

NATÉRCIA REGINA MENDES SILVA

Associação dos níveis séricos de sFLT-1, proteína c reativa (PCR) e leptina e a histopatologia da malária placentária por *Plasmodium vivax*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2018

NATÉRCIA REGINA MENDES SILVA

Associação dos níveis séricos de sFLT-1, proteína c reativa (PCR) e leptina e a histopatologia da malária placentária por *Plasmodium vivax*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho

Versão original

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Silva, Natércia Regina Mendes
Associação dos níveis séricos de sPLT-1, proteína
c reativa (PCR) e leptina e a histopatologia da
malária placentária por Plasmodium vivax / Natércia
Regina Mendes Silva; orientador Claudio Romero
Farias Marinho. -- São Paulo, 2018.
95 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Plasmodium vivax. 2. Malária. 3. Malária
gestacional. 4. Malária placentária. 5.
Biomarcadores. I. Marinho, Claudio Romero Farias,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Natércia Regina Mendes Silva

Título da Tese: Associação dos níveis séricos de sFLT-1, proteína c reativa (PCR) e leptina e a histopatologia da malária placentária por *Plasmodium vivax*

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a//, considerou

Aprovado

Reprovado

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Américo de Sáles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 17 de fevereiro de 2017.

PARECER 1326/CEPSH

CAAE nº 64769416.8.0000.5467
Protocolo CEPSH-ICB nº 1370/17

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Associação sFlt-1, Leptina e PCR como biomarcadores clínicos na malária placentária**", do pesquisador Prof. Dr. **Cláudio Romero Farias Marinho** e da aluna **Natércia Regina Mendes Silva**.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: www.icb.usp.br, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **17/02/2018**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAULO MARINHO DE ANDRADE ZANOOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico este trabalho a duas pessoas muito importantes em minha vida, minha mãe **Creylene** e minha tia **Célia**, por sempre me incentivarem e apoiarem meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Que prazer é o meu ter tantas pessoas para agradecer. Gratidão a vida por tudo isso!

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Marinho, pela grande oportunidade de desenvolver este trabalho. Agora a mais de 3.000 km de distância tudo faz sentido! Obrigada por ter partilhado seu conhecimento científico, profissionalismo, dedicação, disponibilidade e, exigir sempre de nós extrema dedicação em tudo que fazemos, isso me tornou outra pessoa e profissional!

À minha mãe, Creyklene Mendes, que mesmo longe sempre esteve perto e, segurando a barra comigo nesses dois anos, não deixando eu desistir e me incentivando a seguir em frente, sendo meu suporte de uma vida inteira.

À minha tia Célia, sempre tão amável e compreensiva comigo, apoiadora de todos os meus sonhos. Sou uma privilegiada por todas as oportunidades que me concedeu nesta vida. Todo meu sucesso é seu!

À minha irmã, Isadora, e meu primo, Ronaldo, que sempre torceram para o meu sucesso.

Ao meu grande amigo, Fabrício Stocker, que se tornou minha família neste período que estive em São Paulo e que levo para minha vida inteira.

A minha co-orientadora e amiga, Dra. Jamille Dombrowski, a quem tenho um profundo carinho. Obrigada pela ajuda, colaboração, paciência, ensinamentos e exemplo, são poucas as pessoas que conheci como você tão apaixonada pelo que faz! Na trajetória da vida tive sorte de ter te conhecido.

Ao Dr. Oscar Murillo, por ter partilhado seus conhecimentos comigo e pela paciência por me ensinar. Obrigada por me fazer raciocinar desde como se desenha um experimento a sua execução. Nunca pensei que uma Enfermeira amaria trabalhar em bancada. Lembro-me de ocasiões que você, mesmo ocupado fora do Brasil, sempre esteve disponível para me ajudar!

A técnica do laboratório e agora minha amiga, Erika Machado, obrigada por ser tão profissional e gentil conosco, o que seria dos alunos sem você! Você sem dúvida também foi primordial durante todo esse processo! Até as broncas e puxões de orelha foram importantes.

Aos meus amigos de laboratório, Erika Machado, André Barateiro, Douglas Souza, Carla Bandeira, Oscar Murillo e Jamille Dombrowski, foi um prazer imensurável trabalhar esses dois anos com todos vocês. Este trabalho só foi possível devido a colaboração de vocês em cada etapa, foi um enorme prazer compartilhar esses dois anos de muito aprendizado. Obrigada também por terem segurado na minha mão e me levantarem sempre que eu "caía" e, gratidão por me aceitarem com esse meu "jeitinho". Quero poder ter novamente a sorte de trabalhar com pessoas iguais a vocês, tenho certeza que o sucesso será certo!

Um dos meus grandes sonhos é que todos pudessem ter a oportunidade de educação e acesso, para que vissem o quão lindo é o poder do conhecimento e, como ele alimenta a alma!

Agradeço também, todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho e me ajudaram desenvolver esta pesquisa.

A minha banca de qualificação constituída pelos professores Dr. Daniel Bargieri, Dr. Marcelo Urbano e Dr^a. Estela Bevilacqua, obrigada pela contribuição.

A Prof^a. Dr^a. Sabrina Epiphano pela colaboração e ajuda, que foram importantes.

Muito obrigada ao avaliadores desta banca que está ocorrendo hoje, que atenciosamente avaliaram este manuscrito, dispensando seu tempo e atenção, com o objetivo de aprimorar esta dissertação e, assim, contribuir para o meu crescimento acadêmico.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro e todo seu corpo de funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-II/USP).

As agências de fomento CAPES pelo financiamento da minha bolsa, e FAPESP pelo financiamento do meu projeto.

“Não há saber mais ou saber menos: há saberes
diferentes”

Paulo Freire

RESUMO

Silva, NRM. Associação dos níveis séricos de sFlt-1, proteína C reativa (PCR) e leptina com a histopatologia da malária placentária por *Plasmodium vivax*. [Dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

A malária associada à gravidez representa um grande problema de saúde pública. Atualmente, estima-se que 125 milhões de gestantes no mundo estejam expostas ao risco de contrair essa doença. A malária associada à gravidez é definida pela presença de *Plasmodium* spp. no sangue periférico e/ou na placenta, capaz de acarretar anemia materna, restrição do crescimento intrauterino, baixo peso ao nascer e diminuição da viabilidade fetal. No Brasil, observa-se um predomínio das infecções causadas por *Plasmodium (P.) vivax*, onde 95% dos casos ocorrem na Amazônia Legal. Por se tratar de uma doença de magnitude e de efeitos adversos para a mãe e o feto, é necessário a identificação de biomarcadores preditivos para um rápido diagnóstico da enfermidade. Foi realizado um estudo transversal com gestantes residentes na região do Alto Juruá (Acre). As consequências e a extensão dos efeitos da malária gestacional foram avaliadas através da coleta de dados biológicos e epidemiológicos de gestantes com ou sem infecção por *P. vivax*. Neste trabalho, parâmetros histológicos placentários como, agregados nucleares sinciciais, espessamento da barreira placentária e infiltrado inflamatório foram analisados quantitativamente. Para a quantificação dos biomarcadores em plasma periférico foi utilizada a técnica ELISA. Entre as alterações histológicas placentárias, se observou um aumento no número de agregados nucleares sinciciais ($16,12 \pm 7,68$ vs $13,93 \pm 5,96$ - $p < 0,05$) e do infiltrado inflamatório ($9,4 \pm 6,0$ vs $6,3 \pm 4,0$ - $p < 0,001$) em gestantes com malária. Além disso, identificou-se o espessamento da barreira placentária nessas gestantes ($2,73 \pm 0,68$ vs $2,53 \pm 0,51$ - $p < 0,05$). Em relação aos biomarcadores, verificou-se um aumento sérico nos níveis de sFlt-1 ($8796,9$ vs $6414,21$ pg/mL - $p < 0,05$) e proteína C reativa ($1327,13$ vs $1046,12$ pg/mL - $p < 0,05$) e uma redução significativa nos níveis plasmáticos de leptina ($1014,88$ vs $1152,97$ pg/mL - $p < 0,05$) entre as gestantes que apresentaram infecção por *P. vivax* quando comparadas as gestantes não infectadas. Estes resultados indicam que as alterações geradas no ambiente placentário podem ser decorrentes de distúrbios locais e sistêmicos e que, em conjunto, contribuem para um desfecho desfavorável durante a malária gestacional e, portanto, merecem especial atenção para a implantação de estratégias preventivas e curativas no controle da malária durante a gravidez.

Palavras-chave: *Plasmodium vivax*. Malária. Malária Gestacional. Biomarcadores.

ABSTRACT

Silva, NRM. Association of serum levels of sFlt-1, leptin and C-reactive protein (CRP) associated with placental malaria histopathology by *Plasmodium vivax*. [Dissertation (Master in Parasitology)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2018.

Malaria in pregnancy is a serious public health. Currently is estimated approximately 125 million of pregnancies in the world are exposed to the risk of malaria infection. Malaria in pregnancy is characterized by the presence of *Plasmodium spp.* in the peripheral blood and/or the placenta, consequently maternal anaemia, intrauterine growth retardation, low birth weight and decreased foetal viability. In Brazil, it is observed a prevalence of infections caused by *Plasmodium (P.) vivax*, where about 95% of cases occur in the Amazon Legal. Because it is a disease of great magnitude and adverse effects to the mother and the child, it is necessary to identify biomarkers predictive for a rapid diagnosis of the disease. A cross-sectional study was carried out with pregnant women living in the Alto Juruá region (Acre). The consequences of gestational infection were evaluated through the collection of biological and epidemiological data from pregnant women with or without *P. vivax* infection. The work had as main histological parameters, as nuclear aggregates, placental barrier thickness and inflammatory infiltrate were increasing quantitatively. Quantification of the biomarkers in peripheral plasma was done using the ELISA technique. Histological changes were observed in a number of nuclear aggregates (16.12 ± 7.68 vs 13.93 ± 5.96 - $p < 0.05$) and inflammatory infiltrate (9.4 ± 6.0 vs 6.3 ± 4.0 - $p < 0.001$) in pregnant women than the last malaria. In addition, the placental barrier thickening was identified in these pregnant women (2.73 ± 0.68 vs 2.53 ± 0.51 - $p < 0.05$). In relation to the biomarkers, serum levels of sFlt-1 (8796.9 vs 6414.21 pg/mL - $p < 0.05$) and C-reactive protein (1327.13 vs 1046.12 pg/mL - $p < 0.05$) and a significant reduction in plasma levels of leptin (1014.88 vs 1152.97 pg/mL - $p < 0.05$) among those with *P. vivax* infection when compared to uninfected pregnant women. This is an indication that germ changes in the environment may be erroneous, local and systemic, and that together contribute to an unfavorable outcome during gestational malaria and that deserve special attention for the implementation of preventive and curative strategies in the control of malaria during pregnancy.

Keywords: *Plasmodium vivax*. Malaria. Gestational Malaria. Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de distribuição das áreas de risco para malária no mundo em 2016	16
Figura 2 - Mapa de distribuição das áreas de risco de transmissão da malária no Brasil em 2017	18
Figura 3 - Ciclo de vida do plasmódio	19
Figura 4 - Mapa com áreas de risco para malária em gestantes.....	22
Figura 5 - Representação da patogênese da malária placentária	23
Figura 6 - Representação esquemática da classificação de malária placentária	25
Figura 7 - Representação esquemática da placenta humana	27
Figura 8 - Representação simplificada da parte periférica de um vilão placentário maduro e secções transversais típicas dos vários tipos de vilos coriônicos	29
Figura 9 - Representação simplificada de uma vilosidade terminal e suas estruturas	31
Figura 10 - Mapa do Estado do Acre mostrando a localização geográfica da região do Vale do Alto do Juruá	41
Figura 11 - Fotomicrografia dos agregados nucleares sinciciais no espaço intervilosso placentário.....	44
Figura 12 - Fotomicrografia mostrando as marcações para leucócitos totais no espaço intervilosso placentário (CD45+)	45
Figura 13 - Fotomicrografia mostrando as marcações para células mononucleares no espaço intervilosso placentário (CD68+).....	46
Figura 14 - Fotomicrografia da placenta a termo mostrando a distância entre a parede do vaso fetal e a membrana externa das vilosidades.....	47
Figura 15 - Diagrama de fluxo de seleção das gestantes participantes do estudo...	49
Figura 16 - Distribuição de casos de malária causada por <i>P. vivax</i> segregados por trimestre gestacional.	52
Figura 17 - Avaliação do peso placentário por grupo de gestantes não infectadas e infectadas por <i>P. vivax</i>	54
Figura 18 - Avaliação da quantidade de agregados nucleares sinciciais placentários em gestantes não infectadas e infectadas por <i>P. vivax</i>	56
Figura 19 - Avaliação da quantidade de células leucocitárias no espaço intervilosso placentário em gestantes não infectadas e infectadas por <i>P. vivax</i>	57

Figura 20 - Avaliação da quantidade de células mononucleares no espaço intervilloso placentário em gestantes não infectadas e infectadas por <i>P. vivax</i>	58
Figura 21 - Avaliação do espessamento da barreira placentária em gestantes não infectadas e infectadas por <i>P. vivax</i>	59
Figura 22 - Quantificação da caracterização histológica placentária de gestantes não infectadas e infectadas por <i>P. vivax</i> segregadas por paridade	60
Figura 23 - Avaliação do nível sérico de sFlt-1 em plasma periférico de gestantes não infectadas e infectadas por <i>P. vivax</i>	61
Figura 24 - Avaliação dos níveis séricos de sFlt-1 em plasma periférico segregados por paridade	62
Figura 25 - Avaliação do nível sérico de PCR em plasma periférico de gestantes não infectadas e infectadas por <i>P. vivax</i>	63
Figura 26 - Avaliação do nível sérico de PCR em plasma periférico segregados por paridade	63
Figura 27 - Avaliação do nível sérico de leptina em plasma periférico de gestantes não infectadas e infectadas por <i>P. vivax</i>	64
Figura 28 - Avaliação do nível sérico de leptina em plasma periférico segregados por paridade	65
Figura 29 - Curva ROC representando habilidade diagnóstica dos níveis de sFlt-1 periféricos como marcador biológico para malária placentária.....	66
Figura 30 - Curva ROC representando habilidade diagnóstica dos níveis de PCR periféricos como marcador biológico para malária placentária.....	67
Figura 31 - Curva ROC representando habilidade diagnóstica dos níveis de leptina periféricos como marcador biológico para malária placentária.....	68
Figura 32 - Curva ROC representando habilidade diagnóstica dos biomarcadores em conjunto como marcador para malária placentária.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características socioeconômicas da população estudada	50
Tabela 2 - Características clínicas e antecedentes obstétricos das gestantes	51
Tabela 3 - Fatores de exposição à malária e prevenção	53
Tabela 4 - Peso placentário por grupo de gestantes	54
Tabela 5 - Distribuição das lesões placentárias por grupo	55
Tabela 6 - Análise do poder discriminativo da AUC da curva ROC	66
Tabela 7 - Desempenho diagnóstico da curva ROC.....	69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Epidemiologia e distribuição da malária no mundo	16
1.2 Contexto epidemiológico da malária na Amazônia	17
1.3 Ciclo do parasito	18
1.4 Patogênese da malária	20
1.5 Malária durante a gestação	21
1.5.1 <i>Epidemiologia da Malária Gestacional</i>	21
1.5.2 <i>Malária gestacional</i>	22
1.5.3 <i>Malária placentária</i>	23
1.6 Placenta	25
1.6.1 <i>Desenvolvimento placentário humano</i>	25
1.6.2 <i>Características das vilosidades coriônicas</i>	27
1.7 Alterações histológicas durante a malária placentária	29
1.8 Biomarcadores	32
1.8.1 <i>Fatores angiogênicos e antiangiogênicos</i>	33
1.8.2 <i>Proteína C reativa</i>	35
1.8.3 <i>Leptina</i>	36
2 HIPÓTESE CENTRAL DE INVESTIGAÇÃO	38
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Aspectos éticos	40
4.2 Descrições da área estudada	40
4.3 Tipo de estudo e população alvo	41
4.3.1 <i>Critério de exclusão</i>	41
4.4 Coleta e processamento das amostras biológicas	42
4.5 Diagnóstico parasitário	42
4.6 Classificação da malária placentária	43
4.7 Avaliações histopatológicas	43
4.7.1 <i>Agregados nucleares sinciciais</i>	43

4.7.2 Infiltrado inflamatório	44
4.7.3 Espessamento da barreira placentária	46
4.8 Quantificações dos mediadores bioquímicos	47
4.9 Análises estatísticas	48
5 RESULTADOS.....	48
5.1 Gestantes excluídas.....	48
5.2 Caracterização das gestantes e dos grupos estudados.....	49
5.3 Caracterização placentária e alterações histopatológicas	53
5.4 Avaliação sérica dos marcadores placentários.....	61
5.5 Análise de sensibilidade e especificidade	65
6 DISCUSSÃO	70
6.1 Caracterização das gestantes e dos grupos estudados.....	70
6.2 Caracterização das alterações histopatológicas.....	72
6.3 Avaliação sérica dos marcadores placentários.....	73
6.4 Análise de sensibilidade e especificidade dos biomarcadores placentários	77
7 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS.....	80

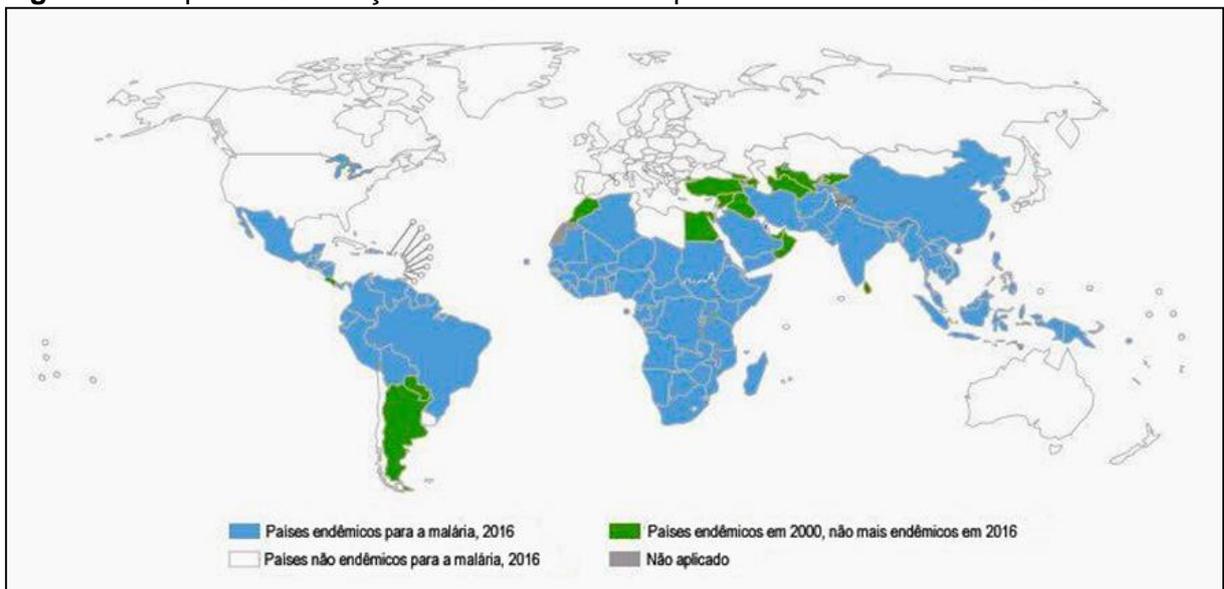
1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e distribuição da malária no mundo

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo uma das protozooses de maior impacto no mundo. De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), somente no ano de 2016 houve aproximadamente 216 milhões de casos (1). Desta maneira, a malária é considerada uma das principais doenças transmissíveis causadoras de morte (2,3). Atualmente, seis espécies infectam o homem: *Plasmodium (P.) falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. cynomolgi*, porém as infecções por *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes e apresentam as mais altas taxas de morbidade e mortalidade (4–6).

Segundo a OMS, as áreas de risco para a transmissão da doença se concentram nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente no continente africano, subcontinente indiano, sudeste asiático, Oriente Médio e Região Amazônica (Figura 1) (1). O relatório de malária de 2017 afirma que houve cerca de 429.000 mortes decorrentes da infecção por *Plasmodium* em 2016 (1). Estima-se ainda que a cada 40 segundos uma criança morra em decorrência da doença, resultando em uma perda diária de aproximadamente 2.000 pessoas ao redor do mundo (7).

Figura 1 - Mapa de distribuição das áreas de risco para malária no mundo em 2016



Fonte: modificado de OMS (2016) (8).

O *P. falciparum* é responsável por 90% dos casos em nível mundial, sendo a espécie que detém maior prevalência no continente africano com aproximadamente 99% das infecções notificadas, as quais são responsáveis também pela maior gravidade e letalidade da doença nas regiões onde é predominante (9). Por sua vez, o *P. vivax* é a principal espécie causadora de malária fora do continente africano, com aproximadamente 4% dos casos mundialmente notificados. Tem alta prevalência no sudoeste asiático, onde cerca de 58% das infecções nessa região são decorrentes desta espécie (9). No caso das Américas, os quatro países que concentram os maiores números são Venezuela (30%), Brasil (24%), Peru (19%) e Colômbia (10%) (9–11).

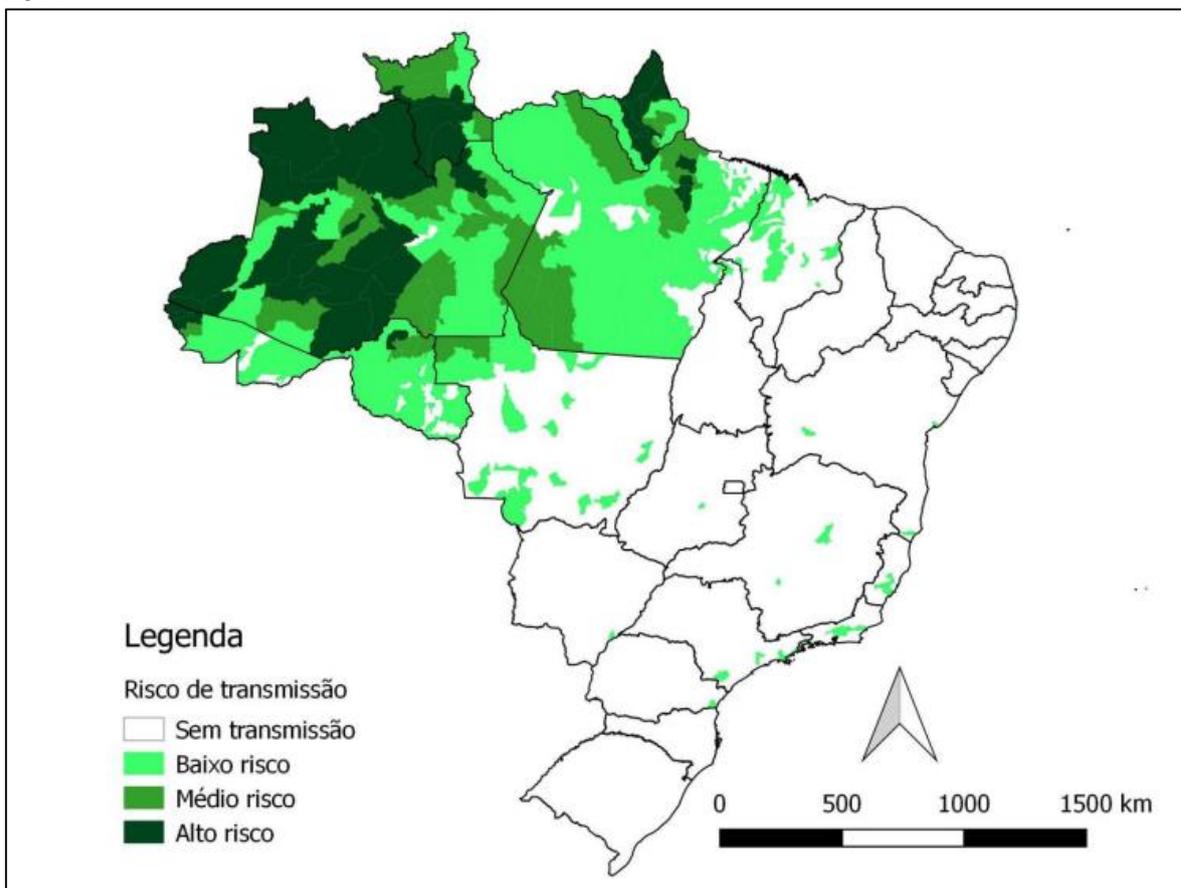
Apesar de se observar uma redução na incidência dos casos da doença e da mortalidade, a malária representa um grande problema de saúde pública. Somente no ano de 2015, aproximadamente 70% das mortes decorrentes da infecção por *P. vivax* foram de crianças menores de 5 anos (9). Além disso, encontram-se no grupo de risco as gestantes, os portadores de imunodeficiência e os viajantes, sendo os principais grupos a apresentarem os desfechos mais graves da doença (12).

1.2 Contexto epidemiológico da malária na Amazônia

No Brasil, aproximadamente 98% dos casos estão concentrados na Amazônia Legal, composta pelos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (13,14). Vale salientar que, nessas regiões, prevalecem as infecções por *P. vivax* (13,15). Os fatores que favorecem os altos índices de permanência dos plasmódios nas referidas regiões são os diferentes determinantes ambientais, como a variabilidade climática, cuja temperatura e áreas de desmatamento (16,17) favorecem de forma significativa a presença de criadouros naturais do vetor. Quanto aos fatores sociais pode-se destacar tanto os hábitos de vida dessa população tais como: o processo de migração, uso de medidas de proteção e nível educacional, bem como as condições precárias de moradias, as quais se constituem de madeira com ausência parcial ou completa de paredes, tornando o contato com o vetor mais próximo. Além disso, uma particularidade nessa região são as coleções hídricas e tanques de piscicultura próximos às residências, o que torna um ambiente propício para a multiplicação do vetor (18).

Sabe-se que o risco de contrair a doença ainda é bastante heterogêneo na região Amazônica, o qual pode ser mensurado pelo Índice Parasitário Anual (IPA) (17). A classificação das áreas endêmicas está relacionada ao grau de risco de transmissão (Figura 2), expresso em valores do IPA: baixo risco (0,1 a 9,9), médio risco (10,0 a 49,9) e alto risco (maior ou igual a 50,0) (13). No ano de 2017, dentre os municípios classificados como alto risco para transmissão, sobressaem com os maiores valores do IPA as cidades de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Rodrigues Alves, todas localizadas no Estado do Acre (19).

