



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Larissa Rodrigues Gomes

**Estudo da resposta imune anti glicosilfosfatidilinositol de *P.falciparum*,  
comparada àquela frente a outros antígenos de fase sanguínea de *P.  
falciparum* e *P. vivax*, como indicadora de exposição prévia à infecção e  
imunidade clínica anti malária**

Rio de Janeiro

2012

Larissa Rodrigues Gomes

**Estudo da resposta imune anti glicosilfosfatidilinositol de *P.falciparum*, comparada àquela frente a outros antígenos de fase sanguínea de *P. Falciparum* e *P. vivax*, como indicadora de exposição prévia à infecção e imunidade clínica anti malárica**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

G633 Gomes, Larissa Rodrigues.

Estudo da resposta imune anti glicosilfosfatidilinositol de *P. falciparum*, comparada àquela frente a outros antígenos de fase sanguínea de *P. falciparum* e *P. vivax*, como indicadora de exposição prévia à infecção e imunidade clínica antimalárica / Larissa Rodrigues Gomes. – 2012.

88 f.

Orientador: Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. [Malária - Teses. 2. Resposta imune - Teses. 3. Plasmodium falciparum. 4. Plasmodium vivax. 5. Antimaláricos. I. Ribeiro, Claudio Tadeu Daniel. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.936

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Larissa Rodrigues Gomes

**Estudo da resposta imune anti glicosilfosfatidilinositol de *P. falciparum*,  
comparada àquela frente a outros antígenos de fase sanguínea de *P. Falciparum* e *P.  
vivax*, como indicadora de exposição prévia à infecção e imunidade clínica anti malária**

Dissertação apresentada, como requisito para  
obtenção do Título de Mestre, ao Programa de Pós-  
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas na  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de junho de 2012.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro  
Instituto Oswaldo Cruz

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Alda Maria da Cruz  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Martha Cecília Suárez Mutis  
Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2012

Dedico este trabalho incondicionalmente ao meu pai, Aliomar Carvalho Gomes, que me incentivou e me provou que inclusive nos momentos mais difíceis somos capazes de prosseguir e alcançar nossos sonhos com bravura. Amigo, companheiro e um grande lutador  
.....estaremos eternamente unidos, te amo!!!

À minha mãe, Ângela, obrigada por se manter firme comigo nessa conquista. Obrigada, também por todas as palavras de incentivo, esse prêmio é nosso! Te amo!!!

Ao meu marido, Raphael, por ter surgido na minha vida e tornado os meus dias mais especiais. Obrigada por demonstrar da maneira mais simples o quanto vale a pena amar alguém, te amo todos os dias, todas as horas, todos os minutos, todos os segundos.....para sempre

## AGRADECIMENTOS

Toda lista de agradecimentos eventualmente peca pela ausência de uma ou outra pessoa que teve papel, ainda que pequeno, na conclusão de um trabalho como este. Mesmo assim, arrisco-me a relacionar os nomes de alguns que participaram dessa jornada comigo, ou antes dela forneceram-me os meios para a travessia.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Dr. Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro por ter me recebido tão gentilmente no Curso de Imunologia do IOC e em seguida em seu laboratório. Agradeço de coração por todos os ensinamentos, dicas e críticas que, inegavelmente, contribuíram para que esse trabalho fosse concluído. Por fim, sou grata por ter me aceito como sua aluna e por esta oportunidade profissional.

Não poderia deixar de registrar aqui os meus mais sinceros agradecimentos à Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz por todo carinho, amizade e palavras de incentivo nessa reta final. Obrigada pelos conselhos, pelas críticas e sugestões.

À Dra Martha Mutis, obrigada por me apresentar o mundo da malária! Minha amiga, obrigada por ter me dado à oportunidade de conviver com você durante esses anos. Você mora no meu coração!

Ao mais novo Doutor do laboratório Paulo Totino, amigo querido! Obrigada pela força! Essa conquista é nossa!!!

Às Dras e irmãs Lilian e Evelyn, muito obrigada por tudo que vocês fizeram por mim e pelo meu pai nesses últimos tempos!

Ao Diretor Nacional do Programa de Malária em Angola, Dr Filomeno Fortes, por disponibilizar as amostras de Lubango para que esse trabalho fosse realizado.

Às Dras Silvia di Santi e Maria Carmem Arroyo, obrigada por me receberem com tanto carinho no Instituto de Medicina Tropical e contribuírem para que esse trabalho ficasse mais bonito! A semana foi intensa e recheada de emoções, aguentei firme graças a vocês, mas valeu à pena!

Aos membros da banca Dras. Alda Cruz, Maria de Fátima Ferreira da Cruz e Martha Suárez, obrigada por aceitarem o convite. Será muito valiosa a contribuição de vocês.

À minha querida amiga angolana Elsa, obrigada pelas longas conversas!!! Agradeço também pela coleta das amostras de Lubango.

Ao amigo Césare, obrigada pela amizade e por toda a ajuda para a realização desse trabalho.

A minha querida Claudinha, secretária do laboratório e amiga de todas as horas. Sou muito grata pela sua amizade!

Ao Dr. Leonardo pelas críticas e sugestões.

Ao Dauto, obrigada pelas palavras de conforto!

Às meninas do LabMal, Fabi, Cris, Ane, Juliana, Natália, Bia, amo vocês!!! Obrigada por esta convivência harmoniosa e também pelo carinho e a amizade!

Ao Dr Paulo, amigo, conselheiro e médico, que viveu intensamente comigo esse dia tão esperado! Obrigada por cuidar com tanto carinho da minha família!!!

À Dra. Cristiana pela amizade, carinho e por todos os momentos *gourmet*.

A mais nova integrante do LabMal, Janaiara aluna de mestrado, desejo muita sorte na vida científica.

Quando você conseguir superar problemas graves  
não se detenha na lembrança dos momentos difíceis,  
mas na alegria de haver atravessado mais essa prova em sua vida...

Leve na sua memória, para o resto da vida,  
as coisas boas que surgiram nas dificuldades.  
Elas serão uma prova de sua capacidade e lhe darão confiança diante de qualquer obstáculo...

Há dois tipos de sabedoria: a inferior e a superior.  
A sabedoria inferior é dada pelo quanto uma pessoa sabe e a superior é dada pelo quanto ela  
tem consciência de que não sabe.  
Tenha a sabedoria superior. Seja um eterno aprendiz na escola da vida.

Tem coisas que o coração só fala para quem sabe escutar!

*Chico Xavier*

## RESUMO

GOMES, Larissa Rodrigues. **Estudo da resposta imune anti glicosilfosfatidilinositol de *P. falciparum*, comparada àquela frente a outros antígenos de fase sanguínea de *P. falciparum* e *P. vivax*, como indicadora de exposição prévia à infecção e imunidade clínica anti malárica.** 2012. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A malária, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, permanece como uma das endemias de maior prevalência em todo o mundo. Durante a ruptura dos eritrócitos infectados e liberação de merozoítos na circulação sanguínea, ocorrem os sinais e sintomas reveladores da patogenia da doença devido a liberação de toxinas pelo parasito e a consequente ativação de macrófagos e produção de citocinas pro-inflamatórias (TNF alfa, IL-1, etc) pelo hospedeiro. Uma das principais toxinas parasitárias é um fosfolípido, a glicosilfosfatidilinositol (GPI), que permite a ancoragem de proteínas plasmodiais responsáveis pela invasão do parasito no eritrócito. As manifestações clínicas resultantes dessa produção excessiva de mediadores inflamatórios em resposta a toxinas como a GPI, podem se acompanhar de efeitos sistêmicos graves (como a anemia, a malária cerebral e o acometimento de vários órgãos e sistemas). Em áreas de alta transmissão de malária, como as da África, o desenvolvimento de imunidade clínica costuma ser gradual e aumentar com a idade e com a conseguinte exposição a antígenos plasmodiais. A aquisição de tal imunidade se acompanha de, e é refletida pela produção de anticorpos específicos da GPI (imunidade anti-antitoxina). No Brasil, a infecção assintomática por *P. vivax* e *P. falciparum* tem sido observada por diversos autores. O presente trabalho teve como objetivo avaliar se a aquisição desta imunidade clínica pode estar relacionada à produção de anticorpos contra a GPI, em indivíduos de populações autóctones de área de elevado risco de transmissão na Amazônia brasileira. Pesquisamos a frequência e a reatividade de anticorpos dirigidos contra a GPI, antígeno total e proteína 3 da superfície de merozoíto 3 (MSP3) do *P. falciparum* e contra a MSP1-19 do *P. vivax*, em indivíduos assintomáticos e portadores de infecção plasmodial, detectada por PCR, e em controles da mesma área (sem infecção nem história pregressa declarada da doença) e, comparativamente, em pacientes de Lubango com malária. Embora, a resposta anti-GPI não tenha sido maior nos indivíduos assintomáticos infectados de Barcelos do que nos controles da região, a resposta aumentava progressivamente com a idade nos assintomáticos, enquanto que uma correlação entre a resposta e a parasitemia foi observada somente nos pacientes de Lubango. A resposta contra outros antígenos parasitários foi maior nos indivíduos assintomáticos (expostos cronicamente à infecção) do que nos pacientes com malária clínica de Lubango (teoricamente, desprotegidos sob o ponto de vista imunológico) somente para os antígenos total de *P. falciparum* e MSP1-19 de *P. vivax*. Já na MSP3 essa resposta foi semelhante nos três grupos. Conclui-se que a resposta anti-GPI não parece ser um bom indicador de exposição crônica a material parasitário, nem, tampouco, refletir a imunidade clínica que, justificaria a inexistência de sintomas dos indivíduos de Barcelos. Por outro lado, a MSP1-19 de *P. vivax* poderia ser considerada um bom antígeno para refletir exposição prévia ao plasmódio, sobretudo em uma região onde esta espécie é responsável por 80% dos casos registrados. Mais estudos com um maior número de indivíduos devidamente caracterizados como portadores assintomáticos de plasmódios e controles de área nunca expostos podem fazer avançar o conhecimento nessa área.

Palavras-chave: Malária. *P. falciparum*. *P. vivax*. GPI. Infecção assintomática.

## ABSTRACT

GOMES, Larissa Rodrigues. **Study of the anti-glycosylphosphatidylinositol immune response of *P. falciparum*, compared to other blood phase antigens *P. falciparum* and *P. vivax*, as an indicator of pre-exposure to infection and antimalarial clinical immunity.** 2012. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Malaria, caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, remains one of the most prevalent endemic diseases worldwide, especially in Africa. During the rupture of infected erythrocytes the release of merozoites in the circulation, signs and symptoms revealing the pathogenesis of the disease occur following the release of toxins by the parasite and the resulting macrophage activation with subsequent induction of pro-inflammatory cytokines (TNF alpha, IL-1, etc.). One of the most important toxins involved is a phospholipid, glycosylphosphatidylinositol (GPI), which allows the anchoring of several plasmodial proteins responsible for invasion of the parasite in the erythrocyte. The clinical manifestations resulting from the excessive production of these mediators in response to toxins like GPI can accompany severe systemic effects (such as anemia, cerebral malaria and involvement of various organs and systems). In areas of high malaria transmission, as those of Africa, the development of clinical immunity (premunition) - that results in the decrease of the symptoms and of the severity of disease, but cannot clear the parasitemia or prevent reinfection - is usually gradual and increase with age and exposure to plasmodial antigens. In Brazil, several authors have observed the asymptomatic infection by *P. vivax* or *P. falciparum*. This study aimed to assess whether the acquisition of clinical immunity could be associated to the production of anti-GPI antibodies in autochthonous individuals from areas of high risk of transmission in the Brazilian Amazon. We investigated the frequency and reactivity of antibodies directed against GPI, the total antigen and the merozoite surface protein3 (MSP3) of *P. falciparum*, as well as to the MSP1-19 of *P. vivax*, in asymptomatic carriers of plasmodial infection, detected by PCR, and controls from the same area (with no infection or history of disease) comparatively to patients from Lubango with acute malaria. Although the anti-GPI response was not higher in infected asymptomatic individuals, as compared to controls from the same region, the response seemed to increase progressively with age in the asymptomatic subjects, whereas a correlation between response and parasitemia was observed only in malarious patients from Lubango. The response against other parasitic antigens was higher in the asymptomatic individuals (chronically exposed to infection) than in Lubango patients (theoretically unprotected from an immunological point of view) with clinical disease only for the total antigen of *P. falciparum* and the MSP1-19 of *P. vivax*. For the MSP3 this response was similar in all groups. It is concluded that the anti-GPI immune response does not appear to be a good marker of chronic exposure to parasite material or to reflect the clinical immunity that would justify the absence of symptoms among the individuals from Barcelos. On the other hand, the MSP1-19 *P. vivax* could be considered as a good antigen to reflect previous exposure to *Plasmodium*, mainly in a region where this species is responsible for 80% of reported cases. Additional studies with higher number of individuals, duly characterized as asymptomatic carriers and area controls never exposed to infection, can enhance the knowledge in this theme.

Keywords: Malaria. *P. falciparum*. *P. vivax*, GPI. Assymptomatic infection.

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>1</b>	<b>ALGUNS ASPECTOS RELEVANTES DA EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA E BIOLOGIA DO <i>Plasmodium</i>.....</b>	<b>13</b>
1.1	<b>Distribuição e a epidemiologia da malária.....</b>	<b>13</b>
1.2	<b>Ciclo biológico do Plasmodium.....</b>	<b>16</b>
1.3	<b>Imunidade e a malária.....</b>	<b>19</b>
1.4	<b>Âncoras de GPI como alvos da resposta imune contra o <i>Plasmodium</i> e proteção contra a patogênese da malária.....</b>	<b>22</b>
1.5	<b>Proteína 3 da superfície do merozoito (MSP3) do <i>P. falciparum</i>.....</b>	<b>23</b>
1.6	<b>Proteína 1 de superfície do merozoito (MSP1) do <i>P. vivax</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>27</b>
2.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL &amp; MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1	<b>Descrição das áreas estudadas.....</b>	<b>28</b>
3.2	<b>Desenho epidemiológico.....</b>	<b>30</b>
3.3	<b>Coleta das amostras.....</b>	<b>30</b>
3.4	<b>Diagnóstico.....</b>	<b>32</b>
3.5	<b>Aspectos éticos.....</b>	<b>36</b>
3.6	<b>Critérios de exclusão.....</b>	<b>37</b>
3.7	<b>Desenho experimental.....</b>	<b>37</b>
3.8	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1	<b>A composição e o histórico das populações.....</b>	<b>47</b>
4.2	<b>Avaliação do perfil da resposta anticorpo anti-GPI, antígeno total e MSP# do <i>P.falciparum</i> e MSP1<sub>19</sub> do <i>P. vivax</i>.....</b>	<b>49</b>
4.3	<b>Anticorpos contra GPI, em relação ao gênero, idade, parasitemia, sintomas e episódios prévios de malária.....</b>	<b>51</b>
4.4	<b>Anticorpos contra antígeno total de <i>P. falciparum</i>.....</b>	<b>54</b>
4.5	<b>Anticorpos contra o antígeno total do <i>P.falciparum</i>, em relação ao gênero, idade, parasitemia, sintomas e episódios prévios relatados de malária.....</b>	<b>56</b>

4.6	<b>Anticorpos contra MSP3 do <i>P.falciparum</i>.....</b>	60
4.7	<b>Anticorpos contra MSP3 do <i>P. falciparum</i>, em relação ao gênero, idade, parasitemia, sintomas, episódios prévios relatados de malária.....</b>	62
4.8	<b>Anticorpos contra MSP1<sub>19</sub> do <i>P. vivax</i>.....</b>	66
4.9	<b>Anticorpos contra MSP!-19 do <i>P.vivax</i>, em relação ao gênero, idade e número de episódios prévios relatados de malária.....</b>	68
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	70
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	78
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	79

## INTRODUÇÃO

A malária permanece como uma das endemias de maior prevalência no mundo, ocasionado cerca de 216 milhões de casos com aproximadamente 665 mil mortes por ano, sobretudo na África (WHO, 2011). Dentre as cinco espécies capazes de infectar o homem, (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. knowlesi*) o *P. falciparum* é responsável pelas formas graves da doença podendo, em alguns casos, levar à morte.

Os sinais e sintomas clínicos da doença ocorrem na fase sanguínea da infecção, no momento do rompimento de eritrócitos infectados, o que justifica o paroxismo febril da doença, que classicamente se acompanha de calafrios, cefaléia e sudorese intensa.

Durante o ciclo eritrocítico, o rompimento de esquizontes libera na circulação, tanto merozoítos no sangue circulante, quanto toxinas responsáveis pela indução de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF $\alpha$  e a IL1, envolvidas na patogenia da doença. Uma das principais toxinas envolvidas na indução desses mediadores inflamatórios é a glicosilfosfatidilinositol (GPI). Presente em vários protozoários a GPI é um fosfolípídeo que permite a ancoragem de proteínas plasmodiais responsáveis pela invasão do parasito no eritrócito (Haldar *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 1993; Naik *et al.*, 2000). Mas, as manifestações clínicas decorrentes da produção em excesso de citocinas, em resposta a toxinas como a GPI, resultam em efeitos sistêmicos maléficos como a febre e a síndrome toxêmica, incluindo algumas complicações como a anemia grave e a malária cerebral (Schofield *et al.*, 1993; Van Amersfoort *et al.*, 2003; Malaguarnera & Musumeci, 2002; Torre *et al.*, 2002).

Classicamente, sabe-se que em áreas de intensa transmissão de malária, como no caso da África Subsaariana, a aquisição de imunidade protetora se desenvolve naturalmente após a exposição contínua ao parasito.

Há evidências, nessas áreas, de que existam dois estágios de desenvolvimento da imunidade na malária: a imunidade clínica e a imunidade antiparasitária; nessa ordem. A imunidade clínica desenvolve-se lentamente durante a infância e a adolescência. O desenvolvimento de imunidade antiparasitária ocorre mais tardiamente e observa-se uma redução da densidade de parasitos até que, muitas vezes, a parasitemia chega a estar abaixo do limiar de detecção da gota espessa (Trape *et al.*, 1994, Smith *et al.*, 1999a, 1999b.).

Apesar do entendimento tradicional de que a premunição necessitaria de muitos anos de desafios repetidos para se estabelecer, observações posteriores indicaram que indivíduos adultos podem adquirir imunidade mais rapidamente do que crianças (Baird *et al.*, 1995),

informação relevante para importante parcela de migrantes que passam a viver na idade adulta em áreas endêmicas inclusive, da Amazônia brasileira.

Porém, nas áreas endêmicas de malária no Brasil, a imunidade parece ser de mais difícil aquisição em função da relativamente baixa exposição ao parasito em várias regiões. Na verdade pouco se sabe sobre a importância e os mecanismos de imunoproteção em populações de baixa transmissão, e ainda são pouco conhecidas às bases da indução de imunidade natural em indivíduos expostos cronicamente à infecção somente após a idade adulta (Schofield & Grau, 2005; Clark *et al.*, 2006; Riley *et al.*, 2006).

Recentemente, evidências da existência de premunicação no Brasil vieram com a demonstração, por diversos autores, de infecção assintomática por *P. falciparum* e *P. vivax*, na Amazônia brasileira (Fontes, 2001; Alves *et al.*, 2002; Suarez-Mutis, 2007).

Como não se conhece a prevalência de anticorpos anti-GPI nos indivíduos de áreas endêmicas da Amazônia brasileira assim como sua importância no desenvolvimento na imunidade clínica nesses pacientes, e considerando que estudos realizados em áreas malarígenas hiperendêmicas sugerem que indivíduos assintomáticos ou paucissintomáticos desenvolvem resposta anticorpo anti-GPI em níveis mais altos do que indivíduos que apresentam a doença, este trabalho visou avaliar se a infecção assintomática na Amazônia brasileira está relacionada à presença de anticorpos contra a GPI do *P. falciparum*.

## 1. ALGUNS ASPECTOS RELEVANTES DA EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA E BIOLOGIA DO *Plasmodium*

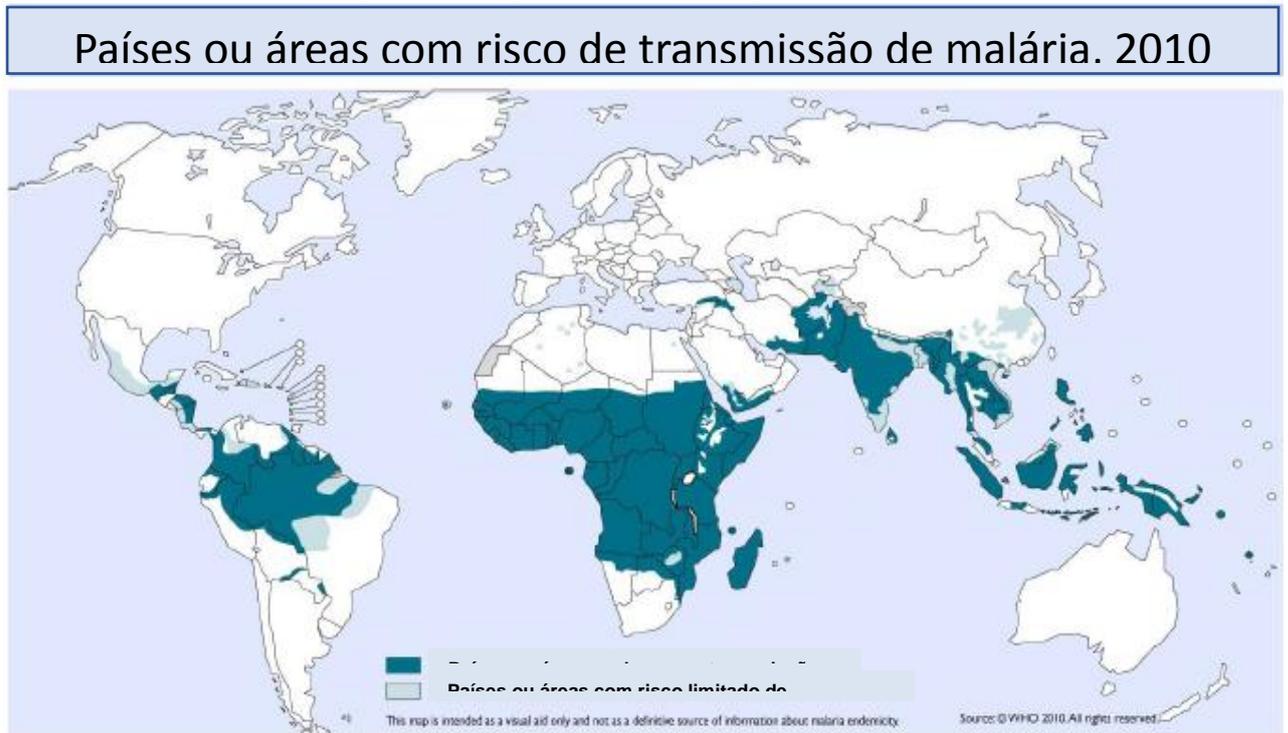
### 1.1. Distribuição e a epidemiologia da malária

#### *Malária no mundo*

A malária ainda permanece como uma das endemias de maior prevalência no mundo, sobretudo na África (Neghina *et al.*, 2010; Garcia, 2010). Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2011, foram registrados cerca de 216 milhões de novos casos, com aproximadamente 665 mil mortes – principalmente em crianças abaixo de cinco anos de idade e mulheres grávidas (WHO, 2011). No ano de 2011, estimou-se que a doença estava presente em 99 países, sendo a maioria deles localizados nas regiões tropicais e subtropicais do globo. Atualmente, 3,3 bilhões de pessoas correm o risco de se infectar pela malária, o que equivale a aproximadamente 47% da população mundial (Figura 1) (WHO, 2011).

