

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

**ANTICORPOS IgG E IgM ANTI- $\alpha$ -GAL  
(Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R) EM PACIENTES INFECTADOS  
POR *Plasmodium vivax***

**ZÉLIA BARBOSA DE ALMEIDA COELHO**

BELO HORIZONTE - MG

2018

ZÉLIA BARBOSA DE ALMEIDA COELHO

**ANTICORPOS IgG E IgM ANTI- $\alpha$ -GAL  
(Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R) EM PACIENTES INFECTADOS  
POR *Plasmodium vivax***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para a obtenção do Título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Érika Martins Braga

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Ferreira Marques

BELO HORIZONTE - MG

2018

Trabalho realizado no Laboratório de Malária, no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Érika Martins Braga. Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Bolsa de Mestrado (2016/2017), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Projeto (404365/2016-7), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (APQ-00361-16). Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética (CAAE: 01496013.8.0000.5149, parecer 519.481) e contou com a colaboração do Dr. Marcus Vinícius Guimarães Lacerda (Fundação de Medicina Tropical do Amazonas) e do Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes (Universidade Federal do Mato Grosso).

Aos meus pais e irmã, pelo apoio incondicional em todos os momentos,  
principalmente nos de incerteza.

Ao amor da minha vida, por dividir essa caminhada comigo,  
tornando-a mais leve.

À minha avó Maria, por todo aconchego e carinho,  
fundamentais para que eu não desistisse.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais, meu segundo lar durante muitos anos, por proporcionar minha formação e a realização deste trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

Aos professores e funcionários do Departamento de Parasitologia e do Programa de Pós-Graduação, em especial à Sibeles e à Sumara, pelo conhecimento transmitido e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À professora Érika Martins Braga, por ser a melhor orientadora que eu poderia ter tido. Você se tornou, para mim, um grande exemplo de profissional, mãe e mulher. Tenho muito orgulho de ter sido guiada por você e ter tido a chance de ser sua aluna. Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos, “puxões de orelha” e bons momentos divididos. Meu carinho, admiração e gratidão a você serão eternos.

Aos professores Cor Jesus Fontes, da Universidade Federal do Mato Grosso, e Marcus Vinícius Guimarães Lacerda, da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (AM), por fornecerem as amostras de soros e os resultados do hemograma dos pacientes com malária.

Ao professor Alexandre Ferreira Marques, por gentilmente fornecer o antígeno  $\alpha$ -Gal utilizado neste trabalho, e aos colegas do Laboratório de Imunoproteoma e Biologia de Parasitos (ICB/UFMG), em especial ao Ramon e à Maíra, por não medirem esforços em ajudar.

Ao professor Ricardo Tostes Gazzinelli, do Laboratório de Imunoparasitologia (ICB/UFMG), por gentilmente ceder o anticorpo anti- $\alpha$ -Gal utilizado neste estudo.

À Luíza, uma das pessoas mais bondosas que já conheci, por ter se tornado mais que uma amiga durante esses anos de convivência. Não existem palavras suficientes para agradecer tudo que você fez e faz por mim. Minha amiga-irmã, que levarei comigo para o resto da vida, seja onde for.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Malária, por toda a ajuda e ótima convivência ao longo desses anos. Em especial à Bia, pela dedicação e perseverança durante os experimentos. Nós conseguimos!

Aos pacientes e aos doadores de sangue, sem os quais este trabalho não seria possível.

Às amigas Sílvia, Natália e Jéssica, por todas as aflições, apresentações, relatórios e risadas compartilhadas. Vocês não imaginam o quanto foram especiais durante essa jornada.

Aos colegas do mestrado, pelos bons e maus momentos divididos.

Aos meus pais, Dalmir e Antônio, pelo amor incondicional e por serem meus maiores incentivadores. Vocês são meu alicerce e maiores exemplos de luta e determinação. Por vocês, jamais desistirei de realizar meus sonhos.

À minha irmã, Viviane, pelo cuidado e por seguir acreditando em mim, quando eu mesma não acreditava.

Ao meu esposo, Júlio, por ser a melhor parte de mim e me lembrar, diariamente, que eu nunca estarei sozinha. Obrigada pelo apoio, companheirismo e paciência ao longo dessa jornada. Seu amor me move e me faz querer crescer cada dia mais.

