinino no seu tratamento, com bons resultados (William *et al.*, 2011). A eficácia dos ACT no tratamento da malária por *P. knowlesi* é desconhecida (William *et al.*, 2011). Dado que *P. knowlesi* sofre replicação a cada 24 horas, métodos rápidos de diagnóstico e uma intervenção atempada são essenciais. Na ausência de testes diagnósticos de rotina para malária por *P. knowlesi*, recomenda-se que doentes que vivam ou viajem para o Sudeste Asiático que estejam doentes, com hiperparasitemia por “*P. malariae*”, diagnosticada por microscopia, devam receber terapêutica intensiva apropriada, semelhante para a malária grave por *P. falciparum* (Cox-Singh *et al.*, 2008).

Tabela 4: Fármacos utilizados no tratamento da malária grave por *Plasmodium falciparum*

Fármaco	Dose e número de tomas
Artesunato	2.4 mg/kg por via endovenosa ou intramuscular na admissão e depois às 12h e às 24 h após a admissão, seguido de uma dose diária nos restantes dias de tratamento
Quinino	20 mg do sal/kg na admissão por via endovenosa ou dividido em duas doses por via intramuscular, seguido de 10 mg/kg cada 8 h
Artemeter	3.2 mg/kg por via intramuscular na admissão e depois 1.6 mg/kg/dia)

Nota: O tratamento deverá ser completado com artemeter +lumefantrina, artesunato + amodiaquina, dihidroartemisinina +piperquina, artesunato + sulfadoxina-pirimetamina, artesunato +clindamicina ou doxiciclina ou quinino + clindamicina ou doxiciclina

1.9. Resistência aos antimaláricos

A resistência aos antimaláricos continua a ser um problema global. A resistência à cloroquina e à sulfadoxina-pirimetamina originada na fronteira entre a Tailândia e o Camboja e que se expandiu subsequentemente para a restante Ásia, África e América do Sul foi responsável por milhões de mortes (Crawley *et al.*, 2010). Perante esta realidade e com a introdução e o desenvolvimento dos ACT no Ocidente, a OMS passou a recomendar os ACT no tratamento de malária não complicada por *P. falciparum*, o que permitiu aumentar a eficácia do tratamento da doença e o atraso no aparecimento de resistências pela eliminação rápida das formas assexuadas do parasita, responsáveis pela fase sintomática da doença, mas também pela redução dos gametócitos, responsáveis pela sua transmissão (OMS, 2010; Lin *et al.*, 2010). Actualmente, os ACT têm sido utilizados em quase todo o mundo, estando aprovados em esquemas terapêuticos de primeira ou segunda linha em 86 países (Hamed e Grueninger, 2012).

Foram identificados marcadores moleculares de resistência de *P. falciparum* à cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina, atovaquona-proguanil e em menor grau para outros antimaláricos. Para a cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina, estes envolvem polimorfismos únicos de nucleótidos em genes que codificam uma proteína transportadora vacuolar de membrana e enzimas envolvidas na síntese do folato respectivamente (Lin *et al.*, 2010). Verificou-se que doentes com aumento do número de cópias de *pfmdr1* (*P. falciparum* multidrug-resistance gene 1) que codifica Pfgh1, uma pretensa bomba transportadora, apresentavam repostas reduzidas à mefloquina, quinino, lumefantrina, e combinações de ACT que continham estas drogas (Picot *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2009).

Mais recentemente, a resistência de *P. falciparum* aos ACT foi confirmada, novamente, na fronteira entre o Camboja e a Tailândia em 2009, suspeitando-se a sua existência em Myanmar e Vietnam (OMS, 2011). No entanto, continuam altamente efectivos em quase todos os países, havendo recomendações claras da OMS para a sua correcta utilização, nomeadamente a sua não utilização em monoterapia entre outras medidas, para a prevenção das resistências a esta classe de drogas (OMS, 2011).

Não existem neste momento marcadores moleculares estabelecidos de resistência à artemisinina, ao contrário do que acontece com a cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina ou atovaquona-proguanil, pelo que deverá manter-se um programa de vigilância à eficácia terapêutica dos ACT, através da medição periódica de taxas de eliminação do parasita por exemplo (Lin *et al.*, 2010; Hamed e Grueninger, 2012).

No que diz respeito a *P. vivax*, a sua resistência à cloroquina está bem estabelecida na Indonésia e está a emergir em outras zonas da região Ásia-Pacífico e na América do Sul (Crawley *et al.*, 2010). Não existe, até este momento, evidência consistente que ligue determinados polimorfismos de qualquer gene à resistência a *P. Vivax* (Baird, 2009).

II. JUSTIFICAÇÃO E OBJECTIVOS

2.1 Local do estudo

Este estudo teve lugar no Hospital São José de Bor, situado na vila de Bor, a quatro quilómetros de Bissau. A Guiné-Bissau é um pequeno país com 36.125Km², situado na Costa Ocidental de África, limitada a Norte pela República do Senegal, a Leste e Sul pela República da Guiné-Conakry e a Oeste pelo oceano atlântico. O País é constituído por uma parte continental e outra insular que engloba o arquipélago dos Bijagós composto por cerca de 80 ilhas e ilhéus, dos quais somente 20 são habitadas (Instituto Nacional de Estatística da Guiné-Bissau-INE, 2011). O clima é tropical húmido, com uma temperatura média anual de 27° C e humidade média anual de 67%, com duas estações: a das chuvas que decorre de Junho a Outubro e a estação seca durante os restantes meses do ano. A população da Guiné-Bissau é de 1.520.830 habitantes, 49,4% das quais entre os zero e os 17 anos (INE-Guiné-Bissau, 2011). O país ocupa o 176º lugar do Índice de Desenvolvimento Humano elaborado pelo Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD, 2011), com uma esperança média de vida à nascença de 48.1 anos (PNUD, 2011) e uma incidência de pobreza extrema de 33% (Inquérito Ligeiro para Avaliação da Pobreza 2, 2010). A mortalidade de crianças com menos de cinco anos de idade é das mais altas do mundo, 193/1000 nados-vivos (UNICEF, 2011). Outros indicadores de saúde podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5: Alguns indicadores do estado de saúde e nutrição na Guiné-Bissau.

INDICADORES	NÚMEROS
Taxa de mortalidade infantil em 2010	92
Taxa de mortalidade neonatal em 2010	40
Produto interno bruto per capita (US\$)	540
Percentagem de crianças com baixo peso à nascença (2006-2010*)	11
Percentagem de crianças com menos de cinco anos com baixo peso moderado ou grave (2006-2010) (OMS)	18
Percentagem da população com acesso à água potável em 2008	61
Percentagem da população com saneamento básico adequado em 2008	21
Malaria 2006-2010, percentagem de crianças com menos de cinco anos dormindo sob redes mosquiteiras tratadas com insecticidas	36
Malaria 2006-2010, percentagem de crianças com menos de cinco anos com febre que recebem tratamento com antimaláricos	51

Fonte: UNICEF.

Disponível em: http://www.unicef.org/infobycountry/guineabissau_statistics.html

A malária é endémica na Guiné-Bissau, sendo responsável por 10% das mortes na população geral (OMS, 2002) e 21 % das mortes em crianças com menos de cinco anos (OMS, 2006). A distribuição da malária na Guiné-Bissau pode ser observada na figura 3.

Estão descritos casos de malária ao longo de todo o ano neste país (Rodrigues *et al.*,2008), mas parece haver uma predominância de casos nos meses das chuvas (Junho a Outubro). A prevalência de malária num estudo de Rodrigues *et al.* de 2008, em consultas externas de crianças com idades entre um mês e os cinco anos em Bissau, era de 13%.

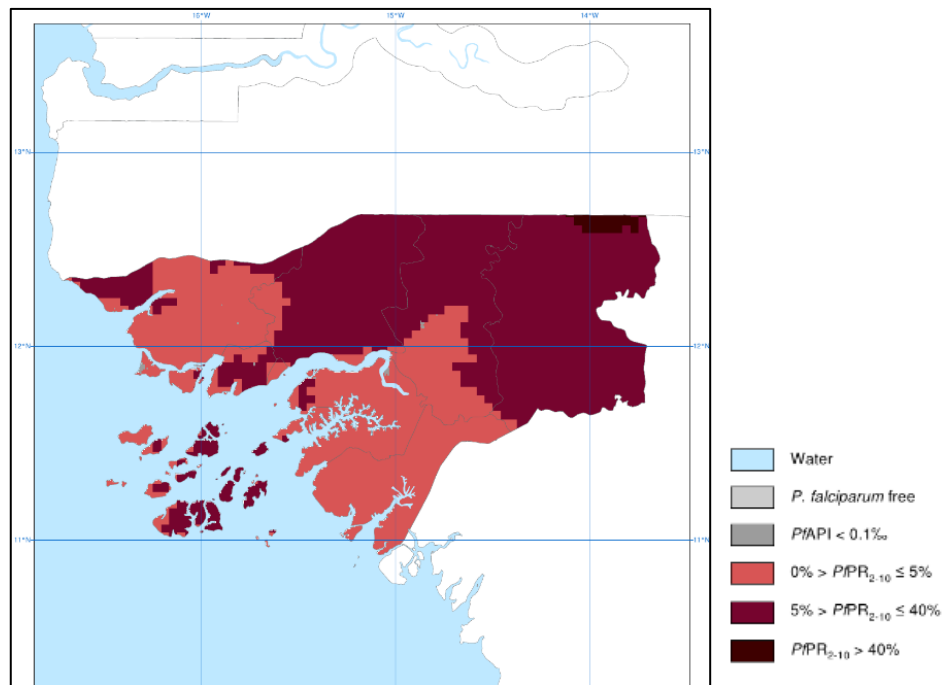


Figura 3: Distribuição espacial dos casos de malária causados por *Plasmodium falciparum* no ano de 2010 na Guiné-Bissau. Representação estratificada por classe de endemicidade. http://www.map.ox.ac.uk/browse-resources/endemicity/Pf_class/GNB

2.2 OBJECTIVOS

A malária é uma doença com importância global, que continua, nos dias de hoje, a ser responsável por uma grande morbidade e mortalidade, sobretudo na África Subsaariana, atingindo predominantemente crianças. É, ainda, responsável por perdas económicas importantes, que contribuem para a manutenção do ciclo de pobreza e subdesenvolvimento que afecta grande parte dos países africanos.

Dos doentes infectados, apenas um pequeno grupo desenvolve doença grave, que os coloca em risco de vida, sendo os restantes casos assintomáticos ou com pouca gravidade.

Os mecanismos que determinam a progressão para doença grave em determinadas pessoas e a sua forma de apresentação em cada indivíduo continuam por explicar, existindo cada vez mais dados que atribuem importância primordial ao papel dos mediadores inflamatórios na fisiopatologia da malária grave. No entanto, continuam a existir poucos estudos que envolvam doentes em idade pediátrica, o que justifica a necessidade de mais trabalhos e mais investigação sobre este tema neste grupo etário. Tendo em conta estes pressupostos, os objectivos deste trabalho foram:

Objectivo Geral:

Estudar o perfil de mediadores pro-inflamatórios como possíveis factores preditivos de malária grave, definida pelos critérios da OMS, em crianças.

Objectivos Específicos:

1. Determinar os níveis de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp. e anticorpos IgG e IgM específicos para *P. falciparum*;
2. Caracterizar o perfil de resposta imune do tipo Th1 *versus* Th2 baseado na pesquisa de anticorpos anti-*P. falciparum* do tipo IgG1, IgG3, IgG4 e IgE;

3. Determinar os níveis de citocinas pro-inflamatórias IFN- γ e TNF- α em amostras de soros de crianças com malária grave;
4. Determinar os níveis de óxido nítrico em amostras de soros de crianças com malária grave;
5. Estudar o processo de ativação do sistema complemento na malária grave em crianças, pela determinação dos níveis de anafilatoxina C5a e proteína C reactiva (CRP).

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População a estudar

Crianças dos zero aos 16 anos, com sintomas de malária grave ou malária com necessidade de internamento por intolerância da via oral, observadas nas consultas de pediatria do Hospital São José de Bor. Por se tratar de um estudo piloto e exploratório, o cálculo estatístico do tamanho da amostra não foi estabelecido, fazendo parte desta, todas as crianças observadas que reuniram os critérios de inclusão durante os meses de Junho e Julho de 2011 (com um período total de cerca de trinta dias).

3.2. Caracterização do processo de amostragem

Foram recrutadas para este estudo, após consentimento informado escrito dos pais ou adulto acompanhante, crianças entre os zero e os 16 anos admitidos nas consultas de pediatria, com sintomas de malária grave e com os critérios de inclusão abaixo indicados e com microscopia óptica positiva para malária. As crianças foram seguidas durante o internamento pelo médico investigador e pela equipa médica e de enfermagem do Hospital São José de Bor. O estudo foi aprovado pelo Comité Nacional de Ética na Saúde da Guiné-Bissau e pelo Comité de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT).

Os critérios de inclusão foram os seguintes: (1) admissão nas consultas de pediatria do Hospital São José de Bor durante os meses de Junho e Julho de 2011; (2) com diagnóstico clínico de malária grave, incluindo a forma cerebral, ou malária com necessidade de internamento por intolerância da via oral; (3) idade entre os zero e os 16 anos; (4) e presença de exame microscópico positivo para *Plasmodium* spp. O diagnóstico de malária grave foi feito pela avaliação clínica, avaliada pelo investigador ou por outro médico de serviço que recrutava a criança, com base nos critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) (OMS, 2000);

Por outro lado, os critérios de exclusão foram os seguintes: (1) crianças com diarreia e desidratação grave, (2) desnutrição grave, (3) pneumonia, (4) meningite, (5) encefalite, (6) tuberculose, (7) infecção VIH conhecida e (8) aquelas em que não se conseguiu o consentimento por parte dos pais ou adulto responsável (Tabela 6).

Foram vários os factores que condicionaram o recrutamento dos doentes para o estudo, nomeadamente: o horário diário disponibilizado pelo Laboratório Nacional de Saúde Pública (cerca de duas e meia) para a realização da avaliação analítica e posterior armazenamento das amostras no Projecto de Saúde de Bandim; a distância entre o Hospital São José de Bor e o Laboratório Nacional de Saúde pública.

Tabela 6: Critérios de inclusão e exclusão para o recrutamento dos pacientes no estudo.

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Admissão nas consultas de pediatria do Hospital São José de Bor durante os meses de Junho e Julho de 2011;	Crianças com diarreia e desidratação grave
Diagnóstico clínico de malária grave ou malária com necessidade de internamento por intolerância da via oral	Desnutrição grave
Idade entre os zero e os 16 anos	Pneumonia
Exame microscópico positivo para <i>Plasmodium</i>	Meningite
	Encefalite Tuberculose
	Infecção VIH conhecida
	Ausência de consentimento informado

3.3. Obtenção dos dados clínicos

3.3.1 Definição das variáveis

A avaliação do estado de consciência determinou-se pela Escala de Coma de Blantyre (Molyneux *et al.*, 1989), que é uma modificação da escala de coma de Glasgow. Nesta escala, a pontuação máxima obtida é de cinco, sendo indicador de alteração do estado de consciência um valor inferior a cinco e de coma profundo um valor igual ou inferior a dois. A prostração foi definida como a incapacidade da criança se manter sentada sem apoio (OMS, 2000).