Figura 2 - Mapa de distribuição das áreas de risco de transmissão da malária no Brasil em 2017



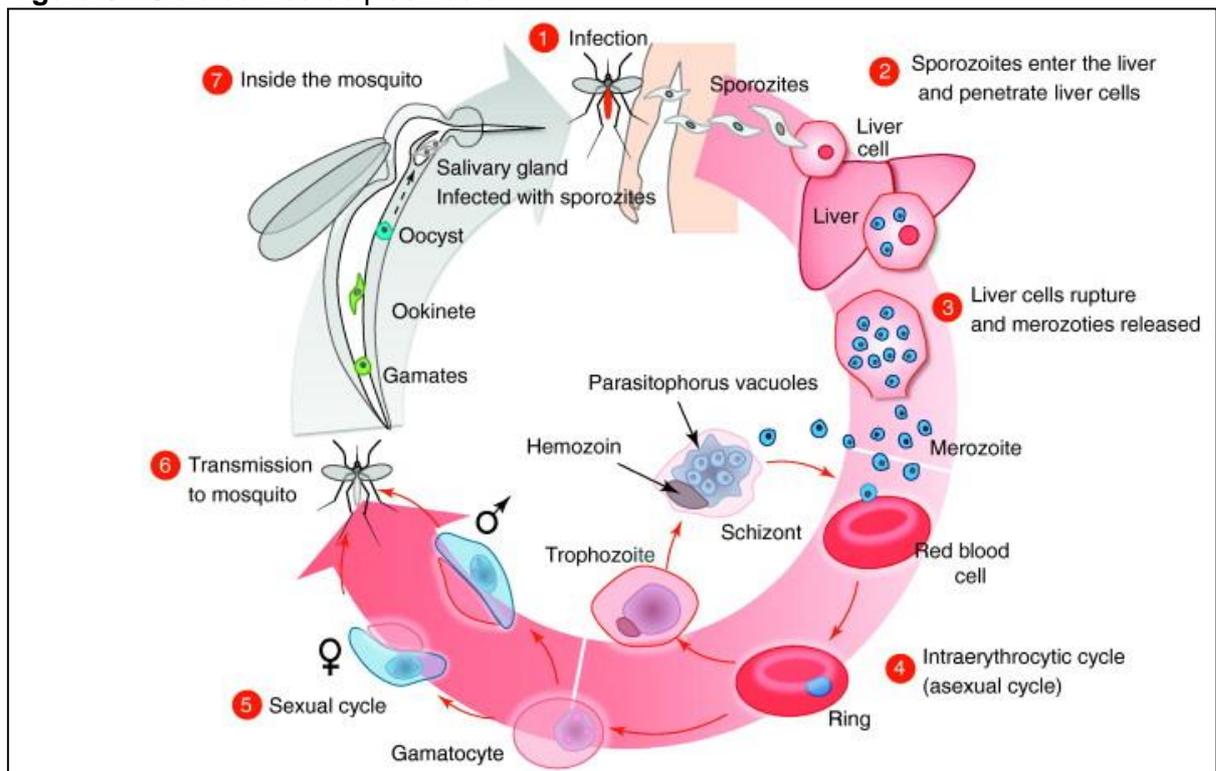
Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS (2017) (20).

1.3 Ciclo do parasito

A doença é transmitida ao homem por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Assim, a biologia do *Plasmodium* inclui um ciclo de vida em um hospedeiro intermediário vertebrado e em um hospedeiro definitivo invertebrado (Figura 3) (21).

O ciclo biológico do parasito no homem resume-se a duas fases: o ciclo hepático (pré-eritrocítico) e o ciclo sanguíneo (ciclo eritrocítico). O primeiro tem início quando a fêmea do anofelino, ao fazer seu repasto sanguíneo, inocula os esporozoítos, os quais, após entrarem na circulação sanguínea, dirigem-se até o fígado, onde penetram nos hepatócitos e produzem esquizontes, que vão dar origem a milhares de merozoítos (22). Estes uma vez liberados pelos hepatócitos, provavelmente na forma de pequenas vesículas conhecidas como merossomos, invadirão as hemácias (dando início ao ciclo eritrocítico), desenvolvendo-se em trofozoítos que, através de divisão nuclear, formam os esquizontes sanguíneos (23). Os esquizontes, ao se fragmentarem, rompem as hemácias e liberam novos merozoítos na circulação sanguínea. Alguns desses merozoítos provenientes da esquizogonia sanguínea resultarão em gametócitos, formas sexuadas responsáveis pela infecção do vetor que darão continuidade ao ciclo no seu hospedeiro definitivo (22).

Figura 3 - Ciclo de vida do plasmódio



Fonte: Cho et al. (2012) (24).

O ciclo biológico do *P. vivax* difere das outras espécies, logo após os esporozoítos penetrarem nos hepatócitos, alguns deles não irão se desenvolver em esquizontes, porém irão permanecer como formas dormentes intra-hepáticas, denominado

hipnozoítos. Salientando que essas formas podem permanecer dormentes por períodos inespecíficos, durante meses ou anos (25,26). Os mecanismos envolvidos na ativação das formas dormentes presentes nos hepatócitos ainda não estão bem elucidados. Além disso, a reativação dessas formas parasitárias leva a novos sinais e sintomas da doença e tornam o homem um reservatório, possibilitando a transmissão dos gametócitos para o vetor e, por consequência, dando origem novamente ao ciclo do *Plasmodium* no homem (26).

1.4 Patogênese da malária

A malária é caracterizada como uma doença de aspectos multifatoriais. As manifestações clínicas dependem de fatores diversos, tanto do hospedeiro quanto do parasito. No caso do hospedeiro, pode-se destacar a idade, as condições nutricionais, geográficas e socioeconômicas, bem como fatores relacionados a exposições prévias à doença (27). Enquanto no parasito, pode-se ressaltar tanto a sua diversidade genética, o que lhe possibilita adaptar-se aos hospedeiros e ter resistências às drogas, como a sua capacidade de virulência (28,29).

Os casos de malária assintomática são caracterizados pela ausência de sintomas, entretanto com a presença dos parasitos na corrente sanguínea (frequentemente associados à baixa parasitemia) (30). Geralmente, as populações que residem em áreas endêmicas apresentam uma imunidade parcialmente adquirida, com características clínicas mais brandas da doença (31). Além disso, podem tornar-se um potencial reservatório do parasita, dificultando o diagnóstico e tratamento desses indivíduos (32).

Durante a malária não complicada sintomática, os sinais e sintomas ocorrem na fase eritrocítica, quando os parasitos invadem os eritrócitos e com a sua ruptura inicia-se a sintomatologia da doença, ocorrendo entre o 7^o a 15^o dia pós-infecção(27). Associada a isso ocorre a liberação de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- α e INF- γ na corrente sanguínea do hospedeiro (33). Em virtude da ativação do sistema imune e da inflamação decorrente desse processo, surgem as manifestações clínicas inespecíficas cujo curso é gradativo ou repentino, as quais, por sua vez, podem ser caracterizadas por febre, cefaleia e calafrio (tríade malárica), e, em alguns casos, o indivíduo pode apresentar artralgia, tremores, dores abdominais, diarreia, náuseas, vômitos, fraqueza e mal-estar (34,35).

Durante os casos da malária grave, o indivíduo pode apresentar: malária cerebral, edema pulmonar, insuficiência renal aguda, anemia – proveniente da hiperparasitemia que leva à destruição exacerbada de hemácias. Além disso, observam-se complicações metabólicas como acidose, hipoglicemia e malária placentária ocasionando insuficiência placentária, prematuridade, baixo peso ao nascer (BPN) e até aborto (34,36,37). Vale lembrar que os casos graves da doença são comumente observados em crianças menores de cinco anos de idade, gestantes, viajantes que retornam de regiões endêmicas ou pessoas que nunca tiveram o contato com o parasito, pois essas consequências devem-se à ausência ou a baixa imunidade ao parasita (38,39).

Interessantemente, apesar de existir uma alta proporção de casos de malária grave por *P. falciparum*, estudos recentes também tem associado a infecção pelo *P. vivax* a graves complicações, tais como: anemia grave, hiperbilirubinemia, disfunções renais, síndromes respiratórias e convulsões (40,41). Recentemente, estudos conduzidos na América Latina com gestantes infectadas por *P. vivax*, reportaram não só alguns desfechos adversos, assim como risco de anemia materna, malária placentária e, conseqüentemente, prematuridade e BPN (42–45).

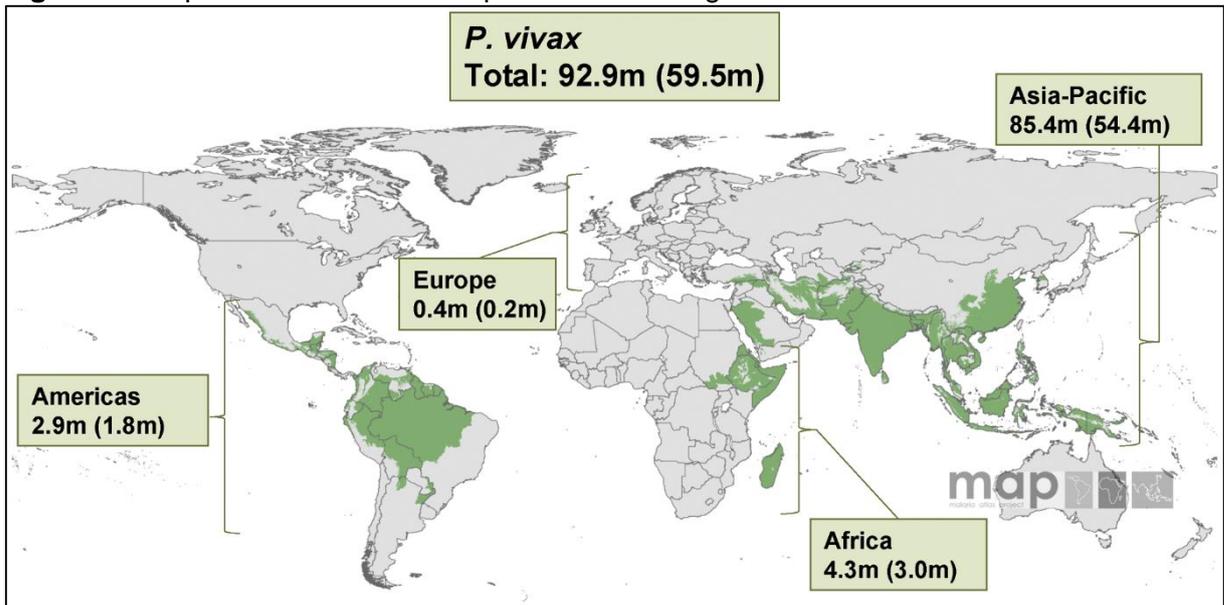
1.5 Malária durante a gestação

1.5.1 Epidemiologia da Malária Gestacional

A malária gestacional é caracterizada pela presença do *Plasmodium* no sangue periférico e/ou na placenta, pode apresentar sintomas clínicos (46). De acordo com dados da OMS, a infecção pelo *Plasmodium* durante o período gestacional ocasiona aproximadamente 10.000 óbitos maternos, um número não estimado de abortos e cerca de 20.000 óbitos de crianças no primeiro ano de vida, decorrentes do BPN e de morte perinatal (47).

Aproximadamente, 92,9 milhões de mulheres residem em áreas endêmicas para o *P. vivax* (Figura 4), estando sob o risco de contraírem a doença e, pr conseguinte, suas complicações (48,49).

Figura 4 - Mapa com áreas de risco para malária em gestantes



Fonte: Dellicour et al. (2010) (49).

1.5.2 Malária gestacional

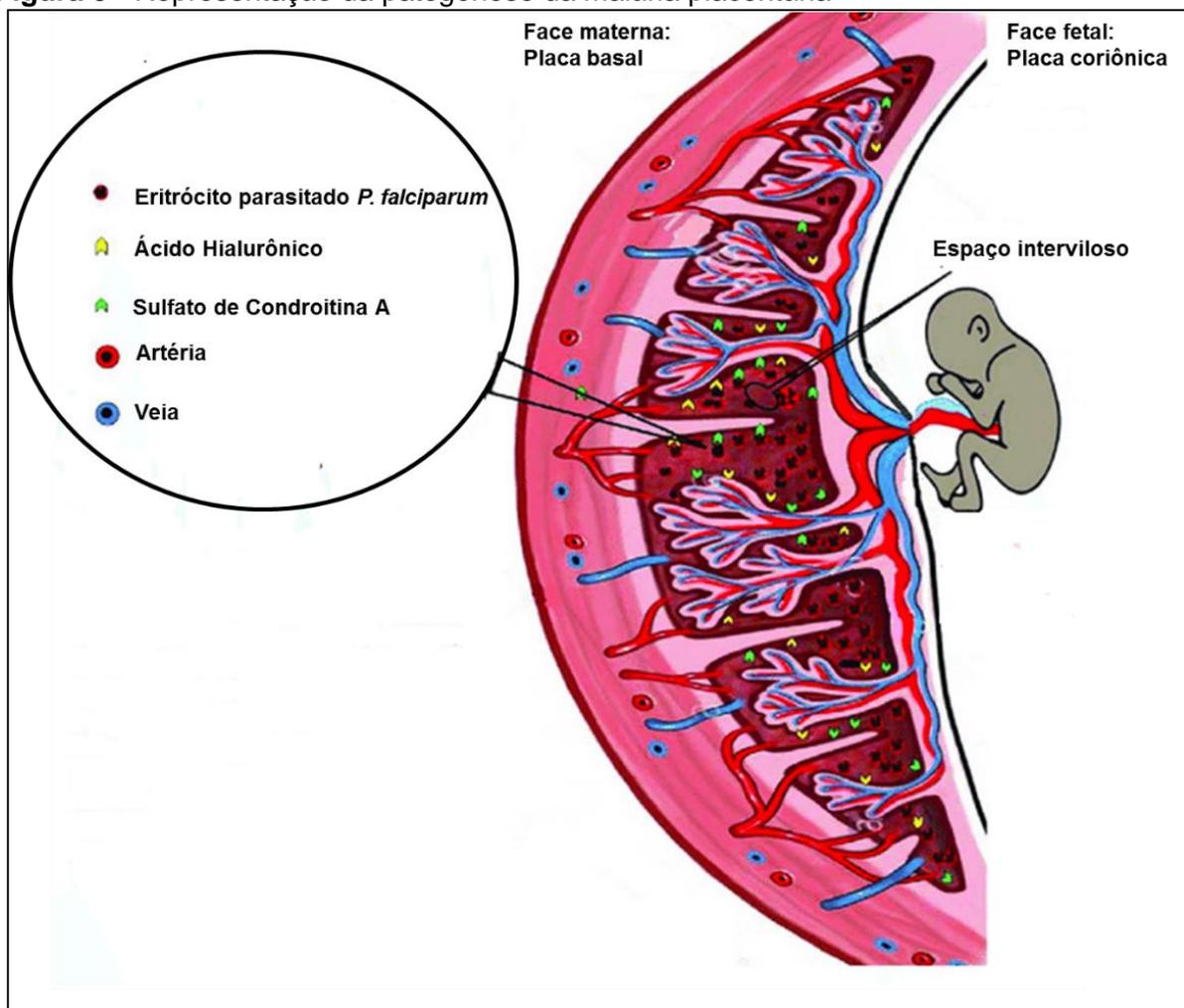
Os desfechos da malária gestacional podem diferir de região para região a depender do grau de transmissão da doença. No caso de regiões de alta transmissão (estável), as gestantes usualmente apresentam efeitos menos graves da malária, ou seja, podem apresentar pouco ou nenhum sintoma clínico da doença, apesar de apresentarem altos níveis de parasitemia (50). Nessas regiões os efeitos mais graves são observados durante as primeiras gestações, o que indica a existência de um forte mecanismo de proteção associado à imunidade específica em face das formas placentárias do plasmódio nas gestantes dessas regiões.

Por outro lado, em áreas de baixa transmissão ou transmissão instável, as gestantes podem apresentar sintomas e complicações mais graves, fator que está relacionado ao nível de imunidade adquirido contra a infecção (51). De forma geral, para as gestantes que residem nessas regiões, a malária durante a gravidez apresenta-se de forma sintomática e, se não diagnosticada e tratada precocemente, pode trazer as seguintes complicações: malária cerebral, edema pulmonar, anemia grave, hipoglicemia, abortamento, natimortos, prematuridade, BPN, malária congênita e óbito materno (52).

1.5.3 Malária placentária

Os mecanismos biológicos que envolvem a susceptibilidade à malária durante a gestação, embora não estejam bem elucidados têm sido amplamente discutidos. Atualmente está bem estabelecido o mecanismo de adesão para o *P. falciparum*. Uma característica importante dos eritrócitos parasitados por *P. falciparum* é a capacidade de se juntar ao endotélio vascular e, posteriormente, ser sequestrado em diferentes órgãos, tais como: o cérebro, o pulmão e a placenta (53). No caso desta, o acúmulo do material parasitário ocorre no espaço intervilloso placentário, mais especificamente na superfície do sinciciotrofoblasto, que possui uma grande quantidade de Sulfato de Condroitina A e Ácido Hialurônico, permitindo, desta forma, a adesão dos eritrócitos parasitados a essas moléculas (Figura 5) (54,55).

Figura 5 - Representação da patogênese da malária placentária



Representação diagramática da malária placentária. A infecção por *P. falciparum*, resulta na infiltração de eritrócitos parasitados no espaço intervilloso placentário, ocasionando um processo inflamatório exacerbado. Fonte: adaptado de Sharma e Shukla (2017) (56).

Esse mecanismo de adesão ocorre devido à expressão de uma proteína denominada PfEMP1 (Proteína de membrana eritrocitária-1 do *P. falciparum*) transcrita aleatoriamente pela família de genes var. Essa proteína é translocada para a superfície do eritrócito parasitado, os quais são sequestrados e se acumulam no ambiente placentário (53,55,57). Contudo, pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvendo o *P. vivax*. Estudos recentes têm associado um mecanismo de citoadesão, no entanto, a relação entre este processo e a patogênese relacionado à espécie ainda permanece incerta (58,59).

Por fim, como resultado do sequestro dos eritrócitos parasitados por *P. falciparum* na placenta, ocorre um acúmulo de células mononucleares, preponderantemente de monócitos e macrófagos. Desse modo, há uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, tais como: proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa (MIP-1 α), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) e interleucina 1 beta (IL-1 β); que, por sua vez, leva ao recrutamento de monócitos adicionais e, como resultado desse intenso processo inflamatório no ambiente placentário, acontece a formação de depósitos de fibrina, prejudicando as trocas materno-fetais e, desta forma, resulta em efeitos adversos tanto para a mãe quanto para o feto (60,61).

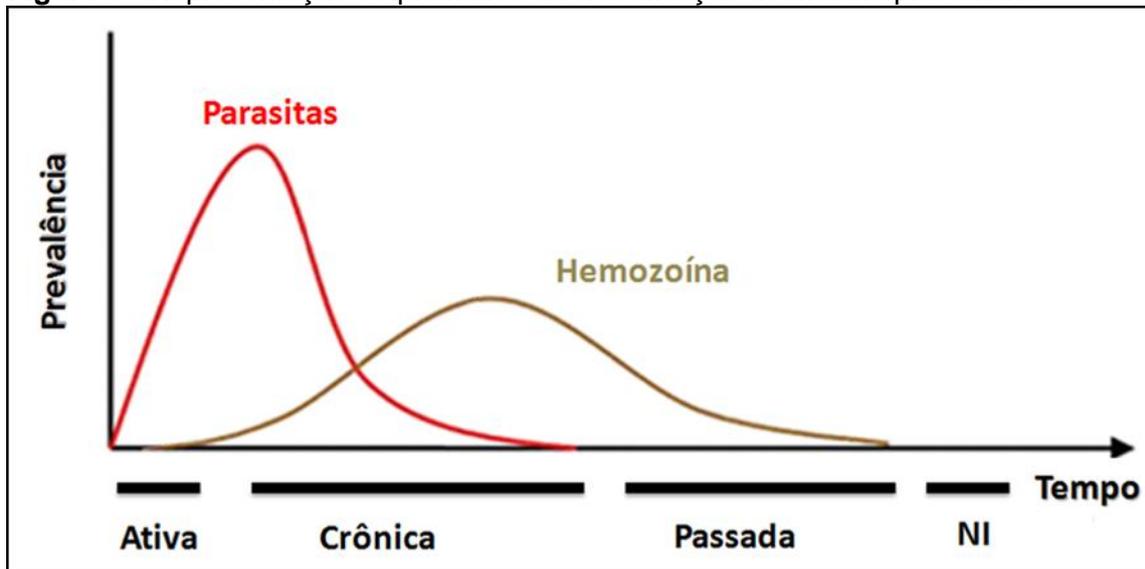
1.5.4 Classificação da malária placentária

Para Bulmer (1993), a malária placentária pode ser classificada histologicamente em quatro categorias, refletindo o tempo cronológico da infecção (62).

- Não infectada: ausência do parasito ou de hemozoína no ambiente placentário;
- Infecção ativa aguda: caracteriza-se pela presença de eritrócitos infectados no espaço intervilosso placentário e monócitos;
- Infecção ativa crônica: ocorre a presença de eritrócitos infectados, hemozoína e monócitos no espaço intervilosso placentário ou livre nos depósitos de fibrina;
- Infecção crônico-passada: caracterizada pela ausência de parasitos no ambiente placentário, apenas contendo hemozoína no espaço intervilosso placentário e em material fibrinóide.

Entretanto, outros autores têm adaptado o sistema de quantificação e qualificação da MP, como, por exemplo, Muehlenbachs e colaboradores, que desenvolveram parâmetros semiquantitativos baseados no grau de inflamação e na deposição dos pigmentos maláricos em fibrina intervillosa durante a MP (Figura 6) (63).

Figura 6 - Representação esquemática da classificação de malária placentária



Fonte: Adaptado de Muehlenbachs (2010) (63).

1.6 Placenta

1.6.1 Desenvolvimento placentário humano

A placenta humana é um órgão transitório, com uma estrutura altamente invasiva, proliferativa e do tipo hemocorial, mensurando entre 15 a 25 cm de diâmetro, com cerca de 3 cm de espessura e um peso médio de 600 g. O adequado desenvolvimento placentário exerce um papel importante durante a gestação, pois é responsável pelo transporte de nutrientes e metabólitos, funções endócrinas, imunológicas, secreção de moléculas reguladoras e atua na proteção do feto contra algumas doenças maternas (Figura 7) (64,65).

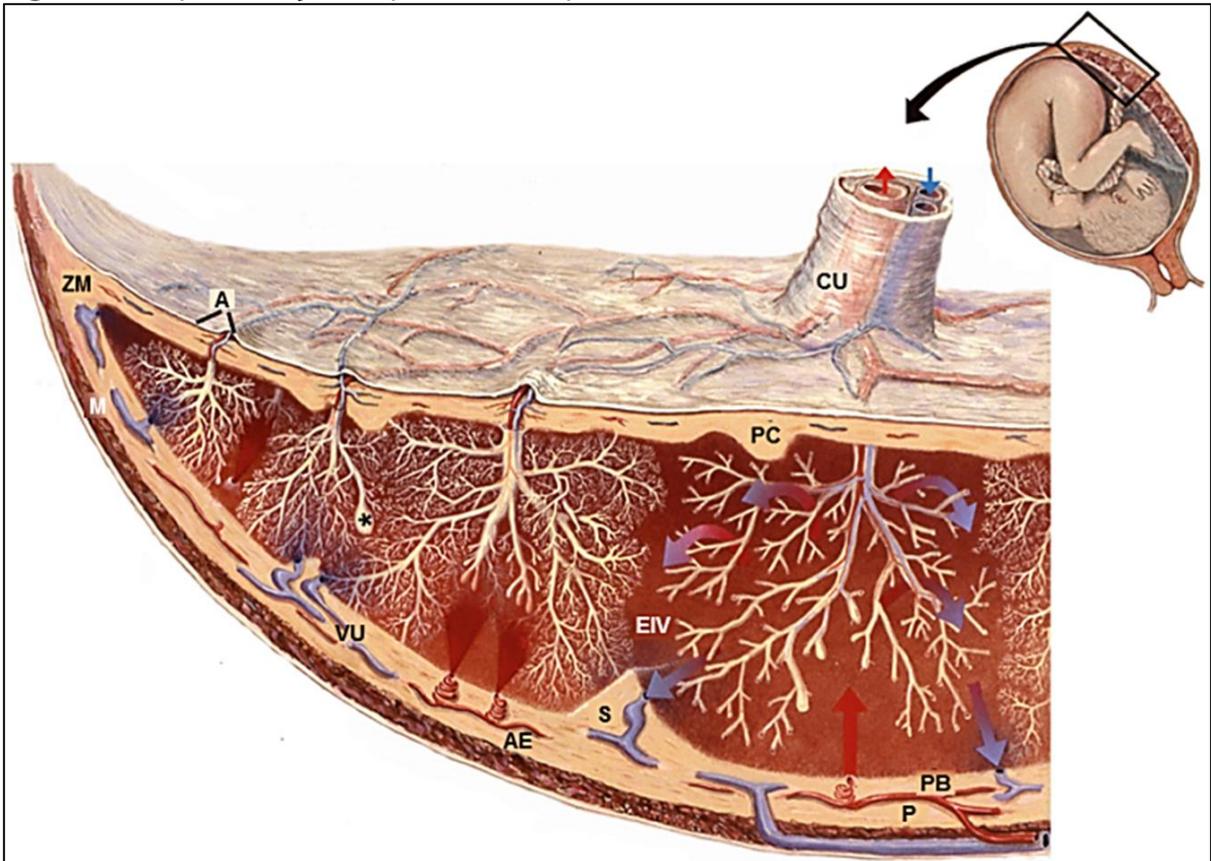
A placenta começa a se desenvolver por volta do sexto dia após a concepção, no momento em que o blastocisto adere à parede do endométrio, começando a invadi-lo, ocorrendo à expansão de células trofoblásticas, as quais se diferenciam em citotrofoblasto e, posteriormente, formam o sinciciotrofoblasto (64,66). Este órgão altamente complexo e especializado é formado por duas unidades estruturais: a placa

coriônica, constituída por vilosidades derivadas do feto, que possuem estruturas físicas separando o compartimento fetal das estruturas que contêm sangue materno; e a placa basal, constituída pela parede uterina, a qual separa o ambiente placentário da decídua materna e do miométrio (64).

Durante a segunda semana de gestação, começam a se formar as vilosidades coriônicas, que são recobertas por uma camada de célula citotrofoblástica e sinciotrofoblástica (67). O citotrofoblasto possui um formato mais globoso e são bem menos numerosos, em contrapartida, o sinciotrofoblasto é caracterizado por uma camada de célula multinucleada, que possui uma organização variada e camadas de espessuras variáveis e fica em contato direto com o sangue materno (64).

No interior das vilosidades coriônicas passam os vasos fetais, que realizam as trocas com o sangue materno que circula no espaço interviloso. Com a progressão da gestação, aumenta o número de vasos no interior dos vilos e ocorre uma redução do tecido mesenquimal, facilitando, assim, as trocas materno-fetais. Adicionalmente, podemos observar do lado oposto da placa coriônica a presença do cordão umbilical, um anexo que possui duas veias e uma artéria, permitindo por meio desse a comunicação entre a mãe e o feto (64,67).

Figura 7 - Representação esquemática da placenta humana



A placa coriônica (PC) e a placa basal (PB) envolvem o espaço intervilloso (EIV) nas partes superior e inferior, respectivamente. As árvores vilosas vascularizadas (*) projetam-se a partir da placa coriônica para o espaço intervilloso e são diretamente rodeadas pelo sangue materno que chega pelas artérias espiraladas (AE). Também podem ser observados o leito placentário (P), o miométrio (M), o âmnio (A), um septo placentário (S), o cordão umbilical (CU), as veias uterinas (VU) e a zona marginal (ZM) entre as membranas placentária e fetal. Fonte: adaptada de Kaufmann e Scheffen (1992) (68).

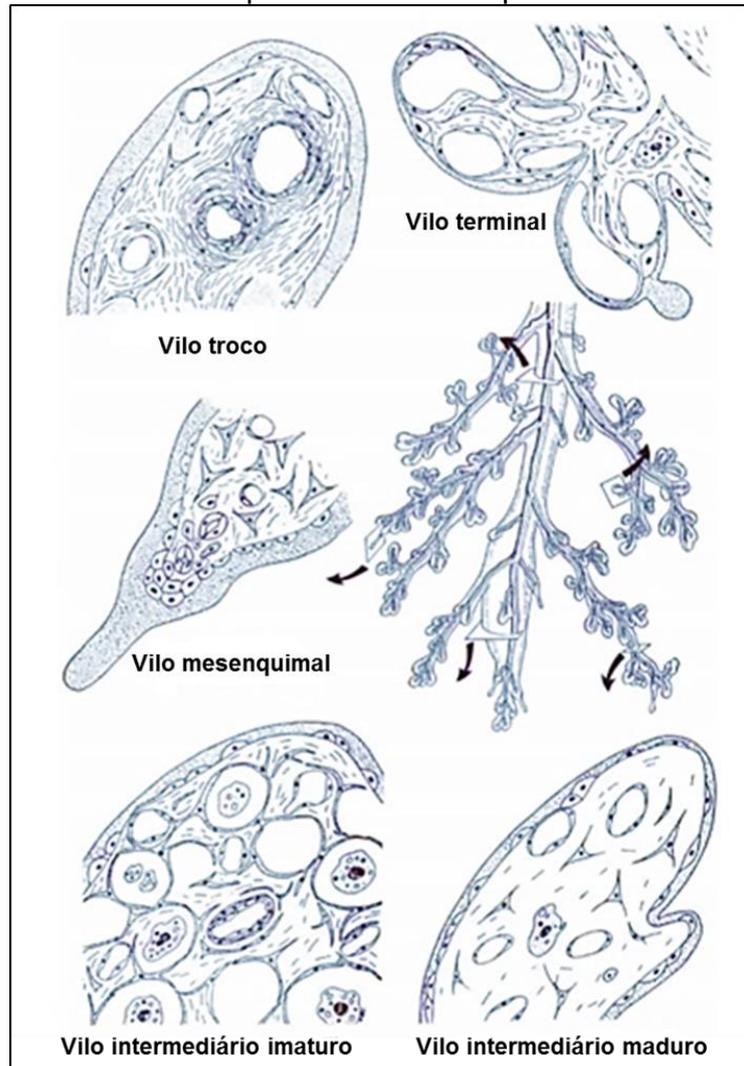
Portanto, quaisquer alterações durante o processo de desenvolvimento placentário acarretam em uma inadequada função da placenta, que pode conduzir a complicações durante a gestação, causando impacto no desenvolvimento fetal, como restrição do crescimento intrauterino, maior morbidade e mortalidade perinatal (69,70).