Aos familiares e amigos, por compreenderem minha ausência e por todas as palavras de carinho proferidas.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Países endêmicos para malária em 2000 e 2016. Fonte: World Health Organization, World Malaria Report 2016 ..... 18
- Figura 2:** Evolução do número de casos de malária no Brasil entre 2007 e 2017. Fonte: Ministério da Saúde - Sinan/SVS/MS e Sivep - Malaria/SVS/MS ..... 20
- Figura 3:** Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2017. As diferentes cores indicam o risco de transmissão de malária, que foi estimado a partir da IPA = Incidência Parasitária Anual (número de exames positivos de malária por 1000 habitantes em uma determinada área, no período de um ano). Baixo risco (IPA menor que 10 casos/mil hab.), Médio risco (IPA entre 10 e 49 casos/mil hab.) e Alto risco (IPA igual ou maior que 50 casos/mil hab.). Fonte: Ministério da Saúde - Sinan/SVS/MS e Sivep-Malaria/SVS/MS..... 21
- Figura 4:** Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*. Fonte: Adaptado de MUELLER et al., 2009..... 23
- Figura 5:** Fórmula estrutural do epítipo  $\alpha$ -Gal (Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R). Fonte: Adaptado de SCHOCKER et al, 2016 ..... 32
- Figura 6:** Síntese do epítipo  $\alpha$ -Gal (identificado por retângulos com linhas tracejadas) em glicoproteínas (A) e em glicolipídios (B), e também a ligação de anticorpos anti- $\alpha$ -Gal. Fonte: GALILI, 2015 ..... 33
- Figura 7:** Interação entre a microbiota intestinal do hospedeiro, o vetor e a resposta imune ao Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R ( $\alpha$ -Gal). Fonte: Adaptado de CABEZAS-CRUZ et al., 2015..... 37

**Figura 8:** Estrutura dos antígenos de grupos sanguíneos e  $\alpha$ -Gal. Indivíduos que apresentam o tipo sanguíneo B, A e O expressam os antígenos B, A e H, respectivamente. Fonte: Adaptado de CABEZAS-CRUZ & DE LA FUENTE, 2017 ..... 38

**Figura 9:** Mapa do Brasil evidenciando as áreas de estudo e os centros de referência em atendimento de pacientes com malária ..... 43

**Figura 10:** Células THP-1 visualizadas em microscópio óptico invertido 72 horas após a adição de PMA. (A) Macrófagos são maiores, com formato irregular, emitem pseudópodes (setas vermelhas) e apresentam vesículas em seu interior (setas pretas). Já os monócitos (B) são mais arredondados, não emitem pseudópodes e não possuem vesículas em seu interior. Fonte: Medeiros, 2016 ..... 47

**Figura 11:** Padronização do ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos IgG contra o epítipo  $\alpha$ -Gal, testando-se duas concentrações diferentes de antígeno (10 ng e 20 ng), bem como duas diluições distintas do plasma (1:100 e 1:200) de indivíduos controle (A) e de pacientes com infecção patente por *P. vivax* (B) ..... 52

**Figura 12:** Resposta de IgG e IgM contra o antígeno Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) em indivíduos controle (n = 20) e em pacientes com infecção patente por *P. vivax* (n = 112). Os níveis de anticorpos anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) foram detectados por ELISA e expressos como valores de densidade óptica. As linhas centrais nos boxes representam a mediana e as barras flutuantes indicam os valores máximos e os mínimos. Significância estatística foi determinada por meio do teste estatístico de Mann-Whitney.\* Indica um valor de  $p < 0.05$  ..... 54

**Figura 13:** Influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO na resposta de anticorpos IgG e IgM contra o antígeno  $\alpha$ -Gal. Cada caixa representa o intervalo que contém os 50% centrais dos dados, sendo que a linha central representa a mediana. As linhas acima e abaixo da caixa indicam, respectivamente, os valores máximos e mínimos. As diferenças entre os níveis de



anticorpos IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal apresentados pelos pacientes infectados por *P. vivax* foram analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis, acompanhado pelo teste de comparação múltipla de Dunn ..... 55

**Figura 14:** Correlação de Spearman entre a resposta de IgG (A) e IgM (B) anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) e a parasitemia ..... 56

**Figura 15:** Correlação de Spearman entre a resposta de IgG (A) e IgM (B) anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) e os níveis de hemoglobina ..... 57

**Figura 16:** Correlação de Spearman entre a resposta de IgG (A) e IgM (B) anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) e os níveis de plaquetas ..... 57