O diagnóstico de anemia grave definiu-se pela presença de hemoglobina inferior a 5,0g/dl, anemia moderada, com uma hemoglobina igual ou superior a 5,0g/dl e menor ou igual a 7,9g/dl; anemia ligeira com valores de hemoglobina entre 8,0g/dl e 10,9g/dl e sem anemia, hemoglobina superior ou igual a 11,0g/dl (Varandas *et al.*, 2000).

A dificuldade respiratória foi definida pela presença de dispneia moderada (tiragem infra e intercostal), dispneia grave (adejo nasal, tiragem global, polipneia, uso dos músculos acessórios da respiração e cianose) ou respiração acidótica (respiração pausada e profunda) (OMS, 2000; Varandas, 2001).

O diagnóstico final de malária cerebral fundamentou-se na duração do estado de coma, igual ou superior a seis horas, sem se identificarem outras causas para o mesmo.

Outras formas de malária grave foram diagnosticadas com base na presença de, pelo menos, uma das manifestações clínicas propostas pela OMS (OMS, 2000). Considerou-se como febre, uma temperatura axilar superior a 37,5°C.

Fala-se de “episódio convulsivo observado” quando testemunhado pelo pessoal de saúde na urgência. A classificação da coloração das conjuntivas em coradas ou descoradas foi efectuada pelo médico de serviço.

Os sinais ou sintomas, antes da admissão, foram classificados em presentes, ausentes ou desconhecidos, com base no questionário efectuado aos pais ou acompanhante e a sua duração quantificada em dias. O tempo decorrido desde a última refeição ingerida pela criança antes da admissão foi quantificado em horas.

Para a determinação do peso das crianças foi utilizada uma balança digital com graduação de 1000g, com precisão de 100g e capacidade de 150 kg. As crianças foram pesadas vestindo roupas leves e descalças, permanecendo em ortostatismo no centro da balança, com os braços esticados ao lado do corpo e sem se movimentar (OMS, 1995).

A escolaridade da mãe foi classificada de zero a treze, em função dos anos escolares completos, sendo a classe treze atribuída a todas as mães com qualquer nível de escolaridade superior ao 12º ano.

No que diz respeito à habitação, o número de divisões da casa não incluiu a cozinha e a casa de banho. Considerou-se que havia água canalizada em casa, ainda que existisse somente num dos compartimentos da mesma.

Quando ocorreu administração prévia de medicação tradicional não se especificou qual o tipo de produto usado.

3.3.2 Formulário de recolha de dados

Para a recolha de dados usou-se um formulário no momento da admissão. O formulário incluía quatro componentes: (1) dados extraídos de registos efectuados em ambulatório (cartão de saúde infantil); (2) dados obtidos pela entrevista dos pais ou acompanhante (3) dados de testes laboratoriais e (4) dados de identificação do ensaio para todos os formulários.

3.4. Obtenção dos dados laboratoriais

Após colheita de quatro mililitros de sangue para tubos com heparina, feita pelos enfermeiros na admissão dos doentes, os procedimentos laboratoriais foram efectuados pelo técnico do laboratório do Hospital São José de Bor, onde foi avaliada a parasitemia em gota espessa de sangue periférico, corado pelo método de Giemsa, e pelos técnicos do Laboratório de Hematologia e Patologia Clínica do Laboratório Nacional de Saúde Pública da Guiné-Bissau, onde foram feitos o hemograma, o doseamento da glicemia e creatinina

sérica. O hemograma foi obtido através do equipamento *Orphee Mythic 18 Hematology Analyzer* (Diamond Diagnostics, EUA) .

Cada amostra foi examinada em cem campos microscópicos, com um aumento de oitocentas vezes, correspondendo a um volume de sangue cerca de 0,25 mm³. A densidade de formas assexuadas de *P. falciparum* foi expressa de forma semi-quantitativa pelo sistema de cruces na avaliação microscópica no Hospital de Bor, sendo: (+) um parasita/campo; (++) de dois a vinte parasitas/campo; (+++) de vinte e um a duzentos parasitas/campo; (++++) superior a duzentos parasitas/campo.

3.5. Tratamento, monitorização e critérios de alta

Todas as crianças receberam tratamento antimalárico, segundo o protocolo em vigor no Hospital São José de Bor. O esquema de tratamento antimalárico consistiu na administração de quinino intravenoso numa dose inicial de 20 mg/Kg, seguido de 10 mg/Kg, cada oito horas, num mínimo de cinco doses de quinino, seguido de terapêutica oral com derivados de artimisinina. A terapêutica antimalárica com quinino foi complementada com utilização de clindamicina 10 mg/Kg, duas vezes por dia em três doentes e em um doente também foi utilizado doxiciclina 3,5 mg/kg uma vez por dia.

O tratamento de suporte, com glicose, sangue, antipiréticos ou antibióticos foi administrado sempre que considerado necessário pelo médico assistente.

A monitorização durante o internamento incluiu a avaliação do estado de consciência, pela escala de coma de Blantyre, temperatura axilar, hemoglobina, densidade parasitária, terapêutica efectuada e registo de complicações.

Os critérios de alta foram os seguintes: (1) ausência de coma, (2) capacidade de se alimentar pela boca, (3) ausência de febre no mínimo durante 24 horas e (4) esquema de tratamento completo.

3.6. Tratamento e conservação das amostras

O armazenamento das alíquotas de sangue para o estudo foi realizado em tubo fechado, com identificação igual à constante no questionário correspondente, a -80°C no Projecto de Saúde de Bandim em Bissau, tendo sido transportado por avião em contentor refrigerado para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical, onde ficaram armazenados a -20°C .

Uma amostra de aproximadamente $100\ \mu\text{l}$ de sangue foi colhida, no momento da admissão e antes de iniciar o tratamento. O sangue foi colocado em papel de filtro, seco e mantido à temperatura ambiente, durante 24 horas. Após este período de tempo, os papéis de filtro foram acondicionados em invólucros de plástico individuais, mantidos em local seco e fresco e depois transportado para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), juntamente com as restantes alíquotas de sangue total, obtidas no momento da admissão do doente.

3.7. Microscopia óptica para a confirmação de malária

Foi feita uma nova avaliação da parasitemia em gota espessa de sangue periférico no IHMT, corado pelo método de Giemsa, para confirmação diagnóstica e aferição da observação no terreno, tendo, os resultados, sido dados em termos qualitativos (positivo para a presença dos parasitas e negativo perante a sua ausência).

3.8. Teste rápido para o diagnóstico da malária

Amostras de sangue total, obtidas individualmente de cada paciente, foram utilizadas para o diagnóstico de malária através do teste rápido OptiMAL-IT (Bio-Rad, EUA), gentilmente oferecido pela Dra. Marília Tavares (Bio-Rad, Portugal). O teste rápido baseia-se em um sistema imunocromatográfico que utiliza anticorpos monoclonais contra a enzima metabólica lactato desidrogenase parasitária (pLDH) de *Plasmodium* spp. Estes anticorpos monoclonais são classificados em dois grupos: o primeiro, específico para *P. falciparum*; e

o segundo anticorpo, multiespecífico que reage com as quatro espécies de *Plasmodium* spp (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, e *P. malariae*).

3.9. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Amostras de sangue de cada paciente foram impregnadas em papel de filtro (Whatman™, GE Healthcare – UK). DNA genômico de cada amostra de sangue foi purificado através do kit *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen – EUA). A seguir, as amostras foram submetidas a um ensaio de *nested PCR* (*Polymerase Chain Reaction*), de acordo com as condições de reacção apresentadas na tabela 7. Na primeira reacção de amplificação o par de *primers* utilizados apresentam especificidade para a sequência ribossomal específica para o género *Plasmodium* spp. Na segunda reacção de PCR, a utilizar uma alíquota da reacção anterior como *template*, quatro pares de *primers*, específicos para uma das quatro espécies de *Plasmodium* spp, foram utilizados. As sequências de cada *primers* e os produtos de amplificação de cada reacção são apresentados na tabela 8 (Doolan, 2002; Snounou *et al.*, 1993).

A mistura da reacção de PCR foi submetida ao termociclador (MJ Mini Gradiente Thermal Cycler, Bio-Rad – EUA), de acordo com as seguintes condições: (1) desnaturação (94°C por dois minutos); (2) etapa adicional de desnaturação (94°C por trinta segundos); (3) *annealing* (55°C por um minuto e trinta segundos); (4) extensão (72°C por dois minutos); (5) final da reacção (4°C). Cada ciclo foi repetido 40 vezes. A seguir, a amplificação das sequências de interesse foram analisadas em eletroforese em gel de agarose a 2% (v/v).

3.10. Tratamento das amostras de sangue para os ensaios imunoenzimáticos

Amostras de soro e plasma normalmente são utilizadas em ensaios imunoenzimáticos para a quantificação de componentes proteicos que constituem o sistema imunitário. Para este estudo, amostras de sangue total foram utilizadas para a quantificação de tais componentes. Assim sendo, amostras de sangue foram fraccionadas em tubos que posteriormente foram

centrifugados sob refrigeração a uma rotação de 10.000 rpm por 30 min. Posteriormente, o sobrenadante foi misturado na proporção de 1:1 (v/v) em solução de preservação (0,05 M de Tris-HCl pH 8,0 contendo 1 mM de cloreto de magnésio e 15 mM de azida sódica). A seguir, a mistura foi armazenada a -20°C até ao momento da utilização.

Tabela 7: Condições de reacção da nested PCR utilizada para amplificar sequências específicas de *Plasmodium* spp em amostras de sangue.

Constituintes (Bioline – UK)	Concentração	Volumes (µl)
Amostra de DNA genómico	-	3,0
<i>NH₄ buffer</i>	10x	5,0
Cloreto de Magnésio	50 mM	3,0
Mistura de dNTPs	100 mM	1,0
<i>Primers (sense e anti-sense)</i>	100 pmol/µl	1,0 cada
Enzima Taq polimerase	5 u/ µl	0,5
Água	q.b.p	50,0

Tabela 8: Sequências nucleotídicas (primers) utilizadas na nested PCR específicas para as espécies de *Plasmodium* spp.

Sequências dos primers*	Especificidade	Produto amplificado
5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3' 5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3'	<i>Plasmodium</i> spp	1.200 pb
5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3' 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3'	<i>P. falciparum</i>	205 pb
5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC-3' 5'-AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA-3'	<i>P. malariae</i>	144 pb

5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3' 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3'	<i>P. vivax</i>	120 pb
5'-ATCTCTTTTGCTATTTTTAGTATTGGAGA-3' 5'-GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG-3'	<i>P. ovale</i>	800 pb

*Os primers foram sintetizados pela companhia Thermo Scientific – Alemanha. Pb: pares de bases.

3.11. Determinação de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp

Anticorpos totais (IgG, IgM e IgA) anti-*Plasmodium* spp foram determinados pelo kit comercial Malaria EIA TEST Kit (Bio-Rad, EUA), gentilmente oferecido pela Dra. Marília Tavares (Bio-Rad, Portugal). Este sistema utiliza quatro antigénios recombinantes específicos para as quatro principais espécies de *Plasmodium* spp: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*. Assim, este kit permite detectar anticorpos em diferentes tipos e fases de infecção com *Plasmodium* spp. Resumidamente, adicionou-se 50µl/poço das amostras de sangue não diluídas, bem como dos controlos negativos e positivos. Incubou-se a placa durante 30 minutos a 37°C com agitação orbital. De seguida, lavou-se a placa cinco vezes com 100 µl/poço de tampão de lavagem e incubou-se a placa com o 50µl/poço de conjugado diluído 1:10 (v/v) em tampão de conjugado durante 30 minutos a 37°C com agitação orbital. Após os 30 minutos, lavou-se a placa cinco vezes com 100 µl/poço de tampão de lavagem. Adicionou-se 50 µl/poço de substrato/cromogénio e incubou-se à temperatura ambiente durante 30 minutos. Como o substrato é fotossensível, a placa é incubada, durante esses 30 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação com o substrato, adicionou-se 50 µl/poço de solução de STOP (ácido sulfúrico 0,5M). A leitura dos resultados foi feita num leitor de microplacas a 450 nm.

3.12. Determinação de subclasses e subtipos de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum*

Determinou-se a presença das subclasses (IgG e IgM) e subtipos (IgG1, IgG3, IgG4, IgE) de anticorpos específicos para *P. falciparum* nas amostras de sangue total dos pacientes com malária de acordo com o protocolo estabelecido por Medina, 2011. Resumidamente, extrato proteico total de *P. falciparum* 3D7, gentilmente oferecido pela Doutora Fátima Nogueira (Unidade de Parasitologia do IHMT/UNL), foi adsorvido (200 ng/poço) em placas de ELISA (Nunc – Dinamarca) em tampão bicarbonato 0,1M pH 8,5. Cada poço levou de volume 100 µl do extrato proteico na concentração final de 200 ng/ poço. Incubou-se a placa com antigénio, durante a noite a 4°C. Após incubação, lavou-se a placa três vezes, com 200 µl de tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05%) por poço, para a remoção do excesso de antigénio que não foi adsorvido à placa. De seguida, incubou-se a placa com 200 µl/poço de tampão de bloqueio (PBS-BSA 1%), durante uma hora à temperatura ambiente e com agitação orbital, com o objectivo de reduzir a ocorrência de ligações inespecíficas. Lavou-se a placa três vezes com 200 µl/poço, com tampão de lavagem. Após isto, incubou-se a placa com 100 µl/poço de diferentes concentrações das amostras de sangue diluídas em tampão de anticorpo (PBS-BSA 0,1%-Tween 0,05%), em duplicado, em diluições seriadas (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400), durante uma hora à temperatura ambiente, com agitação orbital. Esta incubação permitiu a ligação do anticorpo, presente na amostra, ao antigénio adsorvido à placa e as diluições seriadas permitiram identificar a melhor diluição das amostras de sangue a utilizar neste estudo. Após o período de incubação com as amostras de soros, a placa foi lavada cinco vezes com 200 µl de tampão de lavagem, com o objectivo de remover o excesso de anticorpos que não ficaram ligados ao antigénio adsorvido à placa. Para a detecção do anticorpo anti-*P. falciparum* a placa foi incubada com 100 µl/poço de diferentes anticorpos: anti-IgG conjugado com peroxidase (HRP) (1:4000) (AbD Serotec, UK), anti-IgM conjugado com fosfatase alcalina (AP) (1:4000) (Calbiochem – UK), anti-IgG1 conjugado com biotina (1:1000) (Sigma – EUA), anti-IgG3 conjugado com biotina (1:1000) (Sigma – EUA), anti-IgG4 conjugado com biotina (1:1000) (Sigma – EUA), e anti-IgE conjugado com HRP (1:4000) (AbD Serotec, UK); durante 1h à temperatura ambiente e com agitação

orbital. De seguida, fizeram-se cinco lavagens, cada uma com 200 µl/poço de tampão de lavagem, para remover o excesso de anticorpo conjugado que não ficou ligado ao anticorpo primário. Para revelar a presença do conjugado, antígeno-anticorpo primário-anticorpo secundário, para IgG incubou-se a placa com 100 µl/poço de solução de substrato (10 mL de tampão de citrato com 10 mg de OPD e 10 µl de peróxido de hidrogénio 30% v/v) durante 30 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A enzima HRP na presença de peróxido de hidrogénio que catalisa a reacção da *orto-phenylenediamine* (OPD), produzindo uma substância cromófora que absorve a 490 nm. Para parar a reacção, utilizou-se o ácido sulfúrico 4N, que vai inibir a atividade da enzima através da desnaturação pela variação do pH. Para revelar a presença de IgM incubou-se a placa com 100 µl/poço de solução de substrato p-nitrofenil-fosfatase na concentração de 1 µg/ml diluído em tampão dietanolamina 10%, produzindo uma substância cromófora que absorve a 415 nm. Para a reacção com biotina, o procedimento foi desenvolvido de acordo com as informações do fabricante (Sigma – EUA). Os resultados de reactividade foram analisados em função da densidade óptica obtida por cada amostra e em cada sistema colorimétrico.