1.6.2 Características das vilosidades coriônicas

As árvores vilosas são as principais estruturas da placenta, que podem ser subdivididas a partir de cinco características diferentes, como a estrutura do vilos, estágio do seu desenvolvimento, ramificação dos vasos, características histológicas e componentes celulares. Existem assim, pelo menos, cinco tipos de vilosidades coriônicas (Figura 8) (66).

- Vilosidades-tronco ou de ancoragem - conectam-se à placa coriônica e são caracterizadas por um estroma fibroso com vasos espessos e microvasos. Essas vilosidades são compostas de músculo liso e fibrose no estroma central. De forma geral, a função das vilosidades-tronco é apoiar as estruturas das árvores vilosas (71);
- Vilosidades intermediárias - são continuações das vilosidades-tronco, caracterizadas por tecido conjuntivo, estroma reticular, células Hofbauer (macrófagos fetais) e vasos mais proeminentes. Além disso, contam com uma camada descontínua de citotrofoblasto e, por fim, uma camada de sinciotrofoblasto que permanece contínua. Essas porções intermediárias são consideradas o centro da árvore vilosa e são os principais centros de trocas gasosas durante o primeiro e o segundo trimestre gestacional (66);
- Vilosidades intermediárias maduras - são ramificações mais longas e delgadas, com a presença de vasos fetais, como os capilares, as arteríolas e as vênulas juntamente com os feixes de fibra de colágeno em seu estroma e a partir das quais derivam as vilosidades terminais (68);
- Vilosidades terminais - ocorre uma grande capilarização e os sinusoides fetais são amplamente dilatados. Os vilos terminais, os capilares fetais e o sinciotrofoblasto são separados por apenas uma fina camada de membrana com aproximadamente 4-6 μm e, desta forma, facilitam as trocas materno-fetais (66);
- Vilosidades mesênquimais – são estruturas presentes nos primeiros estágios da gravidez, caracterizadas por terem um estroma solto, capilares discretos e duas camadas completas de trofoblasto circundante, uma camada de citotrofoblasto externo na árvore vilosa, cuja estrutura é responsável por quase toda a atividade endócrina (71).

Figura 8 - Representação simplificada da parte periférica de um vilão placentário maduro e secções transversais típicas dos vários tipos de vilos coriônicos



Fonte: adaptada de Baergen e colaboradores (2011) (72).

1.7 Alterações histológicas durante a malária placentária

A malária placentária pode causar alterações na estrutura placentária, o que já foi demonstrado por alguns estudos (73,74). Essas mudanças morfológicas incluem presença de eritrócitos infectados no espaço intervilloso, acúmulo de células leucocitárias e mononucleares, depósitos de fibrina, espessamento da membrana basal e aumento de agregados nucleares sinciciais (75). Essas alterações podem comprometer as trocas materno-fetais, propiciando desfechos adversos neonatais e morte perinatal (74–76).

A maioria dos estudos que analisou essas alterações foi conduzida em regiões da África-subsaariana, consideradas de alta transmissão, onde ocorre o maior número

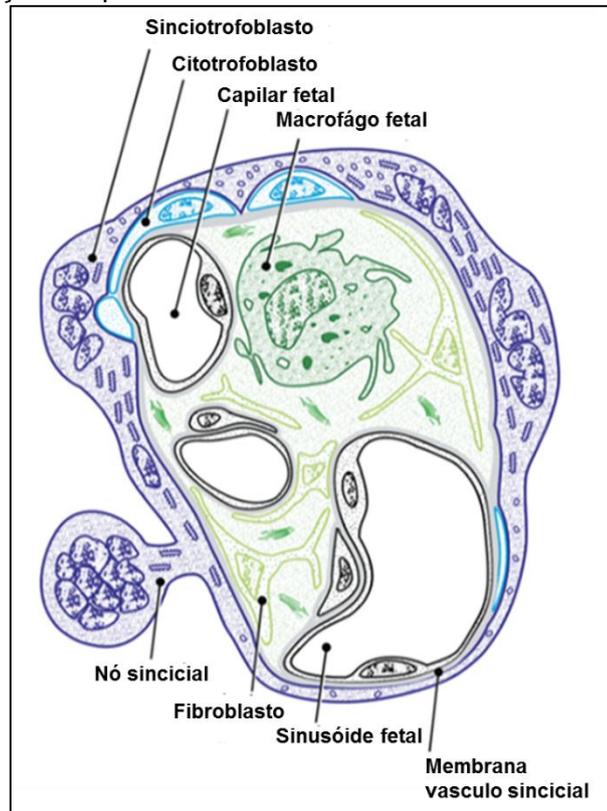
de infecções por *P. falciparum* e apresentam os desfechos mais graves da malária placentária (77,78). Além disso, os impactos da malária placentária podem diferir em gestantes que moram em áreas de baixa transmissão (79).

Contudo, em uma pesquisa conduzida em gestantes infectadas por *P. vivax* em uma região de baixa transmissão, foram observadas durante as análises alterações histológicas placentárias, como o aumento de agregados nucleares sinciciais, acúmulo de células mononucleares e espessamento da barreira placentária (80). Desta maneira, indicando que a infecção pelo *P. vivax* também pode causar desfechos adversos durante a gestação.

Sabe-se que algumas patologias placentárias estão associadas às alterações macroscópicas na placenta, podendo apresentar áreas de infarto, fibrose e calcificação; e em nível microscópico, dentre outras muitas alterações, também é possível observar o aumento exacerbado da presença dos agregados nucleares sinciciais (68,81). Estes agregados nucleares sinciciais ou nós sinciciais são caracterizados por aglomerados de núcleos do sinciotrofoblasto (Figura 9), os quais estão presentes em mais de 40% dos vilos terminais, sendo encontrados na placenta a termo, gestações em locais com altas altitudes. No entanto, o seu aumento pode estar relacionado à gravidade de algumas doenças como pré-eclâmpsia, síndrome antifosfolípide e malária placentária (81–83).

Estas estruturas presentes no vilos terminais podem ser classificadas em nós verdadeiros, brotos ou pontes (84). Os nós verdadeiros possuem núcleos em degeneração, que se projetam para a superfície dos vilos; os nós do tipo broto são os mesmo núcleos em degeneração, porém se projetam para o interior do espaço viloso aparecendo com maior frequência ao final da gestação; e, por fim, os nós do tipo ponte são provenientes da fusão dos nós do tipo broto com as vilosidades adjacentes, fortalecendo a estrutura da árvore vilosa (66,85,86).

Figura 9 - Representação simplificada de uma vilosidade terminal e suas estruturas



Fonte: adaptada de Baergen e colaboradores (2011) (72).

O aumento dessas estruturas tem sido associado aos casos de hipóxia, hiperóxia e espécies reativas de oxigênio (81). Assim, a análise dessas estruturas tem sido utilizada como parâmetro histopatológico para avaliar a intensidade das lesões placentárias em gestantes infectadas por *Plasmodium* sp. Outro parâmetro avaliado nas placentas infectadas por *Plasmodium* reside no acúmulo de células mononucleares e leucocitárias. As placentas infectadas por *P. falciparum* mostram uma significativa proporção de células inflamatórias no espaço intervilo e estão intimamente relacionadas aos níveis de parasitemia local, mais especificamente, no espaço viloso placentário (87,88). Esse infiltrado inflamatório tem sido caracterizado por ser predominantemente formado por monócitos e macrófagos e, em menor quantidade, constituído por algumas populações celulares, as quais são compostas por granulócitos e linfócitos (62,75,87).

Neste caso, os monócitos e macrófagos encontram-se presentes em aproximadamente 30% das placentas infectadas por *Plasmodium* e podem desempenhar importantes papéis durante a infecção. Sugere-se que o acúmulo dessas células no espaço viloso placentário na maior parte das vezes pode estar

associado a uma parasitemia local, além de atuar na depuração dos eritrócitos infectados (75).

Diante disso, o aumento dessas células inflamatórias no espaço intervilosso placentário pode causar danos à morfologia placentária, mais precisamente nos vilos e, assim, prejudicar as trocas materno-fetais (76). Vale salientar que alguns estudos com gestantes infectadas por *P. vivax* já demonstraram a presença dessas alterações morfológicas na placenta, no entanto, ficaram limitados a números reduzidos de amostras placentárias (76,80,89).

Outra alteração histológica placentária encontrada nas gestantes infectadas é o aumento do espessamento da barreira placentária. Alguns estudos têm observado que as gestantes infectadas pelo *Plasmodium* demonstraram ter um maior espessamento dessa estrutura, quando comparadas com as não infectadas (90–92). Contudo, mais estudos se fazem necessários a fim de avaliar o espessamento da barreira placentária, principalmente, nas gestantes infectadas pelo *P. vivax*.

1.8 Biomarcadores

Os biomarcadores são indicadores biológicos que podem ser mensurados quantitativamente no sangue periférico. Durante os processos patológicos algumas alterações bioquímicas e celulares podem ocorrer, e a mensuração por meio de amostras biológicas possibilita identificar o risco de se desenvolver determinada doença ou realizar um diagnóstico precoce (93). Neste sentido, a utilização de marcadores biológicos também pode ser realizada em conjunto, conferindo uma melhor sensibilidade e especificidade para a detecção de patologias, de forma não invasiva, rápida e de baixo custo (94).

De forma geral, os biomarcadores representam importantes ferramentas, sendo determinantes para a avaliação na área médica ou em pesquisas científicas (95). Algumas alterações que ocorrem no corpo humano podem ser avaliadas sericamente, indicando respostas contra microrganismos invasores, patógenos ou resposta a terapias profiláticas (96). Em outros casos podem ser utilizados como indicadores de processos biológicos naturais do organismo, direcionamento de uma conduta terapêutica personalizada ou prevenção de doenças – através da estratificação de risco – como, por exemplo, a utilização do risco de Framingham, que avalia o risco de se desenvolver doenças cardiovasculares em dez anos (97).

Algumas doenças assintomáticas como artrite reumatoide e lupus eritematoso sistêmico podem ser mensuradas através de biomarcadores clínicos e a detecção pode fornecer ao paciente um diagnóstico precoce, possibilitando uma rápida intervenção farmacológica capaz de prevenir sequelas da doença (98).

Neste viés, a utilização de biomarcadores confere uma sensibilidade e acurácia para investigar possíveis processos patológicos (99). A possibilidade de se detectar e avaliar biomarcadores na patogênese da malária gestacional é de grande relevância, sobretudo em zonas endêmicas, caracterizadas pelas altas incidências de infecção nas gestantes e, conseqüentemente, em significativos casos assintomáticos (100). Sendo assim, a detecção de potenciais marcadores biológicos auxilia não somente na classificação de risco, formulação de novas estratégias, assim como no início precoce da profilaxia (99).

As citocinas, as quimiocinas e os mediadores inflamatórios não específicos podem ser potenciais biomarcadores na patogênese da malária grave. A malária cerebral é uma importante e complexa condição clínica, que pode ocorrer durante a infecção por *Plasmodium*. Em um estudo realizado com crianças, avaliou-se os fatores relacionados a apoptose, tais como: IP-10, Il-1r, sTNFR1, sTNFR2, sFas e a redução de fatores neurogênicos protetores (PDGFbb) no soro e líquido cefalorraquidiano dessas crianças, além de verificar uma estreita associação com o quadro clínico da doença, podendo estes serem utilizados como potenciais biomarcadores (101).

Nesse mesmo contexto, recentemente no Malawi, foram mensurados marcadores de inflamação, angiogênese, coagulação e fatores nutricionais em gestantes infectadas por *P. falciparum*. Foi demonstrado que o fator solúvel com a tirosina-kinase 1 (sFlt1), a proteína C reativa e a leptina seriam bons biomarcadores para identificarem a malária placentária (102). Por outro lado, quando se trata de infecções pelo *P. vivax* os estudos são escassos, não havendo nada descrito na literatura que associe biomarcadores à malária placentária por este parasito.

1.8.1 Fatores angiogênicos e antiangiogênicos

Durante a gestação, uma ampla gama de fatores angiogênicos é produzida na placenta, sendo responsável pela angiogênese e vasculogênese placentária, a qual se pode destacar as moléculas da família do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos e angiopoetinas/Tie. No caso da família

do VEGF pode-se ainda incluir as seguintes moléculas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário (PlGF) (103). Essas moléculas possuem receptores específicos que consistem em três proteínas-tirosinas-quinases: VEGF (VEGFR-1, Flt-1), receptor-2 de VEGF (VEGFR-2, Flk-1 / KDR), VEGFR-3 e correceptores de proteína-quinase: neuropilina-1 e neuropilina-2 (104).

Como dito anteriormente, os fatores angiogênicos, tais como: o VEGF estão envolvidos nos mecanismos de angiogênese e vasculogênese atuando como um importante promotor de proliferação e sobrevivência de células endoteliais, e desenvolvendo um papel fundamental na permeabilidade vascular (105). O fator de crescimento placentário (PlGF) pertence à família do VEGF, o qual possui uma atividade pró-angiogênica e sendo bastante expresso na placenta. Esta molécula possui tropismo ao receptor Flt-1, aumentando a capacidade de ação do VEGF-A, o qual é responsável pelo crescimento vascular placentário, proliferação de células endoteliais, permeabilidade vascular e sobrevivência de células endoteliais (106). Contudo, quando submetido a condições de hipóxia, um *splicing* alternativo do gene da molécula Flt-1 na forma de sFlt-1 mRNA é gerado, e essa isoforma molecular é produzida e secretada a partir da placenta, sendo liberada na corrente sanguínea materna (106).

Desse modo, o sFlt-1 quando se encontra na forma livre age como antagonista da angiogênese, ou seja, é uma proteína antiangiogênica; e quando se liga ao fator de VEGF e ao fator de crescimento placentário PlGF bloqueia suas atividades biológicas (107). Um estudo *in vitro* demonstrou que a adição de sFlt-1 inibiu a invasão trofoblástica induzida pela ação do VEGF-A (108). A concentração sérica do sFlt-1 encontra-se relativamente baixa no início da gravidez, aumentando na segunda metade, com pico de liberação máximo no terceiro trimestre. Esse comportamento parece ser fisiológico e essencial no controle da angiogênese placentária (109).

Os níveis séricos de PlGF começam a aumentar progressivamente a partir do primeiro trimestre chegando ao seu ápice no terceiro trimestre e, posteriormente declinando. Em contrapartida, os níveis de sFlt-1 encontram-se relativamente estáveis, porém aumentando substancialmente no terceiro trimestre e, ao final do parto de modo a contrabalancear os níveis séricos de PlGF. Em algumas alterações placentárias é possível mensurar os níveis de sFlt-1, antes mesmo que apareçam os sintomas clínicos (110). No caso da pré-eclâmpsia, já foi demonstrado que durante a

patologia ocorre um aumento exacerbado de sFLT-1 e, a relação dos níveis sérico de PlGF e sFlt-1 são bons biomarcadores para a diagnosticar a pré-eclâmpsia (111).

Portanto, mensurar o nível sérico de fatores angiogênicos placentários como o sFlt-1, nos permite identificar previamente algumas disfunções placentárias que possam estar ocorrendo durante a gestação, e desta forma, evitar desfechos adversos tanto para mãe quanto para o feto (112). Vale ressaltar, que ainda são limitados os estudos que envolvem a quantificação sérica deste biomarcador na malária.

1.8.2 Proteína C reativa

A proteína C reativa (PCR) é um mediador inflamatório não específico, que promove a interação entre imunidades humoral e celular. Essa substância é produzida no fígado e é classificada como pentraxina. Trata-se de um pentâmero com uma fenda ligadora de fosfatidilcolina dependente de íons cálcio e outras fendas na face oposta que se ligam ao componente do sistema complemento C1q e à porção Fc de imunoglobulinas (Fc γ) (113).

Sua função é se ligar a patógenos e células lesadas e/ou apoptóticas, a partir destas iniciar sua eliminação por meio da ativação do sistema complemento ou de fagocitose. Seu mecanismo de ação permite considerá-la como uma opsonina, que são moléculas presentes no plasma que se ligam aos microrganismos estranhos ao organismo, tornando-os mais suscetíveis à fagocitose e à lise (113,114). A PCR também atua regulando a intensidade da reação inflamatória, por se tratar de ser uma proteína de fase aguda positiva, que se eleva significativamente quando ocorrem diversos tipos de lesões sistêmicas (114).

De forma geral, a PCR aumenta gradualmente, elevando-se dentro de 2 horas, posteriormente, atinge limites basais dentro de 6 horas aproximadamente, e, por fim, chega ao seu pico dentro de 48 horas (115). Durante os processos inflamatórios agudos, a PCR pode atingir até 50.000 vezes os seus valores basais, sendo utilizada há bastante tempo na área médica como um biomarcador inflamatório para detectar algumas patologias ou realizar uma triagem clínica (115).

A sua aplicabilidade pode ser utilizada para detectar o risco e/ou diagnosticar doenças cardiovasculares, infecciosas, pancreatite, sepse, colecistite, doenças inflamatórias pélvicas, bem como outras condições, tais como: obesidade, estresse e depressão (116,117). Alguns estudos associam os altos níveis de PCR a

complicações gestacionais, mais especificamente, corioamnionite, pré-eclâmpsia, ruptura das membranas fetais, parto prematuro, restrição do crescimento e perda fetal (118–120).

Entretanto, os estudos que avaliam as proteínas de fase aguda na malária, como a PCR, ainda são limitados, principalmente, quando envolvem um grupo bastante específico: as gestantes infectadas por *P. vivax*. Entretanto, algumas pesquisas já publicadas têm utilizado a PCR e outros marcadores em associação, como importantes biomarcadores para os casos de malária grave, como nas infecções por *P. falciparum* (121).

1.8.3 Leptina

A leptina é um polipeptídeo com 167 aminoácidos que foi originalmente descrito como hormônio das células adiposas, sendo liberado na corrente sanguínea tanto na sua forma protéica livre, quanto na isoforma solúvel do seu receptor (Ob-Re) (122,123). Esta proteína é liberada pelos adipócitos, porém sua expressão pode ser regulada por outros tecidos e possuir diferentes funcionalidades (122,124). Além disso, essa molécula atualmente vem sendo estudada e considerada uma citocina pró-inflamatória, pertencendo à classe das citocinas do tipo I e com uma estrutura similar a interleucina-6 (125).

Outra característica desta molécula está relacionada a seus efeitos pleiotrópicos, ou seja, os múltiplos efeitos que o gene tem de controlar, características que não estão relacionadas entre si. Neste caso, a leptina exerce um papel no controle da ingestão alimentar, regulação neuroendócrina por meio do eixo hipotalâmico, gasto energético e, por fim, da função reprodutora (126). Esta molécula é secretada em níveis mais altos pelos adipócitos e, em concentrações mais baixas, pelo músculo esquelético, estômago e placenta (127,128).

No caso da placenta, as células responsáveis por sua secreção são sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto, que, posteriormente, são liberadas na circulação materna e fetal (129,130). Durante o primeiro e segundo trimestres, a placenta libera altos níveis séricos de leptina, sendo aproximadamente 98% liberados na circulação materna e 2% na circulação fetal (129,131).

A produção desse polipeptídeo durante a gestação atua como um importante mediador não apenas na proliferação celular, na angiogênese placentária, no

crescimento fetal e placentário, assim como na maturação do sistema imune fetal (124,126,132,133). Os níveis reduzidos dessa proteína na placenta durante a gestação podem ocasionar efeitos adversos, como a restrição do crescimento intrauterino (RCIU) (130).

Há estudos que têm demonstrado aumento nos níveis de leptina em algumas desordens, tanto gestacionais quanto reprodutoras, dentre elas síndrome dos ovários policísticos, diabetes gestacional e pré-eclampsia (128,134,135). Por outro lado, em estudos conduzidos com gestantes infectadas por *P. falciparum* foi observada uma redução desta molécula no sangue periférico associada a uma redução no peso ao nascer (102,136,137). Neste sentido, alguns autores têm levantado a hipótese do uso desta molécula como biomarcador para algumas patologias placentárias.

Desse modo, os biomarcadores são importantes ferramentas que podem ser utilizadas para a detecção precoce e avaliação de risco de determinadas doenças, e quando utilizados em conjunto conferem uma maior acurácia preditiva (138). Até o momento, não foram descritos biomarcadores para malária placentária causada por *P. vivax*. Portanto, seria de grande relevância correlacionar e analisar concomitantemente biomarcadores, em gestantes infectadas por esta espécie, supondo que a associação desses biomarcadores que circulam no sangue periférico possa fornecer, de maneira mais específica e precoce, o rápido diagnóstico para a malária placentária.

2 HIPÓTESE CENTRAL DE INVESTIGAÇÃO

As gestantes que residem em locais endêmicos para malária compõem uma população mais suscetível a desenvolver a malária placentária e suas complicações. A malária placentária pode provocar sérias consequências para a mãe e para o feto incluindo anemia materna grave, aborto espontâneo, BPN e morte fetal, sendo, portanto, de grande relevância a sua detecção precoce (139). Um estudo realizado no Malawi entre os anos de 2001 a 2006, avaliando gestantes não infectadas e infectadas por *P. falciparum* e que desenvolveram malária placentária, demonstrou que a relação de três biomarcadores (PCR, sFlt-1 e leptina) foi significativamente associada com a presença do parasita na placenta. Isto foi observado principalmente nos casos em que a infecção não pôde ser detectada através do método de diagnóstico tradicional (identificação de parasitas por meio da gota espessa de sangue periférico). Não existem dados até o presente momento que permitam tirar conclusões sobre a relação desses biomarcadores nas infecções durante a gestação causada por *P. vivax*. Portanto, a hipótese central deste trabalho é de que a associação desses três biomarcadores no plasma sanguíneo periférico também possa ser utilizada como um indicativo da malária placentária causada por *P. vivax*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Correlacionar a alteração dos níveis séricos de sFlt-1, PCR e leptina e a ocorrência de malária placentária por *P. vivax*.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Identificar quantitativamente a intensidade das seguintes alterações histopatológicas: aumento dos agregados nucleares sinciciais, infiltrado de células mononucleares (CD68+), infiltrado leucocitário (CD45+) no espaço viloso placentário e espessamento da barreira placentária;
- 2) Verificar a possível associação de fatores epidemiológicos como paridade e frequência da infecção com o surgimento de alterações histopatológicas na placenta;
- 3) Avaliar o nível sérico dos biomarcadores sFlt-1, PCR, leptina e no plasma periférico;
- 4) Verificar a associação entre as alterações histopatológicas placentárias e as concentrações periféricas dos biomarcadores avaliados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

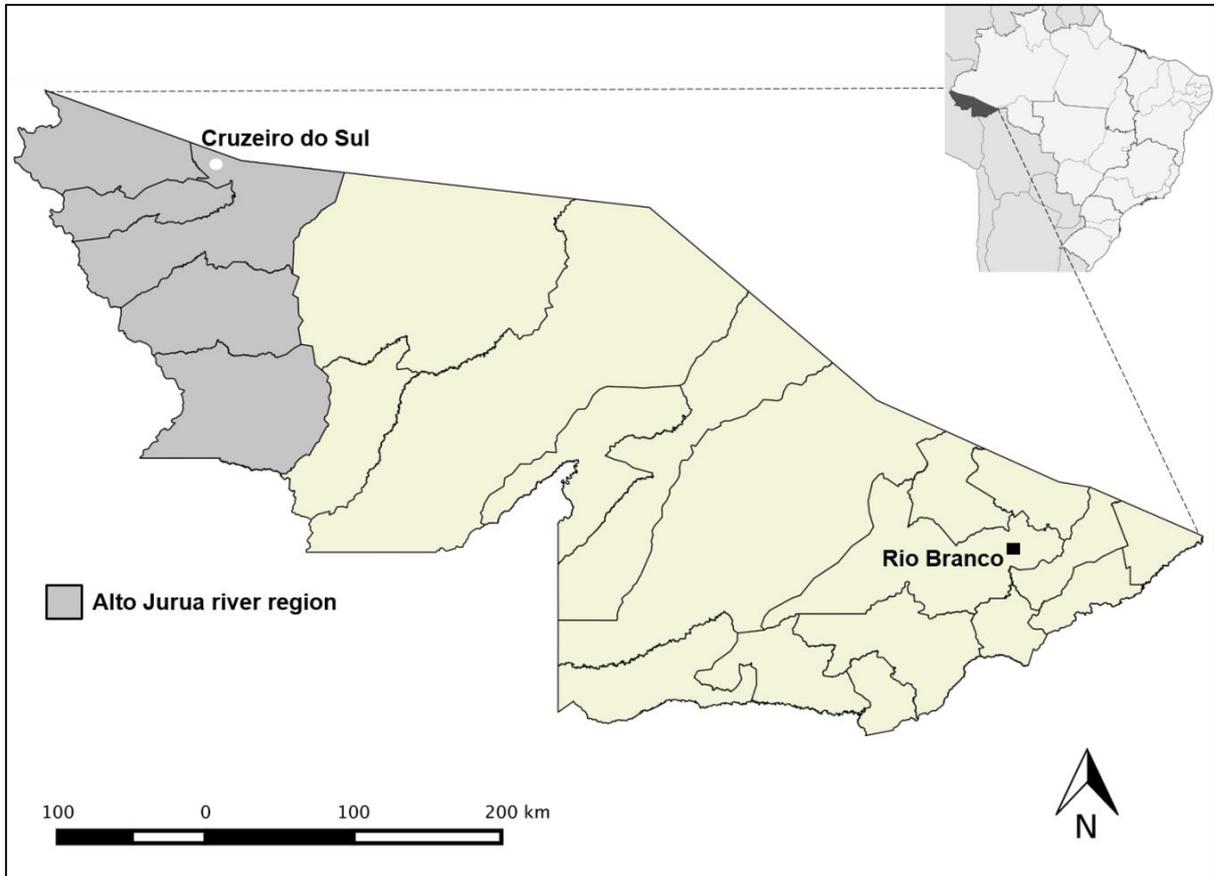
Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (CEPSH) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob o número de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 64769416.8.0000.5467, recebendo aprovação através do parecer nº 1.931.186 em 17 de fevereiro de 2017. Esta pesquisa seguiu as normas da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Para este trabalho foram respeitados os princípios éticos de sigilo e anonimato às participantes, conforme preconizado em estudos com seres humanos. Além disso, as amostras biológicas utilizadas foram coletadas durante o período de um ano e dez meses, e os materiais coletados foram armazenados em um biorrepositório (Of. CEPSH.028.11) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo ICB/USP sob a responsabilidade do Prof. Dr. Cláudio Marinho.