Nas Américas a transmissão da doença ocorre em 21 países e o *P. vivax* é o mais prevalente e responsável por 80% dos casos registrados, seguido do *P. falciparum*. Devido ao sucesso nas estratégias de controle, o número de casos neste continente reduziu em aproximadamente 43% em nove anos, passando de 1,18 milhões de casos registrados em 2000 para aproximadamente 530 mil em 2011. Foi observado que 11 dos 21 países tiveram redução superior a 50%, enquanto que em três países, incluindo o Brasil, houve uma redução entre 25% a 50% no número total de casos de malária. Apesar dos resultados promissores, o Brasil ainda é responsável por mais de 60% do total de casos nas Américas (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010; WHO, 2011).

Figura 1 - Distribuição Mundial da Malária



Fonte: WHO, 2011.

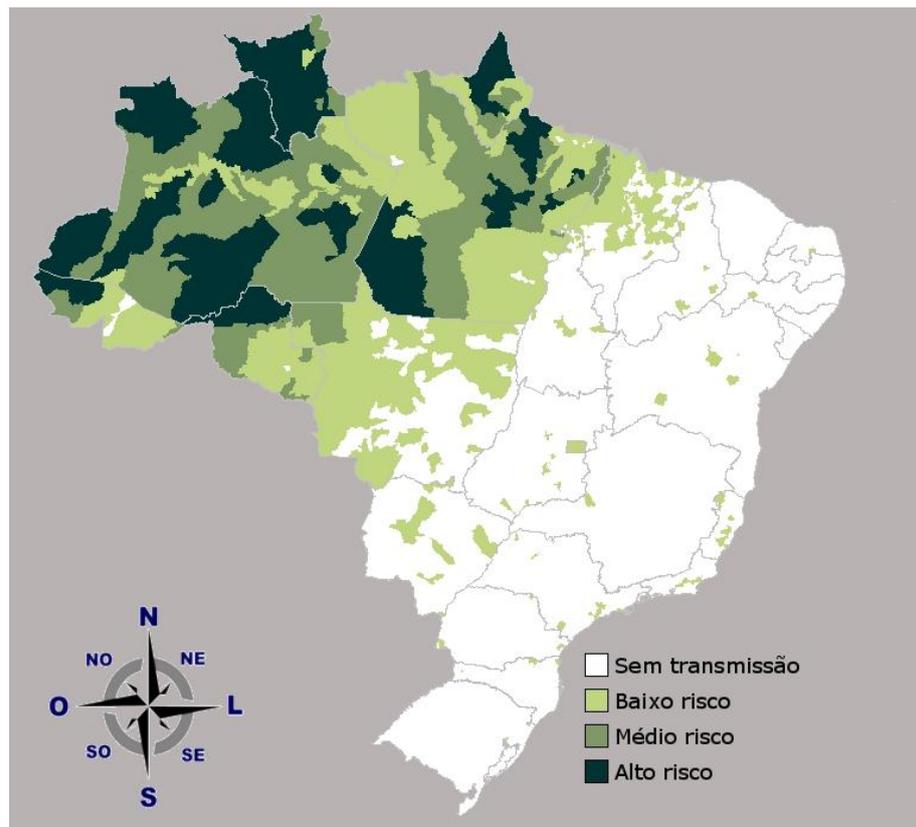
### *Malária no Brasil*

Mais de 99% dos casos de malária no Brasil são registrados na região Amazônica, denominada Amazônia Legal. Contudo, avanços significativos nos principais indicadores de controle da doença foram obtidos entre 2005 e 2011, reduzindo o número de casos pela metade, passando de 607.801 para aproximadamente 263 mil, sendo os estados do Pará, Amazonas e Rondônia detentores dos principais números de casos (SVS, 2011). O *P. vivax* é a espécie mais prevalente com 83,4% dos casos registrados seguida por *P. falciparum* com 16,3% e *P. malariae* que é mais infreqüentemente diagnosticado. Conforme a estratificação epidemiológica de risco estabelecida pela OMS, atualmente o padrão de endemicidade no Brasil é heterogêneo predominando áreas de alto risco (Índice Parasitário Anual - IPA > 50<sup>1</sup>) em cinco dos nove estados da Amazônia Legal (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia) (Figura

<sup>1</sup> Incidência Parasitária Anual (IPA): baixo risco – 0,1 à 9; médio risco – 10 à 49 e; alto risco – 50 à 593 / 1.000 habitantes.

2). Além da heterogeneidade, a transmissão em áreas endêmicas brasileiras é considerada instável com flutuações sazonais anuais. Nessas áreas tendem a ocorrer surtos epidêmicos que afetam adultos e crianças, podendo ser potencialmente grave quando a epidemia é causada por *P. falciparum*.

Figura 2 - Áreas de transmissão de malária no Brasil de acordo com o Índice Parasitário Anual (IPA) no ano de 2010. Fonte: SVS, dados não publicados



Além disso, a infecção assintomática por *P. falciparum* e *P. vivax* vem sendo identificada em estudos epidemiológicos na região Amazônica, o que indica a probabilidade de presença de imunidade clínica tanto em casos autóctones quanto em populações migrantes (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010; Daniel-Ribeiro *et al.*, 2008).

## 1.2. Ciclo biológico do *Plasmodium*

O ciclo evolutivo do parasito está dividido em duas fases bem distintas: uma no hospedeiro vertebrado, esquizogônico ou assexuado, e outra, o esporogônico ou sexuado, na fêmea dos anofelinos (Rey, 2007; Hafalla *et al.*, 2011).

Existem cinco espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* capazes de infectar o homem e causar a malária: *Plasmodium ovale*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum* e, conforme demonstrado mais recentemente, *P. knowlesi* (Somchai *et al.*, 2004; Vythilingam *et al.*, 2006; Cox-Singh *et al.*, 2008; Sabbatani *et al.*, 2010) um plasmódio até então conhecido como causador da malária unicamente em símios. Dentre esses, o *P. falciparum* é a principal espécie responsável pelas formas graves e letais da doença (Rowe *et al.*, 2009; Arévalo-Herrera *et al.*, 2010; Quintero *et al.*, 2011).

No homem o ciclo inicia-se através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles* (Figura 3) que ao realizar seu repasto sanguíneo inocula geralmente na derme as formas infectantes, os esporozoítos (Figura 4). Raramente os esporozoítos são inoculados diretamente na circulação sanguínea; eles são injetados no tecido subcutâneo ao redor da picada, podendo ficar por alguns minutos ou horas nesse local, ou migrar diretamente para um capilar sanguíneo ou mesmo para um linfonodo, seguindo depois para o fígado no qual invadem os hepatócitos. Além disso, os esporozoítos que seguem pelos vasos linfáticos atingem os linfonodos e podem desenvolver-se em formas exoeritrocíticas (no modelo experimental murino) gerando merozoítos infectantes, sendo liberados através de merossomos, como tipicamente observada no fígado (Miller *et al.*, 2002; Crompton *et al.*, 2010; Garcia, 2010).

Figura 3 - *Anopheles darlingi*: principal vetor da malária no Brasil. Fonte: Dr. Marcelo de Campos Pereira, Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia



Fonte: Disponível em: <http://www.icb.usp.br/~marcelcp/Default.htm>.

A invasão de um hepatócito depende de várias interações do tipo ligante-receptor. Este processo de interação ocorre por invaginação da membrana celular dando origem a um vacúolo, denominado parasitóforo que envolve o esporozoíto. Há evidências de que os esporozoítos passam por várias células hospedeiras antes de ingressar no hepatócito definitivo e dar prosseguimento ao ciclo biológico (Aly et al., 2009). Entretanto, para as espécies *P. vivax* e *P. ovale* os esporozoítos podem permanecer quiescentes nas células do fígado por um longo período de tempo, transformando-se em hipnozoítos.

No interior do vacúolo parasitóforo o esporozoíto se multiplica, dando origem à forma multinucleada denominada esquizonte evoluindo para os merozoítos que rompem os hepatócitos e são liberados na circulação sanguínea envolvidos por uma estrutura vesicular denominada merossomos. Tal estrutura tem como característica principal impedir o reconhecimento do parasito pelo sistema imune do hospedeiro (Sturm et al., 2006).

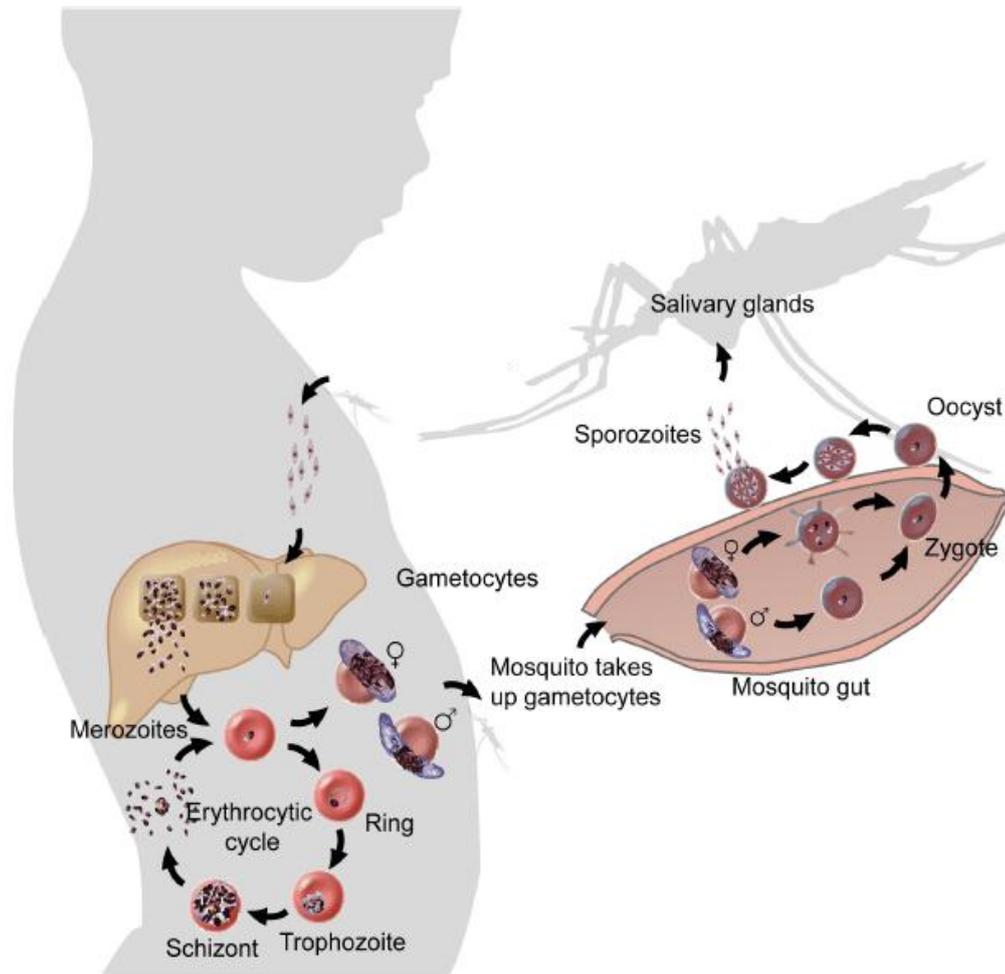
Após romperem a membrana dos merossomos muitos merozoítos serão fagocitados e destruídos pelas células de defesa, porém outros serão liberados na circulação e invadirão os eritrócitos sanguíneos dando início ao ciclo eritrocítico assexuado, marcando o paroxismo típico da doença. Nessa fase o merozoíto se transformará em trofozoíto jovem ou anel seguido por trofozoíto maduro evoluindo para esquizonte, de forma a originar novos merozoítos após um período de um a três dias dependendo da espécie parasitária (Malaguarnera & Musumeci,

2002; Clark et al., 2006; Garcia, 2010). Embora, muitos merozoítos sejam fagocitados pelas células de defesa do sistema imune, outros imediatamente invadem novos eritrócitos para reiniciar o ciclo sanguíneo. O momento da ruptura de esquizontes com a liberação de merozoítos e toxinas parasitárias (que induzem a ativação de macrófago e produção de citocinas inflamatórias) coincide com manifestações clínicas da doença, notadamente o paroxismo febril, caracterizado por febre, calafrio e sudorese intensa.

O processo de invasão de eritrócitos por merozoítos requer, como no caso da penetração dos hepatócitos por esporozoítos, a ligação entre receptores presentes nas membranas do parasito e do hospedeiro. No caso dos merozoítos, tal ligação permite a reorientação do complexo apical do parasito composto pelas roptrias e micronemas, estruturas necessárias para a invaginação na membrana celular do hospedeiro e a formação do vacúolo parasitóforo, local em que o parasito se replicará e se desenvolverá (Baumeister et al., 2010).

Alguns parasitos evoluem para as formas sexuadas, os gametócitos (macrogametócito, fêmea e microgametócito, macho), que circulam no sangue do hospedeiro humano, mas permanecem incapazes de se fertilizar até que sejam sugados pelo mosquito em cujo estômago irá acontecer a reprodução sexuada para formação de novos esporozoítos que são acumulados nas glândulas salivares do vetor prontos para produzir uma nova infecção (Baker et al., 2010).

Figura 4 - Ciclo evolutivo dos parasitos da malária (*P. falciparum*) nos hospedeiros vertebrado e invertebrado



Fonte: Dahlström, 2009.

### 1.3. Imunidade e a malária

Em áreas de alta transmissão de malária, como é o caso da África Subsaariana, crianças maiores de seis meses e menores de cinco anos de idade são as grandes vítimas das formas graves potencialmente letais. A imunidade passiva, recebida da mãe e durável pelos primeiros seis meses de vida, é seguida por um ou dois anos de aumento da suscetibilidade antes que a criança comece a adquirir uma imunidade ativa (Baird *et al.*, 1998; Perlmann & Troye-Blomberg, 2002). As complicações mais frequentes da malária nas crianças jovens são a anemia grave, a malária cerebral e a acidose metabólica, que leva a problemas respiratórios

graves, havendo elevada morbiletalidade pela doença nessa faixa etária (Garcia, 2010; WHO, 2011). Entre os cinco anos de idade e a puberdade, complicações letais são raramente observadas, mas os indivíduos continuam suscetíveis à doença, apresentando manifestações clínicas como febre, dores de cabeça, náuseas, etc. Na pós-puberdade e durante toda a idade adulta, os indivíduos podem apresentar parasitos no sangue em baixas densidades, sem qualquer tipo de manifestação clínica sendo este estado de imunidade adquirida denominada premunição (Baird et al., 1995; Druilhe & Perignon, 1997; Struik et al., 2004).

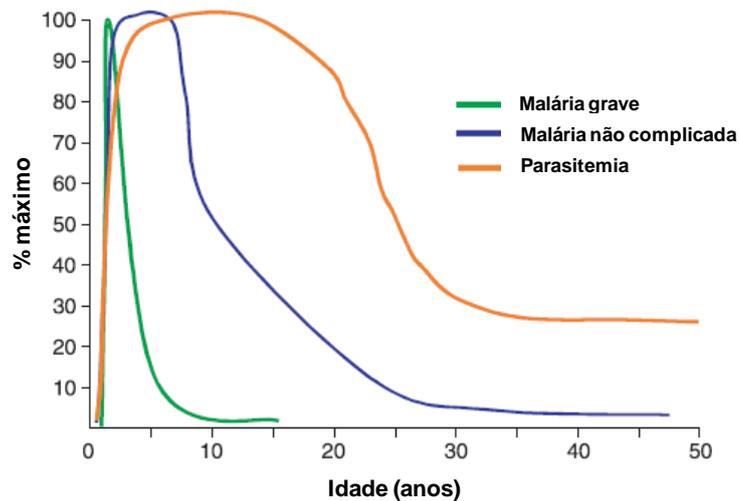
Porém, em áreas de baixa transmissão, como é o caso de grande parte das áreas endêmicas de malária no Brasil, imunidade desse tipo parece ser de mais difícil aquisição em função da baixa exposição ao parasito. Assim, mesmo os adultos podem desenvolver formas graves potencialmente letais, particularmente malária cerebral, edema pulmonar, problemas renais e choque (Schofield & Grau, 2005; Clark et al., 2006; Riley et al., 2006). Pouco se sabe sobre a importância e os mecanismos de imunoproteção em populações de baixa transmissão, além de serem pouco conhecidas às bases da indução de imunidade natural em indivíduos expostos cronicamente à infecção somente após a idade adulta. A dinâmica da transmissão e a idade da pessoa infectada são, portanto importantes determinantes da doença, além das características genéticas do hospedeiro, do parasito, e o tipo de resposta imunológica desencadeada (Schofield & Grau, 2005; Clark et al., 2006; Riley et al., 2006).

Há evidências de que existam dois estágios de desenvolvimento da imunidade adquirida: a imunidade clínica e a imunidade antiparasitária; nessa ordem. A imunidade clínica desenvolve-se lentamente durante a infância e a adolescência (Figura 5). O desenvolvimento de imunidade antiparasitária ocorre mais tardiamente e observa-se uma redução da densidade de parasitos até que muitas vezes chega a estar abaixo do limiar de detecção da gota espessa. No entanto, a esterilidade completa não é atingida, mesmo nas áreas holo e hiperendêmicas da África (Trape et al., 1994, Smith et al., 1999a, 1999b). Ainda hoje, temos uma compreensão incompleta de como opera o mecanismo de aquisição natural de imunidade à malária (Druilhe & Perignon 1997, Zambrano-Villa et al., 2002).

Apesar do entendimento tradicional de que a premunição necessitaria de muitos anos de desafios repetidos para se estabelecer, observações posteriores indicaram que indivíduos adultos podem adquirir imunidade mais rapidamente do que crianças (Baird et al., 1995), informação relevante para importante parcela de migrantes que passam a viver na idade adulta em áreas endêmicas, inclusive na Amazônia brasileira. De fato, Baird e colaboradores (1991 e 1993) estudaram populações nativas e migrantes de regiões hiperendêmicas, e demonstraram

que a imunidade naturalmente adquirida não estava necessariamente relacionada a anos de exposição contínua ao parasito.

Figura 5 - Esquema clássico da aquisição de imunidade clínica em regiões africanas hiperendêmicas de malária



Fonte: Marsh & Kinyanjui, 2006.

No caso de proteção contra a fase hepática, as respostas celulares envolvendo linfócitos CD4+ e principalmente CD8+ e células NK, tem sido demonstradas como essenciais na imunidade protetora induzida por esporozoítos irradiados (Nardin & Nussenzweig, 1993).

A produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-12 e mediadores como o óxido nítrico (ON), perforinas e granzimas também são fundamentais no desenvolvimento desse tipo de imunidade (Doolan & Hoffman, 2000).

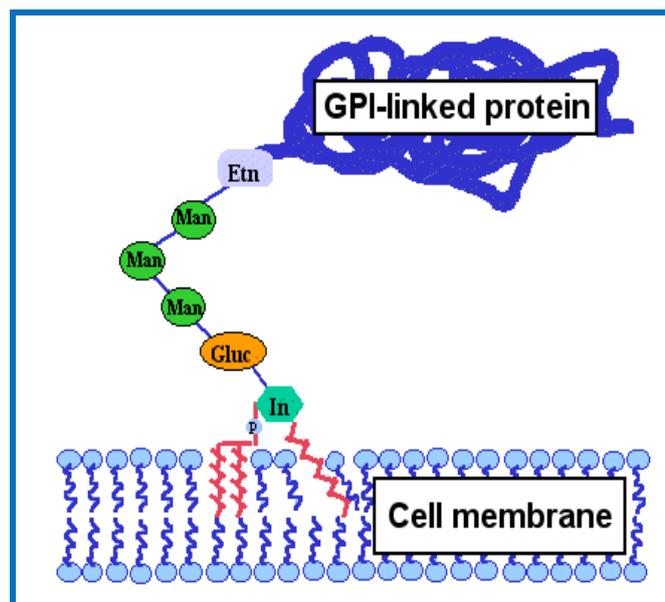
Na fase eritrocítica as manifestações patogênicas são decorrentes da liberação em excesso de citocinas e mediadores pró-inflamatórios secretados por células T e por macrófagos em resposta aos antígenos do parasito, tais como, glicosilfosfatidilinositol (GPI) e hemozoína (pigmento malárico) (Malaguarnera & Musumeci, 2002; Torre et al., 2002).

A imunidade adquirida parece ser espécie-específica, estágio-específico e mais efetiva se ocorre uma nova reinfecção com genótipos homólogos àqueles já experimentados (Snow & Marsh 1998, Rogier et al., 1999, Smith et al., 1999c, Kun et al., 2002), sendo capaz de controlar a doença assim como a densidade parasitária.

#### 1.4. Âncoras de GPI como alvos da resposta imune contra o *Plasmodium* e proteção contra a patogênese da malária

As estruturas conhecidas como âncoras de Glicosilfosfatidilinositol (GPI)(Figura 6) são toxinas parasitárias que parecem contribuir para os eventos imunopatogênicos responsáveis pela malária grave. As GPIs estão presentes em vários protozoários (como por exemplo, *Trypanosoma* e *Leishmania*) e são massivamente produzidas e ancoram proteínas do parasito na membrana citoplasmática, como o caso de proteínas plasmodiais (p. ex. MSP1, MSP2 e MSP4), que permitem a invasão do parasito no eritrócito (Naik et al., 2000).

Figura 6 - Representação esquemática da GPI



Fonte: [www.hmds.org.uk/pnh\\_review.html](http://www.hmds.org.uk/pnh_review.html)

Apesar de as funções biológicas da GPI serem pouco conhecidas, faz sentido pensar que a bioatividade desta toxina em estimular exacerbadamente a resposta imune, não obstante ser deletéria para o hospedeiro, possa desviar a resposta imune dos alvos parasitários. A GPI é um importante indutor de resposta pró-inflamatória e é reconhecida por moléculas envolvidas na resposta imune inata, incluindo os receptores Toll-Like (TLR)(Gowda *et al.*, 2007).

O efeito fisiopatogênico da GPI do parasito está associado à sua capacidade de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1, óxido nítrico (ON) e IFN- $\gamma$ , no

hospedeiro. Desse modo, é possível induzir febre em camundongos através da administração da GPI de *P. falciparum* (Schofield et al., 1993) e estudos in vivo e in vitro demonstraram que a indução de febre está associada à produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 por células mononucleares e que anticorpos monoclonais contra a GPI podem neutralizar a produção de TNF- $\alpha$ . As GPIs de *P. falciparum* também parecem regular a expressão de receptores de superfície de células endoteliais envolvidos na citoaderência de eritrócitos parasitados assim como induzir hipoglicemia, um dos eventos envolvidos na patogenia da malária grave.

Estudos realizados em áreas de elevada transmissão indicam que indivíduos com imunidade clínica (com parasitemia, mas com pouca ou nenhuma sintomatologia) apresentam anticorpos anti-GPI, e o grau de resposta anti-GPI parece estar relacionado ao de proteção contra as manifestações clínicas (febre, anemia) (Naik et al., 2000). Assim, compreende-se que anticorpos anti-GPI sejam apontados como um dos mediadores da imunidade clínica (“anti-doença”) e que vários estudos venham focando o papel protetor de tais anticorpos, considerando a hipótese de que eles possam neutralizar os efeitos tóxicos da GPI do parasito.

### 1.5. Proteína 3 da superfície do merozoíto (MSP3) do *P. falciparum*

A MSP3 de *P. falciparum* foi descrita independentemente pelas equipes de Pierre Druilhe, na França (Oeuvery et al., 1994) e de Robin Anders, na Austrália (Anders et al., 1993; McColl et al., 1994).