3.13. Determinação das proteínas solúveis C5a e CRP nas amostras de sangue

As proteínas solúveis C5a e CRP foram determinadas nas amostras de sangue total através dos kits comerciais *DuoSet ELISA* (R&D Systems – EUA). O kit baseia-se na reacção imunoenzimática (ELISA), onde as proteínas recombinantes C5a e CRP são utilizadas na elaboração de uma curva padrão expressa em pg/mL. Resumidamente, as amostras de sangue são submetidas à placa de ELISA, posteriormente tratada com anticorpos monoclonais anti-C5a ou anti-CRP. As proteínas C5a e CRP presentes nas amostras de sangue são “capturadas” pelos anticorpos específicos anti-C5a e anti-CRP, respectivamente, anteriormente adsorvidos à placa. Após a lavagem, anticorpos anti-C5a e anti-CRP, agora conjugados com biotina são utilizados a seguir. Formando assim o sistema de ELISA conhecido por *ELISA-Sandwich*. Posteriormente, adiciona-se à reacção estreptavidina e a seguir a última lavagem o substrato específico para cada tipo de reacção.

Determinou-se uma curva padrão para cada proteína a quantificar e os resultados das amostras foram obtidas em pg/mL para ambas as proteínas C5a e CRP.

3.14. Determinação de óxido nítrico

O reagente de Griess é um sistema de detecção que pode quantificar nitrito em quantidades variáveis de líquidos biológicos e é amplamente utilizado como um meio indirecto de medir a formação de óxido nítrico (NO) em fluídos biológicos (Bredt e Snyder, 1994). Neste trabalho, a determinação de NO foi executada por este sistema e utilizando o método de Griess comercialmente disponível (*Griess Reagent System*, Promega – EUA).

Resumidamente, a curva de calibração é feita a partir de uma solução aquosa de nitrito 100 μ M que será utilizada para quantificação de NO nas amostras de sangue através da medição da absorbância analisada a um comprimento de onda de 570 nm (*Microplate Reader*, Bio-Rad – EUA).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão foram recrutadas para o estudo treze crianças, tendo para a fase final do mesmo, sido considerados apenas doze crianças, por desaparecimento da amostra de sangue de um dos doentes após o seu armazenamento em Bissau.

4.1. Características sociodemográficas

Dos doentes recrutados para o estudo, 66,6% (n=8), eram oriundos do Sector Autónomo de Bissau e os restantes eram oriundos da região de Biombo.

A mediana do tamanho do agregado familiar era de oito elementos, sendo a mediana do número de crianças nos agregados de três e meio. As casas eram constituídas por uma mediana de quatro divisões, em que a maioria, 83,3% (n=10), não dispunha de água canalizada. Dos doentes observados, 83,3% (n=10) referiram usar redes mosquiteiras para prevenção da malária mas apenas 17% (n=2) referiu usar insecticidas em casa.

No que diz respeito à escolaridade materna, esta era desconhecida em metade dos casos, tendo como mediana seis anos e meio nos casos conhecidos (mín. 2 anos; máx. 11 anos).

Verificou-se que a totalidade das crianças fez aleitamento materno no primeiro ano de vida mas apenas 33,3% dos casos (n=4) tinham documentado o cumprimento do programa nacional de vacinação. Os dados acima apresentados, com as características sociodemográficas dos participantes no estudo, podem ser consultados nas tabelas 9 e 10.

Existem diversos estudos (Stefani *et al.*, 2011; Ouattara *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2007) que associam o aparecimento dos casos de malária com factores socioeconómicos, geográficos e étnicos, embora muitos resultados e a forma da sua medição sejam contraditórios e questionáveis (Barat *et al.*, 2004; Worrall *et al.*, 2005).

Tabela 9: Características sociodemográficas das crianças hospitalizadas no âmbito do estudo.

Doentes	Morada (Região)	Escolaridade da mãe	Cartão de saúde	Vacinação atualizada	Aleitamento materno no 1ºano de vida
A01	Biombo	2	Não	Não	Sim
A02	Bissau	4	Sim	Sim	Sim
A03	Biombo	ND	Sim	Não	Sim
A05	Bissau	11	Sim	Sim	Sim
A06	Bissau	11	Não	Não	Sim
A07	Biombo	ND	Não	Não	Sim
A08	Biombo	ND	Não	ND	Sim
A09	Bissau	ND	Não	Sim	Sim
A10	Bissau	2	Não	ND	Sim
A11	Bissau	ND	Sim	Sim	Sim
A12	Bissau	ND	Não	ND	Sim
A13	Bissau	9	Não	ND	Sim

ND: Não documentado

Neste estudo, a maioria dos doentes eram residentes no Sector Autónomo de Bissau e na Região de Biombo, facto que poderá ser explicado pela maior proximidade ao hospital e facilidade de acesso das populações destas regiões administrativas do país ao contrário do que acontece com muitos doentes de outras regiões que, por insuficiência económica e logística, não conseguem aceder aos cuidados de saúde.

As redes mosquiteiras são utilizadas numa grande percentagem dos casos estudados, facto que poderá estar relacionado com a distribuição de redes mosquiteiras que tem sido efectuado nos últimos anos na Guiné-Bissau, como parte de programas de redução de malária, tanto de instituições governamentais, como de diferentes projectos e organizações não-governamentais e ainda pelas diversas campanhas de sensibilização nos meios de

comunicação social e nas escolas. As redes mosquiteiras impregnadas são instrumentos eficazes, que contribuem para a redução dos casos e da mortalidade associada à malária nos mais diversos países, principalmente nas crianças (Lengeler, 2004). No entanto, torna-se necessário perceber se a sua utilização é feita de forma correcta e mantida, nomeadamente nos diferentes grupos etários.

Tabela 10: Características sociodemográficas das crianças hospitalizadas no âmbito do estudo.

Doentes	Nº de divisões da casa	Tamanho do agregado	Nº de crianças no agregado	Água canalizada	Uso de rede mosquiteira	Uso de insecticida
A01	1	4	2	Não	Não	Não
A02	ND	12	8	Não	Sim	Sim
A03	ND	7	4	Não	Não	Não
A05	3	5	1	Sim	Sim	Não
A06	5	9	2	Não	Sim	Sim
A07	5	9	6	Não	Sim	ND
A08	4	12	10	Não	Sim	Não
A09	3	5	3	Não	Sim	Não
A10	3	7	5	Sim	Sim	Não
A11	8	10	5	Não	Sim	Não
A12	4	6	3	Não	Sim	Não
A13	8	9	2	Não	Sim	Não

ND: Não documentado

O baixo grau de escolaridade, associado ao baixo nível sócio-económico, foi associado em outros países, como estando associados a um pior conhecimento e reconhecimento precoce da malária e às formas de a prevenir (Ouattara *et al.*, 2011; Yewhalaw *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2007). Na nossa amostra verifica-se o desconhecimento, em muitos casos, dos anos

de escolaridade materna. Este facto pode ser explicado, em algumas situações, pelo facto de ser o pai ou outro adulto responsável o acompanhante da criança à consulta e por outro lado por parecer não se dar importância à escolaridade materna mesmo por parte das mães.

Verifica-se na nossa amostra um baixo nível socioeconómico, caracterizado por grandes agregados familiares, vivendo em habitações com poucas divisões, sem água canalizada na sua maioria e com mães com um baixo nível de escolaridade.

Apesar do tamanho reduzido da amostra, estes dados parecem sugerir que o reforço da educação e do desenvolvimento socioeconómico, poderão contribuir para a redução da morbilidade e mortalidade por malária.

4.2 Caracterização clínica da população estudada

Os dados clínicos dos pacientes estudados, estão resumidos nas tabelas 11, 12 e 13. A mediana de idades das crianças internadas no âmbito deste trabalho foi de cinco anos (mínimo 2 anos; máximo 14 anos), com uma predominância do sexo feminino, representando 58% dos doentes (n=7), sendo que 83,3% (n=10) tinham um peso inferior ao percentil 50 para a idade, de acordo com a tabela de percentis da OMS para crianças até aos cinco anos e pela tabela do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) para crianças acima dos cinco anos.

A duração dos sintomas antes do internamento teve uma mediana de dois dias, sendo que a duração da doença igual ou superior a sete dias, geralmente com febre, verificou-se em 16,6% (n=2). Os sinais e sintomas encontrados mais frequentemente foram a febre e a prostração, presente em 100% das crianças, seguido de dificuldade na alimentação presente em 91,6% (n=11) dos casos e de cefaleias e dores articulares, presentes em 66,6% (n=8). Os vómitos foram encontrados em 58,3% (n=7) dos casos (Tabela 11).

Apenas 16,6% (n=2) dos doentes refere ter tomado alguma medicação antes de se dirigirem ao hospital e nenhum dos pacientes fez tomas de antimaláricos ou outros medicamentos tradicionais. A quase totalidade dos doentes da amostra estudada, 91,6% (n=11) teve alta clinicamente melhorado, após tratamento completo, tendo-se verificado um óbito (paciente A3) nas primeiras 24h de internamento, apesar de duas tomas de quinino endovenoso.

Tabela 11: Características clínicas pré-hospitalização.

	n	Prevalência (%)	Média (dias)	Mediana (dias)
Duração da doença (em dias)	12		3,1	2 (1-8)
História de febre	12	12 (100)		
Duração da febre (em dias)	12		3,1	(1-8)
História de vômitos	12	7 (58,3)		
Duração dos vômitos (em dias)			2,5	2 (1-6)
Tempo decorrido desde a última refeição (em horas)	12		9	8 (1-16)
História de convulsões	12	2(16,6)		
Tempo decorrido desde a primeira convulsão (em dias)			1	1
História de perda de consciência	12	3(25)		
Tempo decorrido desde a perda de consciência (em dias)			1	1
História de cefaleias	12	8 (66,6%)		
História de dores articulares	12	8 (66,6%)		
História de diarreia	12	3(25)		
Duração da diarreia (em dias)			1,3	1,5 (1-2)
História de tosse	12	2 (16,6%)		
Duração da tosse (em dias)			4	4(1-7)
Toma anterior de medicação	12	2 (16,6%)		
Toma de antipirético	12	2 (16,6%)		

Tabela 12: Características clínicas na admissão das crianças com malária grave.

Nº Paciente	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Percentil de peso (OMS ≤ 5 anos) ou CDC (≥ 5anos)
A01	M	13	31	<p3
A02	M	5	20	p50-85
A03	F	3	11	p3
A05	M	2	12	p15-50
A06	F	5	15	p3-15
A07	M	9	19	<p3
A08	F	8	20	p3-10
A09	M	11	27	p3-p10
A10	F	14	37	p3
A11	F	3	15	p50-85
A12	F	4	15	p15-50
A13	F	4	14	p15

M-Masculino; F-Feminino

A malária continuam a afectar anualmente um número importante de pessoas no mundo. Trata-se de uma doença multissistémica, cuja forma de apresentação clínica é variável, existindo diferenças entre os adultos e as crianças nas suas diversas manifestações clínicas. Os critérios clínicos e laboratoriais que permitem a classificação de malária grave, foram definidos pela OMS em 1990 e revistos em 2000 (OMS, 1990 e 2000).

As frequências observadas dos diferentes sinais e sintomas na nossa amostra vão de encontro às descritas na literatura (OMS 1990 e 2000; Crawley *et al.*, 2010; Laishram *et al.*, 2012). Os sintomas mais vezes referidos são, de uma forma geral, inespecíficos e incluem, entre outros e, numa percentagem variável, febre, vómitos, mal-estar, dores articulares, entre outros, que podem facilmente estar associados a outros quadros clínicos, sendo importante manter elevado grau de suspeição.

Tabela 13: Características clínicas na admissão das crianças com malária grave.

	Número de indivíduos (n)	Prevalência (%)
Diagnóstico de malária cerebral	12	1 (8,3%)
Dispneia	12	6(50)
Ausente		6(50)
Ligeira		3 (25)
Moderada		3 (25)
Respiração acidótica	12	2(16,6)
Fervores pulmonares	12	2(16,6)
Convulsões	12	3 (25)
Coloração das conjuntivas:	12	
Coradas		5
Descoradas		7
Prostração	12	12(100)
Desidratação	12	8 (66,6)
Icterícia	12	7(58,3)

No que diz respeito à duração entre o aparecimento dos sintomas e a procura do Hospital, podem ser feitas várias considerações. Por um lado, poderá ser explicado pela gravidade do quadro clínico, com instalação súbita e com necessidade de procura urgente de ajuda médica e por outro lado com a facilidade de acesso, com custos reduzidos, dos cuidados de saúde fornecidos pelo Hospital de Bor a estas populações.

Apenas 16,6% dos doentes fizeram alguma medicação antes da ida ao Hospital. Este facto pode ser interpretado de forma positiva pela não procura prévia de antipalúdicos e medicamentos tradicionais antes da observação por médico, mas por outro lado verificou-se

que não foram utilizados antipiréticos para controlo da febre, o que aumenta o mal-estar da criança e o pior estado geral à altura da observação.

Os dados sugerem a importância que a educação para a saúde poderá ter nestas populações, travando a utilização abusiva e sem prescrição médica de antimaláricos, que contribui para o aumento de resistências, mas por outro lado a importância da utilização de antipiréticos por exemplo, na melhoria do bem-estar das crianças antes do acesso ao hospital.

4.3. Caracterização laboratorial da população estudada

Verificou-se a presença da anemia na totalidade dos doentes da amostra, sendo grave em 8,3% (n=1), moderada em 50% (n=6) e ligeira em 41,6 % (n=5). Destes doentes, quatro necessitaram de transfusão sanguínea (tabela 14). A trombocitopenia esteve presente em 66,6% (n=8) dos casos e a leucocitose foi observada em 8,3% (n=1). A hipoglicemia foi observada em 16,6% (n=2) dos doentes da amostra. Não se registaram casos de insuficiência renal aguda na amostra estudada.