4.2 Descrições da área estudada

A região do Vale do Alto Juruá está localizada no Estado do Acre no extremo sudoeste da Região Norte. O referido estado ocupa uma área de 152.581 km² e limita-se ao norte com o Estado do Amazonas, ao leste com o Estado de Rondônia, ao sudoeste com a Bolívia e o Peru (Figura 10). O Vale do Alto Juruá está localizado no extremo noroeste do estado e no extremo oeste do Brasil. A região está situada a uma distância aproximada de 648 km da capital Rio Branco. Tem uma extensão territorial de 74.965,417 e está a uma altitude de 182 metros a nível do mar. A população total dessa região é de aproximadamente 206.084 habitantes, com uma densidade demográfica de 2,75 habitantes/km² (140)

Figura 10 - Mapa do Estado do Acre mostrando a localização geográfica da região do Vale do Alto do Juruá



Fonte: Dombrowski et al. (2018) (141)

4.3 Tipo de estudo e população alvo

Foi realizado um estudo transversal e, para isto, foram utilizadas amostras de sangue periférico do momento do parto. O processo de recrutamento foi realizado por meio de demanda espontânea de todas as grávidas com ou sem malária que aceitaram participar do estudo na região do Vale do Alto Juruá durante janeiro de 2013 a outubro de 2014.

4.3.1 Critério de exclusão

Para este estudo foram excluídas as gestantes diagnosticadas com infecções por *P. falciparum* ou infecção mista (*P. falciparum* e *P. vivax*), usuárias de drogas lícitas (álcool e tabaco) e ilícitas, bem como aquelas que apresentaram diagnóstico positivo para infecções ativas por bactérias, vírus ou outros protozoários (sífilis,

hepatites virais, HIV e toxoplasmose) e/ou que apresentaram alguma morbidade, tais como: hipertensão, pré-eclâmpsia, eclâmpsia e diabetes. Aquelas que tiveram gestação múltipla ou bebês com má-formação congênita também foram excluídas.

4.4 Coleta e processamento das amostras biológicas

As amostras biológicas utilizadas neste trabalho são provenientes de um estudo realizado com gestantes da região do Vale do Alto do Juruá. Houve coleta de sangue periférico no momento do parto, utilizando um sistema a vácuo com tubo heparinizado (*Becton Dickinson, New Jersey, EUA*) e, posteriormente, o material biológico foi processado, sendo separado o plasma e o concentrado de células totais utilizando uma centrífuga (*Thermo Fisher Scientific, EUA*) em uma velocidade de 1.562 r.c.f por 10 minutos. Por último, as amostras biológicas processadas foram transferidas para um tubo criogênico e armazenadas a -80°C , em um biorrepositório do Instituto de Ciências Biomédicas da USP - ICB/USP.

4.5 Diagnóstico parasitário

Primeiramente foi efetuado o diagnóstico parasitário por meio da gota espessa, sendo este considerado o “padrão ouro”. A avaliação das lâminas foi realizada pela equipe de endemias local e, posteriormente, era revisada por uma microscopista externa para a confirmação do resultado. Em seguida, realizou-se o diagnóstico molecular de todas as amostras coletadas utilizando a técnica RT-PCR, conhecida como PET-PCR (PCR baseado em transferência de elétrons fotoinduzida). Esta técnica se baseia na utilização de *primers* com *auto-quenchings* e marcados com fluoróforos para a detecção de *Plasmodium* spp., *P. falciparum* e *P. vivax* por meio da reação multiplex (142).

Ressalta-se que as grávidas com diagnóstico positivo por microscopia foram encaminhadas para tratamento segundo os esquemas terapêuticos preconizados pelo Ministério da Saúde.

4.6 Classificação da malária placentária

A malária placentária relaciona-se com dois componentes principais: eritrócitos infectados e a presença de hemozoína. Sua classificação está baseada na localização espaço-temporal destes elementos. Utilizando os cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (H&E) e microscopia de luz transmitida e polarizada, a malária placentária foi avaliada de acordo com as quatro categorias propostas por Bulmer: não infectada, infecção ativa, crônica e passada (143). Para a classificação histológica, dois profissionais treinados, de forma independente e às cegas, avaliaram os cortes histológicos placentários. Quando detectada a incompatibilidade entre os resultados, os casos foram reavaliados pelos mesmos profissionais.

4.7 Avaliações histopatológicas

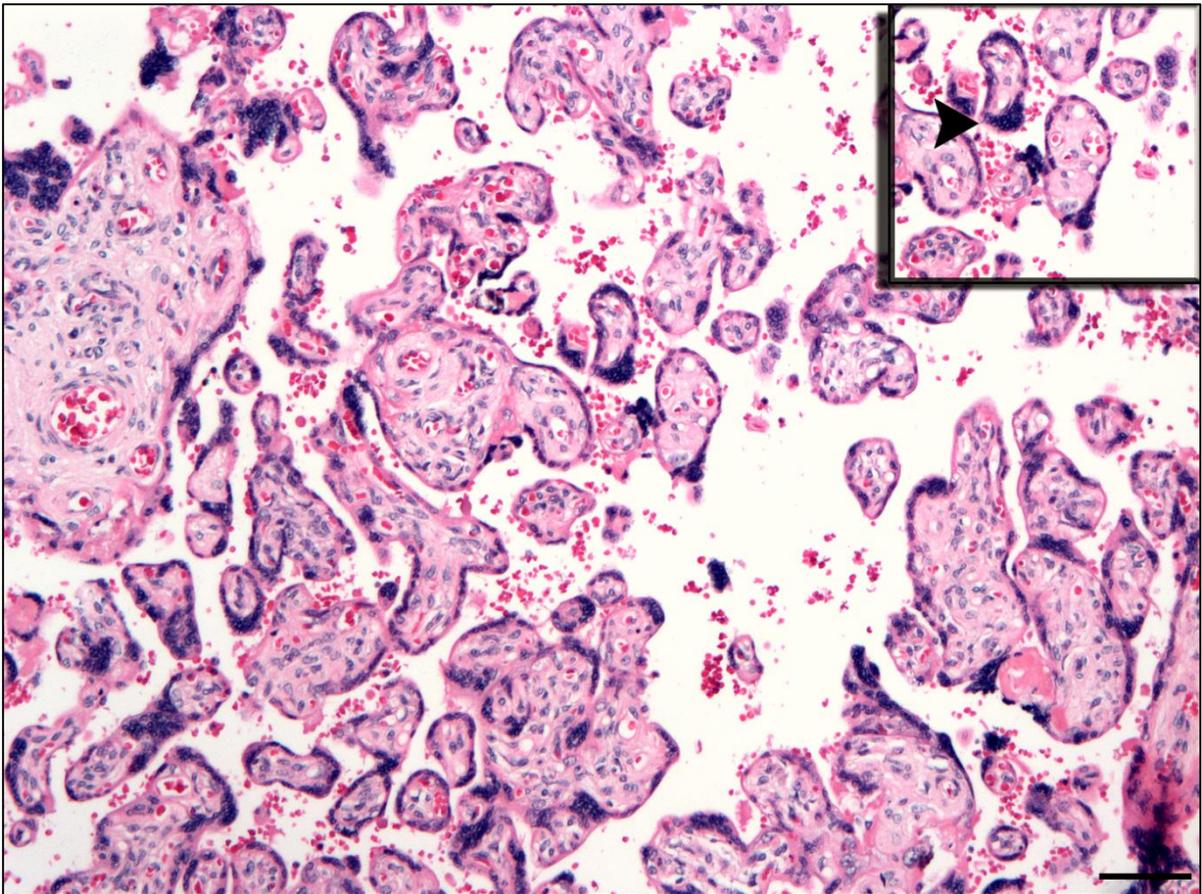
Primeiramente, uma equipe de pesquisadores devidamente treinados realizou uma análise macroscópica (anatômica e patológica) placentária, com o objetivo de avaliar quaisquer possíveis lesões (traumas, isquemia, malformações ou sangramentos), avaliando face apical (fetal), face basal (materna) e cordão umbilical.

Na sequência, foram realizadas 2 secções de aproximadamente de 2 cm³ de amostras do tecido placentário. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em formalina tamponada a 10% e mantidas a 4°C em um período de 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para um tubo de 50 ml contendo a mesma solução limpa para serem enviados ao laboratório para o processamento histológico e, assim, finalmente serem emblocados em parafina para a confecção das lâminas histológicas.

4.7.1 Agregados nucleares sinciciais

Para a análise deste parâmetro foi realizada a contagem do número de agregados nucleares sinciciais (Figura 11) em cem vilosidades coriônicas. Para tal, de cada lâmina foram geradas cinco imagens dos cortes histológicos placentários, os quais foram corados com H&E, utilizando um aumento de 20 vezes. Para a quantificação dos agregados nucleares sinciciais foi utilizada a ferramenta *Cell Counter* do *software* de análise de imagens *ImageJ* (80).

Figura 11 - Fotomicrografia dos agregados nucleares sinciciais no espaço intervilloso placentário

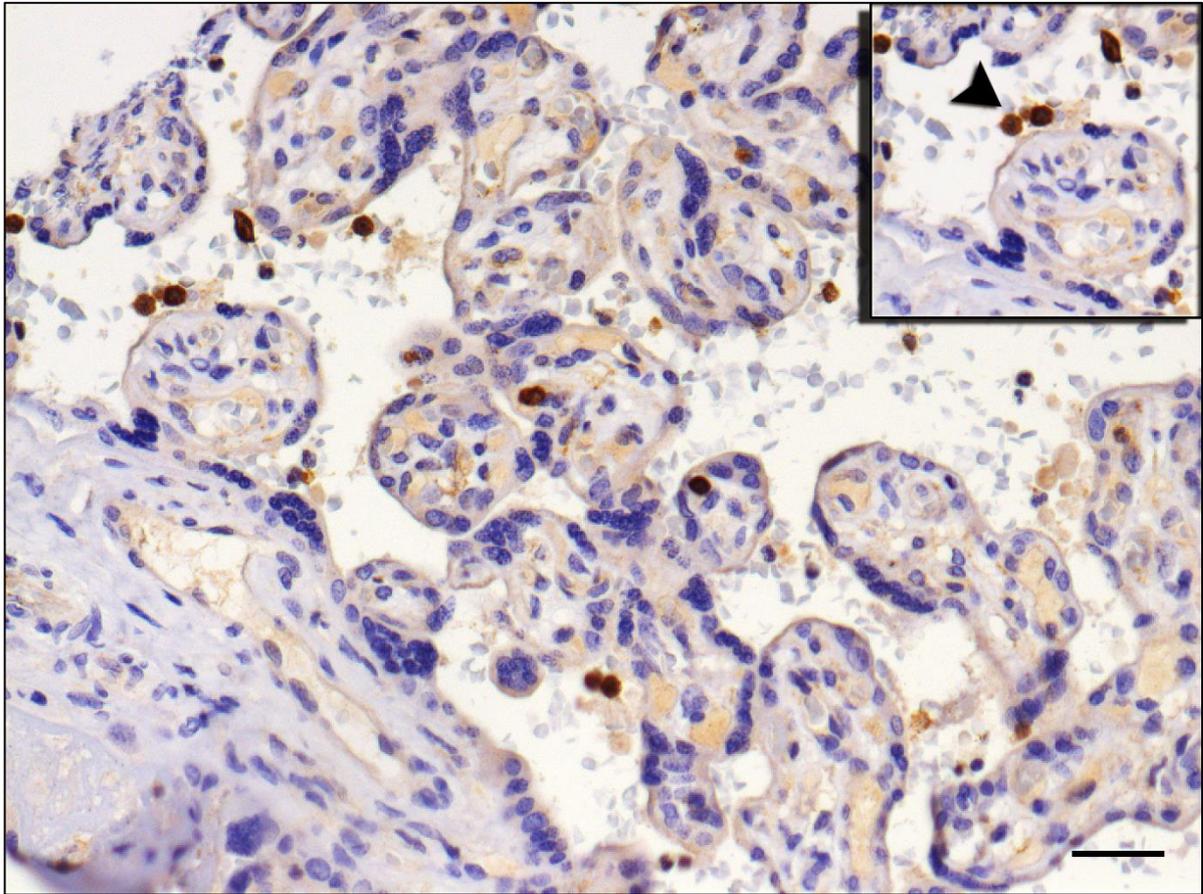


Espaço intervilloso placentário com a presença de agregados nucleares sinciciais. H&E. Aumento de 20 vezes. Foto: Natércia Mendes.

4.7.2 Infiltrado inflamatório

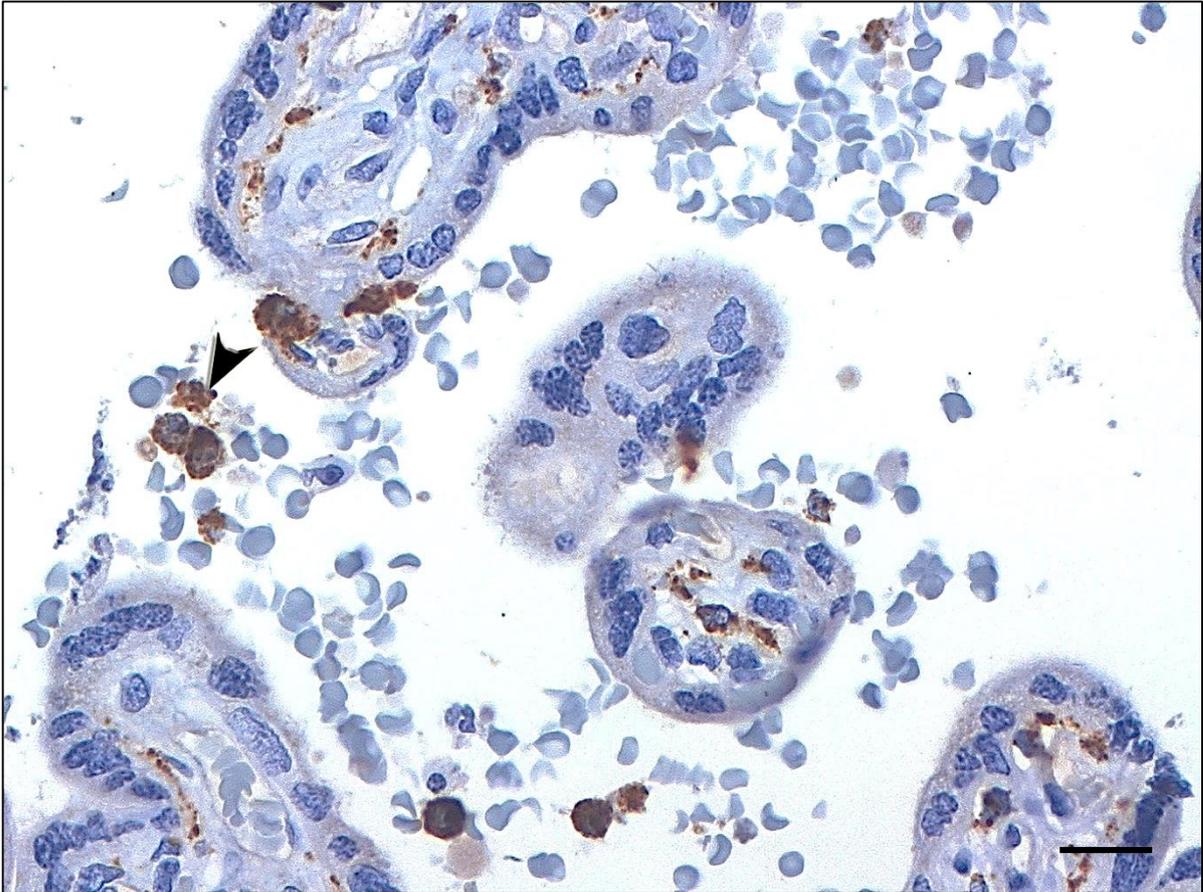
Para a avaliação do infiltrado inflamatório foi utilizada a técnica de imunohistoquímica. Para a determinação do número de leucócitos totais empregou-se a marcação com anticorpos anti-CD45 (Figura 12), e para células mononucleares (macrófagos/monócitos) a marcação por anti-CD68 (Figura 13) em tecidos placentários preparados em *Tissue Micro Array*. Os fragmentos placentários possuíam 2 mm de diâmetro, todos dispostos em uma única lâmina e, desta maneira, garantiu-se que todas as amostras estivessem sob as mesmas condições e colorações. Posteriormente, foi realizada a avaliação do número de células no espaço intervilloso em dez imagens obtidas utilizando microscopia de luz transmitida com um aumento de 40 vezes (89).

Figura 12 - Fotomicrografia mostrando as marcações para leucócitos totais no espaço intervilloso placentário (CD45+)



Leucócitos totais no espaço intervilloso placentário. Imuno-histoquímica contracorada com hematoxilina de Harris. Aumento de 40 vezes. Foto: Natércia Mendes.

Figura 13 - Fotomicrografia mostrando as marcações para células mononucleares no espaço intervilosso placentário (CD68+)

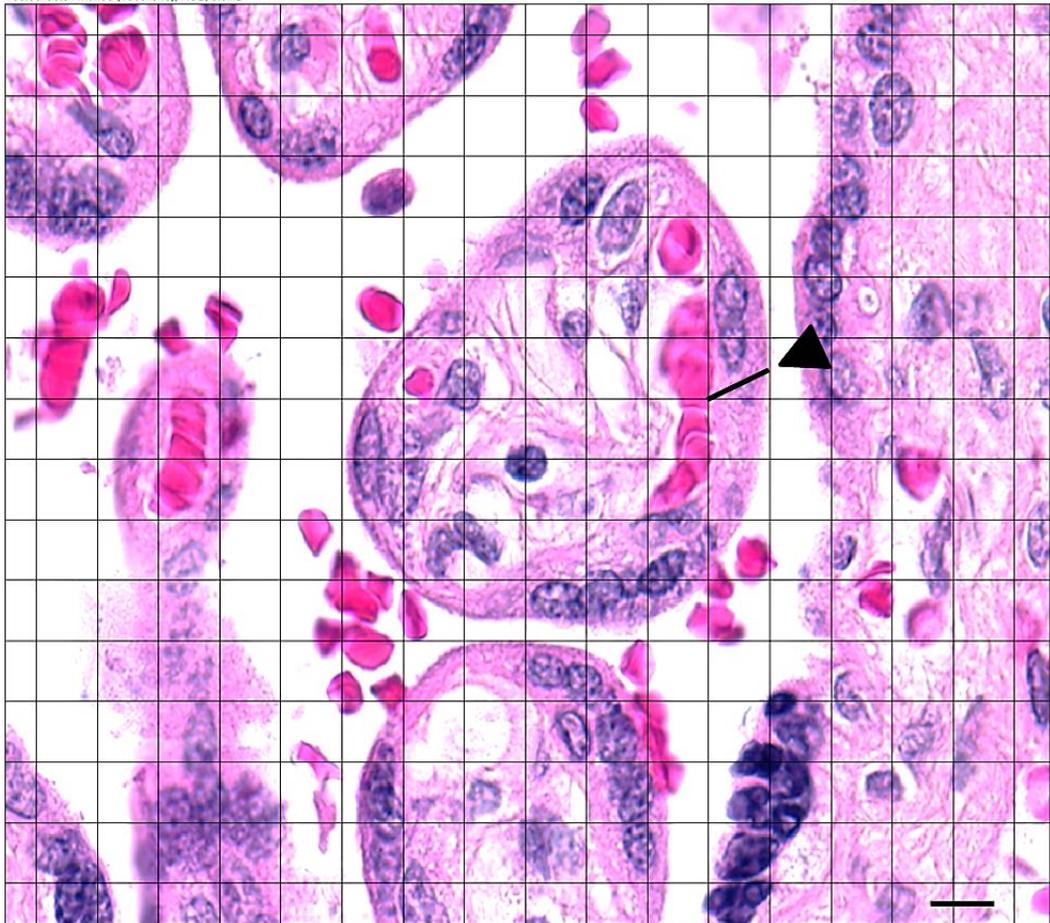


Células mononucleares (macrófagos/monócitos) no espaço intervilosso placentário. Imuno-histoquímica contracorada com hematoxilina de Harris. Aumento de 40 vezes. Foto: Natércia Mendes.

4.7.3 Espessamento da barreira placentária

Para a avaliação do espessamento da barreira placentária foi mensurada a distância média da parede do vaso fetal e da membrana externa das vilosidades. Para tal, foi utilizada uma medida ortogonal, seguindo um ângulo de 90° a partir de pontos determinados por uma *grid* de linhas horizontais e verticais sendo sobrepostas a uma distância linear (reta) (Figura 14). Foram geradas cinco imagens de forma aleatória dos cortes histológicos placentários, corados com H&E, em um aumento de 63 vezes. Posteriormente, para a mensuração do parâmetro histológico foi utilizado *software* de análise de imagens *ImageJ*.

Figura 14 - Fotomicrografia da placenta a termo mostrando a distância entre a parede do vaso fetal e a membrana externa das vilosidades



Distância média entre a parede do vaso fetal e a membrana externa das vilosidades placentárias. H&E. Aumento de 63 vezes. Foto: Natércia Mendes.

4.8 Quantificações dos mediadores bioquímicos

As concentrações plasmáticas dos biomarcadores sFlt-1, leptina e PCR no plasma periférico foram mensuradas pela técnica de ELISA de captura, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante (DuoSets, R & Amp; D Systems, *Minneapolis, MN*). Para as dosagens dos marcadores sFlt-1 foram utilizadas diluições de 1:10, leptina 1:25 e proteína C reativa 1:10.000. De acordo com as recomendações do fabricante, as placas de 96 poços (*High Binding*, da empresa *Corning*) foram incubadas com anticorpo de captura por um período de 16-18 horas, em temperatura ambiente. Após este procedimento, foram lavadas com PBS (*Phosphate-buffered saline*) contendo 0,05% de Tween 20, posteriormente as placas foram bloqueadas com PBS com 1% de BSA (*Bovine serum albumin*), por 2 horas em temperatura ambiente e, em seguida, incubada por 2 horas com as amostras de plasma periférico

das gestantes. Após lavagem, as placas foram incubadas com anticorpo de detecção, seguido de streptavidin - HRP evitando deixá-las em luz direta e, finalmente, de substrato. A reação foi parada com solução ácida e a placa lida em um espectrofotômetro de microplacas (*Epoch BioTek, EUA*) utilizando o *software* Gen5® versão 1.10, com um comprimento de onda de 450 nm conforme estabelecido pelo fabricante.

4.9 Análises estatísticas

Para a análise estatística foram utilizados os programas GraphPad Prism V6 (*GraphPad Software, La Jolla, EUA*) e Stata 14 (*StataCorp, College Station, EUA*). Para a análise das comparações de variáveis contínuas foram realizados os testes de Mann-Whitney e o coeficiente de correlação de Spearman. Usou-se também o teste qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher para avaliar a comparação de proporções e todas as representações gráficas foram feitas a partir do GraphPad Prism V6.

Para a análise estatística dos biomarcadores placentários foi utilizado o *software* Medcalc®, versão 8.2.1.0, utilizando a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Trata-se de uma ferramenta importante para medir e especificar problemas no desempenho de diagnóstico clínico. Esta análise é feita por meio de um método gráfico simples e robusto, o qual permite estudar a variação da sensibilidade e especificidade, para diferentes valores de corte.

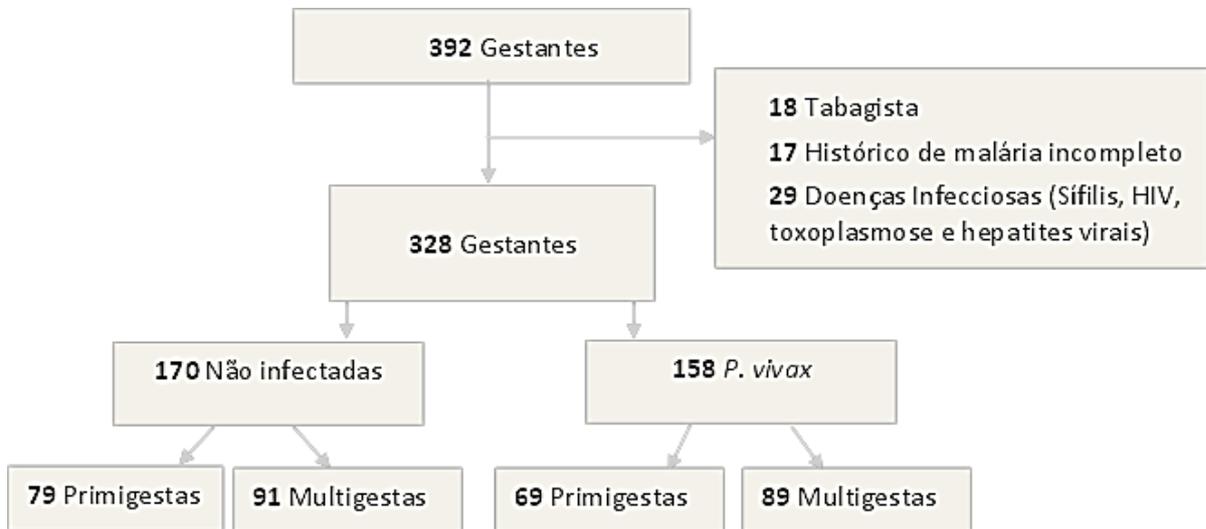
5 RESULTADOS

5.1 Gestantes excluídas

Para a realização do presente estudo foram selecionadas 392 gestantes não infectadas e infectadas por *P. vivax*, que tiveram o diagnóstico confirmatório da infecção realizada pela técnica de PET-PCR (142). Foram excluídas 64 mulheres, devido à presença de outras comorbidades, doenças infecciosas ou pela ausência de histórico clínico completo, totalizando 328 participantes em condições eletivas para análise. As gestantes foram agrupadas em: 1) Gestantes não infectadas – NI; 2)

Gestantes que apresentaram infecção por *P. vivax*; e, posteriormente, ambos os grupos foram subdivididos em primigestas e multigestas (Figura 15).

Figura 15 - Diagrama de fluxo de seleção das gestantes participantes do estudo



5.2 Caracterização das gestantes e dos grupos estudados

Neste estudo, as gestantes infectadas, em geral, eram mais jovens, apresentando uma média de idade de 22 anos quando comparadas com o grupo de não infectadas, que possuíam uma média de 24 anos de idade. Além disso, cerca de 52% das mulheres infectadas por *P. vivax* possuíam no máximo oito anos de estudo, quando comparadas com as não infectadas, em que 77% das gestantes desse grupo possuíam, no mínimo, o ensino médio. Observou-se também grande diferença no local de residência dessas mulheres, onde quase 30% das gestantes infectadas pelo *P. vivax* eram residentes da zona rural (Tabela 1).

Tabela 1 - Características socioeconômicas da população estudada.

	Não infectada (n=170)	<i>P. vivax</i> (n=158)	<i>p-value</i>
Idade (anos), média (DP)¹	24 ± 6,2	22 ± 6,6	0,003 [#]
Estado civil			
Solteira	37 (21,8)	32 (20,1)	
Casada/União estável	131 (77,0)	123 (77,9)	0,138 ⁺
Divorciada/Viúva	2 (1,2)	3 (2)	
Raça/Cor			
Branca	21 (12,5)	22 (14,0)	
Negra	14 (8,0)	18 (11,0)	0,499 ⁺
Parda/Amarela	135 (79,5)	117 (74,0)	
Indígena	0	1 (0,6)	
Educação, n (%)			
Sem escolaridade	0	3 (1,9)	
1-4 anos	7 (4,1)	17 (10,7)	<0,001 ⁺
4-8 anos	32 (18,8)	63 (39,8)	
>8 anos	131 (77,1)	75 (47,6)	
Ocupação			
Empregada	57 (33,5)	33 (20,9)	0,010 ⁺
Desempregada	113 (66,5)	125 (79,1)	
Renda mensal familiar²			
Até 1 salário mínimo	58 (34,0)	75 (47,0)	
1 a 3 salários mínimos	82 (48,0)	64 (41,0)	0,085 ⁺
3 a 5 salários mínimos	25 (15,0)	14 (9,0)	
5 ou mais salários mínimos	5 (3,0)	4 (3,0)	
Residência			
Urbana	162 (95,0)	114 (72,0)	<0,001 ⁺
Rural	8 (5,0)	44 (28,0)	

As variáveis estão representadas em média ± desvio padrão ou em número absoluto (percentual). ¹Idade materna no momento do parto. ²Salário mínimo no período de dez/2012 a out/2014 variou de R\$ 622,00 a R\$ 724,00. [#]Teste χ^2 para a comparação de proporções. ⁺Teste T não pareado para comparação de médias.