Oeuvery e colaboradores (1994) verificaram que soros de indivíduos de áreas endêmicas reconheciam preferencialmente um polipeptídeo de 48 kDa em immunoblot. O balanço entre imunoglobulinas (Igs) citofílicas/não citofílicas variava com o status imunológico: indivíduos imunes tinham predominância de IgG1 e IgG3 enquanto nos não imunes predominavam IgG2 e IgM. Em ensaios de ADCI (Inibição Celular Dependente de Anticorpo), o soro de indivíduos não imunes competia com o de imunes e revertia parcialmente o efeito ADCI da Ig imune. Uma vez que o antígeno reconhecido preferencialmente era o de 48 kDa, era possível que anticorpos contra esse polipeptídeo fossem importantes na imunidade contra à malária. Paralelamente, a partir de uma bateria de anticorpos monoclonais, foi identificado um único anticorpo capaz de reverter o efeito ADCI mediado por Ig imunes, sugerindo que esse anticorpo reconhecia e bloqueava um antígeno alvo importante na imunidade protetora. A partir de uma biblioteca de clones expressando

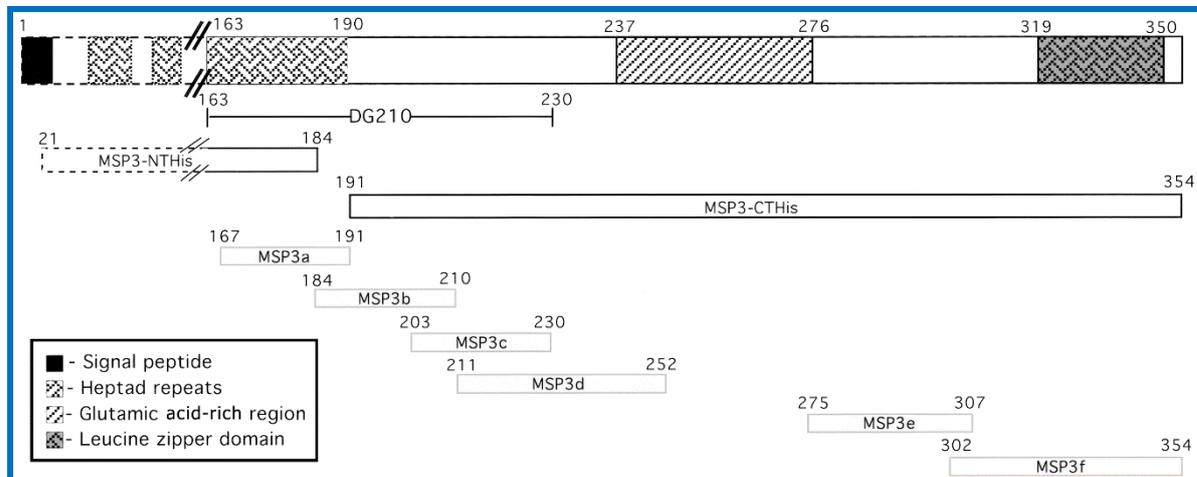
antígenos plasmodiais, identificou-se um (denominado DG210), que era reconhecido por este monoclonal. Ao se purificarem anticorpos de soros imunes africanos utilizando-se a proteína expressa por este clone, verificou-se que os anticorpos purificados reconheciam o mesmo polipeptídeo de 48 kDa em immunoblot. Demonstrou-se a seguir que anticorpos anti-DG210 de indivíduos imunes mediavam efeito ADCI e eram, na sua grande maioria, citofílicos nesses indivíduos. Através de imunofluorescência, immunoblot, extração com detergentes e imunomicroscopia eletrônica, demonstraram que o antígeno estava presente em merozoítos e esquizontes maduros, mas não em outros estágios do parasito. Tendo sido o terceiro antígeno identificado associado ao merozoíto, a nova proteína foi denominada Proteína-3 de Superfície do Merozoíto (Merozoite Surface Protein-3, MSP3). Três peptídeos derivados da proteína DG210 foram obtidos (MSP-3a, MSP-3b e MSP-3c) e verificou-se que o epítipo B imunodominante era MSP-3b.

Estudos independentes realizados pela equipe de Robin Anders (McColl et al., 1994) levaram à identificação de uma proteína denominada Antígeno Polimórfico Associado com o Merozoíto (Secreted Polymorphic Antigen Associated with the Merozoite, SPAM). Análises das sequências definiram a identidade entre SPAM e MSP3, tendo sido esta última denominação definitivamente adotada (McColl & Anders, 1997).

A MSP3 é sintetizada no estágio de esquizonte como um precursor de peso molecular variável entre diferentes isolados de *P. falciparum* (McColl et al., 1994) e então liberada no vacúolo parasitóforo no qual sofre processamento proteolítico. Alguns dos fragmentos parecem estar associados à superfície do merozoíto, mas a maioria é liberada (inclusive no sobrenadante de culturas in vitro) quando da ruptura do esquizonte.

A sequência completa de vários clones de *P. falciparum* foi descrita (McColl et al., 1997), e tem-se demonstrado que a MSP3 é altamente conservada entre isolados provenientes de diferentes regiões geográficas. A capacidade imunogênica da MSP3 já foi demonstrada por diferentes autores. Roussilhon e colaboradores (2007), mostraram que anticorpos anti-MSP3 estavam fortemente associados com a proteção clínica. Além disso, ensaios de ADCI mostraram que imunoglobulinas produzidas em resposta à MSP3 eram capazes de promover a morte ou inativação de *P. falciparum* com o auxílio de monócitos (Ouvray et al., 1994; Singh et al., 2004) (Figura 7).

Figura 7 - Representação esquemática da Proteína MSP-3 de *P. falciparum* e de construções derivadas (proteínas recombinantes e peptídeos)



Fonte: Singh *et al.*, 2004.

#### 1.6. Proteína 1 de superfície do merozoíto (MSP1) do *P. vivax*

A MSP-1 é um antígeno abundantemente expresso na superfície de merozoítos maduros de todas as espécies de *Plasmodium* já estudadas (Pizarro, *et al.*, 2003; Freeman & Holder, 1983) e tem sido descrita como uma importante molécula envolvida na invasão dos eritrócitos durante o ciclo eritrocítico (Holder *et al.*, 1992). Tal antígeno é sintetizado pelo esquizonte como uma grande molécula precursora de 190 kDa (Holder & Freeman, 1982) no final da esquizogonia e é proteoliticamente processada originando polipeptídeos de diferentes tamanhos em fragmentos de 83, 30, 38 e 42 kDa, denominados MSP-1<sub>83</sub>, MSP-1<sub>30</sub>, MSP-1<sub>38</sub> e MSP-1<sub>42</sub>, respectivamente (Holder *et al.*, 1992; Holder & Freeman, 1982).

Durante a invasão eritrocítica, apenas o polipeptídeo de 42 kDa é clivado dando origem a dois fragmentos: um de 33 kDa (MSP-133), que corresponde à região N-terminal da MSP-142 e outro de 19 kDa (MSP-119) que correspondente ao fragmento C-terminal, e participa no processo de invasão do eritrócito (Blackman *et al.*, 1990; Blackman *et al.*, 1991a; Blackman *et al.*, 1991b) (Figura 8).

A MSP-119 permanece ancorada à membrana do merozoíto via GPI e é direcionada para o interior do eritrócito (Blackman *et al.*, 1990; Holder *et al.*, 1992).

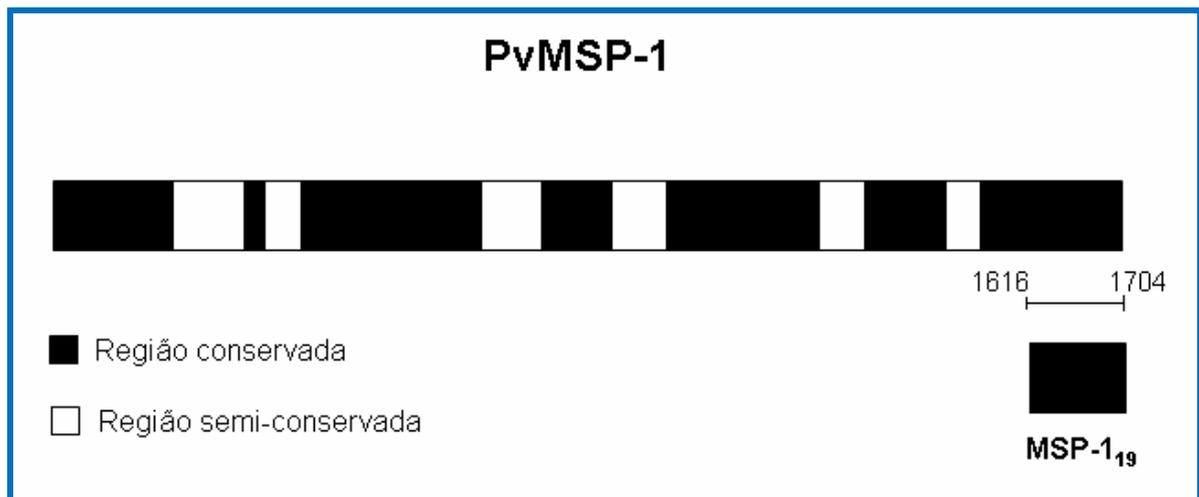
Estudos direcionados à resposta imune naturalmente adquirida contra a proteína MSP-119 de *P. vivax* somente se desenvolveram após a elucidação da estrutura primária do gene

que codifica esse antígeno (Del Portillo et al., 1991). Devido a isso, o potencial imunogênico desse antígeno tem sido estudado em diferentes experimentos, incluindo em roedores (Ling et al., 1994; Koning-Ward et al., 2007) e humanos (Malkin et al., 2007)

Dessa maneira, Soares e colaboradores (1997 e 1999), observaram que a proteína recombinante MSP1-19 de *P. vivax* (PvMSP1-19) mostrou ser altamente imunogênica em humanos durante as infecções naturais. Esse antígeno foi reconhecido por anticorpos e células T de uma grande fração de indivíduos brasileiros expostos ao *P. vivax* (Soares et al., 1997), dados posteriormente confirmados em estudos realizados na Coreia, onde mais de 90% dos indivíduos infectados pelo *P. vivax* apresentaram anticorpos direcionados à PvMSP1-19 (Park et al., 2001). Outro fato importante é que a sequência de DNA que codifica a PvMSP1-19 apresenta um limitado polimorfismo alélico em diferentes regiões do mundo (Pasay, 1995) e este gene também está conservado entre os isolados do parasito encontrados no Brasil (Soares et al., 1999).

Além disso, vários estudos tem relatado associações entre a presença de anticorpos anti-MSP1-19 e proteção contra a malária clínica (Branch et al., 1998; Braga et al., 2002; Doodoo et al., 2008; Stanisic et al., 2009). Soma-se a isso o fato deste fragmento ser conservado entre as espécies de Plasmodium filogeneticamente distantes, o que torna a MSP-119 um antígeno candidato interessante a compor uma vacina (O'Donnell et al., 2000).

Figura 8 - Representação esquemática da Proteína MSP-1 de *P. vivax*.



Fonte: Putaporntip *et al.*, 2000.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Pesquisar a presença e a relação de anticorpos anti-GPI com a imunidade clínica em indivíduos de Barcelos (Amazonas, BR) portadores de infecção assintomática por *P. falciparum* ou *P. vivax* e comparativamente em indivíduos controles da região sem infecção nem história prévia de malária, e pacientes de Lubango (Angola) com malária por *P. falciparum*.

### 2.2. Objetivos específicos

- a) Extrair e purificar a GPI do parasito a partir de cultivo *in vitro* com cepa FCR3 de *P. falciparum* ;
- b) analisar a frequência e a reatividade de anticorpos específicos anti-GPI detectáveis por ELISA nos soros ou plasmas dos indivíduos assintomáticos de Barcelos (Amazonas) e dos pacientes com malária de Lubango (Angola);
- c) analisar comparativamente a frequência e a reatividade de anticorpos específicos de diferentes antígenos (Ag) plasmodiais [Ag total e Proteína 3 de Superfície do Merozoíto (MSP3) de *P. falciparum*, e MSP1-19 de *P. vivax*] detectáveis por ELISA nos soros ou plasmas dos indivíduos assintomáticos de Barcelos (Amazonas) e dos pacientes de Lubango (Angola) com malária;
- d) correlacionar a presença de anticorpos anti-GPI, e comparativamente de outros anticorpos contra Ag plasmodiais de formas sanguíneas, com o grau provável de imunidade clínica, pressuposta pela ausência ou paucipacidade de sintomas e refletida por parâmetros clínicos e epidemiológicos, nos indivíduos assintomáticos e nos pacientes com malária.

### 3. MATERIAL & MÉTODOS

#### 3.1. Descrição das áreas estudadas

##### *Município de Barcelos – Amazonas*

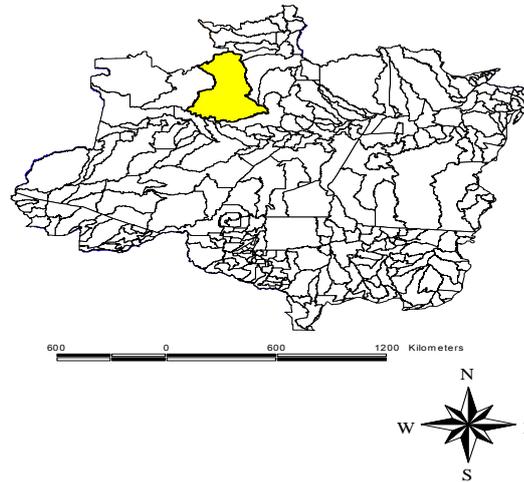
No município de Barcelos, vivem aproximadamente 26 mil pessoas, das quais cerca de 12 mil na área urbana (43,3% do total da população) e o restante na área rural (IBGE, 2011). Com uma área de 122.476 quilômetros quadrados, Barcelos é o segundo maior município do Brasil em extensão territorial, perdendo somente para o município de Altamira no Pará. A sede municipal situa-se na margem direita do rio Negro e dista 390 km da capital do estado do Amazonas (Manaus)(Figura 1). Barcelos situa-se a 0°58'11" latitude norte e 62°56' longitude oeste do estado do Amazonas, estando a uma altitude média de 40 metros sobre o nível do mar.

Esse município encontra-se numa área de floresta tropical úmida com temperaturas médias de 26°C, variando de 31 a 22°C. As médias pluviométricas são superiores a 2.600 milímetros e a área é caracterizada pela sazonalidade. As chuvas iniciam no mês de março e abril, sendo a enchente nos meses de julho a agosto. No mês de outubro, o rio Negro começa a descer, dando início à estação seca, que se estende até março do ano que se sucede. O período mais seco compreende os meses de janeiro, fevereiro e março, quando o calor é mais intenso e o nível das águas alcança sua cota mínima. No trecho de Barcelos, a diferença de nível das águas entre a cheia e a vazante é de 6 e 8 metros. Na horizontal, isso equivale a muitos quilômetros de zonas inundadas em cada margem, com uma variedade incrível de padrões de escoamento das águas, segundo a inclinação das ilhas ou planícies. A umidade relativa do ar mantém uma média anual de 89%, alterando-se no decurso do dia com as mudanças de temperatura e alcançando durante a noite uma saturação de quase 100% (Rojas & Toledo, 1998).

A região é considerada mesoendêmica de malária, tendo registrado, no ano de 2010, 3.247 casos da doença, o que corresponde a uma Incidência Parasitária Anual (IPA) de 126,3 casos por mil habitantes, dos quais 29% foram devidos ao *P. falciparum* (SIVEP, 2012). Nesse município, a região do rio Padauri é uma das que possuem maior endemicidade, com

um IPA de 211,5 por cada 1.000 habitantes (SIVEP, 2012). O IPA no ano do estudo (2004) foi de 70,4 casos para cada 1.000 habitantes.

Figura 9 - Localização geográfica do município de Barcelos na Amazônia Legal



### **Lubango – Angola**

Lubango é uma cidade do sul de Angola situada no planalto da Huíla que dá o nome a província. Com 79.022 km<sup>2</sup> e aproximadamente um milhão de habitantes, Lubango é a capital da província da Huíla, sendo limitada ao Norte com o município de Quilengues, ao Leste com o município de Cacula, ao Sul com os municípios de Chibia e Humpata, e ao Oeste com o município da Bibala. Localizada a 1.760 metros acima do nível do mar, Lubango é uma das cidades mais elevadas de Angola, apresentando dois tipos de clima, tropical e semi-árido, com temperatura média anual de 18°C. É provavelmente a cidade mais fria dessa região, sendo os meses de junho e julho os mais frios, com eventuais geadas. Em zonas de altas altitudes, como a serra da Leba e serra da Chela, as temperaturas podem baixar bruscamente chegando a -10oC. As chuvas mais intensas ocorrem geralmente entre o início de janeiro e o fim de março, e os meses mais quentes são setembro, outubro e novembro.

Assim como diversas outras regiões do continente Africano, Lubango é área endêmica de malária tendo registrado somente no ano de 2011 aproximadamente 70 mil casos da doença, dos quais mais de 90% são atribuídos ao *P. falciparum* (Figura 2)(OMS, 2010). Cabe informar que em 2011, ano da coleta das amostras, o cenário no qual se inseriu o do trabalho de campo foi o de 3.501.953 casos de malária e 6.909 óbitos pela doença em Angola.

Figura 10 - Localização Geográfica de Lubango na República de Angola



### 3.2. Desenho epidemiológico

O nosso trabalho se baseou em um estudo descritivo do tipo série de casos, no qual foram estudados 157 indivíduos, subdivididos em grupos da seguinte maneira:

- a) 28 indivíduos de Barcelos com infecção assintomática por *P. falciparum* ou por *P. vivax* e história de infecção prévia, para ambas as espécies;
- b) 97 indivíduos africanos de Lubango com malária por *P. falciparum*;
- c) 12 indivíduos de Barcelos não infectados e sem história progressiva de malária declarada, denominados controles de área;
- d) 20 indivíduos do Rio de Janeiro nunca expostos à malária, controles de área não endêmica.

### 3.3. Coleta das amostras

#### *a) Indivíduos com infecção assintomática*

As amostras de soros de indivíduos assintomáticos estudadas no presente trabalho foram coletadas durante um estudo prévio denominado “Epidemiologia da malária em comunidades do rio Padauri, médio rio Negro, uma área de extrativismo vegetal da piaçaba

no Estado de Amazonas, Brasil”, realizado pelo Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz (Suárez-Mutis, 2007).

Tal estudo correspondeu a uma coorte aberta em que habitantes do rio Padauri foram acompanhados no campo, ao longo de 18 meses, para se avaliar a epidemiologia da malária e das infecções assintomáticas na área. Foram considerados como tendo infecção assintomática os indivíduos que apresentaram gota espessa e/ou reação em cadeia da polimerase (PCR) positiva para qualquer uma das espécies plasmodiais sem haver apresentado sintomas 30 dias antes ou depois da coleta da amostra. Além da falta de sintomas de malária, para serem considerados como casos de infecção assintomática, os indivíduos recrutados não poderiam ter tomado medicamentos antimaláricos nos 30 dias prévios à coleta da amostra.

Um total de 10 ml de sangue foi coletado em tubo vacutainer® (Becton, Dickinson & Company) sem EDTA para obtenção de soro, que foi separado através de centrifugação e, então, armazenado a 4°C em glicerina na proporção de 1:1 para uma melhor preservação em condições de campo. Posteriormente, as amostras foram congeladas à -20°C até à realização dos testes sorológicos.

Para realização do diagnóstico por PCR, amostras de sangue foram coletadas em tubos vacutainer® com EDTA e foram mantidas a 4°C até a extração do DNA em laboratório.

#### *b) Pacientes com malária por P. falciparum*

As amostras de soro de indivíduos com malária falciparum foram coletadas no ano de 2011 no Hospital Central Dr. Antônio Agostinho Neto em Lubango / Luanda. Foram incluídos nestas coletas pacientes com sintomas e sinais clínicos de malária e gota espessa positiva para *P. falciparum*, sendo o diagnóstico parasitológico confirmado por PCR.

Um total de 8 mL de sangue foi coletado em tubos vacutainer® com EDTA, e utilizado para obtenção de plasma e de concentrado de hemácias para a realização do diagnóstico molecular por PCR. Para separação do plasma e das hemácias, as amostras foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos. O plasma obtido foi aliquoteado e estocado a -20°C, enquanto o concentrado de hemácias foi misturado na proporção de 1:1 em glicerolyte (Sigma) para armazenamento a -20°C.

*c) Indivíduos clinicamente sadios*

As amostras de soro de indivíduos clinicamente sadios não infectados e sem história pregressa de malária declarada foram obtidas durante o estudo realizado em Barcelos, e também foram coletadas de indivíduos nunca expostos à infecção malárica, residentes no Rio de Janeiro. A ausência de infecção plasmodial nos indivíduos controles recrutados de área foi avaliada pelo diagnóstico parasitológico em gota espessa e confirmado pelo diagnóstico molecular por PCR, como descrito posteriormente.

### 3.4. Diagnóstico

O diagnóstico de infecção plasmodial foi realizado tanto pelo exame microscópico de gota espessa, como preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil, quanto pelo método molecular seguindo-se o protocolo descrito por Snounou (1993), como descrito a seguir:

*a) Diagnóstico parasitológico*

Para confecção da gota espessa, uma gota de sangue obtida da ponta do dedo médio dos pacientes, através de uma lanceta estéril, foi espalhada sob lâmina de vidro em uma área de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. Depois de seco, o sangue foi desmembrado com solução hipotônica de azul de metileno (Merck) e, então, corado por 10 minutos com uma solução de Giemsa (Qeel). Após coloração, a lâmina foi examinada em microscópio ótico convencional com objetiva de imersão (100x) para identificação da espécie plasmodial e avaliação da parasitemia (parasitos/mm<sup>3</sup>).

*b) Diagnóstico Molecular*

*PCR para diagnóstico dos indivíduos de Barcelos (Amazonas)*

Uma *nested* PCR foi realizada usando o protocolo de Snounou (1996) com algumas modificações. Os iniciadores (*primers*) utilizados na primeira reação foram específicos para o

gênero *Plasmodium*, amplificando um fragmento de 1200 pares de base (pb) que serviu como molde para a segunda reação. Na segunda reação de PCR foram utilizados iniciadores espécie-específicos de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (Tabela 1), cujos fragmentos tem 120 pb, 205 pb e 144 pb, respectivamente. O volume por amostra de reagentes utilizados na primeira reação para um volume final de 25 µL encontram-se listados na tabela 2 e o perfil térmico na tabela 3. As tabelas 4 e 5 apresentam os mesmos dados para a segunda reação. Controles positivos (DNAs de amostras das três espécies de plasmódio) e negativos (água) foram usados para assegurar a qualidade das reações. Todas as reações foram preparadas no gelo.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para PCR diagnóstico, segundo o protocolo de Snounou (1996)

Iniciador	Sequência	T <sub>m</sub> (°C)
<i>Gênero Plasmodium</i>		
rPlus5	5'-CTT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3'	43
rPlus6	5'-TTA AAA TTG CAG TTA AAA CG-3'	41
<i>P. falciparum</i>		
rFal1	5'-TTA AAC TCG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3'	48
rFal2	5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GCT-3'	55
<i>P. vivax</i>		
rViv1	5'-CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC-3'	54
rViv2	5'-ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA -3'	55
<i>P. malariae</i>		
rMal1	5'-ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC -3'	51
rMal2	5'-AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA -3'	46

Tabela 2 - Reagentes usados na primeira reação do *nested* PCR gênero específico. Volume final de 25 $\mu$ L

Reagente	Concentração/25 $\mu$ L	Volume ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	15,7
Tampão 10X (Invitrogen)	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub> 50mM (Invitrogen)	1,5Mm	1
dNTP mix 2 $\mu$ M (Invitrogen)	0,12 $\mu$ M	1,5
Iniciador rPlus5 10 $\mu$ M	5pmol	0,6
Iniciador rPlus6 10 $\mu$ M	5pmol	0,6
Taq (Invitrogen) 5U/ $\mu$ L	0,5U	0,1
DNA	10-50ng	3

Tabela 3 - Perfil térmico da primeira reação de *nested* PCR

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
95	5 min	1
94	1 min	} 25
58	2 min	
72	2 min	
72	2 min	1
4	$\alpha$	Infinito

Tabela 4 - Reagentes usados na segunda reação de *nested* PCR espécie-específica, para um volume final de 25 $\mu$ L

Reagente	Concentração/25 $\mu$ L	Volume ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	17,7
Tampão 10X (Invitrogen)	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub> 50mM (Invitrogen)	1,5mM	1
dNTP mix 2 $\mu$ M (Invitrogen)	0,12 $\mu$ M	1,5
Iniciador rPlus5 10 $\mu$ M	5pmol	0,6
Iniciador rPlus6 10 $\mu$ M	5pmol	0,6
Taq (Invitrogen) 5U/ $\mu$ L	0,5U	0,1
Produto de PCR da primeira reação	10-50ng	1

Tabela 5 - Perfil térmico da segunda reação da *nested*-PCR

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
95	5 min	1
94	1 min	} 30
65	2 min	
72	2 min	
72	5 min	1
4	$\alpha$	Infinito

A partir de cinco microlitros do material amplificado foi feita eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE 0,5X (Tris + ácido bórico + EDTA) usando 5 $\mu$ L do material amplificado e 3 $\mu$ L de tampão de amostra. Foram utilizados cinco microlitros de um padrão de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen). Os géis foram corados usando

GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain®, 3X em H<sub>2</sub>O e observados e fotografados no visualizador Biosystem da Applied Biosystems.