Os dados acima referidos podem ser observados na tabela 14.

Em áreas de alta transmissão da doença, a anemia é a principal manifestação da malária grave e ocorre principalmente em crianças com menos de três anos de idade (OMS, 2000), sendo que a sua natureza é multifactorial (Biamba *et al.*, 2000). Foi observada na totalidade dos doentes da amostra, podendo estar associada à malária ou ser de natureza multifactorial. Um dos problemas verificados e que limitou em alguns casos a realização de transfusões sanguíneas em doentes com critérios para tal, é a ausência de um Banco de Sangue tanto no Hospital como a nível nacional, que dê garantias de qualidade para a realização de transfusões de derivados de sangue.

A trombocitopenia também é um parâmetro hematológico observado em doentes com malária grave (Trampuz *et al.*, 2003), estando presente na grande maioria das amostras deste estudo, o que já foi observado em outros trabalhos (Maina *et al.*, 2010; Gérardin *et al.*, 2002).

Tabela 14: Resultados da avaliação laboratorial dos pacientes do estudo na admissão.

ID	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (cels/uL)	Plaquetas (cels/uL)	Glicémia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
A01	5.4	17.3	9600	71000	118	0.6
A02	6.4	21.0	7400	96000	86	1.2
A03	2.7	8.9	17800	49000	10	0.8
A05	6.4	19.9	5300	22000	70	0.4
A06	10.8	34.2	7500	186000	74	0.5
A07	10.2	32.4	11600	55000	69	0.5
A08	6.2	20.6	9600	77000	88	0.7
A09	9.5	30.1	11800	70000	100	0.3
A10	10.5	34.1	8900	103000	118	0.9
A11	7.7	25.2	13400	233000	37	1.0
A12	9.6	31.0	12300	312000	142	0.5
A13	7.5	24.6	14300	91000	89	0.2

ID: Identificação dos doentes

A hipoglicemia é outra complicação frequente da malária grave, sendo a sua natureza também multifactorial e associada a pior prognóstico da doença (Ogetii *et al.*, 2010). Num dos doentes da amostra em estudo, a hipoglicemia verificada de 10 mg/dL, poderá ter contribuído para a sua morte, apesar da terapêutica com soro glicosado. Este facto chama a atenção para a necessidade de haver métodos rápidos de detecção e correcção atempada da hipoglicemia em todos os hospitais que atendam doentes com malária.

A leucocitose é, frequentemente, observada na malária grave, mesmo sem sobreinfecção bacteriana (OMS, 2000), o que não se verificou neste trabalho ao contrário de outros estudos (Maina *et al.*, 2010; Ladhani *et al.*, 2002)

A insuficiência renal, que é uma complicação comum nos adultos com malária grave, é rara na idade pediátrica (Crawley *et al.*, 2010) e não se verificou em nenhum dos doentes deste estudo.

4.4. Malária grave

A totalidade dos doentes recrutados para este estudo cumpria os critérios de malária grave, apresentando-se com prostração em 100% dos casos (n=12), icterícia em 58,3% (n=7) e dispneia em 50% (n=6). Verificou-se apenas um caso de malária cerebral e não se observaram doentes com hemorragias espontâneas, colapso circulatório ou insuficiência renal aguda. Os restantes resultados são apresentados na tabela 15.

A prostração, que é uma forma de apresentação frequente da malária grave (OMS, 2000), foi observado na totalidade dos doentes desta amostra.

A malária cerebral é a manifestação clínica de malária grave mais temível, sendo definida pela incapacidade na localização de estímulos dolorosos (OMS, 2000) e está associada a alterações do estado de consciência e algumas vezes a convulsões e coma.

A icterícia, que é uma forma de apresentação pouco usual em crianças pequenas (OMS, 2000), foi das formas de apresentação mais frequentes dos doentes desta amostra. A icterícia resulta, geralmente, da hemólise severa ou do envolvimento hepático na doença (Bhalla *et al.*, 2006).

A dispneia e a respiração acidótica são formas de apresentação conhecidas da malária grave e a sua presença é um factor de mau prognóstico (Marsh, 1995).

Tabela 15: Manifestações clínicas dos doentes com malária grave.

	Número de indivíduos (n)	Prevalência N (%)
Malária cerebral	12	1 (8,3)
Anemia grave	12	1 (8,3)
Dispneia	12	6 (50)
Respiração acidótica	12	2 (16,6)
Duas ou mais convulsões no espaço de 24h	12	2 (16,6)
Prostração	12	12 (100)
Alteração do estado de consciência à entrada e 1h depois	12	1 (100)
Insuficiência renal	12	0 (0)
Hipoglicemia	12	2 (16,6)
Icterícia	12	7 (58,3)

4.5. Microscopia óptica para o diagnóstico da malária

Das doze amostras consideradas como positivas por microscopia óptica (MO) em Bissau, onze foram consideradas positivas na avaliação por MO no IHMT, sendo a amostra do paciente A11 sido considerada negativa (tabela 16). Este resultado discordante com o verificado por MO em Bissau e posteriormente por PCR e teste rápido para o diagnóstico de malária, poderá ser explicado pela diminuição da qualidade da amostra de sangue total analisada no IHMT, submetida a vários processos de descongelamento, com provável hemólise.

Neste estudo, não foi possível quantificar a carga parasitária, pela insuficiente qualidade da amostra na tentativa da sua avaliação no IHMT.

Tabela 16: Diagnóstico laboratorial da malária por microscopia óptica (por gota espessa)

Pacientes	Microscopia óptica Hospital de Bor	Microscopia óptica IHMT
A1	++++	+
A2	+++	+
A3	++++	+
A5	++++	+
A6	+++	+
A7	+++	+
A8	+++	+
A9	+++	+
A10	+++	+
A11	++	-
A12	++	+
A13	+++	+

Resultados semi-quantitativos do Hospital de Bor: (+) um parasita/campo; (++) de dois a vinte parasitas/campo; (+++) de vinte e um a duzentos parasitas/campo; (++++) superior a duzentos parasitas/campo. Os resultados do IHMT são qualitativos: (+) positivo; (-) negativo

4.6. Teste rápido para o diagnóstico laboratorial da malária

Os testes rápidos têm sido cada vez mais utilizados no diagnóstico da malária, principalmente nos países em vias de desenvolvimento, pela sua fácil execução e por apresentar boa sensibilidade e especificidade (OMS 2010), o que poderá contribuir para a melhoria do tratamento da malária e a redução da sua morbidade e mortalidade (Wongsrichanalai *et al.*, 2007).

Das doze amostras em cujo teste foi aplicado, onze revelaram-se claramente positivas, à exceção da amostra A11 que é fracamente positiva (Figura 4). Mais uma vez, este resultado poderá ser explicado pela pouca qualidade da amostra de sangue total analisada já no IHMT, submetida a vários processos de descongelação. O teste foi aplicado igualmente a um grupo controlo, para sua aferição.

As amostras do grupo de controlo foram obtidas na Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos do Hospital de Dona Estefânia. A amostra A foi obtida de uma criança de dez anos, internada por um abscesso hepático por *Staphylococcus aureus*, com necessidade de antibioticoterapia de largo espectro e duas cirurgias com lobectomia. A amostra B é de uma criança de 17 meses, internada por uma romboencefalite por Enterovírus 71, sob ventilação mecânica invasiva e, finalmente, a amostra C é de uma criança de 10 meses, internada por um quadro de bronquiolite hipoxemiante e necessidade de suporte ventilatório não invasivo.

Estes resultados vêm confirmar a importância que os testes rápidos podem adquirir em países em vias de desenvolvimento, como a Guiné-Bissau, podendo contribuir para o aumento da acuidade diagnóstica, em complementaridade com a microscopia óptica clássica, melhorando, assim, os cuidados prestados a estes doentes

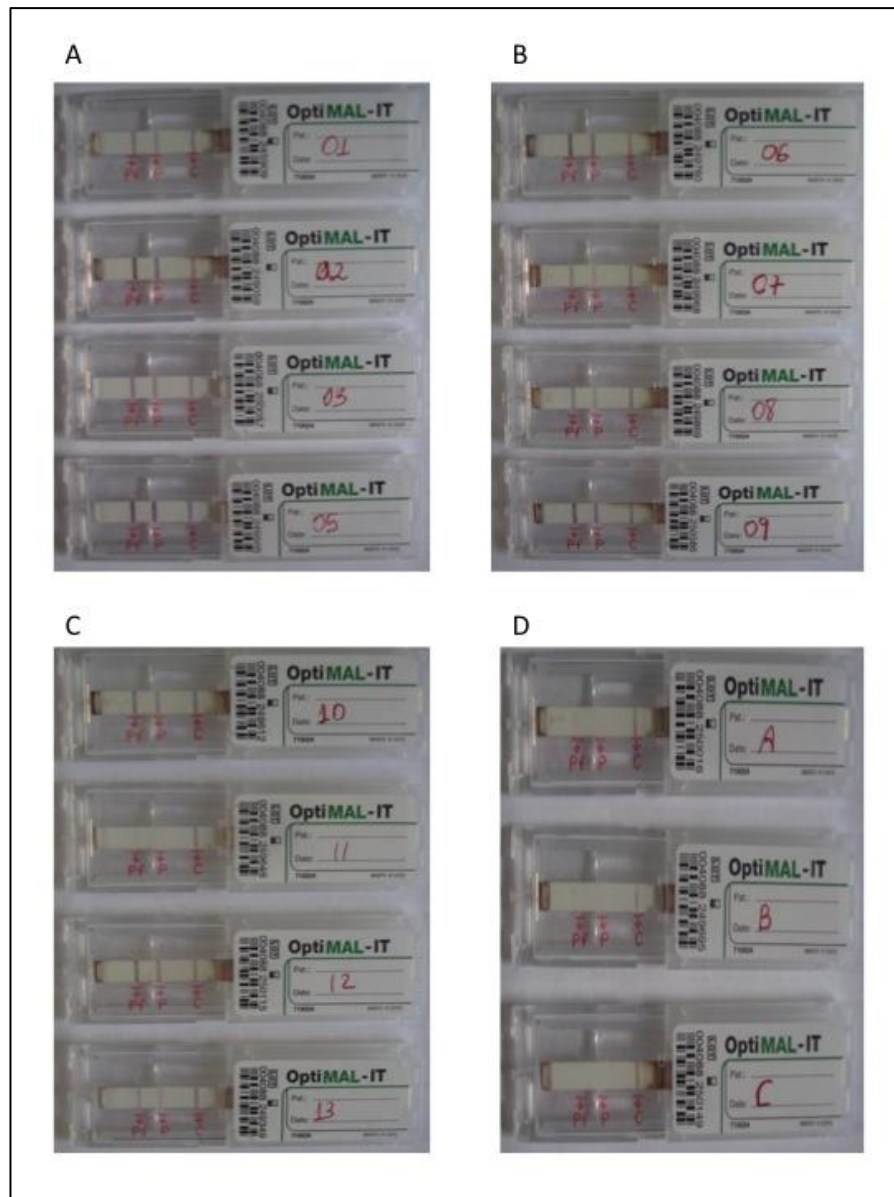


Figura 4 : Resultado do teste rápido para malária. Figuras A, B, C grupo dos pacientes com malária; Legendas (A, B, C) grupo experimental e (Figura D grupo de pacientes sem história de malária. Dados obtidos a partir do Kit OptiMAL-IT (Bio-Rad).

4.7. PCR no diagnóstico da malária

A PCR é um método sensível e específico para a detecção do genoma do *Plasmodium*, o que permite a confirmação da doença, o diagnóstico de infecções, a detecção de casos assintomáticos e a triagem de sangue de doadores de sangue (Barker *et al.*, 1994; Kitchen e Chiodini, 2006), sendo um método cada vez mais útil na confirmação do diagnóstico de malária, principalmente em casos duvidosos (Johnston *et al.*, 2006).

Das doze amostras avaliadas, todas foram positivas para *Plasmodium* spp., utilizando primers específicos para o gênero *Plasmodium*, amplificando um fragmento de 1200 pares de base (Pb) e espécie *P. falciparum*, utilizando primers específicos para a espécie, amplificando um fragmento de 205pb como pode ser observado na figura 5.

Estes resultados vêm confirmar a positividade de todas as amostras utilizadas no estudo para *P. falciparum*, o que vai de encontro à observação por microscopia óptica inicial no Hospital de Bor e depois confirmada com o teste rápido de malária. No entanto, dada a maior sensibilidade e especificidade da PCR, conclui-se que a totalidade das amostras são positivas. Estes resultados foram confrontados com os dados obtidos do grupo controle, constituído de três amostras de sangue de pacientes sem história clínica de malária (pacientes com identificação A, B, C) (resultados não apresentados).

A tabela 17 apresenta de forma resumida os principais resultados apresentados no diagnóstico laboratorial da malária nos pacientes estudados.

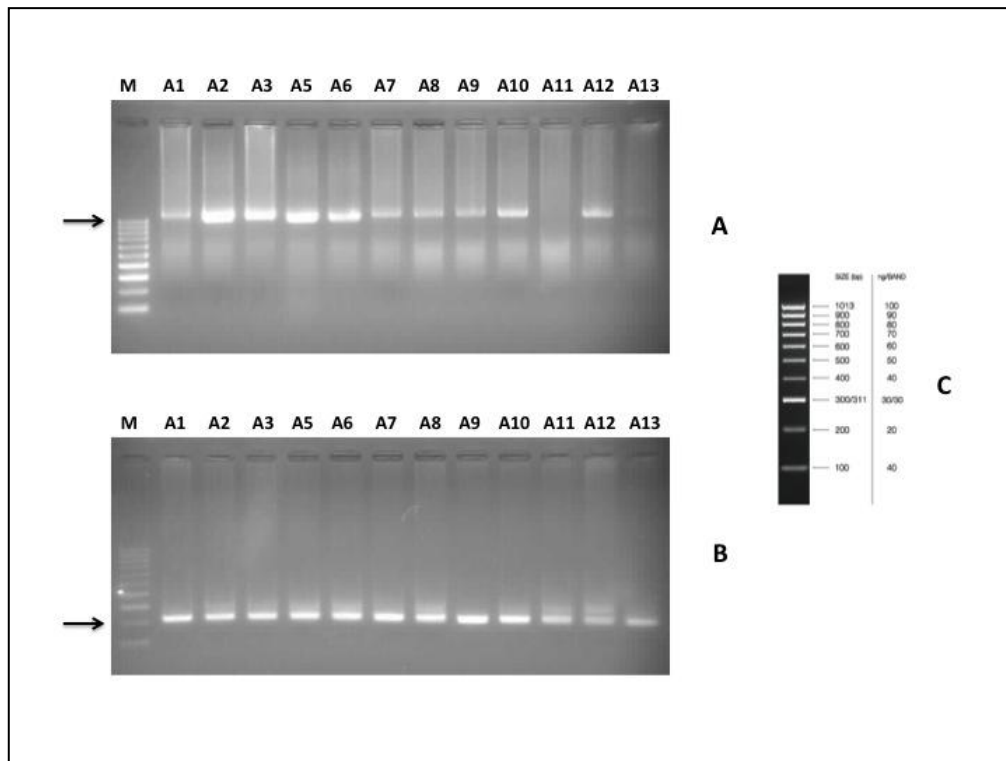


Figura 5: Resultado da PCR para o diagnóstico da malária. Figura A: PCR para o género *Plasmodium* spp.; Figura B: PCR confirmatório para *P. falciparum*; Figura C: Representação dos marcadores moleculares utilizados para a identificação dos tamanhos dos fragmentos amplificados. Resultados analisados em Agarose a 2,0% (m/v)

Tabela 17: Resumo dos métodos de diagnóstico utilizados neste estudo.