Na Tabela 2 estão sumarizadas as características clínicas das gestantes e seus antecedentes obstétricos. Nota-se que, em ambos os grupos, a maioria das mulheres que participou do estudo era multigesta. Além disso, pode-se observar que a maior parte do grupo de gestantes não infectadas (71%) possuía mais de sete consultas pré-natais, quando comparadas com o grupo de gestantes infectadas por *P. vivax*, onde 56% tinham realizado no máximo seis consultas pré-natais. Outro achado interessante residiu na redução do índice de massa corpórea (IMC) entre as gestantes infectadas, demonstrando que a malária tem debilitado essas mulheres (Tabela 2).

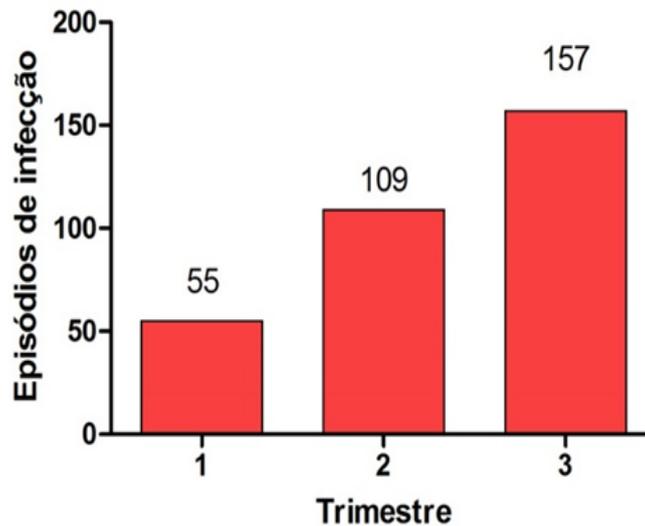
Tabela 2 - Características clínicas e antecedentes obstétricos das gestantes.

	Não infectada (n=170)	<i>P. vivax</i> (n=158)	<i>p-value</i>
Quantidades de gestações			
Primigestas	79 (46,0)	69 (44,0)	0,553 [#]
Multigestas	91 (54,0)	89 (56,0)	
Consultas pré-natal			
≤3	8 (5,0)	18 (14,0)	0,002 [#]
4-6	39 (24,0)	57 (41,0)	
≥ 7	116 (71,0)	62 (45,0)	
Índice de massa corpórea (IMC)	29,0 ± 4,7	27,5 ± 4,5	0,002 ⁺
Idade gestacional (semanas)	38,9 ± 1,5	38,10 ± 1,5	0,376 ⁺
Hematócrito (%)	36,1 ± 3,5	35,1 ± 3,9	0,065 ⁺
Peso ao nascer (g)	3233,22 ± 509,9	3148,02 ± 505,3	0,086 ⁺
Nascimento pré-termo¹	6 (3,5)	16 (10,3)	0,017 [#]
Natimorto²	2 (1,1)	1 (0,6)	0,528 [#]
Aborto³	1 (0,6)	6 (3,7)	0,059 [#]

As variáveis estão representadas em média ± desvio padrão ou em número absoluto (percentual). ¹Nascimento pré-termo: nascimento antes da 37ª semana de gestação. ²Natimorto: quando o feto nasce com ausência de sinais vitais. ³Aborto: é a expulsão espontânea do embrião ou feto antes da 22ª semana de gestação. [#]Teste χ^2 para a comparação de proporções. ⁺Teste T não pareado para a comparação de médias.

Quanto à distribuição dos casos de malária por trimestre gestacional, nota-se ter havido um aumento de aproximadamente 30% dos casos de malária no terceiro trimestre, quando se compara com os casos do segundo ou primeiro trimestres. De forma interessante, pode-se verificar também que o número de casos de malária aumentou proporcionalmente de acordo com período gestacional, apresentando maior incidência no terceiro trimestre (Figura 16).

Figura 16 - Distribuição de casos de malária causada por *P. vivax* segregados por trimestre gestacional.



Os números absolutos estão expressos acima de cada barra. O primeiro trimestre compreende o período abaixo da 14^a semana de gestação, o segundo trimestre compreende o período da 14^a até a 28^a semana de gestação e o terceiro trimestre compreende o período acima da 28^a semana de gestação.

Posteriormente, foram analisados os fatores de exposição à malária. Conforme os dados apresentados na Tabela 3, quase 90% das gestantes infectadas relataram terem tido, pelo menos, uma infecção prévia na vida, um valor bem superior quando comparado com as gestantes não infectadas, onde somente 54% apresentavam esse histórico. Em relação às medidas de prevenção, e de forma bastante interessante, observou-se que 90% das gestantes infectadas possuíam cortinado, onde cerca de 70% destes eram impregnados com inseticida e a maior parte das gestantes confirmou ter feito uso na noite anterior. Foi verificado também que a maioria das gestantes infectadas por *P. vivax* não possuía banheiro dentro da residência.

Tabela 3 - Fatores de exposição à malária e prevenção

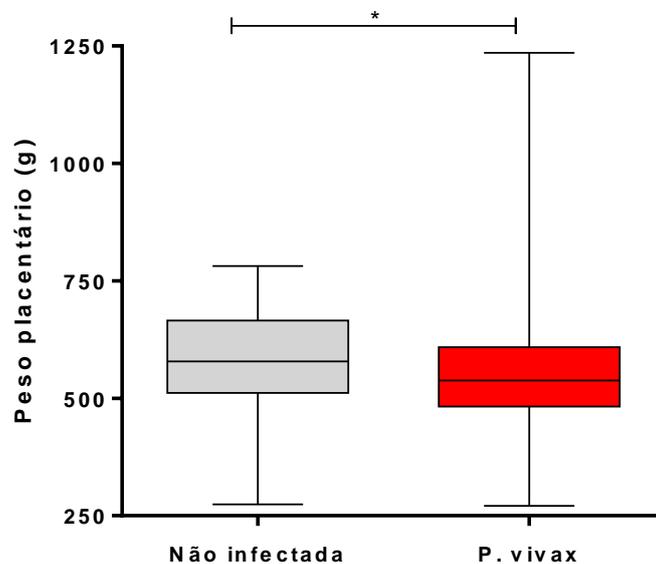
	Não infectada (N=170)	<i>P. vivax</i> (N=158)	<i>p-value</i>
Infeção prévia de malária na vida¹	92 (54,1)	139 (88,0)	<0,0001 [#]
Episódios prévios de malária na gestação¹			
Sim	7 (4,0)	26 (16,5)	<0,0001 [#]
Não	163 (96,0)	132 (83,5)	
Possui cortinado			
Sim	117 (69,0)	143 (89,9)	<0,0001 [#]
Não	53 (31,0)	16 (10,1)	
Uso do cortinado/mosquiteiro			
Sim	93 (79,5)	98 (68,0)	0,029 [#]
Não	24 (20,5)	45 (32,0)	
Cortinado/Mosquiteiro impregnado			
Sim	40 (34,0)	85 (60,0)	<0,0001 [#]
Não	77 (66,0)	57 (40,0)	
Borrifação intradomiciliar			
Sim	21 (12,0)	38 (24,0)	0,006 [#]
Não	149 (88,07)	120 (76,0)	
Prevenção individual²			
Sim	44 (26,0)	33 (21,0)	0,286 [#]
Não	126 (74,0)	125 (79,0)	
Banheiro			
Dentro de casa	109 (64,0)	62 (39,0)	<0,0001 [#]
Fora de casa	61 (36,0)	96 (61,0)	

As variáveis estão representadas em número absoluto (percentual). ¹ Malária anterior à gestação atual, conforme informado pela gestante. ² Métodos de proteção individual contra o mosquito: roupas de mangas compridas, inseticida em *spray* e repelente. [#]Teste χ^2 para a comparação de proporções.

5.3 Caracterização placentária e alterações histopatológicas

Inicialmente, decidiu-se avaliar o peso placentário das gestantes não infectadas e as infectadas por *P. vivax*. Foi observado que o grupo infectado apresentou uma média de peso significativamente menor quando comparado com o grupo não infectado, com uma redução de 26 gramas do peso placentário (Figura 17 e Tabela 4).

Figura 17 - Avaliação do peso placentário por grupo de gestantes não infectadas e infectadas por *P. vivax*



Peso placentário (gramas, g) foi aferido em gestantes não infectadas (n=102, *box* cinza) e em gestantes infectadas por *P. vivax* (n=101, *box* vermelho) utilizando balança padronizada. Todas as placentas foram pesadas com membranas, cordão umbilical, sangue materno e fetal. Para análise estatística foi utilizado o teste Mann Whitney não pareado. **p-value* <0,05.

Tabela 4 - Peso placentário por grupo de gestantes

	Não infectada N=102	Infectada N=101	<i>p-value</i>
Peso placentário			
Média	588,0 [110,1]	562,4 [135,9]	<0,05
Mediana	578,6 [513-658]	541,7 [482-612]	

As variáveis estão representadas em média [desvio padrão] e em mediana [intervalo interquartil].

Para a análise das alterações histopatológicas, as amostras de placenta foram avaliadas em função de quatro parâmetros: agregado nuclear sincicial, infiltrado de célula mononuclear (CD68⁺), infiltrado de leucócito total (CD45⁺) e espessamento da barreira placentária (Tabela 5). Todos estes achados histológicos estão presentes na placenta, independente da malária, porém durante a infecção esses achados tendem a estar modificados como já demonstrado anteriormente pelo nosso grupo (144).

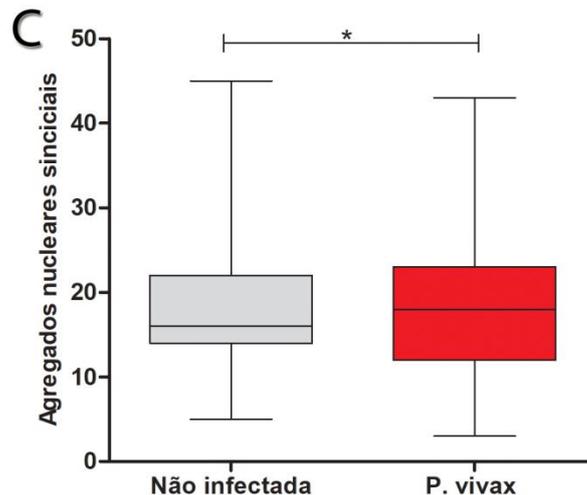
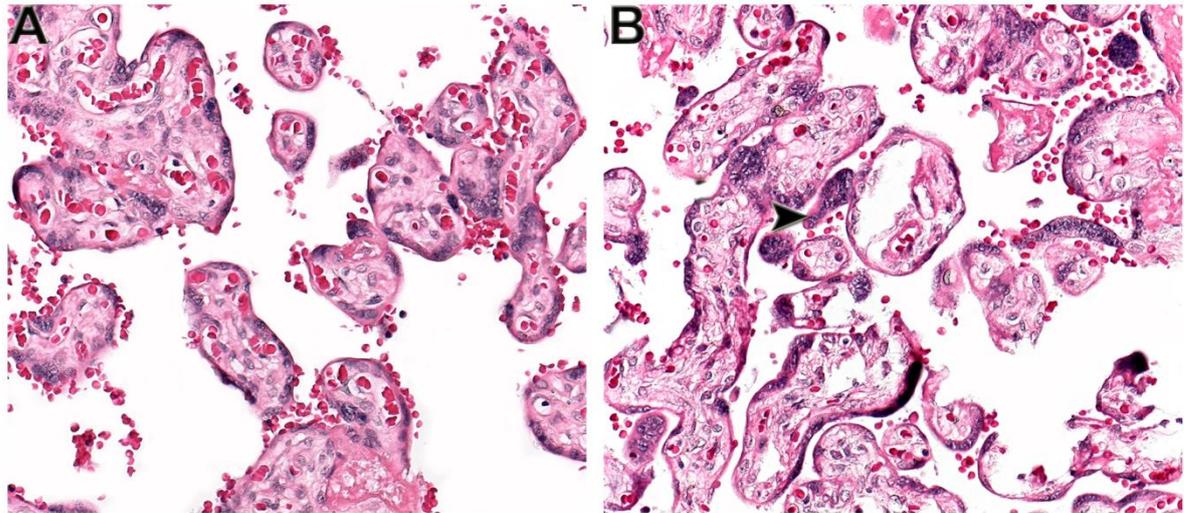
Tabela 5 - Distribuição das lesões placentárias por grupo.

Características histopatológicas	Não infectada	Infectada	p-value
Agregados nucleares sinciciais	(n= 148)	(n= 125)	
Média	13,9 [5,96]	16,1 [7,68]	0,024
Mediana	13,0 [10-17]	15,0 [10-21]	
Infiltrado leucocitário	(n= 148)	(n= 125)	
Média	9,4 [7,5]	11,7 [8,7]	<0,001
Mediana	8,0 [5-12]	10,0 [5-15]	
Infiltrado mononuclear	(n= 148)	(n= 125)	
Média	6,3 [4,0]	9,4 [6,0]	<0,001
Mediana	6,0 [3-9]	9,0 [6-12]	
Espessamento barreira placentária	(n= 147)	(n= 110)	
Média	2,5 [0,5]	2,7 [0,6]	<0,001
Mediana	2,5 [2-2]	2,6 [2-3]	

As variáveis estão representadas em média [desvio padrão] e em mediana [intervalo interquartil].

Para a caracterização das lesões placentárias (Tabela 5), inicia-se pela avaliação dos agregados nucleares sinciciais entre os grupos (Figura 18). Tendo sido um total de 273 placentas, 148 não infectadas e 125 do grupo *P. vivax*. Após a análise quantitativa, foi observada uma diferença estatisticamente significativa no grupo das gestantes infectadas por *P. vivax*, que apresentou um maior número de agregados nucleares sinciciais quando comparado ao grupo de não infectadas.

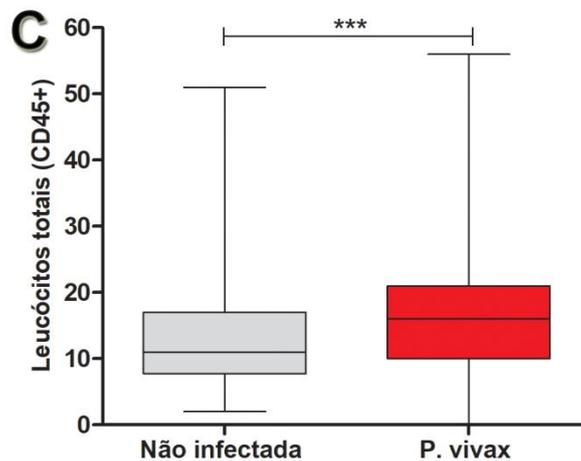
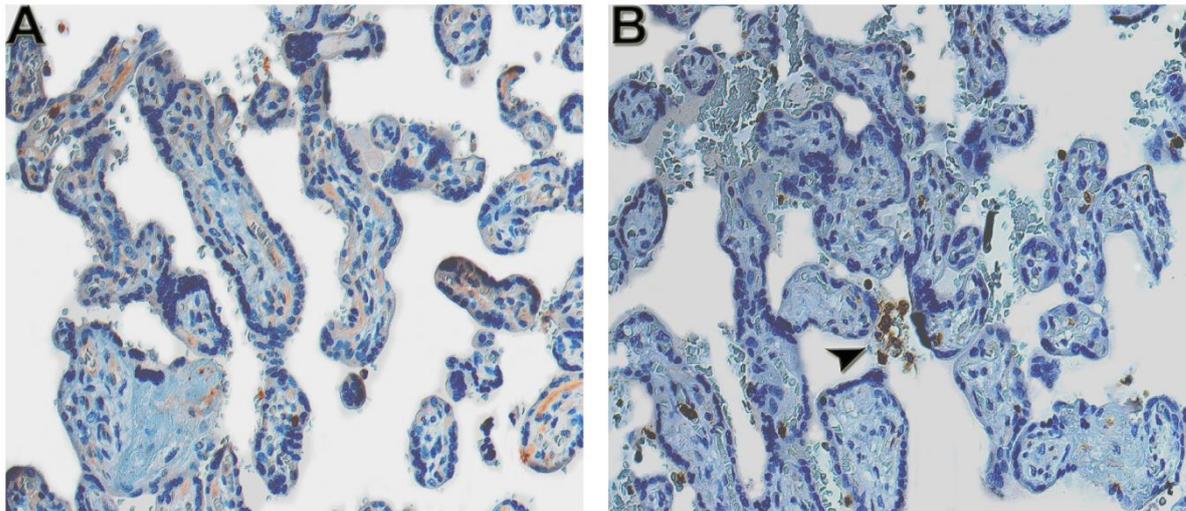
Figura 18 - Avaliação da quantidade de agregados nucleares sinciciais placentários em gestantes não infectadas e infectadas por *P. vivax*



Quantificação dos agregados nucleares sinciciais (**B, seta**) em fotomicrografias do espaço intervilloso de placentas (**A**) não infectadas e (**B**) placentas infectadas por *P. vivax*. Os agregados nucleares sinciciais foram avaliados em lâminas coradas em H&E com aumento de 10x. (**C**) Representação gráfica da quantidade de agregados nucleares sinciciais encontrada no grupo de placentas não infectadas (n=148, box cinza) e infectadas por *P. vivax* (n=125, box vermelho). Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann Whitney não pareado. **p-value*<0,05.

Para a quantificação do infiltrado leucocitário, foram analisadas 278 placentas, sendo 153 não infectadas e 125 do grupo *P. vivax*. Após a quantificação, foi observado um aumento deste parâmetro histopatológico no espaço intervilloso placentário das gestantes infectadas por *P. vivax*, neste caso, as gestantes infectadas apresentaram 1,5 vezes mais infiltrado leucocitário quando comparadas com as gestantes não infectadas (Figura 19 e Tabela 5).

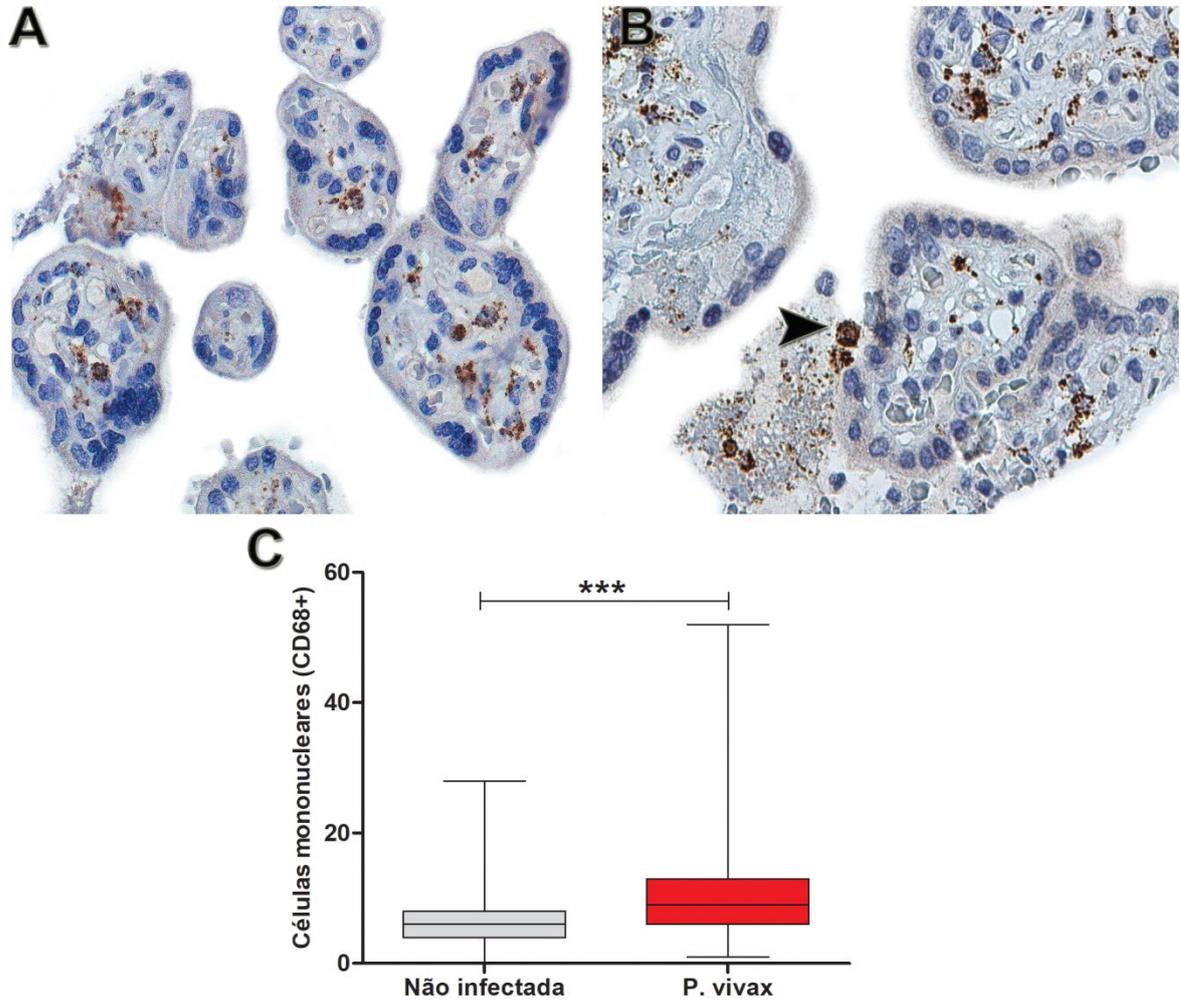
Figura 19 - Avaliação da quantidade de células leucocitárias no espaço intervilloso placentário em gestantes não infectadas e infectadas por *P. vivax*



Quantificação de células leucocitárias (**B**, seta) em fotomicrografia do espaço intervilloso de placentas (**A**) não infectadas e (**B**) infectadas por *P. vivax*. Os leucócitos totais (CD45+) foram avaliados por imuno-histoquímica e contracolorados com hematoxilina de Harris com um aumento de 20x. (**C**) Representação gráfica da quantidade de células leucocitárias no grupo de placentas não infectadas (n=153, box cinza) e infectadas por *P. vivax* (n=125, box vermelho). Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann Whitney não pareado; ****p*-value<0,001.

Já em relação ao número de células mononucleares presentes no espaço intervilloso placentário, foi possível verificar uma diferença estatística significativa entre os grupos (Figura 20 e Tabela 5), indicando que a infecção por *P. vivax* induz um aumento da migração de monócitos/macrófagos para o espaço intervilloso placentário. Neste caso, as placentas provenientes de mulheres infectadas apresentavam 1,5 vezes mais monócitos do que as não infectadas ($9,4 \pm 6,0$ vs $6,3 \pm 4,0$).

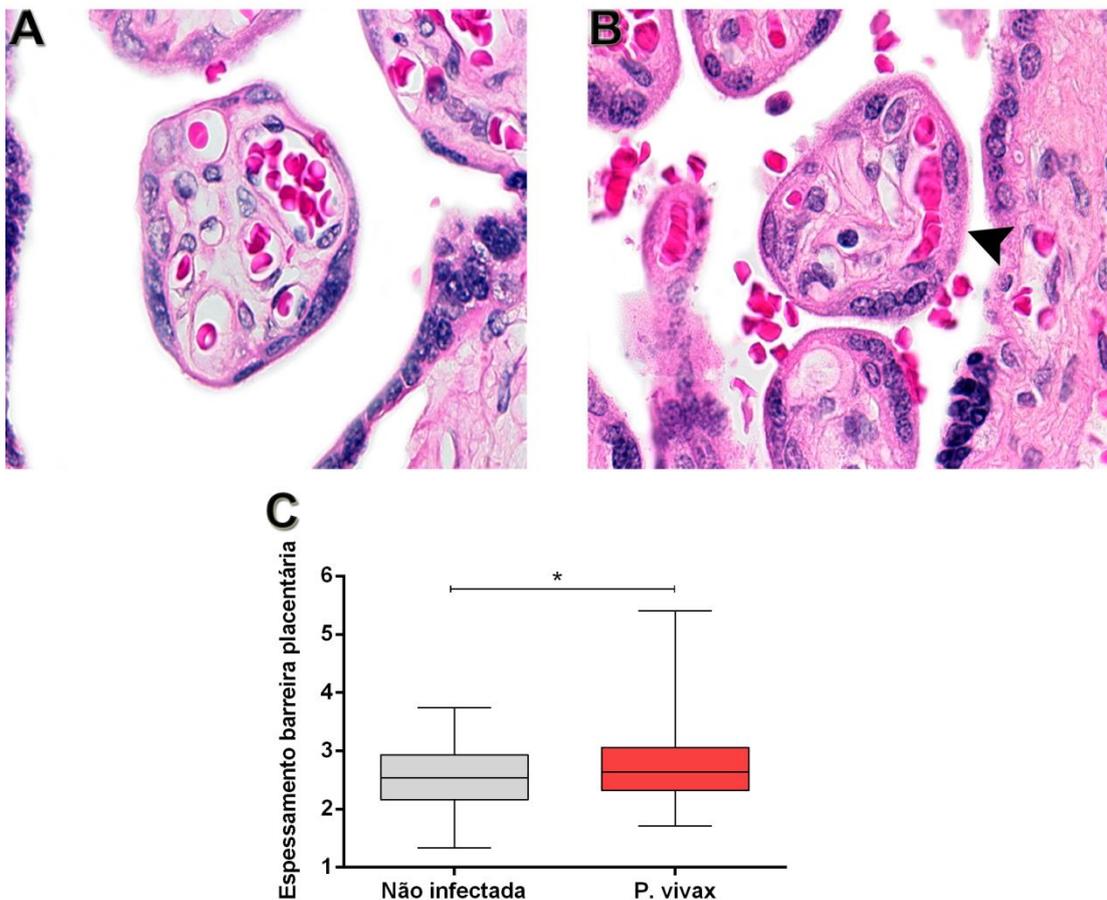
Figura 20 - Avaliação da quantidade de células mononucleares no espaço interviloso placentário em gestantes não infectadas e infectadas por *P. vivax*



Quantificação de células mononucleares (macrófagos/monócitos) (**B**, **seta**) em fotomicrografia do espaço interviloso de placentas (**A**) não infectadas (n=148, *box* cinza) e (**B**) placentas infectadas (n=125, *box* vermelho) por *P. vivax*. As células mononucleares (CD68+) foram avaliadas utilizando a técnica de imuno-histoquímica e contracoradas com hematoxilina de Harris com um aumento de 40x. (**C**) Representação gráfica da quantidade de células mononucleares. Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann Whitney não pareado; ****p-value*<0,001.

Posteriormente, mensurou-se o espessamento da barreira placentária, sendo analisadas um total de 269 placentas, 153 placentas de gestantes não infectadas e 116 placentas de gestantes infectadas por *P. vivax* (Figura 21). Após análise, foi observado que o grupo das gestantes infectadas por *P. vivax* possuía a barreira placentária mais espessa, apresentando uma diferença estaticamente significativa quando comparado com o grupo não infectado ($2,73\pm 0,68$ vs $2,53\pm 0,51$).