**Figura 17:** Fagocitose por macrófagos THP-1 de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO opsonizadas com IgG anti-hemácia ou IgG anti- $\alpha$ -Gal. Hemácias não opsonizadas tratadas com PBS foram utilizadas como controle. A taxa de eritrofagocitose foi determinada como a razão entre o número de macrófagos contendo eritrócitos fagocitados dividido pelo número total de macrófagos contados, multiplicada por 100 ..... 58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Manifestações clínicas encontradas nos pacientes infectados por <i>P. vivax</i> incluídos neste estudo .....	50
<b>Tabela 2:</b> Caracterização da população de estudo .....	51
<b>Tabela 3:</b> Comparação entre os pacientes infectados por <i>P. vivax</i> anêmicos e não anêmicos.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\alpha$ -Gal** – Epítopo Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R
- $\alpha$ -1,3-GT** –  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferase
- $\alpha$ -1,3-GT-KO** –  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferase *knockout*
- °C** – Grau Celsius
- $\mu$ g** – Micrograma
- $\mu$ L** – Microlitro
- %** – Por cento
- 18s SSU rRNA** – *Small Subunit Ribosomal Ribonucleic Acid*
- AM** – Amazonas
- AMA-1** – *Apical Membrane Antigen-1* / Antígeno 1 da Membrana Apical
- BSA** – *Bovine Serum Albumin* / Albumina de Soro Bovino
- CAAE** – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CCDA** – Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
- cm<sup>2</sup>** – Centímetro Quadrado
- CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono
- CS** – *Circum-sporozoite* / Circum-esporozoítio
- DO** – Densidade Óptica
- dL** – Decilitro
- EBA** – *Erythrocyte Binding Antigens* / Antígenos de Ligação do Eritrócito
- ELISA** – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)
- FBS** – *Fetal Bovine Serum* / Soro Fetal Bovino
- FAPEMIG** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
- g** – Grama
- Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R** – N-acetilglicosamina
- HEPES** – (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
- HIV** – *Human Immunodeficiency Virus* / Vírus da Imunodeficiência Humana
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de Hidrogênio

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Ácido sulfúrico  
**ICB** – Instituto de Ciências Biológicas  
**IgA** – Imunoglobulina da classe A  
**IgE** – Imunoglobulina da classe E  
**IgG** – Imunoglobulina da classe G  
**IgM** – Imunoglobulina da classe M  
**IPA** – Incidência Parasitária Anual  
**mg** – Miligrama  
**mL** – Mililitro  
**mM** – Milimolar  
**mm<sup>3</sup>** – Milímetro Cúbico  
**MS** – Ministério da Saúde do Brasil  
**N** – Normal  
**NaCl** – Cloreto de Sódio  
**ng** – Nanograma  
**nm** – Nanômetro  
**nM** – Nanomolar  
**OMS** – Organização Mundial da Saúde  
**OPD** – *o-phenylenediamine dihydrochloride substrate*  
**p** – *p value* / Valor de p  
**PBST** – *Phosphate Buffer Saline containing Tween*  
**PfRh** – *P. falciparum Reticulocyte-binding protein Homologs*  
**pH** – Potencial hidrogeniônico  
**PMA** – *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate* / Forbol-12-Miristato-13-Acetato  
**Qβ** – Bacteriófago Qβ  
**Qβ-VLP** – Bacteriófago Qβ *Virus-like Particle*  
**Qβ (α-Gal)** – Qβ *Virus-like Particle* com 540 unidades do epítipo α-Gal na superfície  
**r** – *Spearman Rank Correlation*  
**RIFINs** – *Repetitive Interspersed Families of Polypeptides*  
**RON** – *Rhoptry Neck protein* / Proteína de Roptria  
**RPMI 1640** – *Roswell Park Memorial Institute Medium*