ID	MO (Hospital Bor)	MO (IHMT)	Teste rápido	PCR <i>P. falciparum</i>
A01	+	+	+	+
A02	+	+	+	+
A03	+	+	+	+
A05	+	+	+	+
A06	+	+	+	+
A07	+	+	+	+
A08	+	+	+	+
A09	+	+	+	+
A10	+	+	+	+
A11	+	-	+/-	+
A12	+	+	+	+
A13	+	+	+	+

Legenda: ID – identificação dos pacientes; MO – microscopia óptica; (+) Positivo; (-) negativo; (+/-) fracamente positivo

4.8. Determinação de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp

A imunidade humoral é parte integrante da resposta do hospedeiro contra o parasita, contribuindo para o controlo da doença. A especificidade aos antígenos tanto por parte dos anticorpos protectores, como das células T CD4⁺, que suportam a geração de anticorpos protectores, continuam pouco claras (Tran *et al.*, 2012).

Na figura 6 observa-se o resultado da pesquisa de anticorpos totais (IgG, IgM e IgA) específicos para *Plasmodium* spp. Os resultados de reactividade serológica de cada paciente para *Plasmodium* spp, apresentados na figura 6, estão expressos como a razão da densidade óptica (DO) obtida pela reacção imunoenzimática, em função dos valores de *cut-off*

(definidos pelo ensaio). Os resultados dos pacientes com malária foram comparados com os controlos internos do ensaio e com as amostras de sangue obtidas dos pacientes controlos e sem história clínica de malária.

Da amostra estudada, 58,3% (n=7) revelaram presença de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp., com valores da relação DO/cut-off superior a uma unidade (Figura 6).

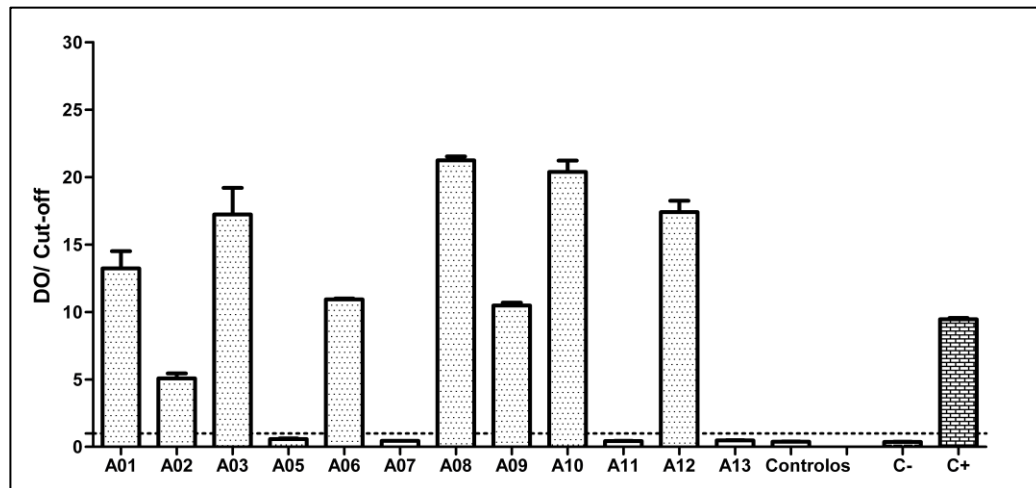


Figura 6: Pesquisa de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp dos pacientes com malária. (C+) controlo positivo; (C-) controlo negativo; (Controlos) pool de amostras de indivíduos sem história clínica de malária.

As amostras A01, A03, A06, A08, A09, A10 e A12 apresentam elevadas reactividades serológicas para *Plasmodium* spp, quando comparadas com o controlo positivo do ensaio. De salientar que os pacientes A01, A03, A06, A08, A10 apresentavam números elevados de parasitas por campo de grande aumento na microscopia óptica inicial realizada no Hospital de Bor (Tabela 16). Por outro lado, o paciente A02 é serologicamente positivo para *Plasmodium* spp mesmo com resultados inferiores ao controlo positivo. A carga parasitária deste paciente era alta, como pode ser observado na tabela 16 mas apresentava apenas um dia de doença. As amostras A05, A07, A11 e A13 não apresentaram reactividade serológica positiva para *Plasmodium* spp, tendo sido consideradas negativas. No entanto, estas amostras apresentavam quase todas valores igualmente altos valores de carga parasitária (Tabela 16), o que não permite especular sobre a relação do número de parasitas

e a maior ou menor resposta humoral nesta amostra. Por outro lado, estes dados podem sugerir o tempo em que estes pacientes estão infectados com o parasita da malária e a fase de activação da resposta imune humoral da infecção.

Verifica-se que as amostras com reactividade serológica positiva para *Plasmodium* spp são de crianças com uma média etária de 9,4 anos, enquanto que a média etária das crianças com resultados negativos são de 4,5 anos, podendo-se especular com a maior aquisição de resposta humoral à medida que as crianças vão crescendo e vão tendo contacto com a doença. Não parece haver relação, neste estudo, entre a presença de anticorpos anti-*Plasmodium* spp. e a gravidade da doença.

4.9. Determinação de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum*

Determinou-se a presença das subclasses de anticorpos IgG e IgM, específicos para a espécie de *Plasmodium Falciparum*, nas amostras de sangue dos pacientes com malária.

Os resultados foram expressos em função da densidade óptica, quando comparados com os grupos controlo, que resultou de uma média de cinco controlos de indivíduos sem história clínica de malária. Considerou-se uma reactividade serologicamente positiva para *P. falciparum* as amostras com resultados superiores a uma unidade. Por outro lado, as amostras com valores iguais ou superiores a uma unidade foram consideradas negativas (Figuras 7 e 8).

Na figura 7 observa-se o resultado da resposta de anticorpos IgM anti-*P. falciparum* e na figura 8 a resposta de anticorpos IgG anti-*P. falciparum*.

Os dados existentes no que diz respeito ao papel e perfil de resposta IgM na malária continuam a ser contraditórios (Branch *et al.*, 1998; Boudin *et al.*, 1993; Czajkowsky *et al.*, 2010). No nosso estudo, e no que diz respeito à resposta IgM específica para *P. falciparum*, verificou-se que, à excepção do paciente A02, todos os restantes apresentavam um aumento deste tipo de resposta aguda à infecção, sendo que, no caso dos pacientes A03, A06, A08, A09, A10 e A13, os valores são pelo menos duas vezes superiores ao apresentado no grupo controlo.

A média etária dos doentes que apresentavam valores de resposta IgM anti-*P. falciparum* duas vezes maior que o controlo é de 7,5 anos e dos que apresentavam valores superiores ao controlo mas inferiores a duas vezes é de 6,75 anos, não se verificando diferenças significativas entre os dois grupos, ao contrário do encontrado por Nmorsi *et al.* (2008) num estudo com crianças nigerianas, onde havia uma correlação negativa entre o nível de resposta IgM anti- *P. falciparum* e a idade das crianças ou por Richards *et al.* (2010), num estudo realizado na Papua Nova Guiné, em que a resposta média IgM era maior em crianças mais velhas.

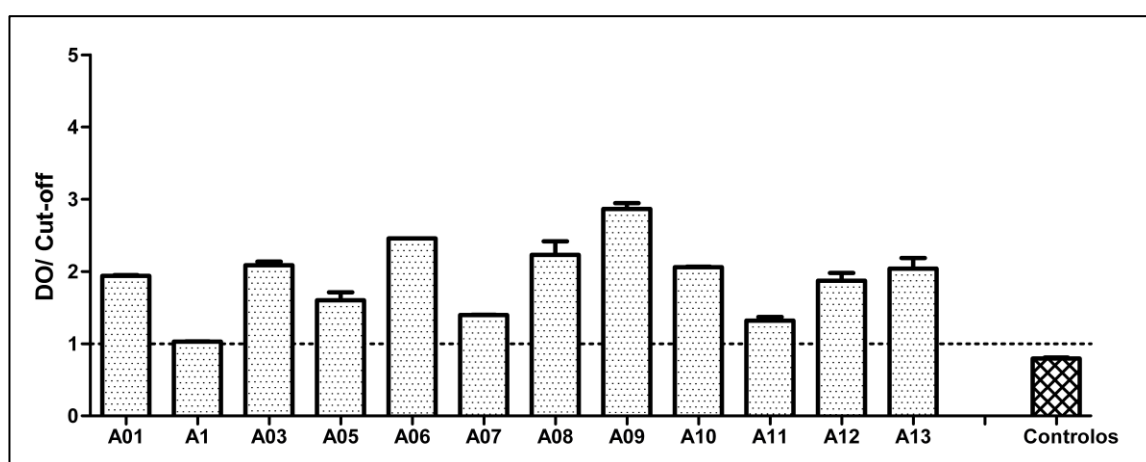


Figura 7: Avaliação da presença de anticorpos IgM anti-*Plasmodium falciparum* em pacientes com malária.

Não se verificam diferenças entre a média dos dias de duração da doença entre o grupo de pacientes com valores superiores a duas vezes o controlo (3,3 dias) e o grupo de pacientes com valores inferiores a duas vezes o controlo (3,75 dias).

Serão necessários mais estudos para ajudar a perceber o perfil de resposta IgM anti-*P. falciparum* nos diferentes grupos etários e a sua comparação com outros doentes com malária não grave e crianças saudáveis.

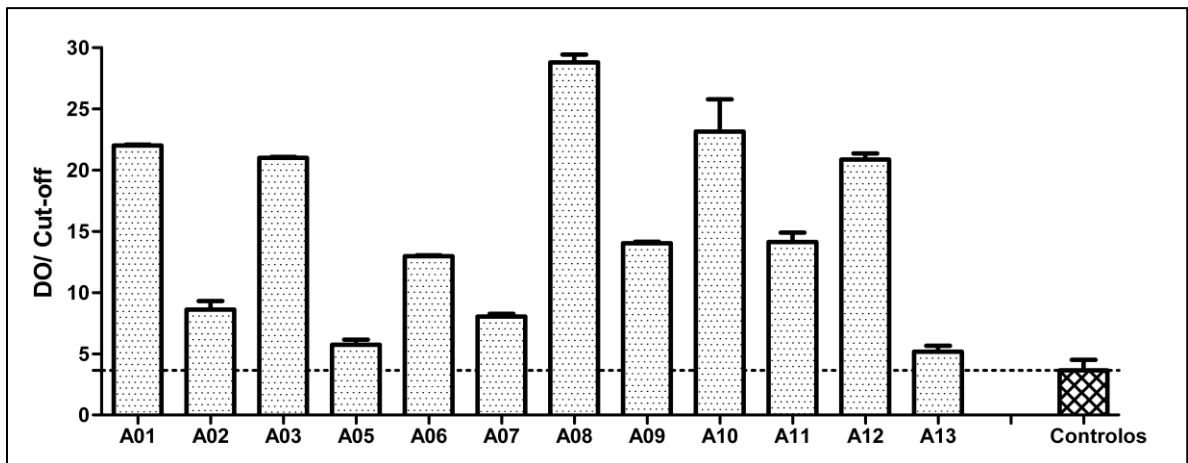


Figura 8: IgG total anti-*Plasmodium falciparum* em amostras de doentes com malária

No que diz respeito ao perfil de resposta humoral por IgG, observa-se que todos os doentes apresentavam respostas superiores aos controlos, sendo que os pacientes A01, A03, A06, A08, A09, A11 e A12 apresentam respostas francamente positivas, como pode ser observado na figura 8.

A média etária dos doentes que apresentavam valores mais altos de resposta Ig G anti-*P. falciparum* era de 7,6 anos e dos restantes pacientes era de 5 anos, sugerindo perfis de resposta Ig G maiores à medida que vai aumentando o grupo etário, o que vai de encontro ao descrito por vários autores (Sarr *et al.*, 2007; Iriemenam *et al.*, 2009; Richards *et al.*, 2010). Quanto aos dias de doença, não se verificam diferenças significativas entre a média de dias de doença dos doentes com respostas IgG mais elevadas (média 2,8 dias) e os restantes pacientes (média 3,75 dias).

Reforça-se a ideia da necessidade de mais estudos que ajudem a perceber o papel das IgGs na malária na criança e a comparação com outros casos de malária em crianças que, mais uma vez, não foi possível efectuar neste estudo, havendo perspectivas da sua realização em futuros trabalhos.

4.10. Determinação do componente C5a do sistema complemento nas amostras de sangue dos pacientes infectados com *Plasmodium falciparum*

O sistema complemento serve como activador da resposta imune inata e desempenha um papel crítico na neutralização do parasita. O componente C5a do complemento é um mediador pro-inflamatório potente, estando também envolvido no recrutamento de células inflamatórias e embora normalmente tenha um papel de defesa imunitária, também promove dano dos tecidos e destruição de células vizinhas (Nyakoe *et al.*, 2009).

Na figura 9 observa-se o perfil de resposta do componente C5a do sistema complemento dos pacientes envolvidos neste estudo.

Verificou-se que todos os pacientes apresentavam níveis de C5a superiores ao controlo, que resultou de um pool de cinco pessoas saudáveis, sendo o que o paciente A02 foi o que apresentou maior resposta deste mediador pro-inflamatório, enquanto que o paciente A03, que foi o único caso de óbito deste estudo, era o que apresentava níveis mais baixos de resposta de C5a, indicando uma baixa activação do sistema complemento neste paciente.