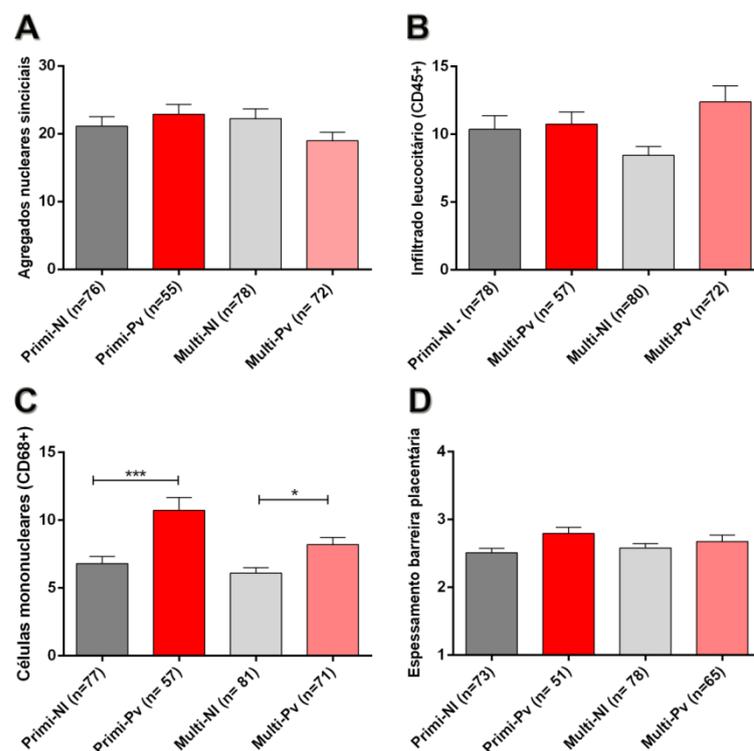
Figura 21 - Avaliação do espessamento da barreira placentária em gestantes não infectadas e infectadas por *P. vivax*



Quantificação do espessamento da barreira placentária (**B, seta**) em fotomicrografias do espaço intervilloso de placentas (**A**) não infectadas e (**B**) placentas infectadas por *P. vivax*. O espessamento da barreira placentária foi avaliado em lâminas coradas em H&E com aumento de 63 vezes. (**C**) Representação gráfica do espessamento da barreira placentária encontrado no grupo de placentas não infectadas ($n=153$, *box* cinza) e infectadas por *P. vivax* ($n=116$, *box* vermelho). Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann Whitney não pareado, considerando $*p\text{-value} < 0,05$.

Após analisar cada parâmetro histológico placentário nos dois grupos distintos, sendo de gestantes não infectadas e gestantes infectadas por *P. vivax*, decidiu-se, então, na etapa seguinte, procurar entender se as múltiplas gestações poderiam interferir na intensidade das lesões placentárias. Na Figura 22 pode-se observar a intensidade das lesões placentárias por paridade. Os grupos foram segregados em primigestas e multigestas, e cada parâmetro histológico placentário foi analisado separadamente (agregados nucleares sinciciais, infiltrado leucocitário, células mononucleares e o espessamento da barreira placentária). Ao realizar a análise estatística para a comparação dos grupos, foi observada uma diferença estatisticamente significativa somente para a presença de infiltrado de células mononucleares no grupo de primigestas e multigestas infectadas por *P. vivax*.

Figura 22 - Quantificação da caracterização histológica placentária de gestantes não infectadas e infectadas por *P. vivax* segregadas por paridade

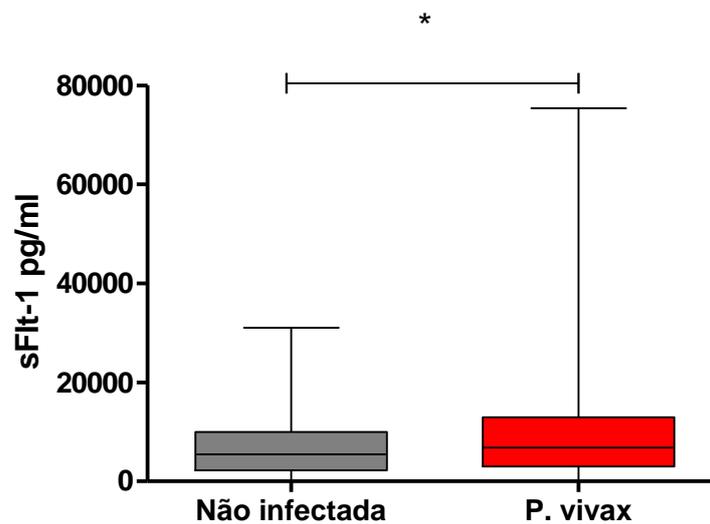


Quantificação dos parâmetros histológicos placentários (**A**) agregados nucleares sinciciais, (**B**) leucócitos totais (CD45+) e (**C**) células mononucleares (CD68+) no espaço intervilo placentário e (**D**) espessamento da barreira placentária. Primi-NI (Primigestas não infectadas); Primi-Pv (Primigestas infectadas por *P. vivax*); Multi-NI (Multigestas não infectadas); Multi-Pv (Multigestas infectadas por *P. vivax*). Os valores estão expressos em média e desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann Whitney não pareado. (***) p -value < 0,001 e * p < 0,05).

5.4 Avaliação sérica dos marcadores placentários

Inicialmente decidiu-se avaliar o perfil sérico do sFlt-1 e para a quantificação deste biomarcador foram incluídas, na análise, 156 amostras do plasma periférico de gestantes não infectadas e 126 amostras de gestantes infectadas por *P. vivax*. Na Figura 23, foram observadas diferenças estatísticas significativas nas gestantes infectadas por *P. vivax*, ocorrendo um aumento nos níveis plasmáticos periféricos de sFlt-1 dessas gestantes infectadas quando comparado com o das não infectadas (8231,22 vs 7821,33 pg/mL).

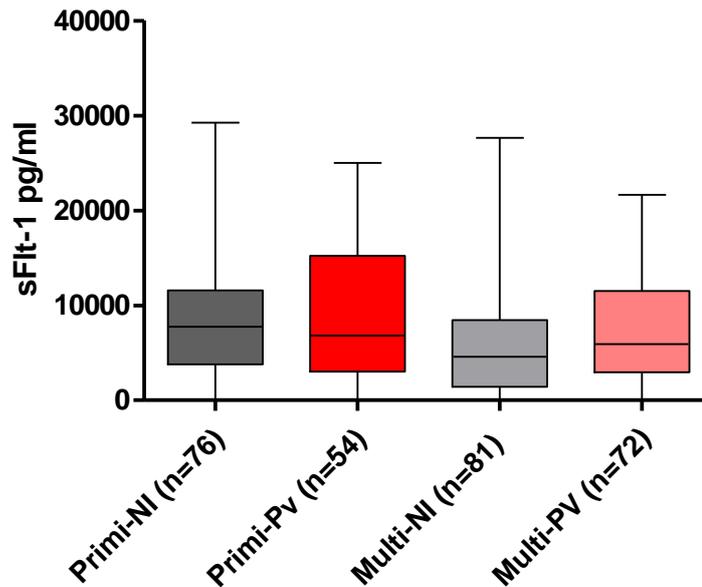
Figura 23 - Avaliação do nível sérico de sFlt-1 em plasma periférico de gestantes não infectadas e infectadas por *P. vivax*



Quantificação sérica dos níveis de sFlt-1 em plasma periférico de gestantes não infectadas (n=156, *box* cinza) e infectadas por *P. vivax* (n=126, *box* vermelho). Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann Whitney não pareado; **p-value*<0,05.

Posteriormente, decidiu-se segregar por paridade, primigesta e multigesta, e, após análise (Figura 24), não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

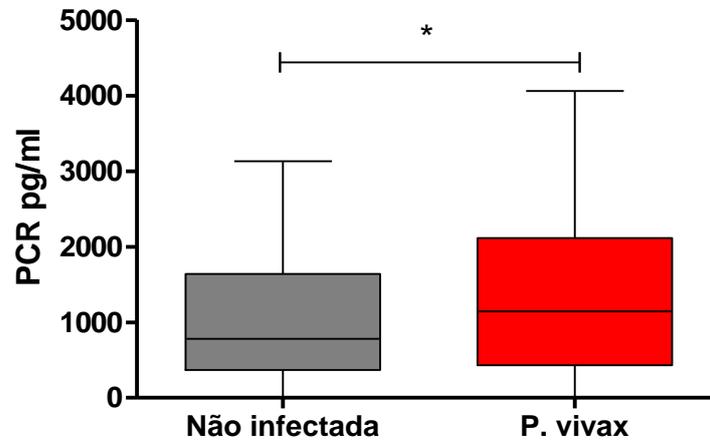
Figura 24 - Avaliação dos níveis séricos de sFlt-1 em plasma periférico segregados por paridade



Primi-NI (Primigestas não infectadas); Primi-Pv (Primigestas infectadas por *P. vivax*); Multi-NI (Multigestas não infectadas); Multi-Pv (Multigestas infectada por *P. vivax*). Para a comparação entre os grupos foi realizado o teste Mann Whitney não pareado. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Quanto ao segundo biomarcador analisado, sabe-se que a PCR é um importante mediador inflamatório de fase aguda, que é sintetizado no fígado e liberado na circulação e, sob determinadas condições inflamatórias, encontra-se bastante elevado (145). Desta forma, foram mensurados os níveis plasmáticos da PCR em 156 amostras de plasma periférico de gestantes não infectadas e em 126 amostras de plasma periférico de gestantes infectadas por *P. vivax*. De acordo com as análises realizadas, pode-se constatar que as gestantes que haviam sido infectadas pelo *P. vivax* (Figura 25) tiveram um aumento sérico deste marcador quando comparadas com as gestantes não infectadas (1295,53 vs 1115,52 pg/mL).

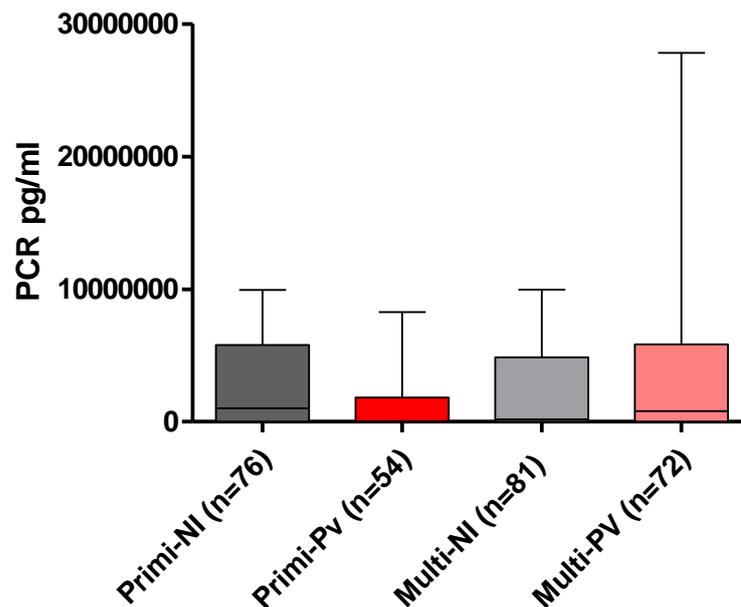
Figura 25 - Avaliação do nível sérico de PCR em plasma periférico de gestantes não infectadas e infectadas por *P. vivax*



Quantificação sérica dos níveis de PCR em plasma periférico de gestantes não infectadas (n=156, box cinza) e infectadas por *P. vivax* (n=126, box vermelho). Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann Whitney não pareado; **p-value* < 0,05.

Além disso, ao realizar a análise segregando ambos os grupos por paridade, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos apresentados (Figura 26).

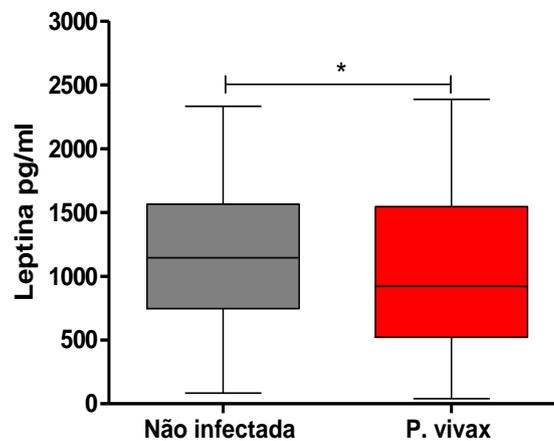
Figura 26 - Avaliação do nível sérico de PCR em plasma periférico segregados por paridade



Primi-NI (Primigestas não infectadas); Primi-Pv (Primigestas infectadas por *P. vivax*; Multi-NI (Multigestas não infectadas); Multi-Pv (Multigestas infectada por *P. vivax*). Para a comparação entre os grupos foi realizado o teste Mann Whitney não pareado. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Na sequência, foram realizadas comparações do último biomarcador entre os grupos de gestantes não infectadas e de gestantes infectadas por *P. vivax*. Ao quantificar o perfil sérico da leptina, foi observado que houve uma diferença estatística significativa entre os grupos, onde as gestantes que apresentaram infecção por *P. vivax* obtiveram um menor nível de leptina no plasma periférico, quando comparadas com as gestantes não infectadas (1014,88 vs 1152,97 pg/mL) (Figura 27).

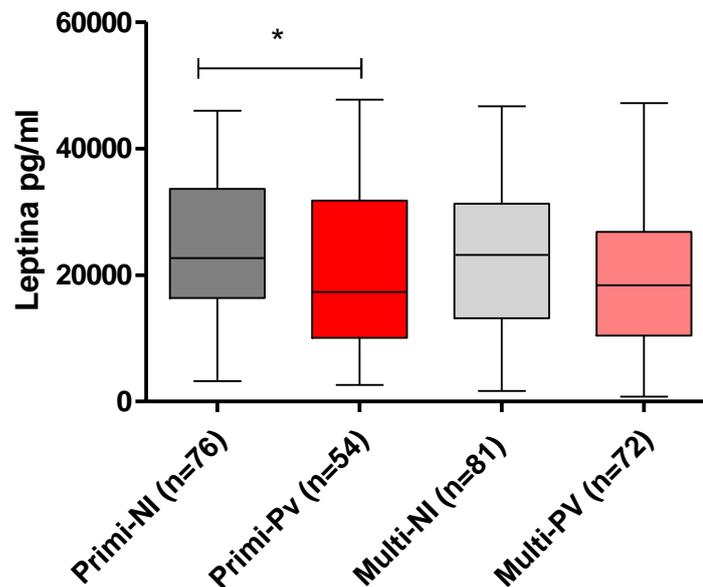
Figura 27 - Avaliação do nível sérico de leptina em plasma periférico de gestantes não infectadas e infectadas por *P. vivax*



Quantificação sérica dos níveis de leptina em plasma periférico de gestantes não infectadas (n=156, box cinza) e infectadas por *P. vivax* (n=126, box vermelho). Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann Whitney não pareado; **p-value* < 0,05.

Por fim, foram segregados também por paridade, conforme se observa na figura 28. Quando foram analisados todos os grupos, não foi evidenciada nenhuma diferença estatística significativa nos grupos apresentados.

Figura 28 - Avaliação do nível sérico de leptina em plasma periférico segregados por paridade



Primi-NI (Primigestas não infectadas); Primi-Pv (Primigestas infectadas por *P. vivax*); Multi-NI (Multigestas não infectadas); Multi-Pv (Multigestas infectadas por *P. vivax*). Para a comparação entre os grupos foi realizado o teste Mann Whitney não pareado. Foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos Primi-NI e Primi-Pv; * *p-value* < 0,05.

5.5 Análise de sensibilidade e especificidade

A utilização de biomarcadores, de acordo com a *National Institutes of Health* é uma importante ferramenta diagnóstica para mensurar e avaliar alterações biológicas, patológicas ou resposta a uma intervenção farmacológica (146). Para a análise das áreas sob a curva (AUC) ROC foi utilizado o método DeLong *et al.* (147). A AUC (Tabela 6) corresponde a um dos índices de precisão, os quais são úteis para avaliar a qualidade da curva e o seu desempenho como teste diagnóstico. Para os pontos de corte dos biomarcadores, estes foram determinados usando o índice de Youden ($J = \max [\text{sensibilidade} + \text{especificidade} - 1]$).

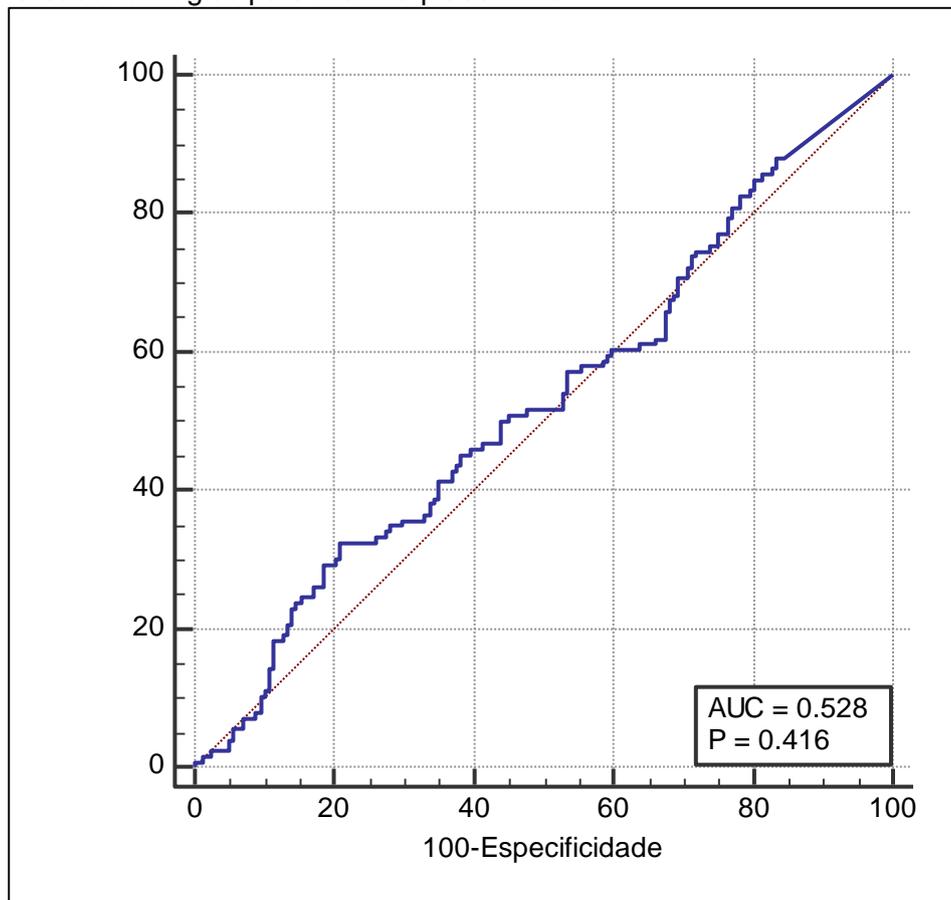
Tabela 6 - Análise do poder discriminativo da AUC da curva ROC

AUC = 0,5	Sem discriminação diagnóstica
0,7 ≤ AUC < 0,8	Discriminação diagnóstica aceitável
AUC ≥ 0,9	Excelente discriminação diagnóstica

Para a análise do sFlt-1 como biomarcador da malária placentária foram analisadas 283 amostras de plasma periférico, 126 amostras (44,5%) do grupo

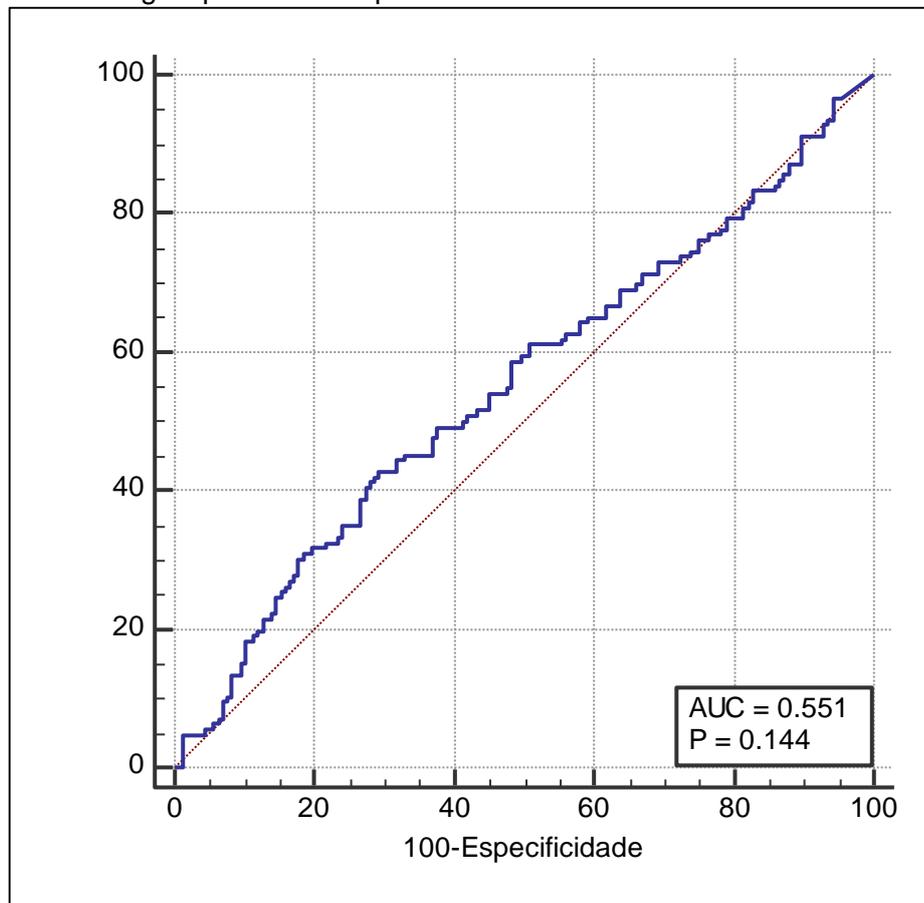
positivo e 157 (55,5%) amostras foram do grupo negativo. Ao se analisar os resultados obtidos por meio da curva ROC, conseguiu-se observar a seguinte curva na figura 29. Nesta situação, a área sob a curva ROC (AUC) corresponde a 0,52, apresentando uma sensibilidade de 32% e especificidade 79% (IC-95% - 0,46 a 0,58), não ultrapassando a linha média, ou seja, não demonstra neste caso ter uma boa *performance* diagnóstica.

Figura 29 - Curva ROC representando habilidade diagnóstica dos níveis de sFlt-1 periféricos como marcador biológico para malária placentária



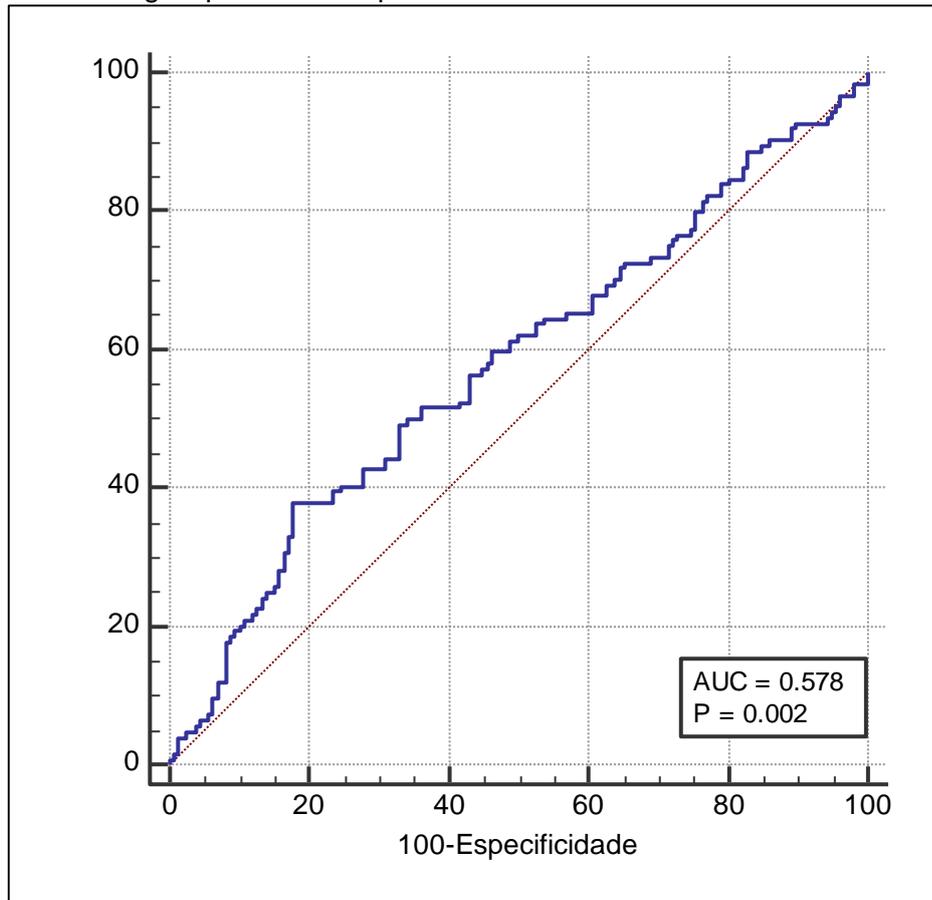
No caso da PCR, também foram analisadas 283 amostras de plasma periférico, sendo destas 126 amostras (44,5%) foram grupo positivo e 157 amostras (55,5%) foram do grupo negativo. Conforme se pode ver no gráfico (Figura 30), a área sob a curva ROC (AUC) que correspondeu apenas a 0,55 de área e apresentou uma sensibilidade 43% e especificidade 71% (IC-95% - 0,491 a 0,610), ou seja, não apresentou neste caso um bom desempenho para diagnóstico clínico para detectar as gestantes infectadas pelo *P. vivax*.

Figura 30 - Curva ROC representando habilidade diagnóstica dos níveis de PCR periféricos como marcador biológico para malária placentária



Por fim, para a análise da leptina como biomarcador clínico, também foram analisadas 283 amostras, sendo destas 126 amostras do grupo positivo (44,0%) e 157 amostras do grupo infectado (56,0%). Na figura 31, é possível observar a curva no gráfico, a área sob a curva ROC (AUC) corresponde a 0,58, apresentando sensibilidade 38% e especificidade 82% (IC-95% - 0,518 – 0,636). De acordo com os valores preditivos da análise da curva ROC, os valores de AUC não são capazes de prever de forma precisa a patologia.

Figura 31 - Curva ROC representando habilidade diagnóstica dos níveis de leptina periféricos como marcador biológico para malária placentária



Depois de estabelecidas as análises dos biomarcadores de forma individual, estes foram comparados entre si utilizando a área sob a curva ROC (Figura 32 e tabela 7). Para saber se houve diferença estatística significativa, foi utilizado o método DeLong (147). Vale salientar que, apesar da leptina apresentar um *p-value* de 0,002, ou seja, apresentar relevância estatística, o valor de *p* não determina a acurácia do teste, mas, sim, a AUC (146). Neste caso, ao sobrepor todos os resultados estes não apresentaram uma boa *performance* diagnóstica para os biomarcadores analisados.