A sensibilidade de detecção da PCR alcança níveis de parasitemia entre 0,01 e 0,001%, sendo adequada para o diagnóstico de infecções assintomáticas e subpatentes (Snounou, 1993; Cox-Singh et al., 1997). Todos os testes de PCR dos indivíduos de Barcelos foram realizados pela Dra. Martha Cecília Suárez Mutis.

#### *PCR para diagnóstico dos pacientes de Lubango (Angola)*

O diagnóstico para as amostras de Lubango foi realizado no Laboratório de Pesquisas em Malária conforme os protocolos descritos a seguir: para o gênero *Plasmodium* (Gama et al., 2007) e para as espécies *P. falciparum* (Zalis et al., 1996), *P. vivax* (Torres et al., 2006).

### **3.5. Aspectos éticos**

As amostras estudadas de Barcelos – Amazonas fazem parte de uma pesquisa maior denominada “Estudo da morbidade da malária em áreas do médio rio Negro Amazonas” coordenado pela Dra. Martha Mutis que foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz sob o número 157-02. Após informações e esclarecimentos sobre a pesquisa, foi lido o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) a todas as pessoas adultas; já no caso das crianças o TCLE foi lido para pais e solicitada autorização. Todas as pessoas que ingressaram no estudo concordaram com a pesquisa e assinaram o TCLE antes da inclusão dos indivíduos.

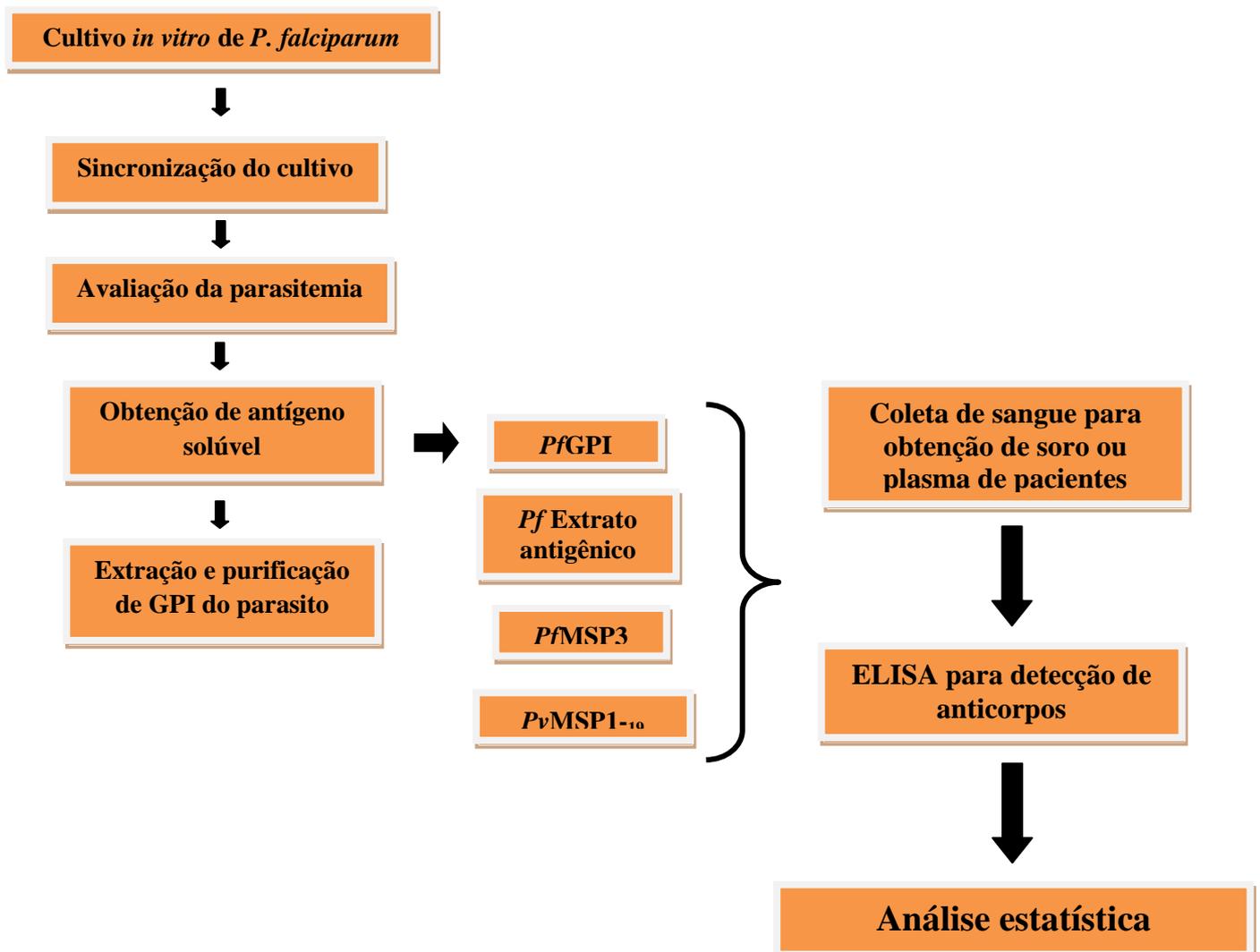
As amostras de Angola – Lubango foram coletadas pela mestrandia angolana de nosso Laboratório Elsa Daniel sendo o estudo aprovado pelo Comitê de Ética local coordenado pelo Diretor do Programa Nacional de Malária da República de Angola, Dr. Filomeno Fortes. Após informações e esclarecimentos sobre a pesquisa, foi lido o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) a todas as pessoas adultas; no caso das crianças o TCLE foi lido para os pais e solicitada autorização. Todas as pessoas que ingressaram no estudo concordaram com a pesquisa e assinaram o TCLE.

### 3.6. Critérios de exclusão

- a) **Lubango** – crianças menores de cinco anos, indígenas, presidiários e doentes mentais;
- b) **Barcelos** – crianças menores de dois anos e indivíduos com doença grave.

### 3.7. Desenho experimental

Realização de estudo da resposta imune contra diferentes antígenos plasmodiais



### **Cultivo *in vitro* do *P. falciparum***

Para obtenção da glicosilfosfatidilinositol (GPI) plasmodial utilizamos a cepa FCR3 de *P. falciparum*, originária da África e mantida no Laboratório de Pesquisas em Malária em cultivo *in vitro* de acordo com o método descrito por Trager & Jensen (1976), com algumas modificações.

Os parasitos foram cultivados de forma assincrônica em hemácias humanas do tipo O, fator Rh<sup>+</sup> (Instituto de Biologia do Exército, RJ, Brasil), em um hematócrito de 3% e mantidos em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, St Lewis, USA), tamponado com 25mM de HEPES (Sigma), suplementado com 0,2% de glicose (Sigma), 23mM bicarbonato de sódio (Sigma), 40µg/L de gentamicina (Gibco Industries, Rockville, USA) e enriquecido com 10% de soro humano normal tipo O, fator Rh<sup>+</sup> (Instituto de Biologia do Exército, RJ, Brasil), inativado a 56°C durante 30 minutos, denominado meio completo. Os parasitos foram cultivados a 37°C em garrafas de cultura (Nunc) e a manutenção do cultivo foi feita com a troca diária de meio de cultura, adição de gases (5% de O<sub>2</sub> e de CO<sub>2</sub> e 90% e N<sub>2</sub> – White Martins, RJ, Brasil) e monitoramento da parasitemia em distensões sanguíneas.

### **Determinação da parasitemia**

A parasitemia foi estimada através de exame microscópico direto por distensão sanguínea corada pelo Kit Panótico Rápido (Laborclin, Paraná, Brasil). A leitura baseou-se na contagem do número de hemácias não parasitadas e parasitadas (pelo menos 1.000 hemácias). O cálculo foi realizado de acordo com a fórmula a seguir:

$$\frac{\text{Hemácias parasitadas (HP)} \times 100}{\text{Hemácias totais (HT)}} = \text{parasitemia em porcentagem(\%)}$$

## **Sincronização do cultivo**

O cultivo *in vitro* foi sincronizado através do tratamento com Voluven® (Fresenius Kabi, Brasil Ltda.), que permite a separação por gradiente das formas sanguíneas jovens (anel) (Mc Bride & Heidricht, 1987), seguido-se tratamento com sorbitol (Merck), que lisa seletivamente as hemácias parasitadas por trofozoítos maduros e esquizontes (Lambros & Vanderberg, 1979).

Para a sincronização foram utilizadas culturas assincrônicas com parasitemia acima de 30% e predominância de anéis. As culturas foram transferidas delicadamente para tubos Falcon de 15 mL, centrifugadas a 2300 g por 5 minutos (temperatura ambiente) e, então, ao pellet obtido foi adicionado uma mistura contendo 2,4 volumes de Voluven® para 1,4 volumes de meio de cultura incompleto (apenas RPMI), utilizando-se como referência o volume inicial do precipitado de hemácias contido em cada tubo. Após homogeneização, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos para a separação seletiva das hemácias contendo formas em anel que, juntamente com as hemácias não parasitadas, sedimentam.

Para garantir a eficiência da sincronização, o pellet obtido, contendo as formas em anel, foi ressuspenso em uma solução de sorbitol a 5% e, então, incubadas por 20 minutos em banho-maria a 37°C, a fim de remover por lise eventuais hemácias parasitadas contendo trofozoítos maduros ou esquizontes. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 2300 g por 5 minutos para a retirada do sobrenadante e o pellet então obtido foi posto em cultura em um hematócrito de 2%.

## **Obtenção de extrato antigênico (GPI) de *P. falciparum***

A GPI plasmodial utilizada em nosso estudo foi obtida a partir de extrato antigênico proveniente de culturas sincrônicas em trofozoítos maduros (30-40h de desenvolvimento intraeritrocítico). Para obtenção do extrato antigênico foram utilizadas culturas com parasitemias entre 30 e 40% contendo cerca de  $5 \times 10^8$  parasitos, como estimado após determinação do número de hemácias por hematimetria em Câmara de Neubauer.

As culturas foram transferidas para tubos *Falcon* de 15 mL e lavadas três vezes com solução salina tamponada 0,15mM pH 7.2 (PBS – 0,15mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 8mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 1,5mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma) por centrifugação de 2000 g por 10 minutos a 4°C. Após as lavagens, a lise das hemácias foi promovida em banho-maria a 37° C durante 15 minutos pela adição de 10 volumes de saponina a 0,1% (Sigma), utilizando-se como referência o volume inicial do sedimento de hemácia contida no tubo. Após a lise, 20 volumes de PBS foram adicionados a cada tubo, seguindo-se centrifugação de 2000 g por 20 minutos à temperatura ambiente para retirada do sobrenadante. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com PBS e, então, o *pellet* (extrato parasitário) obtido foi ressuspensionado em 1mL de PBS e estocado a -20°C até o momento da extração da GPI.

### **Extração e purificação da GPI do parasito**

Para obtenção de GPI do parasito, o extrato parasitário, obtido como descrito anteriormente, foi descongelado, transferido para microtubos de 1,5 mL e, então, centrifugado a 13000 g por 5 minutos à temperatura ambiente para retirada do sobrenadante (PBS). Ao sedimento de parasito formado, foi adicionado 1 mL de Clorofórmio:Metanol (1:1, v/v) para cada 150 µL de sedimento. A suspensão foi então sonicada (Ultra som Sonica) por 5 minutos para homogeneização e, em seguida, mantida overnight sob agitação (Vortex – Genie I) a temperatura ambiente.

Após este período, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante transferido para um novo tubo, seguindo-se de secagem do sobrenadante em um evaporador a vácuo (Speed-Vac, Savanta). Em seguida, o sedimento obtido após secagem foi ressuspensionado em 1 mL de Clorofórmio:Metanol:Água (C:M:A) (10:10:3; v/v/v), sonicado por 30 minutos e, então, centrifugado a 13000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente coletado e seco em evaporador a vácuo, procedimento realizado por mais duas vezes. Após a terceira lavagem do pellet, o mesmo pôde ser congelado para outros experimentos.

O extrato do pellet, C:M:A seco por evaporação, contém glicolipídeos de *P. falciparum* incluindo os intermediários e as âncoras livres de GPI, além de lipídeos de outros tipos tais como fosfo e esfingolipídeos. Para remoção desses contaminantes solúveis em água dos extratos utilizamos a técnica descrita por Folch e colaboradores (1957) que envolve duas etapas bem distintas.

O extrato lipídico foi ressuspensionado e adicionado 1 mL de Clorofórmio:Metanol (C:M, 2:1, v/v) seguido por 150 µL de MgCl<sub>2</sub> a 4 mM e, então a suspensão foi homogeneizada e centrifugada a 13000 g por 5 minutos. Após a adição de C:M (2:1) e MgCl<sub>2</sub>, a amostra se separou em duas fases, a superior foi descartada porque era composta por resíduos contaminantes e a orgânica (inferior) foi lavada duas vezes e adicionado 750µL da “fase aquosa artificial” (C/M/A/1M MgCl<sub>2</sub>, 6:96:94:0,336, v/v/v/v). Seguidamente todas as amostras foram secas em um evaporador a vácuo e para finalizar todo o processo de purificação foram submetidas à última etapa, a partição butanol/água (1:1; v/v).

Nos tubos com os extratos secos foram adicionados 200 mL de butanol, em seguida 200 mL de água, sendo os tubos agitados durante 30 minutos no vortex e centrifugados a 13000 g durante 5 minutos. Após centrifugação, a fase aquosa (acima descrita) foi descartada e esse processo foi repetido por duas vezes. As GPIs extraídas foram liofilizadas e estocadas a -20° até o momento de uso.

### **Obtenção do extrato antigênico (antígeno total) do *P. falciparum* (Pf – Zw)**

A cepa ADA, isolada no estado de Rondônia de um paciente cujo nome é Adalberto, em 1982, de *P. falciparum* é mantida no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical (Universidade de São Paulo) por cultivo in vitro (Trager & Jensen, 1976) e por congelamento em Nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido.

Quando a parasitemia alcançou no mínimo 10%, com predominância de esquizontes, as culturas foram centrifugadas a 1500 g, por 10 minutos, para a separação das hemácias. Após lavagens por duas vezes com PBS, as hemácias foram lisadas pela adição de saponina (Merck, Darmstadt, FR, Germany) a 0,04% em PBS. Após homogeneizar e incubar por 20 minutos à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 3000 g a 4°C por 15 minutos, para separação dos plasmódios. Após lavagens por três vezes com PBS, o sedimento foi processado imediatamente para extração dos componentes antigênicos.

Antígenos somáticos foram extraídos com detergente anfótero Zwittergent® a 2% em PBS contendo os seguintes inibidores de proteases: aprotinina (50 µg/mL), leupeptina (1 µg/mL), antipainá (1 µg/mL) e PMSF (1 mM).

Aproximadamente, 100 mg (peso úmido) de sedimento de parasitos foram ressuspensos na solução de Zwittergent® a 2% em PBS com os inibidores de proteases e

submetidos a uma homogeneização com pipeta Pasteur até total dissolução, observada visualmente. Em seguida, centrifugou-se por 30 minutos, a 14000 g, a 4°C. O conteúdo proteico do sobrenadante foi quantificado pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951) e o antígeno alíquotado e estocado em nitrogênio líquido.

### **Proteína 1 de superfície do merozoíto (MSP1<sub>19</sub>) do *P. vivax***

A proteína clonada no plasmídeo pET14b-PvMSP1-19 foi cedida gentilmente pela Profa. Dra. Irene Soares (Universidade Estadual de São Paulo - UNESP). Todos os procedimentos de clonagem e purificação da proteína recombinante foram realizados no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT – Universidade de São Paulo) conforme protocolo descrito por Cunha et al., 2001.

### **Proteína 3 de superfície do merozoíto (MSP3) do *P. falciparum***

A proteína MSP3 foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Pierre Druilhe (Vac4all, Paris, França). A produção e a purificação foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Theisen e colaboradores (2001).

### **ELISA para detecção de anticorpos anti-GPI**

O método indireto do ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) foi utilizado de acordo com o protocolo descrito por Naik e colaboradores (2000) para a pesquisa de anticorpos anti-GPI nos soros ou plasmas estudados.

Microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc-Maxisorp) foram sensibilizadas por 12 h a 37°C com 50 mL de metanol adicionado ao antígeno, a GPI, em uma concentração aproximadamente de 3 µg por poço. Após a sensibilização e com as amostras secas, foram feitas cinco lavagens consecutivas com tampão TBS (Tris-HCl 0,2M + NaCl 0,06M, pH 7,2)

em temperatura ambiente e posteriormente saturadas com 200 mL do tampão MBS (Tris-HCl 0,2M + NaCl 0,06M + 0,05% Tween 20 + 3% leite desnatado, pH 7,2) por 2 horas a 37°C.

Decorrido o período de saturação, as placas foram lavadas cinco vezes com T-TBS (Tris-HCl 0,2M + NaCl 0,06M + 0,05% Tween 20, pH 7,2) e incubadas por 1 hora a 37°C com os plasmas dos indivíduos a 1:100 em MBS a 3%. Após cinco lavagens com T-TBS, as placas foram incubadas com anti-IgG (Sigma) humano conjugada a peroxidase e diluído a 1:2000 em MBS a 3% por 1 hora a 37°C.

A reação foi revelada com uma solução contendo 0,4 µg / mL de orto-fenilenodiamino (OPD, Sigma) em tampão citrato-fosfato pH 5,4 (ácido cítrico 24 mM, Sigma, e fosfato de sódio dibásico 51 mM, Sigma) e de peróxido de hidrogênio 30% (Merck) diluído 1:2000 durante 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico a 2 normal (Merck).

Após a revelação, a leitura da densidade óptica (DO) foi feita em espectrofotômetro Spectramax® (Molecular Devices, Califórnia, EUA) a 492 nanômetros (nm). Todos os soros ou plasmas foram testados em triplicata e cada placa recebeu um controle "branco" (sem plasma) e cinco soros-padrão não reativos, sendo estes últimos, plasmas de indivíduos que não residem em área endêmica e que nunca tiveram malária. O resultado foi analisado pelo limite mínimo de positividade (cut off), que foi calculado a partir da média da DO de 20 controles não reativos mais duas vezes o desvio padrão (DP). As amostras com resultados superiores a 0,136 foram consideradas positivas.

### **ELISA para detecção de anticorpos anti-antígeno total de *Plasmodium falciparum* Zwittergent® (Pf-Zw)**

Placas NUNC polysorp foram sensibilizadas com 100 µL do extrato antigênico de *P. falciparum* a 5 µg / mL (em PBS) e incubadas por 2 horas a 37°C e overnight a 4°C em câmara úmida.

Após sensibilização, as placas foram lavadas com PBS 0,01 M (pH 7,2) contendo Tween 20, 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com 200 µL PBS-TL-5% (TL- Tween leite) e incubadas por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Decorrido o período de saturação as placas foram lavadas por três vezes com PBS-T e adicionado 50 µL de cada amostra de soro diluído a 1:100 em PBS-L-5%, em duplicata, com incubação de 30 minutos a 37°C em câmara úmida.

Outro ciclo de lavagem foi realizado, e em seguida adicionou-se 100 µL do conjugado enzimático anti-IgG humano-peroxidase (Sigma 0170) diluído a 1:20000 em PBS-L-2% e incubados por 40 minutos a 37°C em câmara úmida. A reação foi revelada com a solução cromógena (100 µL por poço) de TMB (Sigma), sob o abrigo de luz e foi interrompida pela adição de 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2N (Merck).

A leitura da reação foi realizada medindo a absorbância em leitor de ELISA com filtro de 450 nm. Para cada amostra calculou-se o Índice de Reatividade (IR) como a razão entre a absorbância pelo limiar de reatividade do teste, as amostras que apresentaram  $IR \geq 1$  foram consideradas reagentes.

### **ELISA para detecção de anticorpos anti-MSP3 do *P. falciparum***

Placas NUNC polysorp foram sensibilizadas com 100 µL do extrato antigênico de *P. falciparum* a 5 µg / mL (em PBS) e incubadas por 2 horas a 37°C e overnight a 4°C em câmara úmida.

Após sensibilização, as placas foram lavadas com PBS 0,01 M (pH 7,2) contendo Tween 20, 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com 200 µL PBS-TL-5% (TL - Tween leite) e incubadas por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Decorrido o período de saturação as placas foram lavadas por três vezes com PBS-T e adicionado 50 µL de cada amostra de soro diluído a 1:100 em PBS-L-5%, em duplicata, com incubação de 30 minutos a 37°C em câmara úmida.

Outro ciclo de lavagem foi realizado, e em seguida adicionou-se 100 µL do conjugado enzimático anti-IgG humano-peroxidase (Sigma 0170) diluído a 1:20000 em PBS-L-2% e incubados por 40 minutos a 37°C em câmara úmida. A reação foi revelada com a solução cromógena (100 µL por poço) de TMB (Sigma), sob o abrigo de luz e foi interrompida pela adição de 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2N (Merck).

A leitura da reação foi realizada medindo a absorbância em leitor de ELISA com filtro de 450 nanômetros. Para cada amostra calculou-se o índice de reatividade (IR) como a razão entre a absorbância pelo limiar de reatividade do teste, as amostras que apresentaram  $IR \geq 1$  foram consideradas reagentes.

## **ELISA para detecção de anticorpos anti-MSP1-19 do *P. vivax***

Placas de poliestireno Costar 3590, high binding, foram sensibilizadas com 50 µL do antígeno PvMSP1-19 a 4 µg em tampão carbonato 0,05M (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 16 mM Sigma, NaHCO<sub>3</sub> a 34 mM Sigma) pH 9,6 e incubadas por 2 horas a 37°C, decorrido esse período foram postas em câmara úmida overnight a 4°C.

Após sensibilização, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20, 0,05% (PBS-T20) e bloqueadas com 200 µL PBS-TL-5% (TL- tween leite) e incubadas por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Decorrido o período de saturação as placas foram lavadas por três vezes com PBS-T e adicionado 50 µL de cada amostra de soro diluído a 1:100 em PBS-L-5%, em duplicata, com incubação de 30 minutos a 37°C em câmara úmida.

Outro ciclo de lavagem foi realizado, e em seguida adicionou-se 50 µL do conjugado enzimático anti-IgG humano-peroxidase (Sigma 0170) diluído a 1:20000 em PBS-L-5% e incubados por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. A reação foi revelada com a solução cromógena (100 µL por poço) de TMB (Sigma), sob o abrigo de luz e foi interrompida pela adição de 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2N (Merck).

A leitura da reação foi realizada medindo a absorbância em leitor de ELISA com filtro de 450 nm. Para cada amostra calculou-se o índice de reatividade (IR) como a razão entre a absorbância pelo limiar de reatividade do teste, as amostras que apresentaram  $IR \geq 1$  foram consideradas reagentes.

### **3.8. Análises estatísticas**

A informação coletada foi sistematizada em bancos de dados de estatística em EPIDATA e analisadas usando o programa EPINFO (CDC-Atlanta, 2000, software de uso livre). Para variáveis contínuas foram realizadas análises de distribuição de frequências, medidas de tendência central (médias e medianas), medidas de dispersão (variância e desvio padrão), teste t de Student não paramétrico para comparação de diferenças entre médias (no caso de duas séries de dados), e teste de ANOVA em caso de mais de duas séries de dados. Para variáveis categóricas foram usados os testes de Qui quadrado ( $\chi^2$ ) com correção de Yates para proporções e em caso de valores esperados menores que cinco foi feito o teste de Fisher.