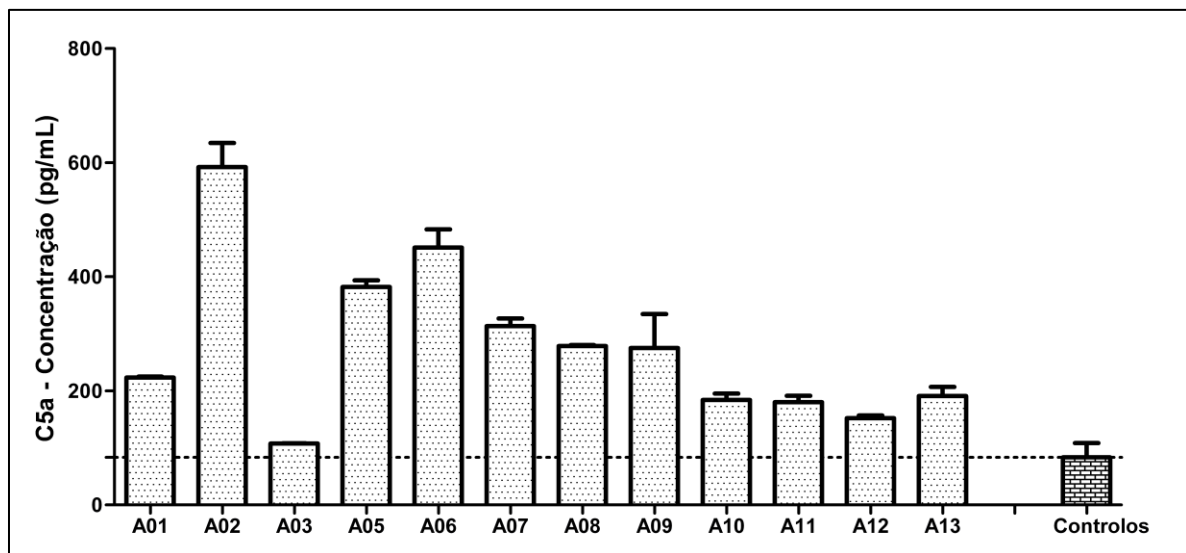


Figura 9: Determinação do componente C5a do sistema complemento em pacientes com malária. Legendas: (Controlos) pool de cinco soros de pessoas saudáveis

Esta resposta do sistema complemento, com elevação do C5a em todas as amostras estudadas, vai de encontro ao que está descrito na literatura (Nyakoe *et al.*, 2009; Lackner *et al.*, 2008; Botto *et al.*, 2009) e que reforça, mais uma vez, a ideia da sua importância na resposta à malária. Sabe-se que C5a joga um papel importante na cascata do complemento, sendo importante no controlo das infecções. No entanto, níveis excessivos deste componente poderá ser deletério, necessitando de um equilíbrio estreito nos seus níveis (Patel *et al.*, 2008; Lackner *et al.*, 2008).

No caso paciente A03, que foi o único caso de óbito no estudo, verifica-se, um aumento ligeiro dos níveis de C5a em relação aos controlos apesar do nível elevado de parasitas e da gravidade da doença, o que não vai ao encontro do possível papel do bloqueio deste componente para prevenção da malária cerebral como advogado por Patel *et al.* No entanto outros factores poderão ter contribuído para este desfecho fatal, além dos níveis reduzidos de C5a. Serão necessários mais trabalhos para ajudar na compreensão do papel do sistema complemento na malária grave em crianças.

4.11. Determinação do componente CRP nas amostras de sangue dos pacientes infectados com *Plasmodium falciparum*

A CRP é um reagente de fase aguda, sendo um indicador precoce de processos inflamatórios e infecciosos, aumentando nos casos de malária de acordo com a gravidade da doença (Hurt *et al.*, 1994; Bourée *et al.*, 2000).

Na figura 10 pode ser observado o perfil de resposta do CRP nas amostras estudadas. Verificou-se um aumento do CRP em todas as amostras avaliadas, o que vai de encontro aos descrito num estudo realizado por Dongho Dongmo *et al.* (2011) em crianças dos Camarões, que apresentavam aumentos acentuados do CRP em relação aos controlos.

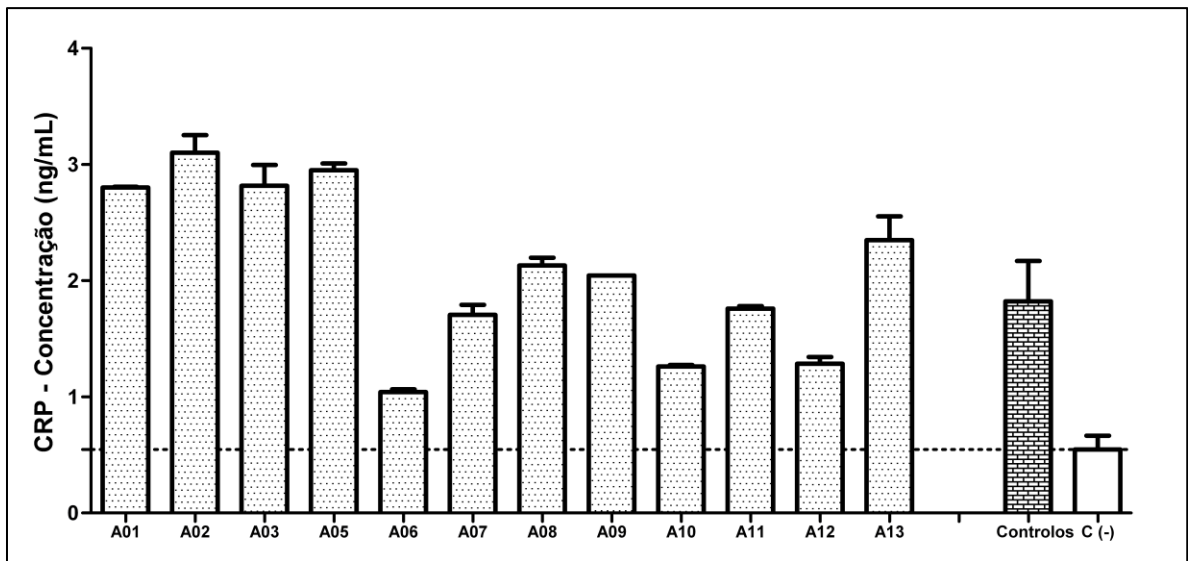


Figura 10: Determinação do componente CRP do sistema complemento em pacientes com malária. Controlos: pool de doentes sem malária internados na Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos do HDE; C (-): pool de cinco soros de pessoas saudáveis.

Todos os doentes desta amostra apresentavam valores superiores a duas vezes ao do controlo negativo, o que vem reforçar a ideia da importância do CRP na resposta aguda à doença. Nota-se também um aumento do CRP no pool de controlo positivo, que resultou de amostras de sangue de três doentes internados na Unidade de cuidados intensivos pediátricos do Hospital de Dona Estefânia. Observa-se ainda que os pacientes A01, A02, A03, A05, A08 e A13 apresentam valores de CRP ainda superiores ao controlo positivo, podendo-se especular com a gravidade da doença nestes casos.

Não se obteve amostras de sangue de crianças saudáveis para comparação, por questões éticas, sendo necessários mais estudos no futuro que permitam associar os níveis de resposta CRP às diferentes formas de malária grave.

4.12. Determinação do óxido nítrico (NO) nas amostras de sangue dos pacientes infectados com *Plasmodium falciparum*

O óxido nítrico (NO) está envolvido, entre outras funções, na regulação da função do endotélio, inibindo as respostas inflamatórias, reduzindo a expressão de moléculas de adesão celular e limitando a agregação plaquetária e leucocitária (Serghides *et al.*, 2001). Atua, ainda, como vasodilatador (Ignarro *et al.*, 1987).

No que diz respeito à malária, apesar dos mecanismos moleculares responsáveis pela aquisição natural de imunidade adquirida contra a malária continuar por clarificar, a produção de NO parece desempenhar um papel importante como marcador de severidade da doença (Keller *et al.*, 2004). Existem relatos contraditórios sobre o papel do NO na malária, existindo autores que envolvem níveis elevados de NO à malária grave (Al-Yaman *et al.*, 1996; Keller *et al.*, 2004), enquanto outros o consideram factor protector na malária (Anstey *et al.*, 1996; Kremsner *et al.*, 1996; Serghides *et al.*, 2011).

No nosso estudo, verificou-se um aumento do óxido nítrico, com valores superiores ao controlo positivo, em 75% dos casos (n=9), como pode ser observado na figura 11. Salienta-se o facto, da amostra do paciente A03 que foi o único óbito do estudo, ter o valor mais baixo do nível de óxido nítrico, o que pode levar a pensar na importância do óxido nítrico como factor protector no combate à malária grave, sendo necessários mais estudos e amostras de pacientes com malária não grave e doentes assintomáticos, que não foi possível obter para este trabalho.

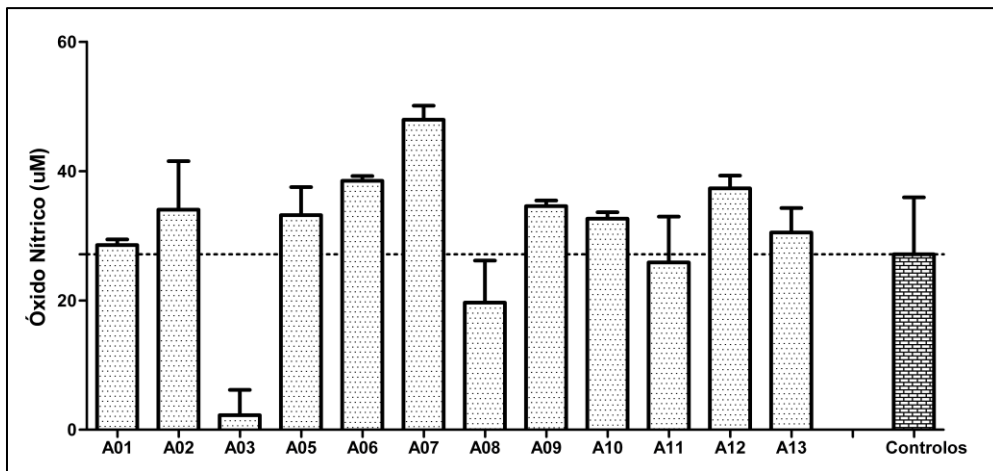


Figura 11: Determinação do óxido nítrico em pacientes com malária. Controlos: pool de pacientes sem história clínica de malária internados na Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos do HDE.

V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da malária grave em crianças continua a ser objecto de poucos estudos, continuando por explicar muitos dos factores que contribuem para a gravidade da doença neste grupo etário.

Neste estudo em que a mediana de idade das crianças é de cinco anos, com um predomínio do sexo feminino, verifica-se um baixo nível socioeconómico e a escolaridade materna é reduzida. Apesar de se tratar de uma amostra pequena, os dados parecem indicar que a melhoria das condições socioeconómicas da população poderá contribuir para a melhoria dos factores que influenciam e agravam a mortalidade e morbilidade da doença. Por outro lado, deverá continuar a insistir-se na prevenção da doença, nomeadamente através de um melhor conhecimento das vias de transmissão da doença e numa melhor utilização de redes mosquiteiras.

Verificou-se que a mediana dos dias entre o início dos sintomas e o desenvolvimento de casos graves da doença foi curta, o que sugere que a melhoria do acesso aos cuidados de saúde, do diagnóstico eficaz e do tratamento precoce e correcto, devem ser prioridades numa zona endémica como é a Guiné-Bissau. Os sintomas observados mais frequentes eram a febre, a prostração e a dificuldade alimentar e os sinais mais frequentes a anemia e a trombocitopenia.

Nesta amostra de doentes, observou-se na maioria dos casos, um aumento dos mediadores inflamatórios doseados, nomeadamente as IgGs totais, IgG e IgM anti-*P.falciparum*, CRP, C5a e NO. No entanto, não se conseguiu neste estudo, associar a expressão e os níveis destes mediadores com a gravidade da doença, bem como a sua utilização como predictores de severidade da malária grave, sendo necessários mais estudos no futuro.

Existem perspectivas actuais e futuras na continuação deste trabalho, nomeadamente no doseamento de citocinas pro-inflamatórias IFN- γ e TNF- α e do estudo do perfil de resposta

imune do tipo Th1 versus Th2 baseado na pesquisa de anticorpos anti-*P. falciparum* do tipo IgG1, IgG3, IgG4 e IgE;Th2 nos casos de malária grave em crianças.

Finalmente, e apesar do reduzido tamanho da amostra, pretendeu-se com este estudo contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e clínicos da malária grave em crianças de uma zona endémica como é a Guiné-Bissau, esperando que no futuro haja mais trabalhos que ajudem a compreender os mecanismos que levam a que a malária continue a ser um factor de mortalidade importante, principalmente em crianças, e que nos permita combater e tratar melhor a doença.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aly AS, Vaughan AM, Kappe SH. 2009. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol.* 63:195-221.

Al-Yaman, F. M., D. Mokela, B. Genton, K. A. Rockett, M. P. Alpers, and I. A. Clark. 1996. Association between serum levels of reactive nitrogen intermediates and coma in children with cerebral malaria in Papua New Guinea. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90:270-273.

Amaratunga C, Lopera-Mesa TM, Brittain NJ, Cholera R, Arie T, Fujioka H, Keefer JR, Fairhurst RM. 2011. A role for fetal hemoglobin and maternal immune IgG in infant resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One.* 6(4):e14798.

Andrews, K.T., and Lanzer, M. 2002. Maternal malaria: *Plasmodium falciparum* sequestration in the placenta. *Parasitol Res* 88: 715–723.

Angulo I, Fresno M. 2002. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(6):1145-52.

Anstey, N. M., J. B. Weinberg, M. Hassanali, E. D. Mwaikambo, D. Manyenga, M. A. Misukonis, D. R. Arnelle, D. Hollis, M. I. McDonald, and D. L. Granger. 1996. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria. Inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J. Exp. Med.* 184:557-567.

Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, Trape JF, Balde AT, Druilhe P, Roussilhon C. 1996. Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa). *Am J Trop Med Hyg.* 54(5):449-57.

Baird JK. 2009. Resistance to Therapies for Infection by *Plasmodium vivax*. *Clin Microbiol Rev.* 22(3): 508–534.

Baker DA. 2010. Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 172(2):57-65.

- Barat LM, Palmer N, Basu S, Worrall E, Hanson K, Mills A. 2004.** Do malaria control interventions reach the poor? A view through the equity lens. *Am J Trop Med Hyg.* 71(2 Suppl):174-8.
- Barker RH Jr, Banchongaksorn T, Courval JM, Suwonkerd W, Rimwungtragoon K, Wirth DF 1994.** *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*: factors affecting sensitivity and specificity of PCRbased diagnosis of malaria. *Exp Parasitol.* 79: 41-49.
- Bhalla A, Suri V, Singh V. 2006.** Malarial hepatopathy. *J Postgrad Med.* 52:315-20.
- Beare NA, Lewallen S, Taylor TE, Molyneux ME. 2011.** Redefining cerebral malaria by including malaria retinopathy. *Future Microbiol.* 6(3):349-55.
- Biemba G, Gordeuk VR, Thuma P, Weiss G. 2000.** Markers of inflammation in children with severe malarial anaemia. *Trop Med Int Health.* 5(4):256-62.
- Bogdan C. 2001.** Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2: 10.
- Botto M, Kirschfink M, Macor P, Pickering MC, Würzner R, Tedesco F. 2009.** Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Mol Immunol.* 46(14):2774-83.
- Boudin C, Chumpitazi B, Dziegiel M, Peyron F, Picot S, Hogh B, Ambroise-Thomas P. 1993.** Possible role of specific immunoglobulin M antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens in immunoprotection of humans living in a hyperendemic area, Burkina Faso. *J Clin Microbiol.* 31(3):636-41.
- Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. 1992.** *Plasmodium falciparum* malaria: Evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect Immun.* 60:1473-1481.
- Bourée P, Botterel F, Lançon A. 2000.** Comparative study VS-CRP in malaria. *Mal. Inf. Dis. Afr.*, p. 2
- Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL, Bloland PB, Kaslow DC, Lal AA. 1998.** A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody response to the merozoite surface protein-1 19-kilodalton domain of *Plasmodium*

falciparum in pregnant women and infants: associations with febrile illness parasitaemia and anemia. Am J Trop Med Hyg . 58:211-219.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Annu Rev Biochem. 1994;63:175-95.