Figura 32 - Curva ROC representando habilidade diagnóstica dos biomarcadores em conjunto como marcador para malária placentária

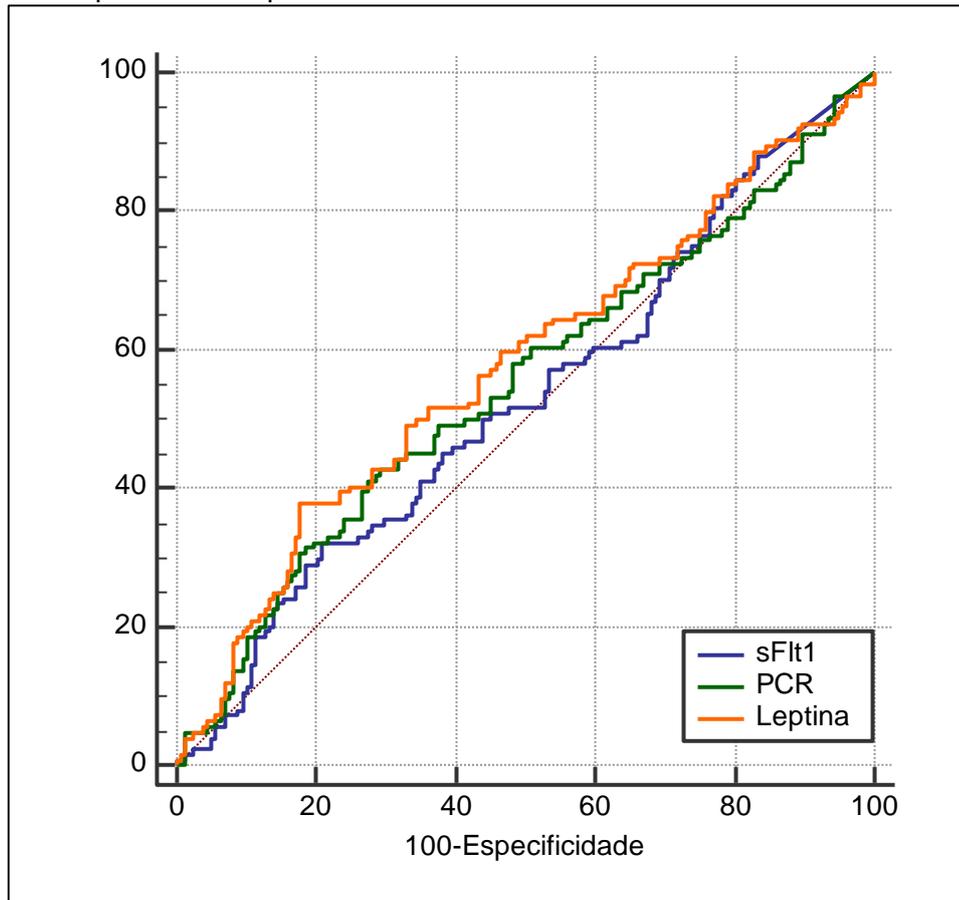


Tabela 7 - Desempenho diagnóstico da curva ROC

Característica	Área	Valor p	Intervalo de Confiança IC 95% min – máx
sFlt-1	0,528	0,416	0,468 - 0,528
PCR	0,551	0,144	0,491 - 0,610
Leptina	0,578	0,002	0,518 - 0,636

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização das gestantes e dos grupos estudados

Sabe-se que a malária durante a gestação representa um importante fator de risco para o baixo peso ao nascer, nascimento pré-termo, aborto, natimorto e outras complicações materno-fetais (148). A maior parte dos estudos envolvendo a malária gestacional demonstrou as consequências e mecanismos fisiopatológicos da infecção por *P. falciparum*, a qual possui alta prevalência e incidência nos países do continente africano (55,149).

Neste sentido, o número de estudos com *P. vivax* é relativamente inferior quando comparado com o *P. falciparum*. Isso provavelmente deve-se ao fato da infecção por este parasito ocorrer em proporções mais baixas e suas manifestações clínicas serem consideradas menos graves quando comparado com as infecções por *P. falciparum*, predominante na região da África subsaariana (150).

No Brasil, tem-se observado uma diminuição de casos de *P. vivax*, no entanto, a espécie continua sendo responsável por mais que 87% dos casos de malária diagnosticados na população, o que torna relevante pesquisas referentes aos mecanismos associados à infecção por essa espécie (151,152).

A região do Alto Juruá, mais especificamente o município de Cruzeiro do Sul, possui grande incidência de casos de malária por *P. vivax*. De acordo com o IPA, no ano de 2013, esta região foi classificada como alto risco de transmissão para doença (IPA=262,4), fato que chama a atenção para as áreas de saúde pública e pesquisadores (152–154). Em face disso, realizou-se uma avaliação do perfil epidemiológico das gestantes dessa área endêmica para malária e, através dos nossos resultados, delinear-se alguns dos fatores epidemiológicos para a caracterização da população estudada.

Neste sentido, foram avaliados dados socioeconômicos que permitiram traçar alguns aspectos dessa população, os quais também, correlacionam-se com achados de outros estudos em regiões da América Latina, onde nível de escolaridade reduzido, alto nível de desemprego, baixa renda familiar mensal, moradias precárias representam fatores de risco para contrair a infecção (7). Portanto, quanto menor o

acesso às condições básicas de saúde e moradia, maior o índice de pobreza de uma região e mais elevado o risco de desenvolver determinadas doenças, dentre as quais, a malária (155).

A região Norte possui a mais elevada taxa de gravidez precoce do país, e sabe-se que mulheres jovens estão sob maior risco de contraírem a malária (156). Isso também foi observado em nossos resultados, mostrando que as gestantes infectadas por *P. vivax* apresentaram uma média de idade menor que as grávidas não infectadas. Corroborando com os resultados de outros estudos, os quais evidenciam quanto mais jovem for a mulher, maior o risco de contrair a infecção pelo *Plasmodium*. Sp (157–159).

Além disso, verificou-se que 44% das gestantes infectadas por *P. vivax* compuseram-se por primigestas. É sabido que os efeitos mais severos da malária podem ser vistos durante a primeira gestação (160). Nossos resultados corroboram com dados de alguns estudos conduzidos na Tailândia, Índia e Indonésia, onde se comprovou o maior risco de gestantes primigestas serem infectadas por *P. vivax*, quando comparadas às multigestas, sendo mais severos os desfechos adversos da doença nesse grupo (161–163).

Como se pode observar em nossos resultados, houve um aumento do número de casos no terceiro trimestre gestacional. Idêntica observação foi realizada por outros autores, quando o pico da infecção nas gestantes obteve alta prevalência no terceiro trimestre (160,164,165). Este fato poderia estar relacionado a fatores como: mudanças fisiológicas durante a gestação e, possivelmente, estariam associadas ao fato das grávidas no terceiro trimestre atraírem mais vetores. Assim, como no final da gravidez, ocorre o aumento da frequência respiratória e, no momento da expiração, exala diferentes componentes que poderiam ser atrativos para o mosquito; sugere-se ainda, que isso esteja relacionado à liberação de substâncias voláteis pela superfície da pele, as quais tornariam essa mulher mais propensa à picada do mosquito e, por extensão, aumentar o risco de infecção (161,166).

Em relação aos fatores de exposição, foi observado que a maioria das gestantes infectadas não possuía banheiro dentro de casa. Uma característica a ser levada em consideração é que durante a gestação ocorrem mudanças fisiológicas, como o aumento da frequência urinária, o que as tornam mais susceptíveis, pois, ao saírem de casa, expõem-se ao mosquito (167,168). Outro aspecto bastante particular consiste na condição de moradia precária da região (em sua maioria, as casas são de

madeiras e possuem frestas), o que torna maior a exposição destas gestantes ao vetor, sendo estas uma fonte de reservatório e facilitação de transmissão a outros indivíduos (169).

6.2 Caracterização das alterações histopatológicas

Sabe-se que a placenta é um órgão altamente vascularizado e especializado, e quaisquer alterações no ambiente placentário podem interferir na sua fisiologia (170). Deste modo, alterações na placenta podem ocasionar alterações patológicas, tais como: a redução da área de superfície do sinciotrofoblasto, aumento da barreira placentária e aumento da apoptose placentária, conseqüentemente, alterando o desenvolvimento e crescimento fetal (69).

Atualmente existem poucos estudos demonstrando as alterações histopatológicas placentárias relacionadas às infecções por *P. vivax*. Acredita-se que essa quantidade reduzida de estudos para a espécie, provavelmente, seja devida a sua baixa taxa de letalidade (80,89,90). Em um estudo recente desenvolvido pelo nosso grupo, envolvendo gestantes infectadas por *P. vivax*, foram observadas algumas alterações placentárias, como aumento de agregados nucleares sinciciais, espessamento da barreira placentária, acúmulo de leucócitos e monócitos nos espaços intervilosos. No entanto, havia limitações nesse trabalho em relação ao tamanho amostral reduzido e ao histórico incompleto das gestantes (80). No presente estudo, conseguiu-se superar essas limitações não só por aumentar o tamanho amostral da população, bem como pela obtenção do histórico clínico completo dessas mulheres. Dessa forma, tornou-se possível averiguar mais precisamente os impactos reais que o *P. vivax* pode ocasionar nas gestantes.

Durante a nossa análise, foi observado o aumento dos agregados nucleares sinciciais nas gestantes infectadas *P. vivax*, os quais estão relacionados à estrutura do sinciotrofoblasto. Esses núcleos de células apoptóticas ajudam a determinar a idade da placenta, além de estarem correlacionados com casos de hipóxia e estresse oxidativo (81). Estudos recentes têm demonstrado uma possível associação da malária placentária e o aumento dos nós sinciciais em casos de hipóxia, o que alterariam as trocas materno-fetais, causando conseqüências ao feto, tais como restrição do crescimento intrauterino e baixo peso ao nascer (81,171).

Verificou-se, ainda, o aumento do espessamento da barreira placentária nas gestantes infectadas, sugerindo assim que a infecção pelo *P. vivax* pode influenciar nessa estrutura específica da placenta. Nossos resultados sobre o aumento do espessamento da barreira placentária foram concordantes com outros estudos descritos na literatura (80,91). Além disso, o aumento do espessamento da barreira placentária afeta diretamente o transporte de gases e nutrientes ao feto, pois quando as trocas ocorrem por difusão passiva, a espessura da barreira e a sua área de troca são importantes nesse processo (172).

Outro achado bastante relevante em nossos resultados foi a presença de células leucocitárias (CD45+) e células mononucleares (CD68+) no espaço intervilloso placentário no grupo de gestantes infectadas. Esses achados poderiam estar relacionados com a presença do parasito no ambiente placentário, isto levaria ao aumento da resposta inflamatória local (173). Além disso, ao segregar por paridade, verificou-se que, no grupo de primigestas infectadas por *P. vivax*, houve um grande aumento do número de células mononucleares (CD68+) no espaço intervilloso, conforme já demonstrado em estudo anterior (174).

Como mencionado, alterações na placenta podem comprometer as suas estruturas e funções fisiológicas, causando desfechos adversos ao feto (175). De acordo com os nossos resultados, foi observada uma diminuição no peso placentário das gestantes infectadas por *P. vivax*. Portanto, a diminuição da massa funcional deste órgão afeta o transporte e o metabolismo de nutrientes imprescindíveis ao desenvolvimento fetal.

Por fim, a malária gestacional causada por *P. vivax* continua gerando lesões na placenta. Sabe-se também que essas alterações no ambiente placentário podem contribuir para desfechos desfavoráveis tanto para mãe quanto para o feto (176). Desta forma, a malária por *P. vivax* durante a gestação requer uma atenção especial dos serviços de saúde pública, por meio da intensificação de estratégias preventivas e curativas para o controle da doença.

6.3 Avaliação sérica dos marcadores placentários

Atualmente, diversos estudos têm associado alguns marcadores a patologias placentárias, bem como a desfechos adversos tanto para mãe quanto para o feto. Como já demonstrado anteriormente por alguns autores, fatores angiogênicos, tais

como VEGF/PlGF desempenham papéis relevantes na ramificação e alongamento dos vasos sanguíneos placentários, atuando diretamente na vasculogênese e angiogênese (177,178). Além disso, qualquer desequilíbrio nessa homeostase pode causar alterações na placenta, tais como: insuficiência vascular placentária e, por consequência, pode levar a uma isquemia e, desta maneira, afetar as trocas materno-fetais (177,178).

Cada vez mais pesquisadores têm encontrado utilidade para o sFlt-1, como marcador biológico, tanto para diagnóstico quanto para prognóstico clínico, independente de combinação com outros fatores, tais como: o VEGF ou PlGF, por exemplo (179). Em trabalhos publicados com gestantes que apresentaram quadros clínicos de pré-eclâmpsia, foi observado o aumento nos níveis séricos de sFlt-1 (antagonista do VEGF/PlGF) e, provavelmente, contribuem para uma disfunção endotelial nessas gestantes, este aumento do sFlt1 também esteve associado a outros distúrbios placentários, por exemplo, gestante com mola hidatiforme (180,181).

No contexto da malária placentária, em um estudo conduzido no Malawi, onde as gestantes estavam infectadas por *P. falciparum*, foram analisados vários marcadores inflamatórios, angiogênicos e antiangiogênicos, dentre eles o sFlt-1; e se detectou níveis aumentados desta molécula no plasma periférico das gestantes infectadas (102). Nossos resultados sobre o comportamento do sFlt-1 foram similares aos encontrados na literatura para outras desordens placentárias (182,183). Adicionalmente, quando se buscou estudos avaliando o perfil sérico de sFlt-1 durante a malária, foram encontrados dados escassos e voltados apenas para as infecções por *P. falciparum*, ou seja, este é o primeiro estudo envolvendo as infecções por *P. vivax*, no qual se encontra também valores aumentados de sFlt-1 nas gestantes infectadas.

De acordo com alguns autores, a hipótese levantada para o aumento considerável de sFlt-1 sérico nas gestantes com alguma desordem placentária pode estar relacionado com casos de hipóxia (109,184). O mecanismo real pelo qual o sFlt-1 exerce um papel inibitório na sinalização do VEGF ainda não está claro, no entanto, supõe-se que, durante os casos de hipóxia, ocorra tanto a transcrição de várias moléculas no tecido placentário, dentre elas o VEGF, Flt-1 e sFlt-1, como a diminuição da transcrição de moléculas como o PlGF, favorecendo a expressão de sFlt-1 (185–187).

De forma complementar, já foi reportado que, apesar do sFlt-1 estar intimamente associado aos processos de angiogênese, ele pode ser expresso também por outras populações celulares, como os macrófagos e as células do sistema imunológico, pode estar associado à resposta inflamatória local e, neste caso, no ambiente placentário (188).

Além disso, quando se segregou por paridade, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativa entre os grupos. Contudo, foi observada graficamente uma tendência de aumento nas gestantes primigestas infectadas. Como já dito anteriormente, os efeitos mais graves da malária placentária são notados durante as primeiras gestações, fator que difere das multigestas, indicando a existência de um forte mecanismo de proteção associado à imunidade específica nas gestantes, o que, desta maneira, protege-as dos efeitos adversos da doença. Sendo assim, supõe-se que este resultado deva-se ao fator relacionado à imunidade associado à paridade, de tal maneira, pois, não se observou o mesmo perfil nas multigestas.

Em seguida, analisaram-se os níveis de PCR em nosso grupo de gestantes. Sabe-se que a PCR é um marcador bioquímico ultrasensível, sendo amplamente utilizado para identificar ou estratificar o risco de várias doenças. Diversos autores já associaram não apenas a níveis elevados de PCR à pré-eclâmpsia, à lesão endotelial e a uma resposta inflamatória sistêmica, assim como a um fator de predição para pré-eclâmpsia (189–191).

A PCR também tem sido estudada em vários pacientes que contraíram malária ao redor do mundo, sendo sugerido como um potencial marcador de gravidade da doença (192–194). Em uma pesquisa realizada na África com gestantes infectada por *P. falciparum* foram coletadas amostras de plasma periférico no momento do parto e, posteriormente, quantificadas as concentrações séricas de PCR. Durante as análises desse estudo foi observado um aumento desta proteína, além deste ter demonstrado ser um bom biomarcador para a malária placentária (102).

Buscou-se, então, analisar o mesmo perfil sérico nas amostras de plasma periférico das gestantes neste estudo. De acordo com os nossos resultados, foi possível observar o mesmo comportamento, em que as gestantes infectadas *P. vivax* apresentaram níveis mais elevados de PCR no plasma periférico em relação às não infectadas, o que corrobora com outros estudos realizados na África (102,121,195).

Vale ressaltar que diversos fatores extrínsecos podem alterar os valores da PCR, desta maneira, tentou-se ser bem criterioso ao empregar os fatores de exclusão,

os quais incluíram gestantes tabagistas, com diabetes *mellitus* ou qualquer quadro de doença infecciosa, para que não interferisse em nossas análises. Assim, como dito anteriormente, as gestantes infectadas pelo *P. vivax* apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de PCR. Infere-se que os níveis elevados da PCR nesse grupo estejam relacionada à exacerbada cascata inflamatória desencadeada pela malária.

A leptina tem sido considerada atualmente um hormônio multifatorial atuando na regulação do peso corpóreo, regulação térmica, hematopoiese, funções imunológicas, neuroendócrinas, angiogênese e regulando também o eixo reprodutor, atuando na implantação, desenvolvimento e crescimento do embrião (196). Sabe-se que a leptina em humanos tem a função de auxiliar no desenvolvimento e crescimento fetal. Atua, portanto, como um sinal em resposta ao ambiente placentário, indicando informações tanto a viabilidade fetal quanto a placentária e as reservas energéticas fetais (197). Algumas pesquisas sugerem que, em condições fisiológicas, grande parte de leptina produzida pela placenta é liberada na circulação materna, restando apenas uma pequena fração para o feto (198,199). Convém lembrar que os receptores dessa molécula estão presentes no sincitiotrofoblasto, sendo transcritos em abundância (200).

As maiorias dos estudos voltados para a avaliação dos níveis séricos de leptina estão correlacionados a outras doenças gestacionais. Ao revisar a literatura, nota-se que as pesquisas associando a leptina à infecção pelo *Plasmodium* ainda são limitados. No entanto, em um dos poucos estudos publicados, o qual foi realizado na Tanzânia avaliando as concentrações séricas de várias citocinas e fatores solúveis em plasma periférico, foi observada a diminuição dos níveis de leptina em primigestas durante a malária placentária (136). Nossas análises demonstraram o mesmo perfil, porém para uma espécie diferente, tendo sido observada uma baixa leptinemia nas grávidas infectadas por *P. vivax*, sugerindo que esta alteração sérica seja influenciada pela infecção.

Conroy e colaboradores sugerem ainda que a leptina possa ser um potencial biomarcador para a malária placentária, pois durante a sua pesquisa, realizada no Malawi com gestantes infectadas por *P. falciparum*, foi observada uma redução nos valores de leptina periférica, e este marcador demonstrou ter uma boa performance diagnóstica nesse grupo de gestantes (102). Além disso, outro estudo realizado na África investigou os níveis de leptina no sangue materno e no cordão umbilical, apesar de não ter observado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, foi

vista uma redução da leptina nas gestantes as quais estavam infectadas pelo *Plasmodium* (201).

Neste sentido, a leptina pode exercer um papel importante na fisiopatogenia da malária placentária, sustentando a hipótese de que a infecção pelo *P. vivax* esteja de forma indireta alterando sua produção pela placenta, contudo, mais estudos precisam ser elaborados para avaliar a associação real desta molécula à infecção pela malária.

6.4 Análise de sensibilidade e especificidade dos biomarcadores placentários

Posteriormente, às análises estatísticas dos marcadores, decidiu-se avaliar nossos resultados utilizando outros métodos estatísticos, os quais são aplicados à medicina diagnóstica. Buscou-se, então, aplicar a curva ROC com o objetivo de investigar o desempenho diagnóstico dos nossos marcadores estudados (sFlt-1, PCR e leptina). Destaca-se que o nosso grupo é o primeiro a investigar a concentração sérica dos marcadores: sFlt-1, PCR e leptina em gestantes infectadas por *P. vivax*. Ressalta-se ainda a inegável importância deste trabalho no contexto da malária placentária.

Embora não se encontre um bom desempenho diagnóstico clínico e laboratorial para os biomarcadores, quando utilizado o método estatístico da curva ROC, foram encontradas diferenças entre os níveis séricos dos marcadores pesquisados. Dessa forma, isso propicia não só uma melhor compreensão em relação aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na malária gestacional, como também realizar estudos adicionais com o objetivo de investigar o comportamento dos biomarcadores em diferentes pontos durante a gravidez e, assim, verificar com maior robustez seu potencial efeito diagnóstico na malária placentária.

Vale ressaltar que o nosso estudo foi conduzido em gestantes infectadas por *P. vivax*, e como já é sabido existem diferenças entre o *P. vivax* e o *P. falciparum*, sendo esta última espécie mais grave por causar desfechos mais severos tanto para mãe quanto para o feto. Conroy e colaboradores, em seu trabalho com gestantes infectadas por *P. falciparum*, observaram uma diferença expressiva das concentrações séricas dos biomarcadores sFlt-1, PCR e leptina, inferiram que estes possuem uma boa *performance* diagnóstica quando aplicados utilizando a análise estatística da curva ROC (102). Apesar das nossas análises usando a curva ROC não terem apontado isso, pois a avaliação sérica apresentou resultados intermediários,

sugerindo que as alterações dos marcadores podem ser decorrentes de distúrbios locais e sistêmicos, e se estes marcadores forem avaliados em diferentes pontos do trimestre gestacional podem ter a acurácia diagnóstica para predizerem a malária placentária por *P. vivax*.

7 CONCLUSÃO

1. Alguns parâmetros socioeconômicos, tais como: idade materna reduzida, nível de escolaridade reduzidos, a ausência de banheiro dentro da residência estão associados com uma maior incidência de malária.
2. As primigestas compreendeu o grupo que apresentou a maior frequência de infecções por *P. vivax*.
3. A incidência de malária gestacional ocorre em maior intensidade no terceiro trimestre gestacional.
4. As gestantes infectadas por *P. vivax* tiveram um menor peso placentário, quando comparadas com as não infectadas.
5. As alterações histopatológicas mais relevantes observadas nas gestantes infectadas por *P. vivax* foram o aumento de agregados nucleares sinciciais, de infiltrado leucocitário e de células mononucleares e o espessamento da barreira placentária.
6. Em relação aos biomarcadores, verificou-se um aumento sérico nos níveis de sFlt-1 e proteína C reativa e uma redução significativa nos níveis plasmáticos de leptina entre as gestantes que apresentaram infecção por *P. vivax*.
7. As alterações geradas no ambiente placentário podem ser decorrentes de distúrbios locais e sistêmicos e que, em conjunto, contribuem para um desfecho desfavorável durante a malária gestacional.

REFERÊNCIAS*

1. World Health Organisation. WHO GLOBAL MALARIA PROGRAMME WORLD MALARIA REPORT 2017 [Internet]. Accessed September. 2017. 196 p. Available from: <http://arxiv.org/abs/1011.1669v0><http://dx.doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201>
2. Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, et al. The international limits and population at risk of Plasmodium vivax transmission in 2009. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2010 Aug 3;4(8):e774. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20689816>
3. Autino B, Noris A, Russo R, Castelli F. Epidemiology of malaria in endemic areas. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2012;4(1).
4. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, et al. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. Clin Infect Dis [Internet]. 2008;46(1537–6591 (Electronic)):165–71. Available from: <c:\%5CKarsten%5CPDFs%5CParasitologie-PDFs%5CParasit-2008%5CCox-Singh et al.-Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.pdf>
5. Zuzarte-Luis V, Mota MM, Vigário AM. Malaria infections: What and how can mice teach us. J Immunol Methods [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;410:113–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2014.05.001>
6. Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM. First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi. Malar J. 2014;13(1):1–7.
7. Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. Nature [Internet]. 2002 Feb 7;415(6872):680–5. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/415680a>
8. World Malaria Report. World [Internet]. Ecos. 2017. Available from: <http://www.publish.csiro.au/?paper=EC12504>
9. WHO. World Malaria Report. World Health Organization. 2016. 1-186 p.
10. Folegatti PM, Siqueira AM, Monteiro WM, Lacerda MVG, Drakeley CJ, Braga ÉM. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: Insights into immunological markers for exposure and protection. Malaria Journal. 2017.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

11. Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current challenges in malaria control and elimination. *Malaria Journal*. 2017.
12. McGregor IA. Epidemiology, malaria and pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1984 Jul;33(4):517–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6383091>
13. SVS/MS. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. *Bol Epidemiol*. 2015;46:43–2015.
14. Mascarenhas MDM, Monteiro RA, Silva MMA da, Malta DC. Mortalidade por acidentes e violências no Brasil: situação em 2010 e tendências de 2001 a 2010. *Saúde Brasil 2011*. 2012. 249-277 p.
15. Lacerda MVG de. Manifestações Clínicas e Patogênese da Plaquetopenia na Malária. [tese]. Universidade de Brasília; 2007.
16. Tauil PL. Avaliação de uma nova estratégia de controle. [tese]. Universidade de Brasília; 2002.
17. Saraiva MDGG, Amorim RDS, Moura MAS, Martinez-Espinosa FE, Barbosa MDGV. Urban expansion and spatial distribution of malaria in the municipality of Manaus, State of Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(5):515–22.
18. Castro MC d., Monte-Mor RL, Sawyer DO, Singer BH. Malaria risk on the Amazon frontier. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;
19. Brasil M da S. Lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária. Base Nac [Internet]. 2016;1–9. Available from: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/19/Lista-de-municipios-pertencentes-as-areas-de-risco-ou-endemicas-para-malaria.pdf>
20. De M. Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2013. 2013;2013.
21. Pessoa SB. *Parasitologia Médica*. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1993.
22. Lacerda MVG de VG de. Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária. *Medicina (B Aires)*. 2007;395.
23. Sturm A. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science (80-)* [Internet]. 2006;313(5791):1287–90. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1129720>
24. Cho S, Kim S, Kim Y, Park YK. Optical imaging techniques for the study of malaria. *Trends Biotechnol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;30(2):71–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.08.004>
25. Hulden L, Hulden L. Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life

cycle and survival.

26. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases*. 2009.
27. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology*. 2014.
28. Ghansah A, Amenga-Etego L, Amambua-Ngwa A, Andagalu B, Apinjoh T, Bouyou-Akotet M, et al. Monitoring parasite diversity for malaria elimination in sub-Saharan Africa. *Science* (80-) [Internet]. 2014 Sep 12;345(6202):1297–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1259423>
29. Nabet C, Doumbo S, Jeddi F, Konaté S, Manciuilli T, Fofana B, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in human malaria cases in Mali. *Malar J. BioMed Central*; 2016;15(1):1–10.
30. Bottius E, Guanzirolli A, Trape JF, Rogier C, Konate L, Druilhe P. Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 90(1):15–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8730301>
31. Staalsoe T, Hviid L. The Role of Variant-specific Immunity in Asymptomatic Malaria Infections: Maintaining a Fine Balance. *Parasitol Today* [Internet]. 1998 May;14(5):177–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17040744>
32. Njama-Meya D, Kanya MR, Dorsey G. Asymptomatic parasitaemia as a risk factor for symptomatic malaria in a cohort of Ugandan children. *Trop Med Int Heal*. 2004;9(8):862–8.
33. Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: A consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria Journal*. 2006.
34. Laishram DD, Sutton PL, Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM, et al. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malar J* [Internet]. 2012;11(1):29. Available from: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-29>
35. Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1).
36. Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2000 Apr;94 Suppl 1:S1-90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11103309>
37. Bruneel F, Hocqueloux L, Alberti C, Wolff M, Chevret S, Be J, et al. The Clinical Spectrum of Severe Imported Falciparum Malaria in the Intensive Care Unit Report of 188 Cases in Adults. 2003;167:684–9.
38. Schwartz E, Sadetzki S, Murad H, Raveh D. Age as a Risk Factor for Severe *Plasmodium falciparum* Malaria in Nonimmune Patients. 2001;33:1774–7.