Foram realizadas análises uni e bivariadas. Em todos os casos foi considerado como estatisticamente significativo um valor de p menor do que 0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. A composição e o histórico das populações

Para avaliar o perfil de resposta anticorpo contra a GPI, o antígeno total e a MSP3 do *P. falciparum* assim como a MSP1-19 do *P. vivax*, foram utilizadas 137 amostras de plasma ou soro de indivíduos distribuídos nos seguintes grupos: **GRUPO I** - 28 sujeitos expostos continuamente ao risco de infecção no município de Barcelos, uma região de elevada transmissão (IPA = 70,9) no estado do Amazonas, e apresentando infecção assintomática por *P. falciparum* (n = 13) ou *P. vivax* (n = 15) e história prévia de malária por *P. falciparum*; **GRUPO II** – 97 pacientes com malária por *P. falciparum* moradores de Lubango, província da Huíla, uma região de alta transmissão (IPA > 100) de Angola e; **GRUPO III** – 12 indivíduos moradores em Barcelos que relataram nunca terem tido infecção e nem história pregressa de malária (controles clinicamente sadios de Barcelos).

O perfil epidemiológico dos grupos I e II encontra-se descrito nas tabelas 1 e 2.

O grupo I era composto por 28 indivíduos infectados por Plasmodium, diagnosticados pela PCR, embora assintomáticos, sendo 19 (68%) do sexo masculino e 9 (32%) do sexo feminino, com idades variando de 3 a 50 anos. Em média foram declarados  $6 \pm 3,3$  episódios prévios da doença (IC95%: 5,3 - 7,8) por indivíduo. Esses indivíduos foram classificados como assintomáticos por terem permanecido sem sintomas por um período de 30 dias de acompanhamento após o diagnóstico da infecção.

Tabela 6 - Gênero, idade e história pregressa de malária em 28 indivíduos de Barcelos (Amazonas) com infecção assintomática por *P. falciparum* (n = 15) ou *P. vivax* (n = 13)

<b>Gênero</b>		
Feminino	n = 9	32%
Masculino	n = 19	68%
<b>Idade:</b> média ± DP e min - máx	20,7 ± 15	3 - 50
<b>Número médio de episódios prévios de malária relatados</b> média ± DP	6 ± 3,3	

O grupo II consistiu de 97 pacientes com malária por *P. falciparum*, diagnosticados em Lubango, uma região mesoendêmica estável de Angola, sendo 59 (61%) do sexo feminino e 38 (39%) do sexo masculino, com idades variando de 15 a 67 anos ( $26 \pm 14$ ). A média de número de episódios prévios de malária declarados foi de 0,9 infecções e os sintomas que predominaram foram: cefaléia (79%) febre (60%), artralgia (60%) e calafrios (56%).

Tabela 7 - Gênero, idade, história pregressa de malária, parasitemia e sintomas em 97 pacientes de Lubango (Angola) com malária *falciparum*

<b>Gênero</b>		
Feminino	n = 38	39%
Masculino	n = 59	61%
<b>Idade:</b> média ± DP e min-máx	26 ± 14	15 - 67

<b>Número médio de episódios prévios de malária relatados</b> (média ± DP)	0,9 ± 1	
<b>Parasitemia (µL) média e min-max</b>	10,43	500 - 25000
<b>Sintomas n (%)</b>		
Febre	58 (60%)	
Cefaléia	77 (79%)	
Calafrios	54 (56%)	
Artralgia	58 (60%)	
Náuseas	40 (41%)	
Dor abdominal	41 (42%)	

O grupo III, denominado controle de Barcelos, era composto por indivíduos moradores da área endêmica de Barcelos e incluía nove indivíduos do sexo feminino e três do sexo masculino, com idades variando de 3 a 66 anos (média  $15,7 \pm 20$ ).

#### 4.2. Avaliação do perfil da resposta anticorpo anti- GPI, antígeno total e MSP3 do *P. falciparum* e MSP1-19 do *P. vivax*

##### Anticorpos anti-GPI

Cinco dos 28 (18%) indivíduos de Barcelos com infecção plasmodial assintomática, 63 dos 97 (65%) pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum* e 5 dos 12 (42%) controles sadios de Barcelos apresentaram anticorpos anti-GPI ( $p = 0,000044$ ). A frequência de positividade de anticorpos anti-GPI nos indivíduos com infecção assintomática por *P.*

*falciparum* (4 dos 13; 31%) foi maior do que naqueles por *P. vivax* (1 dos 15; 7%), porém esta diferença não atingiu significação estatística ( $p=0,24$ , tabela 3).

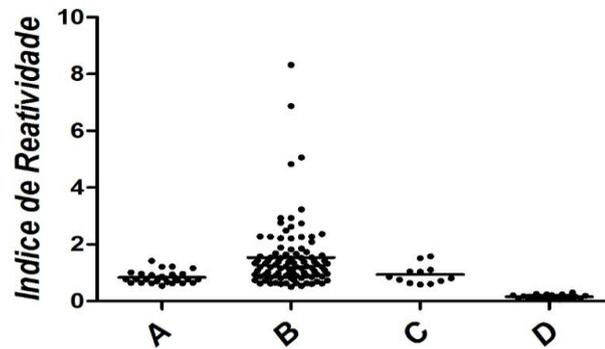
Tabela 8 - Frequência de anticorpos contra a GPI de *P. falciparum* em indivíduos de Barcelos (Amazonas) com infecção assintomática ou controles clinicamente sadios da mesma área e pacientes de Lubango (Angola) com malária

Grupo	Número		(%)
	Reagente	Não reagente	
Indivíduos com infecção			
assintomática	5	23	(18)
Controles sadios	5	7	(42)
Pacientes com malária	63	34	(65)

Indivíduos assintomáticos de Barcelos apresentaram níveis de reatividade anti-GPI ( $0,8375 \pm 0,2119$ , mediana :  $0,7700$ ) similares aos detectados nos controles sadios da mesma área ( $0,9350 \pm 0,339$ , mediana :  $0,8250$ )( $p=0,6053$ ). Já os pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum* apresentaram níveis de reatividade superiores ( $1,539 \pm 1,197$ , mediana :  $1,210$ ) aos dos indivíduos de Barcelos assintomáticos, assim como, aos dos controles de Barcelos ( $p<0,0001$ , figura 1).

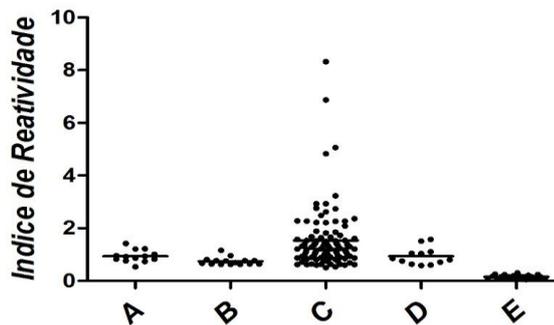
Não foi significativa a diferença entre as médias de reatividade anti-GPI dos portadores de infecção assintomática por *P. falciparum* ( $0,9415 \pm 0,2328$ , mediana :  $0,9200$ ) e por *P. vivax* ( $0,8473 \pm 0,1462$ , mediana:  $0,7001$ ) ( $p=0,684$ ), assim como, entre essas médias e a dos controles de Barcelos ( $0,9350 \pm 0,3390$ , mediana :  $0,8250$ )( $p=0,212$ ). Mais uma vez, o nível médio de reatividade dos pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum* ( $1,539 \pm 1,197$ , mediana :  $1,210$ ) foi maior do que o observado nos indivíduos assintomáticos (por *P. falciparum* ou por *P. vivax*) quanto o dos controles de Barcelos ( $p<0,0001$ , figura 2).

Figura 11 - Índice de reatividade anti-GPI



Legenda: (A) indivíduos de Barcelos (Amazonas) com infecção plasmodial assintomática, (B) pacientes de Lubango (Angola) com malária por *P. falciparum*, (C) indivíduos de Barcelos (Amazonas) sem infecção, nem história pregressa de malária e (D) indivíduos de área não endêmica, Rio de Janeiro.

Figura 12 - Índice de reatividade anti-GPI



Legenda: (A) indivíduos de Barcelos (Amazonas) com infecção plasmodial assintomática por *P. falciparum*, (B) ou por *P. vivax*, (C) pacientes de Lubango (Angola) com malária por *P. falciparum*, (D) indivíduos de Barcelos (Amazonas) sem infecção, nem história pregressa de malária e (E) indivíduos de área não endêmica, Rio de Janeiro; em função da espécie plasmodial infectante

#### 4.3. Anticorpos contra GPI, em relação ao gênero, idade, parasitemia, sintomas e episódios prévios de malária

A tabela 4 mostra as associações entre a reatividade anti-GPI e diversos parâmetros nos grupos de indivíduos estudados. No grupo de Barcelos com infecção assintomática, somente cinco indivíduos, todos homens, (26%) foram reagentes. A média de idade dos indivíduos reagentes ( $33,8 \pm 7,2$  anos) foi maior do que a dos não reagentes ( $18,6 \pm 14,5$  anos) ( $p=0,03$ ). Entretanto, a diferença no número médio de episódios prévios de malária relatados entre os reagentes (8,8) e os não reagentes (6) de Barcelos, não foi significativa ( $p=0,087$ ).

Não foram constatadas diferenças na idade ou no gênero entre os controles clinicamente saudáveis reagentes e não reagentes de Barcelos.

Em relação ao grupo de pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum*, 70% das mulheres e 58% dos homens foram reagentes, e não houve diferença estatística entre a média de idade dos reagentes ( $32,6 \pm 16,4$  anos) e a dos não reagentes ( $27,8 \pm 12,7$  anos) ( $p=0,113$ ), assim como, entre o número médio de episódios prévios de malária relatados pelos reagentes ( $0,86 \pm 0,10$ ) e os não reagentes ( $1,1 \pm 0,2$ ) ( $p=0,3521$ ). Também não foram encontradas diferenças significativas no número de sintomas nem na densidade parasitária entre os reagentes e os não reagentes.

Tabela 9 - Anticorpos anti-GPI em função de variáveis clínicas e epidemiológicas em indivíduos assintomáticos e controles sem infecção de Barcelos (Amazonas), e pacientes de Lubango (Angola) com malária

	Reagente	Não reagente	Total	(%)	p-valor
<b>Indivíduos com infecção assintomática (Barcelos, Amazonas)</b>					
<b>Gênero (%)</b>					
Feminino	0	9	9	(0)	0,242
Masculino	5	14	19	(26)	
<b>Idade</b>					
Média	33,8	18,6	21,4		<b>0,03</b>
Desvio padrão	7,2	14,5	14,6		
IC95%	24,9 - 42,7	12,4 - 24,9	15,7 - 27,0		
<b>Episódios prévios da doença</b>					
Média	8,8	6	6,5		0,087
Desvio padrão	2,7	3,2	3,3		
IC95%	5,5 - 12,1	4,6 - 7,4	5,2 - 7,8		
<b>Pacientes com malária por <i>P. falciparum</i> (Lubango, Angola)</b>					
<b>Gênero (%)</b>					
Feminino	41	18	59	(70)	0,243
Masculino	22	16	38	(58)	
<b>Idade</b>					
Média	32,6	27,8	30,9		0,113
Desvio padrão	16,4	12,7	15,3		
IC95%	28,5 - 36,7	23,4 - 32,3	27,9 - 34,0		
<b>Episódios prévios da doença</b>					
Média	0,86	1,1	-0,2017		0,352
Desvio padrão	0,10	0,2	0,2157		
IC95%	0,650 - 1,064	0,604 - 1,151	-0,630 - 0,227		
<b>Número de sintomas</b>					
Média	4,1	3,7	3,9		0,450

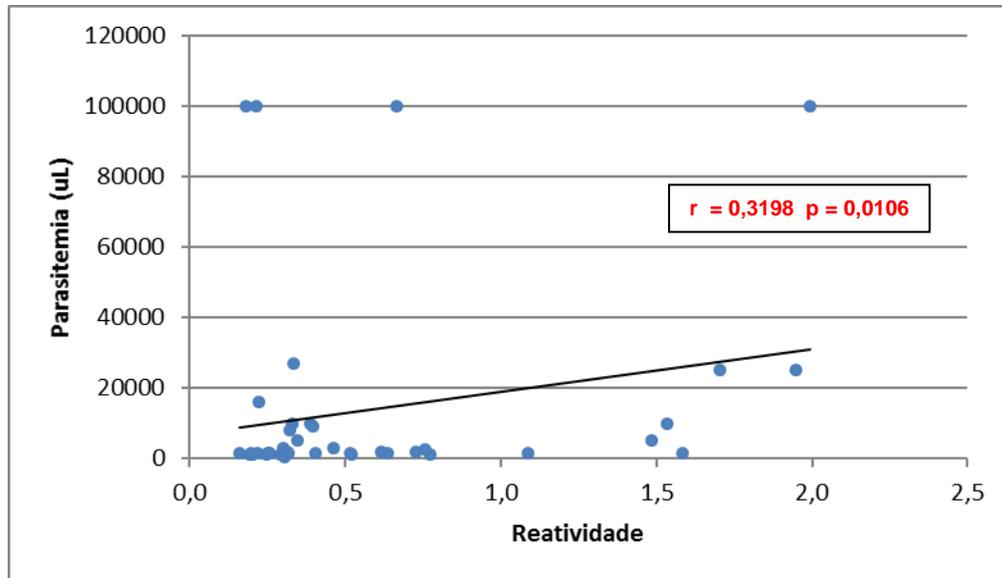
Desvio padrão	2,2	2,4	2,2		
IC95%	3,5 - 4,6	2,9 - 4,5	4,4		
<b>Parasitemia</b>					
Média	10357	10567	10431		0,970
Desvio padrão	24273	28362	25632		
IC95%	4244,1 - 16470	671,7 - 20463	-11284,9 - 11705		
<b>Controles sadios de Barcelos</b>					
<b>Gênero (%)</b>					
Feminino	4	5	9	(45)	1,00
Masculino	1	2	3	(50)	
<b>Idade</b>					
Média	27,8	7.1	20.7		0,090
Desvio padrão	12,7	2,9	11,0		
IC95%	-7,4 - 62,9	0,15 - 14,1	-3,922 - 45,2		

A tabela 10 ilustra as correlações entre reatividade anti-GPI, idade, episódios prévios relatados de malária e parasitemia em indivíduos reagentes estudados. Somente foram encontradas correlações significativas entre a parasitemia e o nível de anticorpos anti-GPI nos indivíduos de Lubango com malária por *P. falciparum* ( $p=0,0106$ , figura 3).

Tabela 10 - Correlações entre a reatividade contra a GPI do *P. falciparum*, a idade, o número relatado de episódios prévios de malária e a parasitemia nos indivíduos reagentes estudados

Variável	r (Spearman)	p-valor
<b>Indivíduos assintomáticos</b>		
Idade	0,2400	0,2186
Nº de episódios prévios de malária	0,2495	0,2003
<b>Pacientes com malária por <i>P. falciparum</i></b>		
Idade	-0,1040	0,4171
Nº de episódios prévios de malária	-0,1440	0,2603
Parasitemia ( $\mu\text{L}$ )	0,3198	<b>0,0106</b>

Figura 13 - Correlação entre parasitemia e intensidade da resposta anti-GPI do *P. falciparum* em pacientes de Lubango (Angola) com malária por *P. falciparum* reagentes a GPI



#### 4.4. Anticorpos contra antígeno total de *P. falciparum*

Na tabela 11 pode ser observado que: 27 dos 28 (96%) indivíduos com infecção assintomática plasmodial, 68 dos 97 (70%) indivíduos de Lubango com malária por *P. falciparum* e 6 dos 12 (50%) controles de Barcelos apresentaram anticorpos contra o antígeno total de *P. falciparum* ( $p = 0,003$ ).

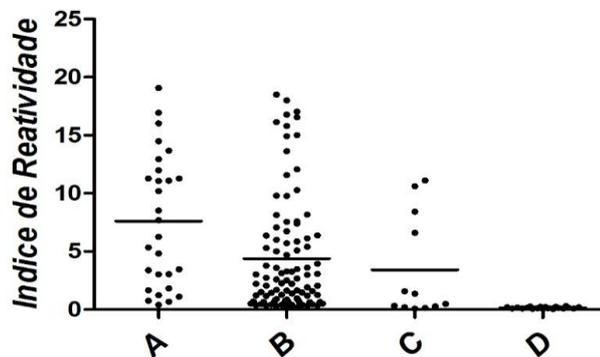
Tabela 11 - Frequência de anticorpos contra antígeno total de *P. falciparum* em indivíduos de Barcelos (Amazonas) com infecção assintomática ou controles clinicamente sadios da mesma área e pacientes de Lubango (Angola) com malária

Grupo	Número		Total	(% )
	Reagente	Não reagente		
Indivíduos com infecção assintomática	27	1	28	(96)
Controles Sadios	6	6	12	(50)
Pacientes com malária	68	29	97	(70)

O índice de reatividade contra antígeno total do *P. falciparum* foi maior nos indivíduos de Barcelos assintomáticos ( $7,619 \pm 5,677$  mediana : 6,975) do que nos controles da mesma região ( $3,436 \pm 4,412$ , mediana : 0,9250) e mesmo do que nos pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum* ( $4,391 \pm 4,928$ , mediana : 2,250)( $p=0,002$ , figura 4).

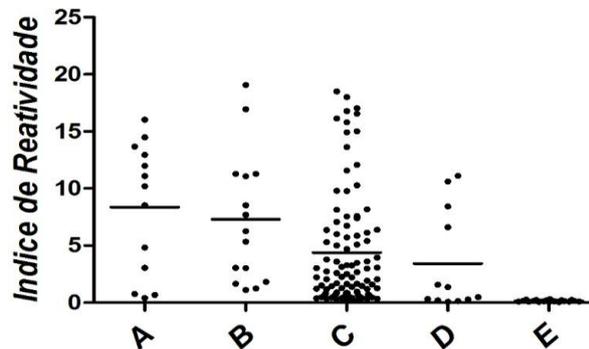
Não foram encontradas diferenças nas médias do índice de reatividade anti-antígeno total do *P. falciparum* entre indivíduos assintomáticos infectados por *P. falciparum* ( $8,358 \pm 5,707$ , mediana : 10,19), ou por *P. vivax* ( $7,295 \pm 5,715$ , mediana : 6,250)( $p=0,6784$ ). No entanto, constatamos que a média de reatividade dos indivíduos assintomáticos de Barcelos infectados por *P. falciparum* ( $p = 0,013$ ) ou por *P. vivax* ( $p=0,020$ ) foi superior a dos controles da mesma área ( $3,436 \pm 4,412$ , mediana : 0,9250). Da mesma forma, a reatividade registrada nos indivíduos assintomáticos infectados por *P. falciparum* foi superior a de pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum* ( $4,391 \pm 4,928$ , mediana : 2,250)( $p=0,0049$ , figura 15).

Figura 14 - Índice de reatividade anti-antígeno total do *P. falciparum*



Legenda: (A) indivíduos de Barcelos (Amazonas) com infecção plasmodial assintomática, (B) pacientes de Lubango (Angola) com malária por *P. falciparum*, (C) indivíduos de Barcelos (Amazonas) sem infecção, nem história progressa de malária e (D) indivíduos de área não endêmica, Rio de Janeiro

Figura 15 - Índice de reatividade anti-antígeno total do *P. falciparum*



Legenda: (A) indivíduos de Barcelos (Amazonas) com infecção plasmodial assintomática por *P. falciparum* (B) ou por *P. vivax*, (C) pacientes de Lubango (Angola) com malária por *P. falciparum*, (D) indivíduos de Barcelos (Amazonas) sem infecção, nem história progressa de malária e (E) indivíduos de área não endêmica, Rio de Janeiro; em função da espécie plasmodial infectante.

#### 4.5. Anticorpos contra o antígeno total do *P. falciparum*, em relação ao gênero, idade, parasitemia, sintomas e episódios prévios relatados de malária

A tabela 7 mostra a distribuição da presença de anticorpos anti-antígeno total em função de parâmetros clínicos e epidemiológicos. No grupo de Barcelos com infecção assintomática, todas as nove mulheres (100%) e 18 dos 19 (95%) homens foram reagentes. A média de idade dos indivíduos reagentes foi de  $21,7 \pm 14,7$  anos e a média de episódios prévios relatados de malária entre os reagentes foi de 6,7. O único indivíduo não reagente estava infectado pelo *P. falciparum*, tinha 12 anos e relatou apenas um episódio de malária prévia. Não foram encontradas diferenças significativas na idade ou na distribuição por gênero entre pessoas reagentes e não reagentes nos indivíduos controles clinicamente saudáveis.

No grupo de pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum*, 43% das mulheres e 25% dos homens foram reagentes sendo que a média de idade entre os pacientes reagentes foi de  $31,6 \pm 16,0$  anos e nos não reagentes foi de  $29,4 \pm 13,6$  anos ( $p=0,499$ ). Não encontramos diferenças entre o número médio de sintomas dos reagentes ( $4,0 \pm 2,23$ ) e o dos não reagentes ( $3,7 \pm 2,27$ ;  $p=0,592$ ), assim como, entre o número médio de episódios prévios de malária relatados pelos reagentes ( $0,89 \pm 0,99$ ) e os não reagentes ( $1,03 \pm 1,08$ ;  $p=0,830$ ). Da mesma forma, não foram encontradas diferenças significativas na densidade parasitária entre os reagentes e não reagentes neste grupo.

Tabela 11 - Anticorpos anti-antígeno total do *P. falciparum* em função de variáveis clínicas e epidemiológicas em indivíduos assintomáticos e controles sem infecção de Barcelos (Amazonas), e pacientes de Lubango (Angola) com malária

	Reagente	Não reagente	Total	%	p-valor
<b>Indivíduos com infecção assintomática (Barcelos, Amazonas)</b>					
<b>Gênero (%)</b>					
Feminino	9	0	9	(100)	1,000
Masculino	18	1	19	(95)	
<b>Idade</b>					
Média	21,7	12	21,3		
Desvio padrão	14,7				
IC95%	15,9 - 27,5				
<b>Episódios prévios da doença</b>					
Média	6,7	1	6,53		
Desvio padrão	3,2	-	-		
IC95%	5,5 - 8,0	-	-		
<b>Pacientes com malária por <i>P. falciparum</i> (Lubango, Angola)</b>					
<b>Gênero (%)</b>					
Feminino	43	16	59	(43)	0,456
Masculino	25	13	38	(25)	
<b>Idade</b>					
Média	31,6	29,4	31		0,499
Desvio padrão	16,0	13,6	15,3		
IC95%	27,7 - 35,5	24,2 - 34,6	27,9 - 34,0		
<b>Número de sintomas</b>					
Média	4,0	3,7	3,9		0,592
Desvio padrão	2,23	2,27	2,24		
IC95%	3,5 - 4,6	2,9 - 4,6	3,5 - 4,4		
<b>Episódios prévios da doença</b>					
Média	0,89	1,03	0,90		0,830
Desvio padrão	0,99	1,08	1,00		
IC95%	0,64 - 1,12	0,62 - 1,44	0,110 - 0,201		
<b>Parasitemia</b>					
Média	9769	11982	10430		0,728
Desvio padrão	23484	30485	25632		
IC95%	4084 - 15453	386,69 - 23578	-10567 - 14995		
<b>Controles Sadios</b>					
<b>Gênero (%)</b>					
Feminino	5	4	9	(57)	1,000
Masculino	1	2	3	(33)	
<b>Idade</b>					
Média	27,8	7,1	20,7		0,090
Desvio padrão	12,7	2,9	11,0		
IC95%	-7,36 - 62,96	0,15 - 14,13			

A tabela 12 mostra as correlações entre a reatividade contra o antígeno total de *P. falciparum*, idade, número relatado de episódios prévios de malária e parasitemia. Entre os indivíduos de Barcelos assintomáticos encontramos correlações entre a idade e a reatividade ( $p=0,0043$ , figura 6). Nos indivíduos de Lubango com malária por *P. falciparum*, somente foram encontradas correlações estatisticamente significativas entre a parasitemia e a reatividade ( $p=0,0043$ , figura 17).