**SINAN** – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

**SIVEP** – Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica

**SVS** – Secretaria de Vigilância à Saúde

**TE** – Taxa de Eritrofagocitose

**THP-1** – Linhagem de monócitos humanos comerciais

**TRAP** – *Thrombospondin-Related Anonymus Protein* / Proteína Adesiva Associada à Trombospondina

**UDP-Gal** – Uridina Difosfato Galactose

**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais

**U/mL** – Unidades por mililitro

**v** – Volume

**WHO** – *World Health Organization*

## RESUMO

*Plasmodium vivax* é a espécie de plasmódio mais amplamente distribuída no mundo e, no Brasil, é a principal espécie causadora da malária. O reconhecimento da ocorrência de casos graves da doença, em infecções causadas por *P. vivax*, tem direcionado diferentes estudos visando determinar os mecanismos associados à morbidade e suscetibilidade à essa espécie de parasito. Os autoanticorpos têm sido considerados importantes componentes da resposta imune e seu potencial em determinar mecanismos imunológicos de destruição de células infectadas e não infectadas durante a malária tem sido considerado por nosso grupo. Cerca de 1% a 5% do repertório de IgG e IgM circulantes no plasma são direcionados ao epítipo  $\alpha$ -Gal em indivíduos saudáveis, sendo tais anticorpos produzidos naturalmente em resposta à estimulação antigênica por bactérias do trato gastrointestinal. Estudos mostram que a produção de anticorpos anti- $\alpha$ -Gal em algumas doenças parasitárias está associada à presença do epítipo  $\alpha$ -Gal no parasito. Antígenos com domínios  $\alpha$ -Gal já foram identificados em estágios sanguíneos de *P. falciparum* e a produção de anticorpo anti- $\alpha$ -Gal tem sido associada à proteção contra a malária. Assim, o presente estudo visa determinar a resposta de anticorpos IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal durante a malária causada por *P. vivax*. Para isso, pacientes infectados por essa espécie tiveram seus níveis de IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal mensurados por ELISA e correlacionados às variáveis epidemiológicas (idade), parasitológicas (parasitemia detectada na gota espessa, exposição prévia à malária), clínicas (presença de anemia, trombocitopenia) e hematológicas (sistema ABO). Indivíduos com infecção patente por *P. vivax* apresentaram níveis elevados de anticorpos IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal, indicando que tais imunoglobulinas podem desempenhar papel importante na infecção por esta espécie. Não foi observada nenhuma associação entre os níveis de anticorpos anti- $\alpha$ -Gal e os grupos sanguíneos do sistema ABO. Foi verificada uma associação positiva apenas entre IgG anti- $\alpha$ -Gal e a parasitemia em pacientes com malária vivax. Entretanto, tais anticorpos não estimularam a fagocitose de eritrócitos não infectados *in vitro*, independente do grupo sanguíneo. Tais resultados podem contribuir para o melhor entendimento da resposta imune do hospedeiro durante a malária vivax e possibilitar, a longo prazo, o desenvolvimento de estratégias de controle da doença em países endêmicos.

**Palavras-chave:** malária vivax, autoanticorpos, anticorpos anti- $\alpha$ -Gal

## ABSTRACT

*Plasmodium vivax* is the most widely distributed plasmodium species in the world. In Brazil it is the main species associated with malaria infection. The recognition of occurrence of severe malaria cases in *P. vivax* infections has directed different studies to determine the mechanisms associated with morbidity and susceptibility to this parasite. Autoantibodies have been considered important components of the immune response and their potential to determine immunological mechanisms of destruction by infected and uninfected cells during malaria has been considered by our group. About 1% to 5% of circulating IgG e IgM antibodies repertoire are targeted to  $\alpha$ -Gal epitope in healthy individuals and such antibodies are naturally produced in response to antigenic stimulation by bacteria of the gastrointestinal tract. Studies have shown that production of anti- $\alpha$ -Gal antibodies in some parasitic diseases is associated with presence of  $\alpha$ -Gal epitope in the parasite. Antigens with  $\alpha$ -Gal domains have already been identified in asexual blood stages of *P. falciparum* and anti- $\alpha$ -Gal antibody production has been associated with protection against malaria. Thus, the present study aims to determine the response profile of anti- $\alpha$ -Gal IgG and IgM antibodies during *P. vivax* malaria. For this purpose, *P. vivax* infected patients had their anti- $\alpha$ -Gal IgG and IgM antibodies levels measured and correlated to epidemiological (age), parasitological (parasite levels detected using thick blood smears, previous exposure to malaria), clinical (presence of anaemia and thrombocytopenia) and haematological variables (ABO blood group system). *P. vivax* infected individuals showed elevated levels of anti- $\alpha$ -Gal IgG and IgM antibodies, indicating that such immunoglobulins could play an important role in malaria vivax. No association was observed between anti- $\alpha$ -Gal antibody levels and blood groups of ABO system. A positive association was found between anti- $\alpha$ -Gal IgG and parasitemia in patients with vivax malaria. However, such antibodies did not stimulate phagocytosis of uninfected erythrocytes *in vitro*, independent of blood group. Such results may contribute to a better understanding of the host immune response during vivax malaria and, in long term, it may allow the development of disease control strategies in endemic countries.