Butler AR, Khan S, Ferguson E. 2010 . A brief history of malaria chemotherapy. J R Coll Physicians Edinb. 40(2):172-7.

Butler D. 2009. Initiative targets malaria eradication. Nature 462: 19.

Capanna E. 2006. Grassi versus Ross: who solved the riddle of malaria? Int Microbiol. 9(1):69-74.

Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M. 2000. Molecular aspects of severe malaria. Clin Microbiol Rev. 13(3):439-50.

Clark IA, Cowden WB.2003. The pathophysiology of *falciparum* malaria. Pharmacol Ther. 99(2):221-60.

Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. 2006. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. Malar J. 5:85.

Colombatti R, Penazzato M, Bassani F, Vieira CS, Lourenço AA, Vieira F, Teso S, Giaquinto C, Riccardi F. 2011. Malaria prevention reduces in-hospital mortality among severely ill tuberculosis patients: a three step intervention in Bissau, Guinea-Bissau. BMC Infect Dis. 11:57.

Cox FE. 2010. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasit Vectors. 3(1):5.

Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, et al. 2008. *Plasmodium knowlsei* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. Clin Infect Dis. 46:165–71.

Crawley J, Chu C, Mtove G, Nosten F. 2010. Malaria in children. Lancet. 375(9724):1468-81.

- Cunha CB, Cunha BA. 2008.** Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. *J Vector Borne Dis.* 45(3):194-9.
- Czajkowsky DM, Salanti A, Ditlev SB, Shao Z, Ghumra A, Rowe JA, Pleass RJ. 2010.** IgM, Fc mu Rs, and malarial immune evasion. *J Immunol.* 184(9):4597-603.
- De Kossodo, Grau GE. 1993.** Role of cytokines and adhesion molecules in malaria immunopathology. *Stem Cells.* 11:41–8.
- Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, Newman RD. 2007.** Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis.* 7(2):93-104.
- Dinglasan RR, Jacobs-Lorena M. 2008.** Flipping the paradigm on malaria transmission-blocking vaccines. *Trends Parasitol* 24: 364–70
- Dondorp, A. M., B. J. Angus, M. R. Hardeman, K. T. Chotivanich, K. Silamut, R. Ruangveerayuth, P. A. Kager, N. J. White, and J. Vreeken. 1997.** Prognostic significance of reduced red blood cell deformability in severe *falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57:507–511.
- Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J, White NJ. 2000.** Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitol Today.* 16(6):228-32.
- Dondorp AM, Pongponratn E, White NJ. 2004.** Reduced microcirculatory flow in severe *falciparum* malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. *Acta Trop.* 89(3):309-17.
- Dongho Dongmo F. F., Ngono Ngane R. A., Gouado I., Pankoui Mfonkeu J. B., Mbackop Kwemba V., Ngwa V., Fotso Kuate H. and Amvam Zollo P. H. 2011.** Predictors of childhood severe malaria in a densely populated area: Douala, Cameroon. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(33), pp. 6319-6324.
- Doolan DL.** *Methods in Molecular Medicine – Malaria Methods and Protocols.* Human Press, Inc., Totowa, NJ. 72: 189-203, 2002.

- Duarte J, Deshpande P, Guiyedi V, Mécheri S, Fesel C, Cazenave PA, Mishra GC, Kombila M, Pied S. 2007.** Total and functional parasite specific IgE responses in *Plasmodium falciparum*-infected patients exhibiting different clinical status. *Malar J.* 6:1.
- English M C, Waruiru C, Lightowler C, Murphy S A, Kirigha G, Marsh K. 1996.** Hyponatraemia and dehydration in severe malaria. *Arch Dis Child* 74:201-205.
- Falade C, Mokuolu O, Okafor H, et al. 2007.** Epidemiology of congenital malaria in Nigeria: a multi-centre study. *Trop Med Int Health* 12: 1279–87.
- Fortin A, Stevenson MM, Gros P. 2002.** Susceptibility to malaria as a complex trait: big pressure from a tiny creature. *Hum Mol Genet.* 11(20):2469-78.
- Franklin, B. S., Parroche, P., Ataidea, M. A., Lauw, F., Ropert, C., de Oliveira, R. B., Pereira, D., Tada, M. S., Nogueira, P., da Silva, L. H. P., Bjorkbacka, H., Golenbock, D. T., Gazzinelli, R. T., 2009.** Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (14): 5789-5794.
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B. 2002.** Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.*419(6906):498-511.
- Garraud O, Perraut R, Riveau G, Nutman. 2003.** Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses. *Trends Parasitol.* 19(7):300-304.
- Garraud O, Mahanty S, Perraut R. 2003.** Malaria-specific antibody subclasses in immune individuals: a key source of information for vaccine design. *Trends Immunol.* 24:30-35.

Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE. 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest.* 118(4):1266-76.

Hamed K, Grueninger H. Coartem(®): a decade of patient-centric malaria management. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012 Jun;10(6):645-59.

Hartman TK, Rogerson SJ, Fischer PR. 2010. The impact of maternal malaria on newborns. *Ann Trop Paediatr.* 30(4):271-82.

Ho M, White NJ. 1999. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol.* 276(6 Pt 1):C1231-42.

Huber-Lang, M., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., Rittirsch, D., Neff, T.A., McGuire, S.R., et al. 2006. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 12: 682–68.

Huber-Lang, M., Younkin, E.M., Sarma, J.V., Riedemann, N., McGuire, S.R., Lu, K.T., et al. 2002. Generation of C5a by phagocytic cells. *Am J Pathol* 161: 1849–1859.

Hughes KR, Biagini GA, Craig AG. 2010. Continued cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells after antimalarial treatment. *Mol Biochem Parasitol.* 169(2):71-8.

Hurt N, Smith T, Tanner M, et al. 1994. Evaluation of C-reactive protein and haptoglobin as malaria episode markers in an area of high transmission in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* ; 88:182–6.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G.1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9265–9269.

Iriemenam NC, Okafor CM, Balogun HA, Ayede I, Omosun Y, Persson JO, Hagstedt M, Anumudu CI, Nwuba RI, Troye-Blomberg M, Berzins K. 2009. Cytokine profiles and antibody responses to *Plasmodium falciparum* malaria infection in individuals living in Ibadan, southwest Nigeria. *Afr Health Sci,* 9:66-74.

- Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. 2006.** PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Microbiol.* 44(3):1087-9.
- Kaca, W., and Roth, R. 1995.** Activation of complement by human hemoglobin and by mixtures of hemoglobin and bacterial endotoxin. *Biochim Biophys Acta* 1245: 49–56.
- Keller CC, Kreamsner PG, Hittner JB, Misukonis MA, Weinberg JB, Perkins DJ. 2004.** Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells, *Infect. Immun.*, 72: 8.
- Kitchen AD, Chiodini PL.** Malaria and blood transfusion. *Vox Sang* 2006. 90: 77–84.
- Kothare SV, Kallapur SG, Irani SF, Prabhu SB, Gangal PS, Agarwal GJ. 1987.** Congenital malaria (a report of 2 cases). *J Postgrad Med*;33:158.
- Kreamsner, P. G., S. Winkler, E. Wildling, J. Prada, U. Bienzle, W. Graninger, and A. K. Nussler.** 1996. High plasma levels of nitrogen oxides are associated with severe disease and correlate with rapid parasitological and clinical cure in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**:44-47.
- Kumar, A., Haery, C., Parrillo, J.E., 2001.** Myocardial dysfunction in septic shock: Part I. Clinical manifestation of cardiovascular dysfunction. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 15, 364–376
- Kurtis JD, Lanar DE, Opollo M, Duffy PE. 1999.** Interleukin-10 responses to liver-stage antigen 1 predict human resistance to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 67:3424–9.
- Kurtzhals, J.A., Adabayeri, V., Goka, B.Q., Akanmori, B.D., Oliver-Commey, J.O., Nkrumah, F.K., Behr, C., Hviid, L. 1998.** Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 351, 1768–1772.
- Kyes SA, Kraemer SM, Smith JD. 2007.** Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: gene organization and regulation of the var multigene family. *Eukaryot Cell.* 6(9):1511-20.

- Lackner P, Hametner C, Beer R, Burger C, Broessner G, Helbok R, Speth C, Schmutzhard E. 2008.** Complement factors C1q, C3 and C5 in brain and serum with cerebral malaria. *Malar J.*10;7:207.
- Ladhani S, Lowe B, Cole AO, Kowuondo K, Newton CR. 2002.** Changes in white blood cells and platelets in children with *falciparum* malaria: relationship to disease outcome. *Br J Haematol.* 119(3):839-47.
- Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. 2008.** Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol.* 9(7):725-32.
- Laishram DD, Sutton PL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM, Joshi H.2012.**The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malar J.* 11(1):29.
- Leder K, Black J, O'Brien D, Greenwood Z, Kain KC, Schwartz E, Brown G, Torresi J. 2004.** Malaria in travelers: a review of the GeoSentinel surveillance network. *Clin Infect Dis.* 15;39(8):1104-12.
- Ledermann W, Valle G. 2009.** Ética e investigación en la historia de la malaria. *Rev Chilena Infectol.* 26(5):466-71.
- Lengeler C. 2004.** Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev:* pp CD000363.
- Leoratti FM, Durlacher RR, Lacerda MV, Alecrim MG, Ferreira AW, Sanchez MC, Moraes SL. 2008.** Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Malar J.* 7:186.
- Lim P, Alker AP, Khim N, et al. 2009.** Pfm^{dr1} copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in *falciparum* malaria in Cambodia. *Malar J.* 8:11.
- Lima GF, Levi JE, Geraldi MP, Sanchez MC, Segurado AA, Hristov AD, Inoue J, Costa-Nascimento Mde J, Di Santi SM. 2011.** Malaria diagnosis from pooled blood samples: comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunoassay as a

platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large-scale. Mem Inst Oswaldo Cruz. 106(6):691-700.

Lin JT, Juliano JJ, Wongsrichanalai C. 2010. Drug-Resistant Malaria: The Era of ACT. Curr Infect Dis Rep. 12(3):165-73.

Lindner SE, Miller JL, Kappe SH. 2012. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. Cell Microbiol. 14(3):316-24.

Loutan L.2003. Malaria: still a threat to travellers. Int J Antimicrob Agents 21(2):158-63.

Luckner D, Lell B, Greve B, et al. 1998. No influence of socioeconomic factors on severe malarial anaemia, hyperparasitaemia or reinfection. Trans R Soc Trop Med Hyg 92,478-81.

Maina RN, Walsh D, Gaddy C, Hongo G, Waitumbi J, Otieno L, Jones D, Ogutu BR. 2010. Impact of *Plasmodium falciparum* infection on haematological parameters in children living in Western Kenya. Malar J. 9 Suppl 3:S4

Maitland K, Marsh K. 2004. Pathophysiology of severe malaria in children. Acta Trop. Apr;90(2):131-40.

Mali S, Tan KR, Arguin PM, Frieden TR, Jaffe HW, Stephens JW, Thacker SB, Zaza S. 2011. Malaria surveillance-United States, 2009. MMWR Surveill Summ. 22;60(3):1-15.

Marsh, K. 1999. Clinical malaria. In: Perlman, Wahlgren, M.(Eds.), Malaria: Molecular and Clinical Aspects. Gordon and Breach Publishers.

Marsh K, Forster D, Waruiru C, Mwangi I, Winstanley M, Marsh V, Newton C, Winstanley P, Warn P, Peshu N, et al. 1995. Indicators of life-threatening malaria in African children. N Engl J Med. 332(21):1399-404.

Mayer DC, Kaneko O, Hudson-Taylor DE, Reid ME, Miller LH. 2001. Characterization of a *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding protein paralogous to EBA-175. Proc Natl Acad Sci U S A 98(9):5222-7.

Medina RC. 2011. Caracterização serológica e imunoquímica de candidatos antigénicos de *Plasmodium falciparum* em pacientes com malária importada. Tese de Mestrado em Bioquímica Médica da Universidade de Lisboa.

- Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. 2001.** The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 64(1-2 Suppl): 97-106.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. 2002.** The pathogenic basis of malaria. *Nature* 7;415 (6872):673-9.
- Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. 1976.** The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 295(6):302-4.
- Mishra SK, Mohanty S, Mohanty A, Das BS. 2006.** Management of severe and complicated malaria. *J Postgrad Med.* 52:281-7.
- Mishra SK, Das BS. 2008.** Malaria and acute kidney injury. *Semin Nephrol.* 28:395–408.
- Moody A. 2002.** Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev.* 15(1):66-78.
- Morrisette NS, Sibley LD. 2002.** Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(1):21-38.
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodríguez A. 2001.** Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science.* 5;291(5501):141-4.
- Mota, M.M., Hafalla, J.C., and Rodriguez, A. 2002.** Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat Med.* 8: 1318–1322.
- Muehlenbachs, A., Fried, M., Lachowitzer, J., Mutabingwa, T.K., and Duffy, P.E. 2007.** Genome-wide expression analysis of placental malaria reveals features of lymphoid neogenesis during chronic infection. *J Immunol.* 179: 557– 565.
- Nahrevanian, H. 2004.** Nitric Oxide Involvement during Malaria Infection; Immunological Concepts, Mechanisms and Complexities: a Novel Review. *J Trop Med Parasitol;* 27:93-101.

- Najera JA. Malaria and the work of WHO. 1989.** Bull World Health Organ. 67(3):229-43.
- Ndyomugenyi R, Magnussen P. 2000.** Chloroquine prophylaxis, iron/folic-acid supplementation or case management of malaria attacks in primigravidae in western Uganda: effects on congenital malaria and infant haemoglobin concentrations. Ann Trop Med Parasitol 94:759–68.
- Newton, C.R., Hien, T.T., White, N. 2000.** Cerebral malaria. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. 69, 433–441
- Newton, C.R., Krishna, S. 1998.** Severe *falciparum* malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. Pharmacol. Ther. 79, 1–53.
- Nmorsi, O, Ukwandu, N. C. D, Isaac, C, Ekoma, N. E, Asibor, V. 2008.** Immunoglobulin profile of Nigerian children with *Plasmodium falciparum* infection. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (2), pp. 077–080.
- Nuchsongsin F, Chotivanich K, Charunwatthana P, Omodeo-Salè F, Taramelli D, Day NP, White NJ, Dondorp AM. 2007.** Effects of malaria heme products on red blood cell deformability. Am. J. Trop. Med. Hyg 77(4), 2007, pp. 617–622.
- Nyakoe NK, Taylor RP, Makumi JN, Waitumbi JN. 2009.** Complement consumption in children with *Plasmodium falciparum* malaria. Malar J. 8:7.
- Ochiel DO, Awandare GA, Keller CC, Hittner JB, Kremsner PG, Weinberg JB, Perkins DJ. 2005.** Differential regulation of beta-chemokines in children with *Plasmodium falciparum* malaria. Infect Immun. 73(7):4190-7.
- OMS. 2000.** Severe *falciparum* malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 94(suppl 1):S1-S90.
- OMS. 2010.** Guidelines for the treatment of malaria, second edition.
- OMS. 2011.** World Malaria Report 2011.
- OMS. 2011.** Global plan for artemisinin resistance containment.