Tabela 12 - Correlações entre a reatividade contra o antígeno total de *P. falciparum*, a idade, o número relatado de episódios prévios de malária e a parasitemia nos indivíduos reagentes

Variável	r (Spearman)	p-valor
<b>Indivíduos assintomáticos</b>		
Idade	0,5231	<b>0,0043</b>
Nº de episódios prévios de malária	0,2187	0,2635
<b>Pacientes com malária por <i>P. falciparum</i></b>		
Idade	-0,1609	0,1900
Nº de episódios prévios de malária	-0,1084	0,3789
Parasitemia ( $\mu\text{L}$ )	0,3420	<b>0,0043</b>

Figura 16 - Correlação entre a reatividade contra o antígeno total do *P. falciparum* e a idade nos indivíduos de Barcelos (Amazonas) assintomáticos com infecção plasmodial

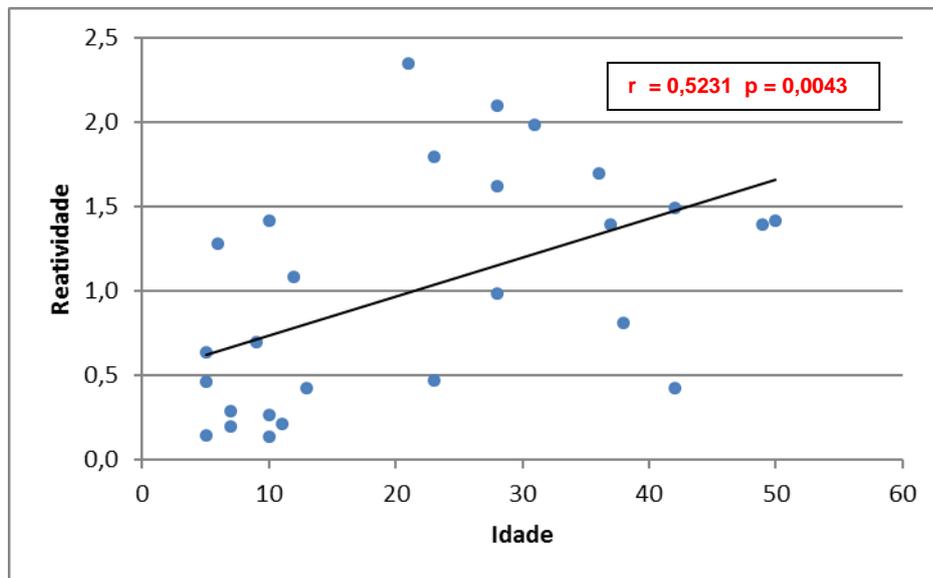
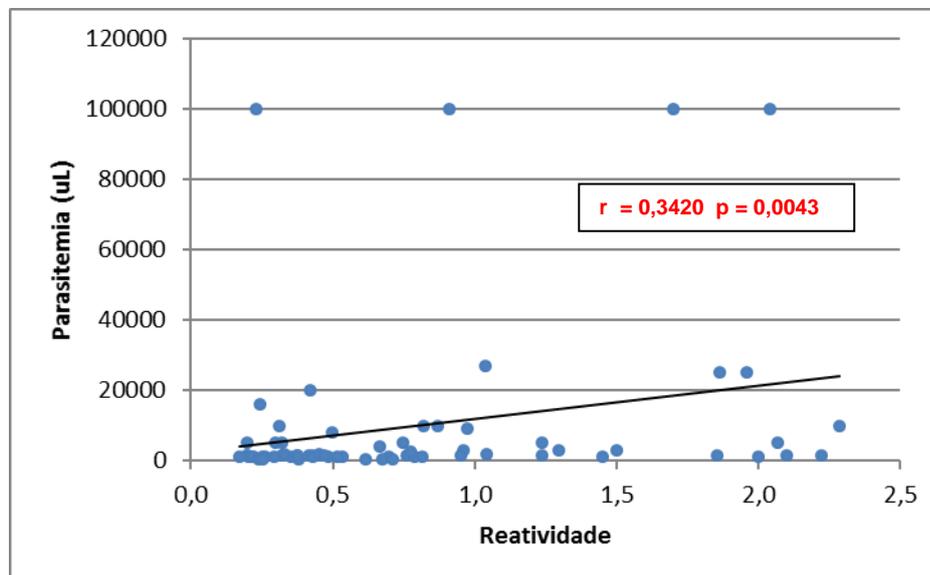


Figura 17 - Correlação entre a reatividade contra o antígeno total do *P. falciparum* e a parasitemia nos pacientes de Lubango (Angola) com malária por *P. falciparum*



#### 4.6. Anticorpos contra MSP3 do *P. falciparum*

Foi observada uma positividade de 46%, 42% e 44%, respectivamente, nos indivíduos de Barcelos com infecção assintomática, nos controles sadios da mesma área; e nos pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum*, respectivamente (tabela 9).

Nove dos 13 (69%) indivíduos assintomáticos com infecção pelo *P. falciparum* tinham anticorpos anti-MSP3 enquanto que 4 dos 15 (27%) indivíduos infectados por *P. vivax* foram reagentes ( $p = 0,02$ ). Não encontramos diferenças significativas na prevalência desses anticorpos entre os indivíduos de Barcelos reagentes e os controles da mesma área ( $p = 0,7426$ ), quando estratificamos os assintomáticos em função da espécie plasmodial infectante. Da mesma forma, os grupos de assintomáticos reagentes com *P. falciparum* ou *P. vivax* e os de doentes com malária de Lubango, 44% (43/97) não apresentaram diferenças significativas ( $p = 0,091$ ), assim como não observamos diferenças entre os pacientes de Lubango com malária e os controles sadios de Barcelos.

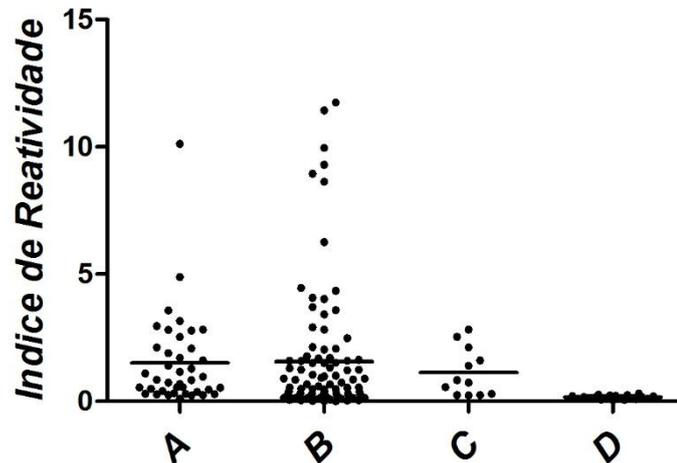
Tabela 13 - Frequência de anticorpos contra MSP3 do *P. falciparum* em indivíduos de Barcelos (Amazonas) com infecção assintomática ou controles clinicamente sadios da mesma área e pacientes de Lubango (Angola) com malária

Grupo	Número			Total	(% )
	Reagente	Não reagente			
Indivíduos com infecção assintomática	13	15	28	(46)	
Controles sadios	5	7	12	(42)	
Pacientes com malária	43	54	97	(44)	

O índice de reatividade anti-MSP3 do *P. falciparum*, registrado entre os indivíduos de Barcelos com infecção plasmodial ( $1,584 \pm 1,803$ , mediana : 0,8370) assintomática não diferiu significativamente daquele observado nos controles da mesma área ( $1,133 \pm 0,9408$ , mediana :0,7800) e nem daquele dos pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum* ( $1,562 \pm 2,505$ , mediana: 0,5480) ( $p=0,6928$ , figura 18). O mesmo foi verdadeiro quando estratificamos o grupo de assintomáticos de Barcelos por *P. falciparum* ( $p=0,9783$ ) ou por *P.*

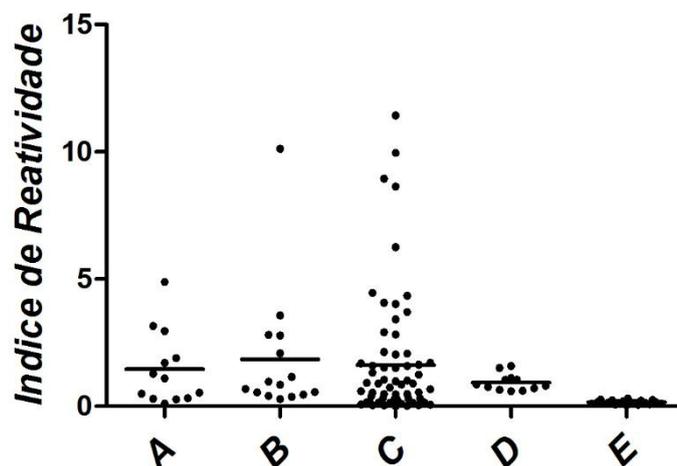
*vivax* ( $p=0,8644$ ) e os comparamos com os controles da mesma área, e mesmo com os pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum* ( $p=0,4545$ , figura 19).

Figura 18 - Índice de reatividade anti-MSP3 do *P. falciparum*



Legenda: (A) indivíduos de Barcelos (Amazonas) com infecção plasmodial assintomática, (B) pacientes de Lubango (Angola) com malária por *P. falciparum*, (C) indivíduos de Barcelos (Amazonas) sem infecção, nem história progressa de malária e (D) indivíduos de área não endêmica, Rio de Janeiro.

Figura 19 - Índice de reatividade anti-MSP3 do *P. falciparum*



Legenda: (A) indivíduos de Barcelos (Amazonas) com infecção plasmodial assintomática por *P. falciparum*I, (B) ou *P. vivax*, (C) pacientes de Lubango (Angola) com malária por *P. falciparum* (D), indivíduos de Barcelos (Amazonas) sem infecção, nem história progressa de malária e (E) indivíduos de área não endêmica, Rio de Janeiro; em função da espécie plasmodial infectante.

#### 4.7. Anticorpos contra MSP3 do *P. falciparum*, em relação ao gênero, idade, parasitemia, sintomas e episódios prévios relatados de malária

A tabela 10 mostra as associações entre a reatividade anti-MSP3 do *P. falciparum* e as variáveis clínicas e epidemiológicas nos indivíduos estudados. No grupo com infecção plasmodial assintomática, seis (67%) mulheres e sete (37%) homens foram reagentes ( $p=0,283$ ). A média de idade dos indivíduos reagentes foi de  $25,8 \pm 13,4$  anos e para os não reagentes foi de  $17,5 \pm 14,9$  ( $p=0,134$ ). O número de episódios prévios de malária nos indivíduos com anticorpos anti-MSP3 do *P. falciparum* foi similar ao dos não reagentes, respectivamente,  $6,9 \pm 2,8$  e  $6,2 \pm 3,7$  ( $p=0,564$ ).

No grupo de pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum*, 51% das mulheres e 34% dos homens foram reagentes ( $p=0,107$ ), sendo a média de idade dos reagentes ( $29,8 \pm 15,6$  anos) semelhante a dos não reagentes ( $31,9 \pm 15,2$  anos;  $p = 0,512$ ), bem como o número médio de sintomas entre os reagentes ( $4,0 \pm 2,4$ ) e os não reagentes ( $3,9 \pm 2,2$ ;  $p=0,773$ ). O número médio de episódios prévios da doença entre os reagentes foi de  $0,77 \pm 0,81$  e os não reagentes foi de  $1,05 \pm 1,14$  ( $p=0,249$ ).

Tabela 14 - Anticorpos anti-MSP3 do *P. falciparum* de acordo com dados clínicos e epidemiológicos em indivíduos assintomáticos e controles sem infecção de Barcelos (Amazonas), e pacientes de Lubango (Angola) com malária

	Reagente	Não reagente	Total	%	p-valor
<b>Indivíduos com infecção assintomática (Barcelos, AM)</b>					
<b>Gênero (%)</b>					
Feminino	6	3	9	(67)	0,283
Masculino	7	12	19	(37)	
<b>Idade</b>					
Média	25,8	17,5	21,3		0,134
Desvio padrão	13,4	14,9	14,6		
IC95%	17,7 - 34,0	9,2 - 25,7	15,7 - 27,0		
<b>Episódios prévios da doença</b>					
Média	6,9	6,2	6,5		0,564
Desvio padrão	2,8	3,7	3,3		
IC95%	5,2 - 8,6	4,1 - 8,2	5,2 - 7,8		
<b>Pacientes com malária por <i>P. falciparum</i> de Lubango</b>					
<b>Gênero (%)</b>					
Feminino	30	29	59	(51)	0,107
Masculino	13	25	38	(34)	
<b>Idade</b>					
Média	29,8	31,9	31		0,512
Desvio padrão	15,6	15,2	15,3		
IC95%	25,0 - 34,6	27,7 - 36,0	27,9 - 34,6		
<b>Número de sintomas</b>					
Média	4,0	3,9	3,94		0,773
Desvio padrão	2,4	2,2	2,24		
IC95%	3,3 - 4,7	3,3 - 4,5	3,5 - 4,4		
<b>Episódios prévios da doença</b>					
Média	0,77	1,05	0,90		0,249
Desvio padrão	0,81	1,14	0,99		
IC95%	0,517 - 1,02	0,74 - 1,36	0,123 - 0,155		
<b>Parasitemia</b>					
Média	13774	7768	10430		0,266
Desvio padrão	28720	22806	25632		
IC95%	4935 - 22613	1543 - 13993	5264 - 15597		
<b>Controles sadios de Barcelos</b>					
<b>Gênero (%)</b>					
Feminino	4	5	9	(44)	0,735
Masculino	1	2	3	(33)	
<b>Idade</b>					
Média	19	13,4	5,6		0,670
Desvio padrão	12,0	6,6	12,7		
IC95%	-14,4 - 52,4	-2,7 - 29,5	-22,7 - 33,9		

A tabela 11 mostra as correlações entre idade, reatividade, número de malárias prévias e parasitemia nos indivíduos estudados. No grupo de Barcelos com infecção assintomática plasmodial encontramos correlações estatisticamente significativas entre a idade e a reatividade ( $p=0,0424$ , figura 10). Nos indivíduos de Lubango com malária por *P. falciparum*, somente foram encontradas correlações significativas entre a parasitemia e a reatividade anti-MSP3 do *P. falciparum* ( $p=0,0348$ , figura 11).

Tabela 15 - Correlações entre a reatividade anti-MSP3 do *P. falciparum*, a idade, o número relatado de episódios de malária e a parasitemia nos indivíduos reagentes

Variável	r (Spearman)	p-valor
<b>Indivíduos assintomáticos</b>		
Idade	0,3861	<b>0,0424</b>
Nº de episódios prévios de malária	0,1694	0,3889
<b>Pacientes com malária por <i>P. falciparum</i></b>		
Idade	0,0567	0,7180
Nº de episódios prévios de malária	0,0084	0,9573
Parasitemia ( $\mu\text{L}$ )	0,3228	<b>0,0348</b>

Figura 20 - Correlação entre a reatividade anti-MSP3 de *P. falciparum* e a idade nos indivíduos de Barcelos (Amazonas) assintomáticos com infecção plasmodial

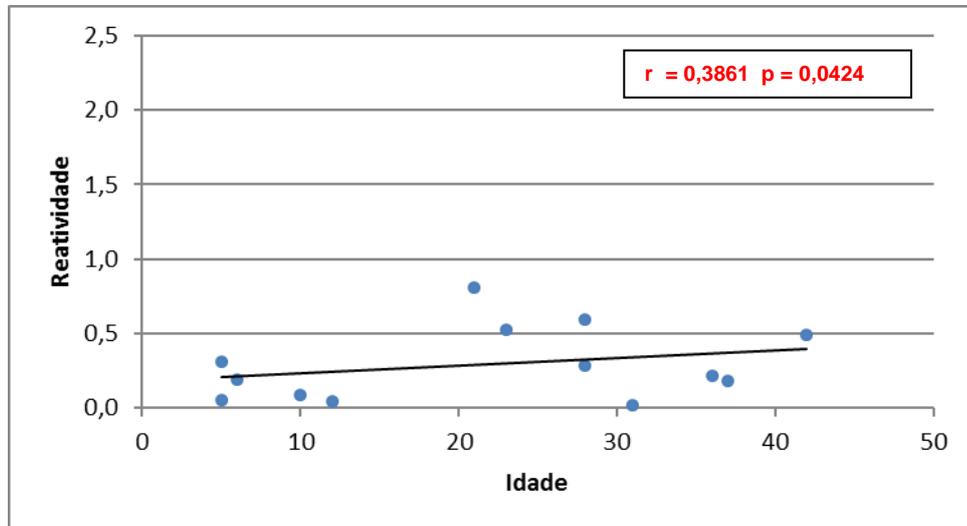
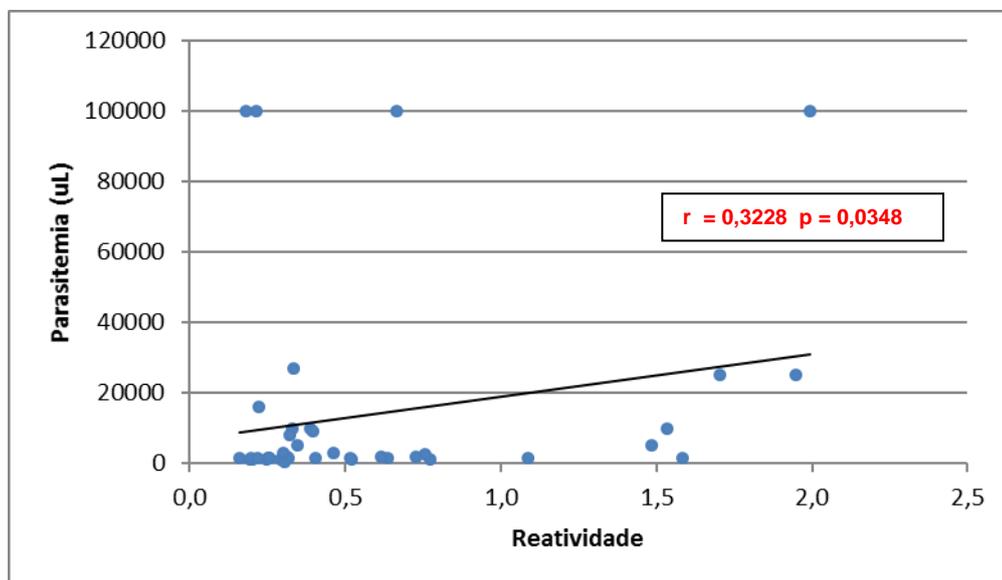


Figura 21 - Correlação entre a reatividade anti-MSP3 de *P. falciparum* e a parasitemia nos indivíduos de Lubango (Angola) com malária por *P. falciparum*



#### 4.8. Anticorpos contra MSP1-19 do *P. vivax*

A tabela 12 mostra que 24 dos 28 (86%) indivíduos com infecção plasmodial assintomática, 2 dos 12 (17%) controles sadios da mesma área e 2 dos 92 (2%) pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum* apresentaram anticorpos contra a MSP1-19 do *P. vivax*.

Observou-se que 14 dos 15 (93%) indivíduos assintomáticos com infecção por *P. vivax* tinham anticorpos anti-MSP1-19 enquanto que 10 dos 13 (78%) indivíduos infectados por *P. falciparum* foram reagentes ( $p=0,03$ ).

Tabela 16 - Frequência de anticorpos anti-MSP1-19 de *P. vivax* em indivíduos de Barcelos (Amazonas) com infecção assintomática ou controles clinicamente sadios da mesma área e em pacientes de Lubango (Angola) com malária

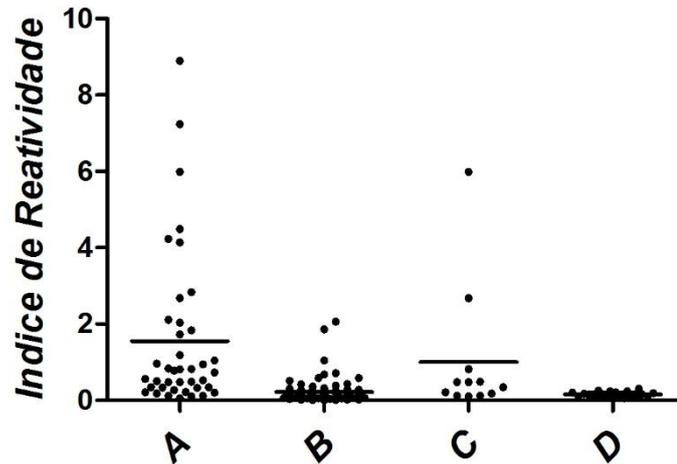
Grupo	Número		Total	(%)
	Reagente	Não reagente		
Indivíduos com infecção assintomática	24	4	28	(86)
Controles sadios	2	10	12	(17)
Pacientes com malária	2	95	97	(2)

O índice médio de reatividade de anticorpos anti-MSP1<sub>19</sub> do *P. vivax* registrado nos indivíduos de Barcelos assintomáticos ( $1,794 \pm 2,117$ , mediana : 0,8950) foi maior do que nos controles da mesma área ( $1,002 \pm 1,722$ , mediana : 0,4150) ( $p=0,031$ ). Da mesma forma, a média de reatividade encontrada nos portadores de infecção assintomática e controles de Barcelos foi significativamente maior do que nos pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum* ( $0,2216 \pm 0,3033$ , mediana : 0,0160) ( $p<0,0001$  e  $p=0,007$ , respectivamente, figura 12).

Notamos também que a média de reatividade anti-MSP1<sub>19</sub> do *P. vivax*, em função da espécie plasmodial infectante, no grupo de indivíduos de Barcelos com infecção assintomática por *P. falciparum* ( $2,514 \pm 2,806$ , mediana : 1,050) ( $p=0,020$ ) ou por *P. vivax* ( $1,169 \pm 1,222$  mediana:0,7800) ( $p=0,1367$ ) foi maior que a média dos controles da mesma área ( $1,002 \pm 1,722$ , mediana : 0,4150). Não encontramos diferenças significativas entre os grupos de indivíduos assintomáticos por *P. falciparum* ou por *P. vivax* ( $p=0,167$ ). O nível de reatividade nos pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum* ( $0,2216 \pm 0,3033$ , mediana : 0,0160)

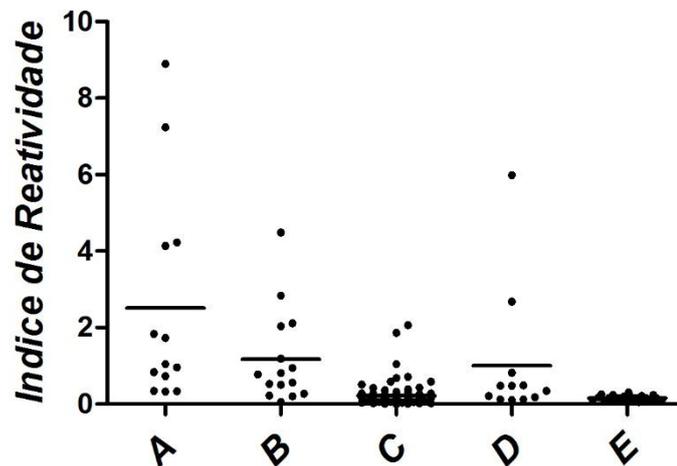
foi menor do que nos indivíduos portadores de infecção assintomática por *P. falciparum* ou por *P. vivax* ( $p < 0,0001$ , figura 13).