39. Awa S, Offiah U, Ekperi O, Igwe FE, Nwosu SO. Malaria in non - immune travelers : A case report and reminder for increased awareness of the problem. 2014;9(4):160–4.
40. Melo GC, Monteiro WM, Siqueira AM, Silva SR, Magalhães BML, Alencar ACC, et al. Expression levels of pvcrt-o and pvmdr-1 are associated with chloroquine resistance and severe Plasmodium vivax malaria in patients of the Brazilian Amazon. PLoS One. 2014;
41. Medina-Morales DA, Montoya-Franco E, Sanchez-Aristizabal V d. P, Machado-Alba JE, Rodríguez-Morales AJ. Severe and benign Plasmodium vivax malaria in Emberá (Amerindian) children and adolescents from an endemic municipality in Western Colombia. J Infect Public Health. 2016;
42. Pincelli A, Neves PAR, Lourenço BH, Corder RM, Sampaio-silva J, Souza RM De, et al. The Hidden Burden of Plasmodium vivax Malaria in Pregnancy in the Amazon : An Observational Study in northwestern Brazil. :1–24.
43. Souza RM De, Gonc A, Silva M. Malaria during pregnancy and newborn outcome in an unstable transmission area in Brazil : A population-based record linkage study. 2018;1–16.
44. Agudelo O, Arango E, Maestre A, Carmona-Fonseca J. Prevalence of gestational, placental and congenital malaria in north-west Colombia. Malar J [Internet]. Malaria Journal; 2013;12(1):1. Available from: Malaria Journal
45. Pinerros JG, Tobon-Castano A, A´lvarez G, Portilla C, Blair S. Maternal clinical findings in malaria in pregnancy in a region of northwestern colombia. Am J Trop Med Hyg. 2013;89(3):520–6.
46. Brabin BJ. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. Bull World Health Organ. 1983;61(6):1005–16.
47. Stokowski LA. Make every mother and child count--World Health Day. Adv Neonatal Care. 2005;5(3):124.
48. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RFG, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. Lancet Infect Dis. Elsevier; 2007;7(2):105–117.
49. Dellicour S, Tatem AJ, Guerra C a, Snow RW, ter Kuile FO. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: a demographic study. PLoS Med. Public Library of Science; 2010 Jan;7(1):e1000221.
50. Menendez C. Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. Parasitol Today. 1995 May;11(5):178–83.
51. McGregor IA. Epidemiology, malaria and pregnancy. Am J Trop Med Hyg. 1984 Jul;33(4):517–25.
52. Baird JK. Neglect of Plasmodium vivax malaria. Trends Parasitol. 2007 Nov;23(11):533–9.
53. Sharma L, Shukla G. Placental Malaria: A New Insight into the Pathophysiology. Front Med. 2017;

54. Fried M, Duffy PE. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science*. 1996;272(5267):1502–4.
55. Beeson JG, Rogerson SJ, Cooke BM, Reeder JC, Chai W, Lawson AM, et al. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. *Nat Med*. 2000;6(1):86–90.
56. Sharma L, Shukla G. Placental Malaria: A New Insight into the Pathophysiology. *Front Med* [Internet]. 2017;4(July):1–6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2017.00117/full>
57. Rogerson SJ, Chaiyaroj SC, Ng K, Reeder JC, Brown G V. Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med* [Internet]. 1995;182(1):15–20. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192085&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
58. Carvalho BO, Lopes SCP, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax* –Infected Erythrocytes. *J Infect Dis* [Internet]. 2010;202(4):638–47. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/654815>
59. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Suwanarusk R, Pukrittayakamee S, Wilairatana P, Beeson JG, et al. *Plasmodium vivax* adherence to placental glycosaminoglycans. *PLoS One*. 2012;7(4):1–7.
60. Rogerson SJ, Pollina E, Getachew A, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME. Placental monocyte infiltrates in response to *Plasmodium falciparum* malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2003 Jan;68(1):115–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12556159>
61. Abrams ET, Brown H, Chensue SW, Turner GDH, Tadesse E, Lema VM, et al. Host Response to Malaria During Pregnancy: Placental Monocyte Recruitment Is Associated with Elevated Chemokine Expression. *J Immunol* [Internet]. 2003;170(5):2759–64. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.170.5.2759>
62. Bulmer JN, Rasheed FN, Francis N, Morrison L, Greenwoods BM. Placental malaria. I. Pathological classification. *Histopathology*. 1993;22(3):211–8.
63. Muehlenbachs A, Fried M, McGready R, Harrington WE, Mutabingwa TK, Nosten F, et al. A Novel Histological Grading Scheme for Placental Malaria Applied in Areas of High and Low Malaria Transmission. *J Infect Dis*. 2010;
64. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res*. 2004;114(5–6 SPEC. ISS.):397–407.
65. Sandovici I, Hoelle K, Angiolini E, Constância M. Placental adaptations to the maternal-fetal environment: Implications for fetal growth and developmental programming. *Reprod Biomed Online*. 2012;25(1):68–89.
66. Castellucci M, Kaufmann P. Basic structure of the villous trees. *Pathol Hum placenta*, 4th ed [Internet]. 1999;50–115. Available from:

- <http://www.barnesandnoble.com/w/pathology-of-the-human-placenta-kurt-benirschke/1101680200?ean=9780387988948>
67. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol* [Internet]. 2008;61(12):1296–302. Available from: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.2008.055277>
 68. Benirschke K & Kaufmann P. *Pathology of the Human Placenta* 4 ed. New York: Springer; 2000. 950 p.
 69. Arroyo JA, Winn VD. Vasculogenesis and Angiogenesis in the IUGR Placenta. *Semin Perinatol*. 2008;32(3):172–7.
 70. Langheinrich AC, Vorman S, Seidenstücker J, Kampschulte M, Bohle RM, Wienhard J, et al. Quantitative 3D Micro-CT Imaging of the Human Feto-placental Vasculature in Intrauterine Growth Restriction. *Placenta* [Internet]. 2008 Nov;29(11):937–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400408002622>
 71. Wang Y. *Vascular Biology of the Placenta. Colloq Ser Integr Syst Physiol From Mol to Funct* [Internet]. 2010;2(1):1–98. Available from: <http://www.morganclaypool.com/doi/abs/10.4199/C00016ED1V01Y201008ISP009>
 72. Castellucci M Kp, Benirschke K, Kaufmann P Br, Editor. *Pathology Of The Human Placenta*. 5th Edition. 2006.
 73. Walter PR, Garin Y, Blot P. Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. *Am J Pathol*. 1982;109(3):330–42.
 74. Chaikitgosiyakul S, Rijken MJ, Muehlenbachs A, Lee SJ, Chaisri U, Viriyavejakul P, et al. A morphometric and histological study of placental malaria shows significant changes to villous architecture in both *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infection. *Malar J* [Internet]. 2014;13(1):4. Available from: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-4>
 75. Walter PR, Garin Y, Blot P. Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. *Am J Pathol*. 1982;109(3):330–42.
 76. Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. The Impact of Placental Malaria on Gestational Age and Birth Weight. *J Infect Dis* [Internet]. 2000;181(5):1740–5. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315449>
 77. Rogerson SJ, Mkundika P, Kanjala MK. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* Malaria at Delivery: Comparison of Blood Film Preparation Methods and of Blood Films with Histology. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003 Apr 1;41(4):1370–4. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.41.4.1370-1374.2003>
 78. Rogerson SJ, Pollina E, Getachew A, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME. Placental monocyte infiltrates in response to *Plasmodium falciparum* malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. *Am J Trop Med Hyg*. 2003/01/31. *ASTMH*; 2003;68(1):115–119.

79. Parekh FK, Davison BB, Gamboa D, Hernandez J, Branch OLH. Placental histopathologic changes associated with subclinical malaria infection and its impact on the fetal environment. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(5):973–80.
80. Souza RM, Ataíde R, Dombrowski JG, Ippólito V, Aitken EH, Valle SN, et al. Placental Histopathological Changes Associated with Plasmodium vivax Infection during Pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(2):1–11.
81. Heazell AEP, Moll SJ, Jones CJP, Baker PN, Crocker IP. Formation of Syncytial Knots is Increased by Hyperoxia, Hypoxia and Reactive Oxygen Species. *Placenta* [Internet]. IFPA and Elsevier Ltd; 2007;28(SUPPL.):S33–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2006.10.007>
82. Levy RA, Avvad E, Oliveira J, Porto LC. Placental pathology in antiphospholipid syndrome. *Lupus* [Internet]. 1998;7 Suppl 2:S81-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9814679>
83. Khalid ME, Ali ME, Ali KZ. Full-term birth weight and placental morphology at high and low altitude. *Int J Gynaecol Obstet* [Internet]. 1997 Jun;57(3):259–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9215488>
84. Burton GJ, Jones CJP. Syncytial knots, sprouts, apoptosis, and trophoblast deportation from the human placenta. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. Chinese Academy of Agricultural Sciences; 2009;48(1):28–37. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1028-4559\(09\)60032-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1028-4559(09)60032-2)
85. Benirschke K. The human placenta. J. D. Boyd and W. J. Hamilton. Heffer, Cambridge, 365 pp. 1970. *Teratology* [Internet]. 1973 Aug;8(1):77–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/tera.1420080118>
86. Cantle SJ, Kaufmann P, Luckhardt M, Schweikhart G. Interpretation of syncytial sprouts and bridges in the human placenta. *Placenta.* 1987;8(3):221–34.
87. Leopardi O, Naughten W, Salvia L, Colecchia M, Matteelli A, Zucchi A, et al. Malaric Placentas. *Pathol - Res Pract* [Internet]. 1996 Jan;192(9):892–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0344033896800689>
88. Ordi J, Menendez C, Ismail MR, Ventura PJ, Palacín A, Kahigwa E, et al. Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence of natural killer cells. *J Infect Dis* [Internet]. 2001;183(7):1100–7. Epub 2001 Mar 8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237836>
89. Mayor A, Bardají A, Felger I, King CL, Cisteró P, Dobaño C, et al. Placental infection with plasmodium vivax: A histopathological and molecular study. *J Infect Dis.* 2012;206(12):1904–10.
90. Ismail MR, Ordi J, Menendez C, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Hum Pathol.* 2000 Jan;31(1):85–93.
91. Ataíde R, Murillo O, Dombrowski JG, Souza RM, Lima FA, Lima GFMC, et al. Malaria in Pregnancy Interacts with and Alters the Angiogenic Profiles of the Placenta. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015;9(6):e0003824. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26090803>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4475015>
92. McGready R, Davison BB, Stepniewska K, Cho T, Shee H, Brockman A, et al. The effects of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections on placental histopathology in an area of low malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Apr;70(4):398–407.
 93. Strimbu K, Tavel J a. What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 2011;5(6):463–6.
 94. Conroy A, Conroy AL. Biomarkers of severe malaria : complement activation and dysregulated angiogenesis in placental malaria and by Biomarkers of Severe Malaria : Complement Activation and Dysregulated Angiogenesis in Placenta Malarial and Cerebral Malaria. *Lab Med.* 2011;
 95. Parikh NI, Vasan RS. Assessing the clinical utility of biomarkers in medicine. *Biomark Med.* 2007;
 96. Ray S, Reddy PJ, Jain R, Gollapalli K, Moiyadi A. Proteomic technologies for the identification of disease biomarkers in serum : Advances and challenges ahead. 2011;2139–61.
 97. Jahangiry L, Farhangi MA, Rezaei F. Framingham risk score for estimation of 10-years of cardiovascular diseases risk in patients with metabolic syndrome. *J Heal Popul Nutr. Journal of Health, Population and Nutrition;* 2017;36(1):1–6.
 98. Robinson WH. Mechanistic biomarkers for clinical decision making in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(5):267–76.
 99. Mathema VB, Na-Bangchang K. A brief review on biomarkers and proteomic approach for malaria research. *Asian Pac J Trop Med [Internet]. Hainan Medical College;* 2015;8(4):253–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60327-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60327-8)
 100. Zoghi S, Mehrizi AA, Raeisi A, Haghdoost AA, Turki H, Safari R. Survey for asymptomatic malaria cases in low transmission settings of Iran under elimination programme. 2012;1–10.
 101. Armah HB, Wilson NO, Sarfo BY, Powell MD, Bond VC, Anderson W, et al. Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. 17:1–17.
 102. Conroy AL, Liles WC, Molyneux ME, Rogerson SJ, Kain KC. Performance characteristics of combinations of host biomarkers to identify women with occult placental malaria: A case-control study from Malawi. *PLoS One.* 2011;6(12).
 103. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 1996 Mar 19;93(6):2576–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8637916>
 104. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-

- Angiogenic Therapies. *Genes and Cancer*. 2011;2(12):1097–105.
105. Oncology M, Francisco SS. Vascular Endothelial Growth Factor : Basic Science and. 2004;25(4):581–611.
 106. Shibuya M. JB Review Vascular endothelial growth factor and its receptor system : physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. 2013;153(1):13–9.
 107. Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J, Bujold E, Mee Kim Y, Gon??alves LF, et al. Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia: Young Investigator Award. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190(6):1541–50.
 108. Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cells, Mol Dis*. 2007;38(3):258–68.
 109. Herraiz I, Simón E, Gómez-arriaga PI, Martínez-moratalla JM. Angiogenesis-Related Biomarkers (sFlt-1 / PLGF) in the Prediction and Diagnosis of Placental Dysfunction : An Approach for Clinical Integration. *Int J Mol Sci*. 2015;19009–26.
 110. Lapaire O, Zeisler H, Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D. hypertensive pregnancy disorders and its pregnancy disorders and its prognostic. *YMOB [Internet]*. Mosby, Inc.; 2014;(January 2012). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2011.07.037>
 111. Schoedl M, Ph D, Hund M, Ph D, Verlohren S, Ph D. Predictive Value of the sFlt-1:PIGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. 2016;
 112. Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Ph D. Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia. 2004;
 113. Du Clos TW. Function of C-reactive protein. *Ann Med*. 2000;32(4):274–8.
 114. Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein. *JEmergMed*. 1999;17(0736–4679 (Print)):1019–25.
 115. Seo HS. The role and clinical significance of high-sensitivity C-reactive protein in cardiovascular disease. *Korean Circulation Journal*. 2012;
 116. Su Y-J. The value of C-reactive protein in emergency medicine. *J Acute Dis [Internet]*. 2014;3(1):1–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221618914600019>
 117. Berk M, Wade AA, Kuschket RH, O 'neill-Kerr A. Acute phase proteins in major depression. *J Psychosom Res*. 1997;43(5):529–34.
 118. Maguire PJ, Power KA, O'Higgins AC, Jackson S, Harley R, Le Roux CW, et al. Maternal C-reactive protein in early pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015;
 119. Taylor BD, Holzman CB, Fichorova RN, Tian Y, Jones NM, Fu W, et al. Inflammation biomarkers in vaginal fluid and preterm delivery. 2013;28(4):942–

- 52.
120. Kabyemela ER, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE. Fetal responses during placental malaria modify the risk of low birth weight. *Infect Immun.* 2008;76(4):1527–34.
 121. Saad AA, Mohamed OE, Ali AAA, Bashir AM, Ali NI, Elbashir MI, et al. Acute-phase proteins in pregnant Sudanese women with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;
 122. Hanitsch S, Attanasio A, Blum WF, S EKC, Giessen D-, Hospital C. Levels of Leptin in Maternal Serum , Amniotic Fluid , and Arterial and Venous Cord Blood : Relation to Neonatal and Placental Weight. 1997;82(5):1480–3.
 123. Licinio J, Mantzoros C, Negrão AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB, et al. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med [Internet].* 1997 May;3(5):575–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142131>
 124. Sagawa N, Yura S, Itoh H, Mise H, Kakui K, Korita D, et al. Role of leptin in pregnancy--a review. *Placenta [Internet].* 2002;23 Suppl A:S80-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11978063>
 125. Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet.* 1998;351(9104):737–42.
 126. Henríquez A, Tejerizo-garcía A, González-rodríguez SP, Belloso M. Leptina, embarazo y reproducción. 2006;33(5).
 127. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature [Internet].* 1998 Jun 18;393(6686):684–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/31474>
 128. Pérez-Pérez A, Toro A, Vilariño-García T, Maymó J, Guadix P, Dueñas JL, et al. Leptin action in normal and pathological pregnancies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2018.
 129. Linnemann K, Malek A, Sager R, Blum WF, Schneider H, Fusch C, et al. Leptin Production and Release in the Dually in Vitro Perfused Human Placenta *. 2000;85(11):4298–301.
 130. Ashworth CJ, Hoggard N, Thomas L, Mercer JG, Wallace JM, Lea RG. Placental leptin. *Rev Reprod.* 2000;5(1):18–24.
 131. Sivan E, Whittaker PG, Sinha D, Homko CJ, Lin M. Leptin in human pregnancy : The relationship with gestational hormones. (protocol 2):1128–32.
 132. Henson MC, Ph D, Castracane VD, Ph D. Leptin : Roles and Regulation in Primate Pregnancy.
 133. New THE, Journal E, Medicine OF. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. 1996;292–5.
 134. Pérez-Pérez A, Guadix P, Maymó J, Dueñas JL, Varone C, Fernández-Sánchez M, et al. Insulin and Leptin Signaling in Placenta from Gestational Diabetic

Subjects. *Horm Metab Res.* 2015;

135. El shahat AM, Ahmed AB, Ahmed MR, Mohamed HS. Maternal serum leptin as a marker of preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2013 Dec 15;288(6):1317–22. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00404-013-2915-8>
136. Kabyemela ER, Muehlenbachs A, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE. Maternal peripheral blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria. *Malar J* [Internet]. 2008;7:26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18230163>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2265723>
137. Kabyemela ER, Fried M, Kurtis JD, Mutabingwa TK, Duffy PE. Fetal responses during placental malaria modify the risk of low birth weight. *Infect Immun.* 2008;76(4):1527–34.
138. Carty D, Delles C, Dominiczak A. Novel Biomarkers for Predicting Preeclampsia - Trends in Cardiovascular Medicine. *J Cardiovasc.* 2008;18(5):186–94.
139. Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: what can we learn? *Trends Parasitol.* 2004 Sep;20(9):425–32.
140. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. CENSO 2010 [Internet]. 2010. Available from: http://www.censo2010.ibge.gov.br/resultados_do_censo2010.php
141. Dombrowski JG, Souza RM de, Silva NRM, Barateiro A, Epiphany S, Gonçalves LA, et al. Malaria during pregnancy and newborn outcome in an unstable transmission area in Brazil: A population-based record linkage study. Snounou G, editor. *PLoS One.* 2018 Jun;13(6):e0199415.
142. Lucchi NW, Narayanan J, Karell MA, Xayavong M, Kariuki S, DaSilva AJ, et al. Molecular Diagnosis of Malaria by Photo-Induced Electron Transfer Fluorogenic Primers: PET-PCR. *PLoS One.* 2013;8(2):1–7.
143. Bulmer JN, Rasheed FN, Francis N, Morrison L, Greenwood BM. Placental malaria. I. Pathological classification. *Histopathology.* 1993 Mar;22(3):211–8.
144. Souza RM, Ataíde R, Dombrowski JG, Ippólito V, Aitken EH, Valle SN, et al. Placental histopathological changes associated with *Plasmodium vivax* infection during pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Jan;7(2):e2071.
145. Kushner I, Feldmann G. Control of the acute phase response. Demonstration of C-reactive protein synthesis and secretion by hepatocytes during acute inflammation in the rabbit. *J Exp Med* [Internet]. 1978 Aug 1;148(2):466–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/702046>
146. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. [Internet]. 2016. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27010052>
147. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric

- approach. *Biometrics* [Internet]. 1988 Sep;44(3):837–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3203132>
148. Meira DA. Infecção pelo plasmodium falciparum e gravidez. Relato de casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 22(2): 99-101, AbrJun .
 149. Rogerson SJ, Mwapasa V, Meshnick SR. Malaria in pregnancy: Linking immunity and pathogenesis to prevention. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(SUPPL. 6):14–22.
 150. Parekh FK, Hernandez JN, Krogstad DJ, Casapia WM, Branch OH. Communities of the Peruvian Amazon. 2013;77(3):451–7.
 151. Martínez-Espinosa FE, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim WD. Malaria during pregnancy in a reference centre from the Brazilian Amazon: Unexpected increase in the frequency of Plasmodium falciparum infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(1):19–21.
 152. Medeiros K, Costa DM, Aparecida W, Almeida F De, Magalhães IB, Montoya R, et al. Malária em Cruzeiro do Sul (Amazônia Ocidental brasileira): análise da série histórica de 1998 a 2008. 2010;28(1).
 153. Braz RM, Duarte EC, Tauil PL. Epidemiology of malaria in the municipality of Cruzeiro do Sul, State of Acre, Brazil, in 2010: uses of a control chart at the local level. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2012;45(4):526–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822012000400023&lng=en&tlng=en
 154. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J* [Internet]. BioMed Central; 2016;15(1):284. Available from: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-016-1335-1>
 155. de Castro MC, Sawyer DO, Singer BH. Spatial patterns of malaria in the Amazon: Implications for surveillance and targeted interventions. *Heal Place.* 2007;13(2):368–80.
 156. Chagas ECDS, do Nascimento CT, de Santana Filho FS, Bôtto-Menezes CH, Martínez-Espinosa FE. Impact of malaria during pregnancy in the Amazon region. *Rev Panam Salud Publica.* 2009;26(3):203–8.
 157. Dicko A, Mantel C, Thera MA, Doumbia S, Diallo M, Diakitè M, et al. Risk factors for malaria infection and anemia for pregnant women in the Sahel area of Bandiagara, Mali. *Acta Trop.* 2003;89(1):17–23.
 158. Kourtis AP, Read JS, Jamieson DJ. Pregnancy and Infection. *N Engl J Med* [Internet]. 2014;370(23):2211–8. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1213566>
 159. Adam I, Khamis AH, Elbashir MI. Prevalence and risk factors for Plasmodium falciparum malaria in pregnant women of eastern Sudan. *Malar J.* 2005;4:18.
 160. Schmiegelow C, Minja D, Oesterholt M, Pehrson C, Suhrs HE, Boström S, et al. Malaria and Fetal Growth Alterations in the 3rd Trimester of Pregnancy: A Longitudinal Ultrasound Study. *PLoS One.* 2013;8(1):18–20.

161. McLEAN ARD, ATAIDE R, SIMPSON JA, BEESON JG, FOWKES FJI. Malaria and immunity during pregnancy and postpartum: a tale of two species. *Parasitology* [Internet]. 2015;142(8):999–1015. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182015000074
162. Singh N, Shukla MM, Sharma VP. Epidemiology of malaria in pregnancy in central India. *Bull World Health Organ*. 1999;77(7):567–72.
163. Maitland K, Williams TN, Newbold CI. *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*: Biological interactions and the possibility of cross-species immunity. *Parasitol Today*. 1997;13(6):227–30.
164. Nosten F, ter Kuile F, Maelankirri L, Decludt B, White NJ. Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991;85(4):424–9.
165. Adam I, Khamis AH, Elbashir MI. Prevalence and risk factors for *Plasmodium falciparum* malaria in pregnant women of eastern Sudan. *Malar J* [Internet]. 2005;4:18. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1087872&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
166. Lindsay S, Ansell J, Selman C, Cox V, Hamilton K, Walraven G. Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. *Lancet* [Internet]. 2000;355(9219):1972. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600023345>
167. Thorp JM, Norton P a, Wall LL, Kuller J a, Eucker B, Wells E. Urinary incontinence in pregnancy and the puerperium: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1999;181(2):266–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10454667>
168. Ansell J, Hamilton KA, Pindeti M, Walraven GEL. Short-range mosquitoes attractiveness of pregnant women to *Anopheles gambiae*. 2002;
169. Vittor AY, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Lozano WS, et al. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of *falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;
170. Gudmundsson S, Dubiel M. Placental Morphologic and Functional Imaging in High-Risk Pregnancies. *YSPER* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;33(4):270–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2009.04.005>
171. Boeuf P, Tan A, Romagosa C, Radford J, Mwapasa V, Molyneux ME, et al. Placental hypoxia during placental malaria. 2009;197(5):757–65.
172. Schröder HJ. Comparative aspects of placental exchange functions. *Eur J Obstet Gynecol*. 1995;63(1):81–90.
173. Hq WHO. WHO Evidence Review Group : The Safety and Effectiveness of Single Dose Primaquine as a *P. falciparum* gametocytocide. 2012;(September):1–19.
174. Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. The

- impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis* [Internet]. 2000;181(5):1740–5. Available from: %5C%5Clarser13%5CTIS\$%5Clit%5CB4000%5CB03049.pdf
175. Diversity MH. Book reviews. *Appl Physiol Nutr Metab* [Internet]. 2012;37(2):394. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22466419>
 176. Rogerson SJ, Boeuf P. New approaches to pathogenesis of malaria in pregnancy. 2017;(2007):1883–93.
 177. Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. 2000;92:35–43.
 178. Shorea VH, Wang C. Vascular Their Endothelial Growth Factor , Human Placenta Trophoblast Growth Factor and Receptors in Isolated. 1997;657–65.
 179. Wu FTH, Stefanini MO, Mac F, Kontos CD. A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function , pathogenic role and therapeutic use. 2010;14(3):528–52.
 180. Maynard SE, Min J, Merchan J, Lim K, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction , hypertension , and proteinuria in preeclampsia. 2003;111(5):649–58.
 181. Koga K, Ph D, Osuga Y, Ph D, Tajima T, Hirota Y. Elevated serum soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) level in women with hydatidiform mole. *Fertil Steril* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;94(1):305–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.02.015>
 182. Nevo O, Soleymanlou N, Wu Y, Xu J, Kingdom J, Many A, et al. Increased expression of sFlt-1 in in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1. 2018;1085–93.
 183. Maynard SE, Sukhatme VP, Ananth S, Invest JC, Maynard SE, Min J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction , hypertension , and proteinuria in preeclampsia Find the latest version : and proteinuria in preeclampsia. 2003;1.
 184. Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res*. 2004;95(9):884–91.
 185. Hospital PA, Road C. Influence of Hypoxia on Vascular Endothelial G r o w t h Factor and Chorionic G o n a d o t r o p h i n Production in the Trophoblast-derived Cell Lines " JEG , JAr and BeWo. 1997;451–8.
 186. Trollmann R, Amann K, Schoof E, Beinder E, Wenzel D, Rascher W. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo : Up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia. :517–23.
 187. Li H, Gu B, Zhang Y, Lewis DF, Wang Y. Hypoxia-induced Increase in Soluble Flt-1 Production Correlates with Enhanced Oxidative Stress in Trophoblast Cells

- from the Human Placenta *. 2005;210–7.
188. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1 / Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. 2006;1:225–30.
 189. Paternoster DM, Fantinato S, Stella A, Nanhornguè KN, Milani M, Plebani M, et al. C-Reactive Protein in Hypertensive Disorders in Pregnancy. :330–7.
 190. Tjoa ML, Van Vugt JMG, Go ATJJ, Blankenstein MA, Oudejans CBM, Van Wijk IJ. Elevated C-reactive protein levels during first trimester of pregnancy are indicative of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2003;59:29–37. Available from: www.elsevier.com/locate/jreprimm
 191. Hwang HS, Kwon JY, Kim MA, Park YW, Kim YH. Maternal serum highly sensitive C-reactive protein in normal pregnancy and pre-eclampsia. 2007;105–9.
 192. Hurlt N, Box PO. Evaluation of C-reactive protein and haptoglobin an area of high transmission in Africa as malaria episode markers in. 1994;182–6.
 193. Hurt N, Smith T, Teuscher T, Tanner M. Do High Levels of C-Reactive Protein in Tanzanian Children Indicate Malaria Morbidity ? 1994;1(4):437–44.
 194. Lima-junior JC, Rodrigues-da-silva RN, Pereira VA, Storer FL, Perce-da-silva DDS, Fabrino DL, et al. Cells and mediators of inflammation (C-reactive protein , nitric oxide , platelets and neutrophils) in the acute and convalescent phases of uncomplicated *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection. 2012;107(December):1035–41.
 195. Abrams ET, Kwiek JJ, Mwapasa V, Kamwendo DD, Tadesse E, Lema VM, et al. Malaria during pregnancy and foetal haematological status in Blantyre, Malawi. *Malar J*. 2005;4:1–8.
 196. Gambino YP, Maymó JL, Pérez AP, Calvo JC, Sánchez-margalet V, Varone CL. Elsevier Trophoblast Research Award Lecture : Molecular mechanisms underlying estrogen functions in trophoblastic cells À Focus on leptin expression. *Placenta* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;33:S63–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2011.12.001>
 197. Forhead AJ, Fowden AL. The hungry fetus ? Role of leptin as a nutritional signal before birth. 2009;6:1145–52.
 198. Henson MC, Castracane VD. Minireview Leptin in Pregnancy : An Update 1. 2006;229(August 2005):218–29.
 199. Sezen D, Ko L, Nese Z. Maternal serum, amniotic fluid and cord leptin levels at term : their correlations with fetal weight " r O. 2004;32:266–71.
 200. Bajoria R, Sooranna SR, Ward BS, Chatterjee R. Prospective Function of Placental Leptin at Maternal – Fetal Interface. 2002;103–15.
 201. Elsheikh H, Adam I, Elhassan EM, Mohammed AA, Khamis AH, Elbashir MI. Leptin, insulin like growth factor-I levels and histology-diagnosed placental malaria in an area characterized by unstable malaria transmission in central

Sudan. F1000Research. 2017;