- Ogetii GN, Akech S, Jemutai J, Boga M, Kivaya E, Fegan G, Maitland K. 2010.** Hypoglycaemia in severe malaria, clinical associations and relationship to quinine dosage. *BMC Infect Dis.* 10:334.
- Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koech D, Orago AS, Udhayakumar V. 1999.** A low interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *J Infect Dis* 180:1753–5.
- Owusu-Agyei S, Koram KA, Baird JK, Utz GC, Binka FN, Nkrumah FK, Fryauff DJ, Hoffman SL. 2001.** Incidence of symptomatic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection following curative therapy in adult residents of northern Ghana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65:197–203.
- Patel SN, Berghout J, Lovegrove FE, Ayi K, Conroy A, Serghides L, Min-oo G, Gowda DC, Sarma JV, Rittirsch D, Ward PA, Liles WC, Gros P, Kain KC. 2008.** C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. *J Exp Med.* 12;205(5):1133-43.
- Peerschke, E.I., Yin, W., and Ghebrehiwet, B. 2008.** Platelet mediated complement activation. *Adv Exp Med Biol* 632: 81–91.
- Penman B, Gupta S.2008.** Evolution of virulence in malaria. *J Biol* 28;7(6):22.
- Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ong'echa JM. 2011.** Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci.* 7(9):1427-42.
- Perlmann H, Helmby H, Hagstedt M, Carlson J, Larsson PH, TroyeBlomberg M, Perlmann P. 1994.** IgE elevation and IgE anti-malarial antibodies in *Plasmodium falciparum* malaria: Association of high IgE levels with cerebral malaria. *Clin Exp Immunol*, 97:284-292.
- Peyron F, Burdin N, Ringwald P, Vuillez JP, Rousset F, Banchereau J. 1994.** High levels of circulating IL-10 in human malaria. *Clin Exp Immunol* 95:300–3.
- Plebanski M, Hill AVS: The immunology of malaria. 2000.** *Curr Opin Immunol* 12:437-441.

- Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, et al. 2009.** A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in *falciparum* malaria. *Malar J.* 8:89.
- Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, et al. 2009.** Vivax malaria: a major cause of morbidity in early infancy. *Clin Infect Dis*; 48: 1704–12.
- Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave PA, Mishra GC, Pied S. 2006.** Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of Central India. *J Infect Dis.* 194(2):198-207.
- Richards JS, Stanisic DI, Fowkes FJ, Tavul L, Dabod E, Thompson JK, Kumar S, Chitnis CE, Narum DL, Michon P, Siba PM, Cowman AF, Mueller I, Beeson JG. 2010.** Association between naturally acquired antibodies to erythrocyte binding antigens of *Plasmodium falciparum* and protection from malaria and high-density parasitemia. *Clin Infect Dis.* 51(8):e50-60.
- Rodrigues A, Schellenberg JA, Kofoed PE, Aaby P, Greenwood B.** Changing pattern of malaria in Bissau, Guinea Bissau. *Trop Med Int Health.* 2008. 13(3):410-7.
- Roestenberg, M., McCall, M., Mollnes, T.E., van Deuren, M., Sprong, T., Klasen, I., et al. 2007.** Complement activation in experimental human malaria infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 101: 643–649.
- Rogerson, S.J., Mwapasa, V., and Meshnick, S.R. 2007.** Malaria in pregnancy: linking immunity and pathogenesis to prevention. *Am J Trop Med Hyg.* 77: 14–22
- Schwenk RJ, Richie TL. 2011.** Protective immunity to pre-erythrocytic stage malaria. *Trends Parasitol.* 27(7):306-14.
- Seção de Infecçologia Pediátrica. 2006.** Malária - Protocolo Diagnóstico e Terapêutico. *Acta Pediatr Port* 37:205-
- Sehgal VM, Siddiqui WA, Alpers MP. 1989.** A seroepidemiological study to evaluate the role of passive maternal immunity to malaria in infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 83 Suppl:105-6.

- Serghides L, Kim H, Lu Z, Kain DC, Miller C, Francis RC, Liles WC, Zapol WM, Kain KC. 2011.** Inhaled Nitric Oxide Reduces Endothelial Activation and Parasite Accumulation in the Brain, and Enhances Survival in Experimental Cerebral Malaria. *PLoS One*. 6(11):e27714.
- Sherman IW, Crandall I, Smith H. 1992.** Membrane proteins involved in the adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to the endothelium. *Biol Cell*. 74(2):161-78.
- Shi YP, Sayed U, Qari SH, Roberts JM, Udhayakumar V, Oloo AJ, Hawley WA, Kaslow DC, Nahlen BL, Lal AA. 1996.** Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Infect Immun*. 64(7):2716-23.
- Shortt HE, Garnham PCC. 1948.** Pre-erythrocytic stages in mammalian malaria parasites. *Nature* 161:126.
- Silver, K. L., Higgins, S. J., McDonald, C. R. and Kain, K. C. 2010.** Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial diseases. *Cellular Microbiology*, 12: 1036–1045.
- Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ, Miller LH. 1994.** Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science* 24;264(5167):1941-4.
- Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox- Singh J, Thomas A, Conway DJ. 2004.** A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 363:1017-1024.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosário VE, Thaithong S, Brown N.** High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol*. 61: 315-320, 1993.
- Srinivasan P, Beatty WL, Diouf A, Herrera R, Ambroggio X, Moch JK, Tyler JS, Narum DL, Pierce SK, Boothroyd JC, Haynes JD, Miller LH. 2011**

Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. Proc Natl Acad Sci U S A. 9;108(32):13275-80.

Stefani A, Hanf M, Nacher M, Girod R, Carme B. 2011. Environmental, entomological, socioeconomic and behavioural risk factors for malaria attacks in Amerindian children of Camopi, French Guiana. Malar J. 10:246.

Swan H, Sloan L, Muyombwe A, Chavalishewinkoon-Petmitr P, Krudsood S, Leowattana W, Wilairatana P, Looareesuwan S, Rosenblatt J. 2005. Evaluation of a real-time polymerase chain reactions assay for diagnosis of malaria in patients from Thailand. Am J Trop Med Hyg. 73: 850-854.

Takeuchi, O. and Akira, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell 140: 805–820.

Tangteerawatana P, Krudsood S, Chalermrut K, Looareesuwan S, Khusmith S. 2001. Natural human IgG subclass antibodies to *Plasmodium falciparum* blood stage antigens and their relation to malaria resistance in an endemic area of Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 32(2):247-54.

Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. 2003. Clinical review: Severe malaria. Crit Care 7(4):315-23.

Tran TM, Samal B, Kirkness E, Crompton PD. 2012. Systems immunology of human malaria. Trends Parasitol. 28(6):248-57.

Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, Buley ID, Gatter KC, Newbold CI, Pukritayakamee S, Nagachinta B, et al. 1994. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. Am J Pathol. 145(5):1057-69.

Van den Eede P, Van HN, Van Overmeir C, Vythilingam I, Duc TN, Hung le X, Manh HN, Anné J, D'Alessandro U, Erhart A. 2009. Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. Malaria Journal 8:249

Varandas L, Julien M, Van Lerberghe W, Goncalves L, Ferrinho P. 2000. Independent indicators of outcome in severe paediatric malaria: maternal education, acidotic breathing and convulsions on admission. *Ann Trop Paediatr.* 20(4):265-71.

Varandas L. 2001. Vitamina A como adjuvante do tratamento da malária grave na criança. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor no Ramo da Medicina Tropical, Especialidade de Clínica, Disciplina de Pediatria das Regiões Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Weatherall DJ. 2008. Genetic variation and susceptibility to infection: the red cell and malaria. *Br J Haematol.* 141(3):276-86.

William T, Menon J, Rajahram G, Chan L, Ma G, Donaldson S, Khoo S, Frederick C, Jelip J, Anstey NM, Yeo TW. 2011. Severe *Plasmodium knowlesi* malaria in a tertiary care hospital, Sabah, Malaysia. *Emerg Infect Dis.* 17(7):1248-55.

Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. 2007. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg.* 77(6 Suppl):119-27.

Worrall E, Basu S, Hanson K. 2005. Is malaria a disease of poverty? A review of the literature. *Trop Med Int Health.* 10(10):1047-59.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial dos casos de malária..	4
Figura 2: Ciclo de vida do parasita da malária.	8
Figura 3: Distribuição espacial dos casos de malária causados por <i>Plasmodium falciparum</i> no ano de 2010 na Guiné-Bissau.....	38
Figura 4 : Resultado do teste rápido para malária.....	66
Figura 5: Resultado da PCR para o diagnóstico da malária.	68
Figura 6: Pesquisa de anticorpos totais anti- <i>Plasmodium</i> spp dos pacientes com malaria..	70
Figura 7: Avaliação da presença de anticorpos IgM anti- <i>Plasmodium falciparum</i> em pacientes com malaria.	72
Figura 8: IgG total anti- <i>Plasmodium falciparum</i> em amostras de doentes com malária	73
Figura 9: Determinação do componente C5a do sistema complemento em pacientes com malária.	74
Figura 10: Determinação do componente CRP do sistema complemento em pacientes com malária..	76
Figura 11: Determinação do óxido nítrico em pacientes com malária.	78



LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Definição clínica e laboratorial dos casos de malária grave.	18
Tabela 2: Frequência relativa das principais manifestações de malária grave em adultos e crianças e respectivos valores de mau prognóstico.	19
Tabela 3: Fármacos utilizados no tratamento da malária por <i>P. falciparum</i> não complicada	32
Tabela 4: Fármacos utilizados no tratamento da malária grave por <i>P. falciparum</i>	33
Tabela 5: Alguns indicadores do estado de saúde e nutrição na Guiné-Bissau.	37
Tabela 6: Critérios de inclusão e exclusão para o recrutamento dos pacientes no estudo. .	42
Tabela 7: Condições de reacção da nested PCR utilizada para amplificar sequências específicas de <i>Plasmodium</i> spp em amostras de sangue.	48
Tabela 8: Sequências nucleotídicas (primers) utilizadas na nested PCR específicas para as espécies de <i>Plasmodium</i> spp.	48
Tabela 9: Características sociodemográficas das crianças hospitalizadas no âmbito do estudo.	54
Tabela 10: Características sociodemográficas das crianças hospitalizadas no âmbito do estudo.	55
Tabela 11: Características clínicas pré-hospitalização.	57
Tabela 12: Características clínicas na admissão das crianças com malária grave.	58
Tabela 13: Características clínicas na admissão das crianças com malária grave.	59
Tabela 14: Resultados da avaliação laboratorial dos pacientes do estudo na admissão.	61

Tabela 15: Manifestações clínicas dos doentes com malária grave.....	63
Tabela 16: Diagnóstico laboratorial da malária por microscopia óptica (por gota espessa)	64
Tabela 17: Resumo dos métodos de diagnóstico utilizados neste estudo.	69

ANEXOS

Anexo I: Parecer de aprovação do Comité Nacional de Ética na Saúde da Guiné-Bissau.

 <p>REPÚBLICA DA GUINÉ-BISSAU Ministério da Saúde</p>	 <p>INASA Instituto Nacional de Saúde Pública</p>
Nº Refº0003/INASA/CNES/2012	Bissau, 06 de Dezembro de 2012
Ao Dr. Anaxore Inhelder Cardoso Casimiro	
LISBOA	
ASSUNTO: Aprovação do Protocolo de Pesquisa	
Com os melhores cumprimentos.	
O Comité Nacional de Ética na Saúde reunido na sua oitava sessão ordinária no dia 02 de Dezembro de 2011, convocada para analisar Projectos de Pesquisa que lhe foram submetidos e, ao analisar o Protocolo: " Mediadores pró-inflamatórios como factores preditivos de Malária grave em crianças ", os presentes, decidiram por consenso pela sua aprovação, cumpridos os arranjos recomendados e, dado a sua importância e pertinência para o Sistema Nacional de Saúde.	
Cumpra os parâmetros requeridos.	
Com elevada consideração.	
O Presidente	
Dr. Cunhate Na Bangha	
<hr/> <p>Instituto Nacional de Saúde Pública • Avenida dos Combatentes da Liberdade da Pátria, Hospital "3 de Agosto" • Apartado: 861 Bissau, 1004 Bissau Cedex • Administração TM: + 245 551 5150 • E-mail: inasagb@gmail.com / moreira.vary8@gmail.com / a.rodriques@bandim.org</p>	

Anexo II: Parecer do Comité de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical.



Parecer sobre Protocolo de Estudo

Comissão de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Referência: 3-2012-TM

Título do Estudo: MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS COMO FACTORES PREDITIVOS DE MALÁRIA GRAVE EM CRIANÇAS

Nomes dos investigadores: Drs. Anaxore Casimiro, Marcelo Silva, Luís Varandas

Pretende-se estudar o perfil de mediadores pró-inflamatórios como possíveis factores preditivos de malária grave, definida pelos critérios da OMS, em crianças dos 0 aos 16 anos. O estudo será realizado no Hospital São José de Bor, Guiné-Bissau, e na UEI Clínica Tropical do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa.

Verifica-se respeito pelos princípios da investigação científica, havendo objectividade e imparcialidade; os dados obtidos de cada participante serão tratados estatisticamente pelos investigadores não sendo fornecidos a entidades terceiras.

Conflito de interesses: Não existe conflito de interesses.

Consentimento: A participação é voluntária; os sujeitos/representantes legais das crianças podem recusar a participação ou interrompê-la a qualquer momento; será respeitado o princípio do consentimento informado para inclusão no estudo. Sugere-se que o consentimento informado seja redigido com termos mais simples, adequados à população de pais/responsáveis legais das crianças. A declaração de participação deve ser feita em folha separada da do consentimento informado, de modo a que este fique na posse do responsável pela criança.

Confidencialidade: Os dados serão anonimizados; apenas o investigador e o responsável pelo serviço de pediatria do hospital terão acesso à correspondência entre o número da amostra e a identidade do participante.

O acompanhamento dos doentes será feito em conjunto com a instituição hospitalar.

Os dados serão divulgados junto da comunidade científica. Sugere-se que os dados sejam, também, divulgados junto das autoridades de saúde guineenses.

Risco/Benefício: Não há riscos relevantes nesta participação.

Conclusão: Consideramos que o estudo é eticamente válido e justificado, sendo aprovado o protocolo. As correcções sugeridas não inviabilizam esta aprovação.

Lisboa, 30 de Março de 2012

Prof. Doutora Rosa Teodósio

Inv. Doutor Bruno de Sousa


GILLES DUSSAULT
Presidente do Conselho de Ética