Figura 22 - Índice de reatividade de anticorpos anti-MSP1-19 do *P. vivax*



Legenda: (A) indivíduos de Barcelos (Amazonas) com infecção plasmodial assintomática (B), pacientes de Lubango (Angola) com malária por *P. falciparum* (C), indivíduos de Barcelos (Amazonas) sem infecção, nem história pregressa de malária e (D) indivíduos de área não endêmica, Rio de Janeiro

Figura 23 - Índice de reatividade de anticorpos anti-MSP1-19 do *P. vivax*



Legenda: (A) indivíduos de Barcelos (Amazonas) com infecção plasmodial assintomática por *P. falciparum* (B) ou *P. vivax* (C), pacientes de Lubango (Angola) com malária por *P. falciparum*, (D) indivíduos de Barcelos (Amazonas) sem infecção, nem história pregressa de malária (E) e indivíduos de área não endêmica, Rio de Janeiro; em função da espécie plasmodial infectante

#### 4.9. Anticorpos contra MSP1-19 do *P. vivax*, em relação ao gênero, idade e número de episódios prévios relatados de malária

A tabela 17 mostra a distribuição de anticorpos anti- MSP1-19 do *P. vivax* nos diferentes grupos de indivíduos. No grupo de Barcelos com infecção assintomática, oito mulheres (89%) e 16 homens (84%) foram reagentes. A diferença da média de idade entre os indivíduos reagentes ( $23,3 \pm 14,8$  anos) e os não reagentes ( $9,5 \pm 3,1$ ) foi significativa ( $p = 0,0004$ ) e a média de episódios prévios relatados de malária foi de  $6,9 \pm 4,5$  nos reagentes e  $4,5 \pm 4,3$  nos não reagentes ( $p = 0,36$ ).

Não foram encontradas diferenças significativas na idade e nem na distribuição por gênero entre os indivíduos controles reagentes e não reagentes.

Tabela 17 - Anticorpos MSP1-19 do *P. vivax* em função de variáveis clínicas e epidemiológicas em indivíduos assintomáticos e controles de Barcelos (Amazonas) sem infecção e pacientes de Lubango (Angola) com malária

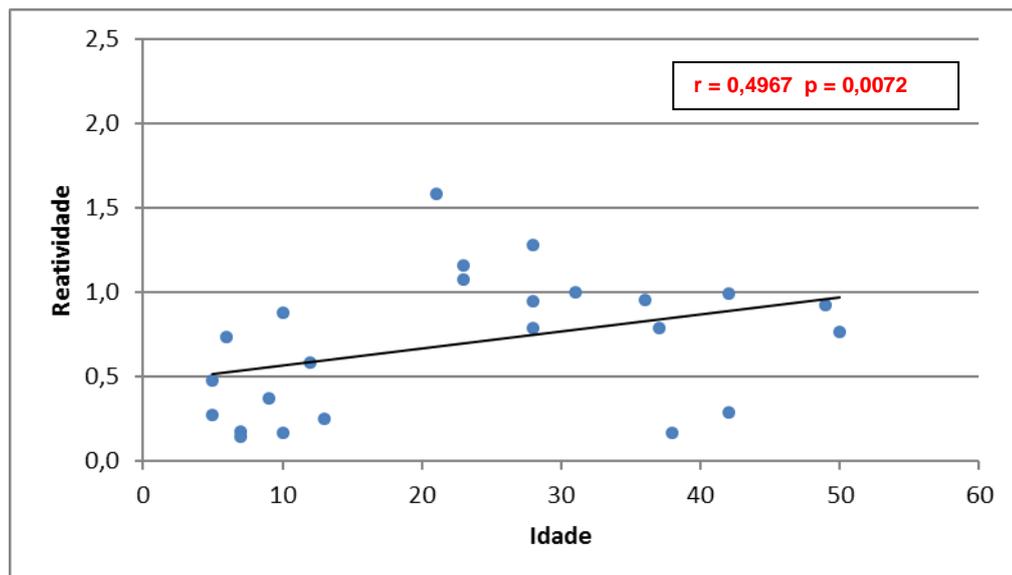
	Reagente	Não reagente	Total	%	p-valor
<b>Indivíduos com infecção assintomática (Barcelos, AM)</b>					
<b>Gênero (%)</b>					
Feminino	8	1	9	(88,9)	0,804
Masculino	16	3	19	(84,2)	
<b>Idade</b>					
Média	23,3	9,5	21,3		<b>0,0004</b>
Desvio padrão	14,8	3,1	14,6		
IC95%	17,0-29,6	4,5-14,4	15,7-27,0		
<b>Episódios prévios da doença</b>					
Média	6,9	4,5	6,5		0,361
Desvio padrão	3,1	4,3	3,3		
IC95%	5,6-8,2	1,2-11,4	5,2-7,8		
<b>Controles sadios de Barcelos</b>					
<b>Gênero (%)</b>					
Feminino	6	3	9	(66,7)	0,735
Masculino	1	2	3	(33,3)	
<b>Idade</b>					
Média	24	4,2	19,8		0,107
Desvio padrão	9,3	0,7	11,2		
IC95%	1,2-46,8	2,2-6,2	-5,1-44,7		

A tabela 18 ilustra as correlações entre a reatividade anti-MSP1-19 de *P. vivax*, idade e número de episódios prévios de malária referidos. Somente entre os indivíduos assintomáticos encontramos correlações significativas entre a idade e a reatividade ( $p = 0,0072$ , figura 14).

Tabela 18 - Correlações entre a reatividade anti-MSP1-19 de *P. vivax*, a idade e o número de episódios prévios de malária nos indivíduos reagentes

Variável	r (Spearman)	p-valor
<b>Indivíduos assintomáticos</b>		
Média de idade	0,4967	<b>0,0072</b>
Nº médio de episódios prévios de malária	0,1347	0,4943

Figura 24 - Correlação entre a reatividade anti-MSP1-19 do *P. vivax* e a idade nos indivíduos de Barcelos (Amazonas) assintomáticos com infecção plasmodial



## 5. DISCUSSÃO

A GPI do *Plasmodium falciparum* é um fosfolípídeo liberado pelo parasito após a lise de eritrócitos infectados durante o ciclo eritrocítico. Sendo um potente ativador de macrófago, essa toxina é capaz de induzir a produção de citocinas pro-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1, no hospedeiro. As manifestações clínicas resultantes da produção e da liberação desses mediadores inflamatórios em resposta à GPI são usualmente típicas da doença (febre, calafrios, sudorese intensa) e da toxemia que acompanha a septicemia por bactérias GRAM negativas. Estas, dotadas de lipopolissacarídeos (LPS) (igualmente ativador de macrófago) em sua constituição, causam sintomatologia compatível com a de liberação de citocinas inflamatórias em grande concentração (Van Amersfoort *et al.*, 2003). No caso da malária, as manifestações clínicas podem, inclusive, se acompanhar de complicações graves como a anemia e a malária cerebral (Schofield *et al.*, 1993) de cuja gênese, a síntese exagerada de citocinas inflamatórias também participa. Schofield (1993) demonstrou que é possível induzir febre em camundongos através da administração da GPI do *P. falciparum*, e estudos *in vivo* e *in vitro* confirmaram que a indução de febre está associada à produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 por células mononucleares e que anticorpos monoclonais contra a GPI podem neutralizar a produção de TNF- $\alpha$ .

Estudos realizados em áreas de elevada transmissão, na África e Ásia (Naik *et al.*, 2000; de Souza *et al.*, 2002; Keenihan *et al.*, 2003), indicam que indivíduos assintomáticos ou paucissintomáticos apresentam intensa resposta de anticorpos anti-GPI, cujos níveis parecem estar relacionados ao grau de proteção contra as manifestações clínicas (febre, anemia) e refletir a imunidade clínica da doença. Assim, compreende-se que anticorpos anti-GPI sejam apontados como um dos indicadores e, possivelmente, mediadores da imunidade “anti-doença” e que diversos estudos venham focando o papel protetor de tais anticorpos, considerando a hipótese de que eles possam neutralizar os efeitos tóxicos da GPI do parasito.

O presente trabalho foi desenhado com o intuito de investigar se a resposta imune anti-GPI, tradicionalmente associada à proteção clínica em indivíduos africanos provenientes de áreas hiper ou holoendêmicas de malária, também refletiria imunidade clínica em uma área de alto risco de transmissão, na Amazônia Brasileira.

Para isso, selecionamos indivíduos infectados por *P. falciparum* e *P. vivax* e assintomáticos ou paucissintomáticos de Barcelos, um município mesoendêmico para a malária, situado no estado do Amazonas com IPA de 70,4 casos por mil habitantes (alto risco

de transmissão), assim como indivíduos controles da mesma região que declararam não terem tido episódios prévios de malária. Comparativamente, estudamos pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum*, uma área mesoendêmica instável para a doença, com IPA estimado em superior a 100 casos por mil habitantes em Angola; e indivíduos do Laboratório de Pesquisas em Malária / IOC – Fiocruz no Rio de Janeiro nunca expostos à infecção. Para este fim, utilizamos uma metodologia de extração de GPI tradicionalmente conhecida por manter a estrutura requerida para o reconhecimento da molécula nativa (Naik *et al.*, 2006; Berhe *et al.*, 1999).

Uma primeira constatação, surpreendente, foi o fato de que a frequência de anticorpos anti-GPI nos indivíduos de Barcelos assintomáticos, aparentemente com imunidade clínica, não foi diferente daquela observada nos controles da mesma área (declaradamente sem infecção nem história prévia de malária)( $p=0,605$ ). Tal observação contrasta com o fato de que, em pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum*, e possivelmente sem imunidade clínica, a frequência de anticorpos anti-GPI foi elevada. A produção desses anticorpos, baixos em indivíduos infectados e assintomáticos, de Barcelos, uma área de elevado risco de transmissão no Brasil, e altos em pacientes de Lubango com malária clínica e provenientes de uma região igualmente de mesoendemicidade, não parecem confirmar o conceito já previamente estabelecido de que anticorpos anti-GPI refletem imunidade clínica.

Cabe lembrar aqui, que, embora ambas as áreas estudadas possam ser consideradas de alto risco ( $IPA > 49$  e  $< 593$ ), Angola teve em 2011 cerca de 13 vezes mais malária do que o Brasil (3.500.000 casos versus 263.000). Quase paradoxalmente, os indivíduos com malária (doença) provém da área de maior risco de transmissão e conseqüentemente, na qual, teoricamente eles seriam menos protegidos sob o ponto de vista imunológico do que aqueles de Barcelos que estão assintomáticos embora infectados, situação que evoca em princípio a existência de um estado de premunição (imunidade clínica).

Apesar da produção de anticorpos anti-GPI nos indivíduos de Barcelos assintomáticos ter sido baixa, a reatividade parece estar associada à idade ( $p=0,03$ ). Já nos pacientes de Lubango com malária, a reatividade não se apresentou relacionada com a idade, mas sim com a parasitemia ( $p=0,01$ ). Tais dados parecem indicar que a resposta imune anti-GPI em indivíduos de Barcelos assintomáticos estaria associada à exposição repetida e crônica (que acompanha a progressão da idade) e que, por outro lado, em pacientes maláricos de Lubango, nos quais possivelmente a imunidade clínica inexistia ou tenha falhado (todos os indivíduos estavam sintomáticos), esta resposta estaria sendo reforçada pela exposição ao parasito durante a infecção aguda presente. Embora não tenhamos encontrado relação entre a resposta

anti-GPI e a proteção clínica, a correlação entre a resposta e a idade parece ir no mesmo sentido da observação de outros autores em áreas de elevada transmissão de malária nas quais residentes adultos expostos frequentemente à doença, adquirem anticorpos anti-GPI progressivamente com a idade (Boutlis *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2010). Do mesmo modo Naik e colaboradores (2000), em um estudo no Quênia, observaram que a prevalência e a concentração de anticorpos anti-GPI entre crianças e adultos, aumentava durante a infância e a adolescência e atingia o pico máximo na idade adulta. Por outro lado, também já foi observado que, em caso de malária aguda, os níveis produzidos desses anticorpos são mais elevados e estão diretamente associados à parasitemia (Boutlis *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2002; Yacouba *et al.*, 2006), tal qual observado em nossos pacientes de Lubango.

Não obstante, permaneceria a ser demonstrado que o grupo de indivíduos de Barcelos assintomáticos, selecionados para o presente estudo justamente em função da inexistência ou escassez de sintomas, efetivamente representa uma população com imunidade clínica.

A possibilidade de avaliarmos a resposta imune dos indivíduos estudados frente a outros antígenos plasmodiais nos permitiu aprofundar o estudo do padrão de respostas dos diferentes grupos de indivíduos e avançar na estimativa, ao menos aproximada, da condição deles em termos de exposição / imunidade. Assim, procurou-se buscar informações ilustrativas do real status de clinicamente “imunes” dos indivíduos de Barcelos assintomáticos, assim como do de “desprotegidos”, ainda que temporariamente, sob este ponto de vista, para os pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum*.

Inicialmente, buscamos estudar a experiência prévia dos indivíduos de Barcelos assintomáticos em termos de contato com o parasito. Para isso, avaliamos a resposta imune frente ao antígeno total de *P. falciparum* (obtido em presença do detergente Zwittergent®, Pf-Zw), comparando a resposta obtida com a registrada em indivíduos controles da mesma área e nos pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum*.

A frequência de anticorpos anti-antígeno total de *P. falciparum* foi de 96% nos indivíduos assintomáticos de Barcelos e de 50% nos controles da mesma área, que relataram não terem tido episódios anteriores de malária ( $p=0,006$ ), indicando que os indivíduos assintomáticos tiveram contato prévio com o parasito em intensidade ou quantidade maior do que os controles.

Um ponto que merece ser discutido está relacionado à dificuldade em atribuir a condição de “controle” a indivíduos de área endêmica unicamente em função da informação, fornecida através do questionário livre e esclarecido, de que nunca tiveram malária. Como se trata de uma resposta anticorpo contra as formas sanguíneas do parasito, a interpretação

cabível é a de que não só os indivíduos foram picados por mosquitos infectados, mas também que os esporozoítos inoculados evoluíram até as formas pré-eritrocíticas hepáticas e que estas deram origem a formas sanguíneas em quantidade e tempo suficiente para gerar uma resposta imune específica, contra estas. As chances de que tais eventos tenham ocorrido em indivíduos que não se recordam de terem tido episódios clínicos anteriores de malária são de fato restritas. Podemos, então, considerar que; ou as informações fornecidas por esses indivíduos não correspondem à realidade dos fatos, ou que outras razões existam para a produção destes anticorpos, por exemplo, a existência de reações cruzadas com outros microorganismos (Elm et al., 1998; Fonseca et al., 2000).

Pacientes de Lubango com malária por *P. falciparum* apresentaram uma frequência de anticorpos anti-antígeno total de *P. falciparum* de 70%. Os 30% não reagentes, diagnosticados com malária (sintomas clínicos) e confirmados por gota espessa, podem indicar que, em alguns casos, anticorpos não foram detectados nos primeiros dias da doença por ausência de tempo hábil para a produção de resposta anticorpo. Neste caso, entretanto, teríamos que considerar também que esses pacientes corresponderiam a casos de primoinfecção (Coelho *et al.*, 2007; Kitchen & Chiodini, 2006; Slinger *et al.*, 2001).

Os anticorpos produzidos no grupo de indivíduos de Barcelos assintomáticos mostraram-se associados à idade ( $p=0,0043$ ), enquanto que nos pacientes de Lubango com malária a reatividade anti-antígeno total estava mais uma vez relacionada à parasitemia ( $p=0,0043$ ).

Esses resultados sugerem que também na Amazônia Brasileira, em um cenário de provável elevada transmissão, a reatividade contra o antígeno total de *P. falciparum* em indivíduos assintomáticos pode estar relacionada aos repetidos episódios prévios de malária, que se acumulam com o passar do tempo, como observado em áreas endêmicas na África, onde a resposta imune aumenta em função da idade e, conseqüentemente, da exposição ao parasito e acompanha o desenvolvimento da imunidade clínica (Baird et al., 1995; Trape et al., 1994; Druilhe & Perignon, 1997; Struik et al., 2004; Smith et al., 1999a, 1999b). No nosso estudo, parece haver uma tendência de correlação entre anticorpo e número de episódios prévios de malária, contudo nossos dados não atingiram significância estatística. Baird et al (1991 e 1993) constataram também na Indonésia através de um estudo epidemiológico realizado em uma área de intensa transmissão, que a proteção contra a doença aumentava conforme a idade após a exposição repetida ao parasito.

Outro antígeno do *P. falciparum* testado com o intuito de avaliarmos o grau de exposição / imunidade dos indivíduos concernidos por este estudo foi a Proteína-3 de

Superfície do Merozoíto (Merozoite Surface Protein-3, MSP3). Localizada no domínio C - terminal do *P. falciparum* com características altamente conservadas entre isolados provenientes de diferentes regiões geográficas (Huber *et al.*, 1997; McColl *et al.*, 1997), a MSP3 é sintetizada no estágio de esquizonte e então liberada no vacúolo parasitóforo no qual sofre processamento proteolítico. Alguns dos fragmentos parecem estar associados à superfície do merozoíto, mas a maioria é liberada no sobrenadante de culturas *in vitro* após a ruptura do esquizonte (McColl *et al.*, 1994). Estudos conduzidos em indivíduos residentes em áreas endêmicas, e frequentemente expostos à infecção, indicam que os níveis desses anticorpos aumentam com a idade e estão associados à proteção clínica que surge como resultado do contato intenso e duradouro durante os períodos de transmissão (Oeuvray *et al.*, 1994; Segeja *et al.*, 2010). Outro estudo demonstrou que a aquisição de anticorpos contra a MSP3 do *P. falciparum*, em indivíduos provenientes de uma região endêmica de malária na Tanzânia, que aumentava conforme a idade e a exposição cumulativa ao parasito, possivelmente, estaria refletindo a maturação do sistema imune (Soe *et al.*, 2001; Doodoo *et al.*, 2008).

A frequência de anticorpos anti-MSP3 de *P. falciparum* entre assintomáticos (46%) ou controles de Barcelos (42%) e pacientes com malária de Lubango (44%) foi similar. A presença desses anticorpos nos indivíduos assintomáticos infectados por *P. falciparum* (69%) foi maior do que nos assintomáticos infectados por *P. vivax* (27%)( $p=0,02$ ), embora não significativamente maior do que nos controles de área (42%)( $p=0,7426$ ). Cabe ressaltar, que esta frequência de anticorpos para o antígeno anti-MSP3 em indivíduos controles (que negam episódios prévios de malária) é tão surpreendente quanto aquela de 50% registrada para os anticorpos contra o antígeno total. A produção de anticorpos anti-MSP3 nos indivíduos de Barcelos assintomáticos mostrou-se mais uma vez correlacionada à idade, ao contrário de nos pacientes de Lubango com malária, nos quais a associação ocorreu mais uma vez com a parasitemia.

Faz todo o sentido a reatividade e a frequência de Ac anti-MSP3, maior nos assintomáticos infectados por *P. falciparum* do que nos infectados por *P. vivax*. De fato, a MSP3 é um antígeno específico do *P. falciparum*, que no presente estudo, está cumprindo seu papel de refletir uma maior resposta imune nos assintomáticos infectados por *P. falciparum* do que naqueles infectados por *P. vivax* que, possivelmente, tenham tido (declaradamente tiveram) contato prévio com o *P. falciparum*. Nos pacientes maláricos de Lubango, essa reatividade anti-MSP3 parece ser reforçada pela exposição aguda ao plasmódio, refletida na associação observada com a parasitemia. Tais resultados também sugerem que a produção de

anticorpos anti-MSP3 em indivíduos assintomáticos estaria relacionada à exposição prévia repetida ao *P. falciparum* que acompanha a idade e, em pacientes com malária de Lubango, estaria relacionada à parasitemia, como observado com a GPI e o antígeno total, ambos de *P. falciparum*.

Estudamos, finalmente, a resposta contra um antígeno específico de *P. vivax*, a MSP1-19 que é sintetizada pelo esquizonte como um precursor de 190 kDa e, no final da esquizogonia, sofre clivagem proteolítica originando, pelo menos, quatro polipeptídeos de diferentes tamanhos que se associam à superfície do parasito (Holder *et al.*, 1992). Vários autores tem sugerido associações entre a presença de anticorpos anti-MSP1-19 do *P. vivax* e proteção contra a malária clínica por esta espécie (Branch *et al.*, 1998; Doodoo *et al.*, 2008; Stanistic *et al.*, 2009). Além disso, foi observado também que a MSP1-19 é considerada uma proteína altamente imunogênica durante a infecção natural em humanos pelo *P. vivax* (Soares *et al.*, 1997; Soares *et al.*, 1999). De fato, estudos prévios mostraram que a MSP1-19 recombinante foi reconhecida por anticorpos de indivíduos expostos à infecção por *P. vivax* e provenientes de diferentes regiões do Brasil (Soares *et al.*, 1997). Outra observação importante que confirma as capacidades antigênica e imunogênica desse antígeno foi feita em um estudo realizado na Coreia, onde mais de 90% dos indivíduos infectados pelo *P. vivax* produziram anticorpos específicos contra a MSP1-19 (Park *et al.*, 2001).

Nosso objetivo ao utilizarmos a MSP1-19 do *P. vivax* como alvo da resposta imune avaliada nos indivíduos que integram os diferentes grupos de estudo neste trabalho, foi a de medir a experiência prévia deles com o *P. vivax*, já que no Brasil essa espécie plasmodial é responsável por 80% dos casos registrados, e, portanto a real exposição ao risco de infecção por plasmódios.

A frequência de anticorpos anti-MSP1-19 do *P. vivax* foi alta (86%) nos indivíduos de Barcelos assintomáticos, uma área onde, no ano do estudo 67% dos casos eram devidos ao *P. vivax*. A reatividade anti-MSP1-19 do *P. vivax* nos indivíduos de Barcelos assintomáticos foi maior do que nos controles da mesma área (17%) e, da mesma forma, do que nos pacientes de Lubango (2%). Como esperado, a frequência da resposta contra a anti-MSP1-19 do *P. vivax* foi maior nos assintomáticos infectados por *P. vivax* (93%) do que nos infectados por *P. falciparum* (78%)( $p=0,03$ ). A presença desses anticorpos nos indivíduos assintomáticos de Barcelos mostrou-se associada à idade ( $p=0,0004$ ). Também cabe enfatizar a elevada frequência de positividade anti-MSP1-19 do *P. vivax* nos indivíduos assintomáticos. Tal observação, poderia se explicar pela prevalência, superior a 80%, de casos de malária por infecção pelo *P. vivax* no Brasil (Oliveira-Ferreira, 2010) e de 67% no ano de estudo na

região de Barcelos (SVS, 2008) e que mesmo indivíduos assintomáticos com infecção por *P. falciparum* tiveram provavelmente infecções anteriores por *P. vivax*. Um segundo aspecto digno de nota foi a baixa frequência de indivíduos positivos entre os controles da área de Barcelos, o que parece validar a MSP1-19 do *P. vivax*, mais do que os outros antígenos testados, como indicador de contato prévio com antígenos parasitários e, de certa forma, resgatar a credibilidade das informações colhidas dos indivíduos selecionados como controles. Evidentemente, é importante lembrar que a MSP1-19 foi o único antígeno do *P. vivax* estudado nesse trabalho embora, como já dito anteriormente, a prevalência predominante seja de casos de malária por *P. vivax* em nosso meio. Também é esperada a muito baixa positividade em pacientes com malária por *P. falciparum* de Lubango, onde sabidamente a infecção por *P. vivax* é rara (7%; Angola Malaria Indicator Survey 2006-2007, Slinger et al, 2001), como constatado num estudo com a MSP1-19 do *P. vivax* em pacientes africanos expostos naturalmente ao *P. falciparum* no qual não foram detectados anticorpos contra este antígeno (Rodrigues et al, 2003).

Em suma, a frequência de anticorpos anti-GPI foi baixa nos indivíduos de Barcelos com infecção assintomática pelo plasmódio, enquanto que em pacientes de Lubango com malária (doença clínica), nos quais a imunidade clínica antimalárica não existiria ou teria falhado, esta frequência foi elevada. Todo o trabalho evoluiu no sentido de indicar que a resposta anti-GPI e aquelas direcionadas a outros antígenos plasmodiais nos indivíduos assintomáticos aumenta progressivamente com a idade e mostra-se com tendência a acompanhar o número de crises passadas (embora associações significativas não tenham sido encontradas), enquanto que nos pacientes com malária essa resposta parece estar associada à exposição aguda, uma vez que está correlacionada com a parasitemia.

Embora sejam bastante intuitivos, os dados apresentados aqui, não permitem inferir que a ausência ou paucidade de sintomas dos indivíduos de Barcelos com infecção plasmodial (detectada por métodos moleculares) decorra de imunidade clínica protetora ou resulte da própria dinâmica de transmissão do parasito em uma população que se encontra exposta ao risco de infecção de forma perene.

Assim, tomados no seu conjunto, os dados deste trabalho sugerem que a resposta imune anti-GPI não refletiria com grande precisão a imunidade clínica que supostamente justificaria a infecção assintomática dos indivíduos de Barcelos. Por outro lado, a resposta dirigida contra a MSP1-19 do *P. vivax*, parece ser um bom indicador de exposição prévia e repetida à infecção pelo parasito desta espécie. Entretanto, novos estudos com uma melhor caracterização do que sejam casos de infecção assintomática e controles não expostos à

infecção, assim como, contendo um número maior de indivíduos, parecem ser necessários para que o conhecimento nessa área possa avançar.

### **Perspectivas**

Realizar estudos com um maior número de indivíduos, devidamente caracterizados (quanto aos aspectos parasitológico, molecular, clínico e epidemiológico) como portadores assintomáticos de plasmódios e controles de área nunca expostos à infecção; em áreas de alto risco de transmissão na Amazônia brasileira e na África subsaariana ;

Avaliar a resposta anti-GPI no modelo simiano representado pela infecção de primatas neo-tropicais *Saimiri sciureus* ou *Aotus infulatus* em animais imunizados por infecções repetidas ou com formulações potencialmente vacinais.

## CONCLUSÕES

- a) A presença de anticorpos anti-GPI não foi maior nos portadores assintomáticos de plasmódio do que nos controles sem infecção nem história prévia de malária de Barcelos ;
- b) embora observados em baixa frequência, os anticorpos anti-GPI nos portadores assintomáticos de plasmódio de Barcelos estavam correlacionados com a idade e, portanto, possivelmente com a exposição prévia repetida a antígenos plasmodiais ;
- c) a resposta imune contra outros antígenos de fase eritrocítica do *Plasmodium*, estudada na tentativa de caracterizar a exposição prévia ou aguda (durante a infecção) à infecção plasmodial, parece apresentar o mesmo padrão de correlação com a idade nos assintomáticos ;
- d) uma correlação entre as frequências e/ou reatividades de anticorpos e a idade em uma população autóctone de área endêmica parece apontar para uma associação de resposta imune com o número de crises passadas de malária, uma tendência claramente observada em nosso estudo, embora tal associação não tenha atingido significância estatística ;
- e) contrariamente à resposta anti-GPI, aquela contra outros antígenos parasitários de forma sanguínea foi maior nos indivíduos assintomáticos (expostos cronicamente à infecção) do que nos pacientes com malária clínica de Lubango (teoricamente, desprotegidos sob o ponto de vista imunológico) para os antígenos total de *P. falciparum* e MSP1-19 de *P. vivax* ;
- f) parece que a MSP1-19 de *P. vivax* poderia representar um bom antígeno para refletir exposição prévia ao plasmódio, sobretudo em uma região onde esta espécie é responsável por 80% dos casos registrados, e deu credibilidade à informação obtida dos controles de área no nosso trabalho ;
- g) a resposta anti-GPI não parece ser um bom indicador de exposição crônica a material parasitário, nem, tampouco, refletir a imunidade clínica que, justificaria a inexistência de sintomas dos indivíduos de Barcelos.

## REFERÊNCIAS

- Alves FP; Durlacher RR, Menezes MJ; Krieger H; Silva LHP; Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian population. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v. 66, p. 641-648, 2002.
- Aly AS, Vaughan AM, Kappe SH. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. Annu Rev Microbiol. v 63:195-221, 2009.
- Anders RF, McColl DJ, Coppel RL. Molecular variation in *Plasmodium falciparum*: polymorphic antigens of asexual erythrocytic stages. Acta Trop. v.53(3-4):239-53, 1993.
- Angola Malária Indicator Survey 2006-2007.
- Arévalo-Herrera M, Chitnis C, Herrera S. Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. Hum Vaccin 6: 124-32, 2010.
- Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Basri H, Purnomo, Masbar S. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol.45(1): 65-76, 1991.
- Baird JK, Purnomo, Basri H, Bangs MJ, Andersen EM, Jones TR, Masbar S, Harjosuwarno S, Subianto B, Arbani PR. Age-specific prevalence of *Plasmodium falciparum* among six populations with limited histories of exposure to endemic malaria. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol.49(6): 707-19,1993.
- Baird JK; Host. Age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* Parasitology Today, v. 11(3), p. 105-111, 1995.
- Baird JK; Masbar S; Basri H; Tirtokusumo S; Subianto B; Hoffman SL. Age-dependent susceptibility to severe disease with primary exposure to *Plasmodium falciparum*. The Journal of Infectious Diseases. v. 178(2), p. 592-5, 1998.
- Baker DA. Malaria gametocytogenesis. Molecular and Biochemical Parasitology, vol.172(2):57-65, 2010.
- Baumeister S, Winterberg M, Przyborski JM, Lingelbach K. The malaria parasite *Plasmodium falciparum*: cell biological peculiarities and nutritional consequences. Protoplasma, vol.240(1-4):3-12, 2010.
- Berhe S, Schofield L, Schwarz RT, Gerold P. Conservation of structure among glycosylphosphatidylinositol toxins from different geographic isolates of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. v.15;103(2):273-8, 1999.
- Blackman MJ, Heidrich H, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. Journal of Experimental Medicine, v.172, p.379-382, 1990.

Blackman MJ, Ling IT, Nicholls SC, Holder AA. Proteolytic processing of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. *Mol Biochem Parasitol.* v.49(1):29-33,1991.

Blackman MJ, Whittle H, Holder AA. Processing of the Plasmodium falciparum major merozoite surface protein-1: identification of a 33-kilodalton secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. *Mol Biochem Parasitol.* v.49(1):35-44, 1991

Boutlis CS, Gowda DC, Naik RS, Maguire GP, Mgone CS, Bockarie MJ, Lagog M, Ibam E, Lorry K, Anstey NM. Antibodies to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositols: inverse association with tolerance of parasitemia in Papua New Guinean children and adults. *Infection and Immunity.* v.70(9): 5052-7, 2002.

Boutlis CS, Gowda DC, Naik RS, Maguire GP, Mgone CS, Bockarie MJ, Lagog M, Ibam E, Lorry K, Anstey NM. Antibodies to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositols: inverse association with tolerance of parasitemia in Papua New Guinean children and adults. *Infect Immun.* V.;70(9):5052-7, 2002.

Braga EM, Barros RM, Reis TA, Fontes CJ, Morais CG, Martins MS, Krettli AU: Association of the IgG response to Plasmodium falciparum merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* vol.66:461-466, 2002.

Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL, Bloland PB, Kaslow DC, LAL AA. A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-KDa domain of Plasmodium falciparum in pregnant woman and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* v.58, p.211- 219, 1998.

Clark IA; Budd AC; Alleva LM; Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria Journal,* v. 10 p. 5:85, 2006.

Coelho JS, Soares IS, Lemos EA, Jimenez MC, Kudó ME, Moraes SL, Ferreira AW, Sanchez MC. A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous detection of malaria, Chagas disease, and syphilis-specific IgG antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* v.;58(2):223-30. Epub 2007 Feb 14, 2007.

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. *Clinical Infectious Diseases.* vol.46:165–71, 2008.

Cox-Singh J, Mahayet S, Abdullah MS, Singh B. Increased sensitivity of malaria detection by nested polymerase chain reaction using simple sampling and DNA extraction. *Int J Parasitol.* v.27(12):1575-7, 1997.

Crompton PD, Pierce SK and Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. *The Journal of Clinical Investigation,* v.120:12, 2010.

Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine*. V.12;20(3-4):385-96, 2001.

Dahlström S. Role of pfATP6 and pfMRP1 in *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs. Stockholm: Karolinska Institute, 2009.

Daniel-Ribeiro CT, Lacerda MV, Oliveira-Ferreira J. *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: some aspects of its epidemiology, clinical spectrum and naturally induced immune responses. *Bull Soc Pathol Exot*, vol.101(3):243-8, 2008.

Del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.1;88(9):4030-4, 1991.

de Souza JB, Runglall M, Corran PH, Okell LC, Kumar S, Gowda DC, Couper KN, Riley EM. Neutralization of malaria glycosylphosphatidylinositol in vitro by serum IgG from malaria-exposed individuals. *Infection and Immunity*. v.78(9): 3920-9, 2010.

de Souza JB, Todd J, Krishegowda G, Gowda DC, Kwiatkowski D, Riley EM. Prevalence and boosting of antibodies to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols and evaluation of their association with protection from mild and severe clinical malaria. *Infect Immun*. v.;70(9):5045-51, 2002.

Dodoo D, Aikins A, Kusi KA, Lamptey H, Remarque E, Milligan P, et al: Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. *Malaria Journal*, vol.7:142, 2008.

Doolan DL; Hoffman SL. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. *Journal of Immunology*. v. 1:165(3): 1453-62, 2000.

Druilhe P; Perignon JL. A Hypothesis about the chronicity of malaria infection. *Parasitology Today* 13:353-357, 1997.

Elm J, Desowitz R, Diwan A. Serological cross-reactivities between the retroviruses HIV and HTLV-1 and the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *P N G Medical Journal*. vol.41(1):15-22, 1998.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. vol.226(1):497-509, 1957.

Fonseca MO, Pang L, de Avila Sdo L, Arruk VG, Tozetto-Mendoza TR, Ferreira AW, Saes-Alquezar A, Boulos M. Cross-reactivity of anti-*Plasmodium falciparum* antibodies and HIV tests. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.94(2):171-2, 2000.

Fontes CJF. Epidemiologia da Malaria e Fatores Associados à Infecção Assintomática por *Plasmodium* em uma População de Garimpeiros da Amazônia Brasileira (Mato Grosso, 1996), PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

Freeman RR, Holder AA. Characteristics of the protective response of BALB/c mice immunized with a purified *Plasmodium yoelii* schizont antigen. *Clin Exp Immunol.* v.54(3):609-16. 1983.

Gama BE, Silva-Pires FE, Lopes MN, Cardoso MA, Britto C, Torres KL, de Mendonça Lima L, de Souza JM, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz Mde F. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol.* 2007 Aug;116(4):427-32, 2007 .

Garcia LS. Malaria. *Clin Lab Med*, vol.30(1):93-129, 2010.

Gowda DC. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol*, v.(23), 12, 596-604, 2007. Review

Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. *Immunol Rev* 240: 297-316, 2011.

Haldar K, Henderson CL, and Cross GAM. Glycolipid anchorage of *Plasmodium falciparum* surface antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v: 83:8565–8569, 1986.

Holder AA, Blackman MJ, Burghaus PA, Chappel JA, Ling IT, Mccallum-Deighton N, Shai S. A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.87, p.37-42, 1992.

Holder AA, Freeman RR. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. *J Exp Med.* v.1;156(5):1528-38,1982.

Huber W, Felger I, Matile H, Lipps HJ, Steiger S, Beck HP. Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3. *Mol Biochem Parasitol.* v.87(2):231-4, 1997.

Intituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2011.

Keenihan SN, Ratiwayanto S, Soebianto S, Krisin, Marwoto H, Krishnegowda G, Gowda DC, Bangs MJ, Fryauff DJ, Richie TL, Kumar S, Baird JK. Age-dependent impairment of IgG responses to glycosylphosphatidylinositol with equal exposure to *Plasmodium falciparum* among Javanese migrants to Papua, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* v.;69(1):36-41, 2003.

Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. *Vox Sanguinis* vol.90:77– 84, 2006.

Koning-Ward TF, O`Donnell RA, Drew DR, Thomson R, Speed TP, Crabb BS. A new rodent model to assess blood stage immunity to the *Plasmodium falciparum* antigen merozoite surface protein 119 reveals a protective role for invasion inhibitory antibodies. *J. Exp. Med.*, v.198, p.869-875, 2003.

Kun JFK; Missinou MA; Lell B; Sovric M; Knoop H; Bojowald B; Dangelmaier O; Kremsner P. New emerging *Plasmodium falciparum* genotypes in children during the transition phase from asymptomatic parasitemia to malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* v. 66: 653-658, 2002.

Lambros C; Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *Journal of Parasitology*. v. 65(3), p. 418-20, 1979.

Ling IT, Ogun AS, Holder AA. Immunization against malaria with a recombinant protein. *Parasite Immunology*, v.16, p.63-67, 1994.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. V.193(1):265-75, 1951.

Malaguarnera L; Musumeci S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infectious Diseases*. v. 2(8):472-8, 2002. Review.

Malkin E, Long CA, Stowers AW, Zou L, Singh S, MacDonald NJ, Narum DL, Miles AP, Orcutt AC, Muratova O, Moretz SE, Zhou H, Diouf A, Fay M, Tierney E, Leese P, Mahanty S, Miller LH, Saul A, Martin LB. Phase 1 study of two merozoite surface protein 1 (MSP142) vaccines for *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Clinical Trials*, v.2, e12, 2007.

Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol* 28: 51-60, 2006.

McBride JS, Heidrich HG. Fragments of the polymorphic Mr 185 000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol.23(1), 71–84, 1987.

McCull DJ, Anders RF. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). *Mol Biochem Parasitol*. v.1;90(1):21-31, 1997.

McCull DJ, Silva A, Foley M, Kun JF, Favaloro JM, Thompson JK, Marshall VM, Coppel RL, Kemp DJ, Anders RF. Molecular variation in a novel polymorphic antigen associated with *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol*. v.68(1):53-67, 1994.

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415: 673-679, 2002.

Miller LH, Roberts MT, Mc- Cutchan TF. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol. Biochem. Parasitol*. 59:1–14, 1993.

Naik RS; Branch OH; Woods AS; Vijaykumar M; Perkins DJ; Nahlen BL; Lal AA; Cotter RJ; Costello CE; Ockenhouse CF; Davidson EA; Gowda DC. Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *Journal Experimental Medicine*. v. 4;192(11):1563-76, 2000.

Naik RS; Krishnegowda G; Ockenhouse CF; Gowda, DC Naturally elicited antibodies to glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of *Plasmodium falciparum* require intact GPI structures for binding and are directed primarily against the conserved glycan moiety. *Infection and Immunity*. v.74(2):1412-5, 2006.

Nardin EH, Nussenzweig RS. T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages. *Annu Rev Immunol.* v.11:687-727, 1993. Review.

Neghina R, Neghina AM, Marincu I, Iacobiciu I. Malaria, a journey in time: in search of the lost myths and forgotten stories. *The American Journal of the Medical Sciences,* vol.340(6):492-8, 2010.

O'Donnell RA, Saul A, Cowman AF, Crabb BS. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP1-19 across distantly related *Plasmodium* species. *Nature Medicine,* v.6, p.91-95, 2000.

Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Grass-Masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, Filgueira M, Tartar A, Druilhe P. Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood,* v.84, p.1594-1602, 1994a.

Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Grass-Masse H, Lepers JP, Ralamboranto L, Tartar A, Druilhe P. A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,* v.89, p.77-80, 1994b.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau LJB, Tauil PL, Daniel –Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal.* vol. 9:115, 2010.

Park JW, Moon SH, Yeom JS, Lim KJ, Sohn MJ, Jung WC, Cho YJ, Jeon KW, Ju W, Ki CS, Oh MD, Choe K: Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology,* vol. 8:14-20, 2001.

Pasay MC, Cheng Q, Rzepczyk C, Saul A. Dimorphism of the C terminus of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Mol Biochem Parasitol.* v 70(1-2):217-9, 1995  
 Perlmann P; Troye-Blomberg M. Malaria and the immune system in humans. *Chemical Immunology.* v. 80:229-42, 2002. Review.

Pizarro JC, Chitarra V, Verger D, Holm I, Petres S, Dartevelle S, Nato F, Longacre S, Bentley GA. Crystal structure of a Fab complex formed with PfMSP1- 19, the C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*: a malaria vaccine candidate. *Journal of Molecular Biology.* v.328, p.1091-1103, 2003.

Putaporntip C, Jongwutiwes S, Seethamchai S, Kanbara H, Tanabe K. Intragenic recombination in the 3' portion of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol.* v.109(2):111-9, 2000.

Quintero JP, Siqueira AM, Tobón A, Blair S, Moreno A, Arévalo-Herrera M, Lacerda MVG, Valencia SH. Malaria-related anaemia: a Latin American perspective. *Mem Instituto Oswaldo Cruz* 106(suppl. I): 91-104, 2011.

Rey L. *Parasitologia* . 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Riley EM; Wahl S; Perkins DJ; Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunology*. v. 28(1-2):35-49, 2006. Review.

Rodrigues MH, Cunha MG, Machado RL, Ferreira OC Jr, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. *Malaria Journal*. vol.14;2(1):39, 2003.

Rogier C; Tall A; Diagne N; Fontenille D; Spiegel A; Trape JF. *Plasmodium falciparum* clinical malaria: lessons from longitudinal studies in Senegal. *Parassitologia* v. 41:255-259, 1999.

Rojas LI & Toledo L. Espaço e Doença: um olhar sobre o Amazonas. Ed. Fiocruz. Rio de Janeiro. 1998.

Roussilhon C, Oevray C, Muller-Graf C, Tall A, Rogier C, Trape J-F, Theisen M, Balde A, Perignon J-L, Druilhe P. Long-term clinical protection from *falciparum* malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. *PloS Medicine*, v.4, p.e320, 2007.

Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman M. Adhesion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 11:e16, 2009.

Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern? *Braz J Infect Dis* 14: 299-309, 2010.

Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature Review Immunology*. v. 5(9):722-35, 2005.

Schofield L; Vivas L; Hackett F; Gerold P; Schwarz RT; Tachado S. Neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the dominant TNF-alpha-inducing toxin of *Plasmodium falciparum*: prospects for the immunotherapy of severe malaria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. v. 87(6):617-26, 1993. Review.

Segeja MD, Mmbando BP, Seth MD, Lusingu JP, Lemnge MM. Acquisition of antibodies to merozoite surface protein 3 among residents of Korogwe, north eastern Tanzania. *BMC Infect Dis*. v.8;10:55, 2010.

Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet*. Vol.27;363(9414):1017-24, 2004.

SIVEP Malária – Biliboteca Virtual 2012.

Slinger R, Giulivi A, Bodici-Collins M, Hindieh S, St Jonh F, Sher G, Goldman M, Ricketts M, Kain K Transfusion-transmitted malaria in Canada. *Canadian Medical Association Journal*, vol.164:377–379, 2001.

Smith T; Beck HP; Kitua A; Mwankusye S; Felger I; Fraser-Hurt N; Irion A; Alonso P; Teuscher T; Tanner M. The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. *Age*

dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* v. 93: Suppl 1 15-20, 1999a.

Smith T; Felger I; Fraser-Hurt N; Beck HP. The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. Effect of insecticide-treated bed nets on the dynamics of multiple *Plasmodium falciparum* infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* v. 93: Suppl 1 53-57, 1999b.

Smith T; Felger I; Tanner M; Beck HP. The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. Premunition in *Plasmodium falciparum* infection: insights from the epidemiology of multiple infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 93: Suppl 1 59-64, 1999c.

Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* v.;58(2):283-92, 1993.

Snounou G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. *Methods Mol Biol.* v.;50:263-91, 1996.

Snow RW & Marchs K. New insights into the epidemiology of malaria relevant for disease control. *British Medical Bulletin* v. 54:293-309, 1998.

Soares IS, Cunha MG, Silva MN, Souza JM, del Portillo HA, Rodrigues MM: Longevity of the naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* MSP1. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.60:357-363, 1999.

Soares IS, Levitus G, Souza JM, del Portillo HA, Rodrigues MM: Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infection and Immunity*, vol.65:1606-1614, 1997.

Soe S, Khin SA, Htay A, Nay W, Tin A, Than S, et al: Premunition against *Plasmodium falciparum* in a malaria hyperendemic village in Myanmar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.95:81-84, 2001.

Somchai J; Chaturong P; Takuya I; Tetsutaro S; Hiroji Kanbara. Naturally Acquired *Plasmodium knowlesi* Malariain Human, Thailand, *Emerging Infectious Diseases* v. 10, No. 12, 2004.

Stanisic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, Gilson PR, Murphy VJ, Anders RF, Mueller I, Beeson JG. Immunoglobulin G Subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infection and Immunity*, v.77, p.1165-1174, 2009.

Struik SS; Riley EM. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunology Review*. v.201, p. 268-90, 2004.

Sturm A, Amino R, Van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. Sep 1;313(5791):1287-90, 2006.

Suárez-Mutis MC. Epidemiologia da malária em comunidades do rio Padauri, médio Rio Negro, uma área de extrativismo vegetal da piaçaba no Estado do Amazonas, Brasil. PhD Thesis, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

Suárez-Mutis MC; Coura JR. Changes in the epidemiological pattern of malaria in a rural area of the middle Rio Negro, Brazilian Amazon: a retrospective analysis. *Cadernos de Saúde Pública*. v. 23(4), p. 795-804, 2007.

Suárez-Mutis MC; Cuervo P; Leoratti FM; Moraes-Avila SL; Ferreira AW; Fernandes O; Coura JR. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina de Tropical de São Paulo*. v. 49(3):159-64, 2007.

SVS Malária – Biblioteca Virtual 2012.

Theisen, M., D. Doodoo, A. Toure-Balde, S. Soe, G. Corradin, K. K. Koram, J. A. Kurtzhals, L. Hviid, T. Theander, B. Akanmori, M. Ndiaye, and P. Druilhe. Selection of glutamate-rich protein long synthetic peptides for vaccine development: antigenicity and relationship with clinical protection and immunogenicity. *Infect. Immun*. v. 69:5223–5229, 2001.

Torre D; Speranza F; Martegani R. Role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *The Lancet Infectious Diseases*. v. 2(12), p. 719-20, 2002.

Torres KL, Figueiredo DV, Zalis MG, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim W, Ferreira-da-Cruz Mde F. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. *Parasitol Res*. May;98(6):519-24, 2006.

Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193: 673-675, 1976.

Trape JF; Rogier C; Konate L; Diagne N; Bouganali H; Canque B; Legros F; Badji A; Ndiaye G; Ndiaye P; Brahimi K; Faaye O; Druilhe P; Pereira da Silva L. The Dielmo Project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* v. 51: 123-137, 1994.

Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical Microbiology Reviews*, vol.16(3):379-414, 2003.

Vythilingam I; Tan CH; Asmad M; Chan ST; Lee KS; Singh B. Natural transmission of *Plasmodium knowlesi* to humans by *Anopheles latens* in Sarawak, Malaysia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 100(11):1087-8, 2006.

World Health Organization. Malaria Report, 2010.

World Health Organization. Malaria Report, 2011.

Yacouba C, Daou M, Lyke KE, Dicko A, Diarra I, Kone A, Guindo A, Traore K, Krishnegowda G, Diallo DA, Doumbo OK, Plowe CV, Gowda DC, Sztein MB. Serum antibody levels to glycosylphosphatidylinositols in specimens derived from matched Malian children with severe or uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria and healthy controls. *Am J Trop Med Hyg.* v.;75(2):199-204, 2006.

Zalis MG, Ferreira-da-Cruz MF, Balthazar-Guedes HC, Banic DM, Alecrim W, Souza JM, Druilhe P, Daniel-Ribeiro CT. Malaria diagnosis: standardization of a polymerase chain reaction for the detection of *Plasmodium falciparum* parasites in individuals with low-grade parasitemia. *Parasitol Res.* v 82 (7):612-6, 1996.

Zambrano-Villa S; Rosales-Borjas D; Carrero JC; Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology* v. 18: 272-278, 2002.