**Key words:** vivax malaria, autoantibodies, anti- $\alpha$ -Gal antibodies.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Situação atual da malária .....	18
1.2. Ciclo Biológico de <i>Plasmodium</i> .....	22
1.3. Anemia na malária vivax .....	28
1.4. O epítipo $\alpha$ -Gal .....	31
1.5. Anticorpos anti $\alpha$ -Gal .....	34
1.6. Grupos sanguíneos do Sistema ABO e a malária .....	38
2. JUSTIFICATIVA .....	41
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. Objetivo principal .....	42
3.2. Objetivos específicos.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. População de estudo .....	43
4.2. Tipagem sanguínea ABO .....	44
4.3. Preparo das Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) <i>Virus-like Particles</i> (Q $\beta$ – VLP) .....	44
4.4. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) .....	45
4.5. Eritrofagocitose por macrófagos THP-1 .....	46
4.5.1. Cultivo de células THP-1 .....	46
4.5.2. Preparo dos eritrócitos e eritrofagocitose .....	47
4.6. Análise Estatística .....	49
5. RESULTADOS .....	50
5.1. Descrição da população de estudo .....	50
5.2. Detecção de anticorpos anti-Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) em plasmas de pacientes infectados por <i>Plasmodium vivax</i> .....	52
5.2.1. Padronização da ELISA para a detecção de anticorpos anti- Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) .....	52
5.2.2. Comparação entre os níveis de anticorpos IgG e IgM anti- Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) de indivíduos saudáveis e de pacientes com infecção patente por <i>P. vivax</i> . .....	53



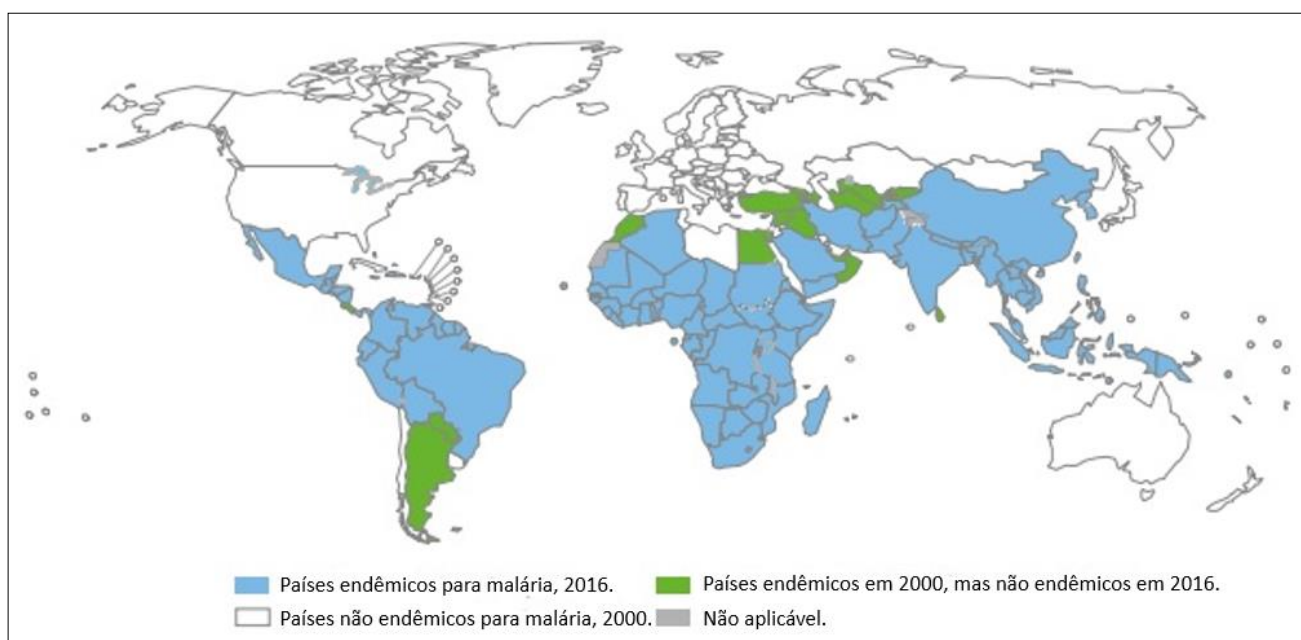
5.2.3. Comparação entre os níveis de anticorpos IgG e IgM anti-Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) de pacientes com infecção patente por <i>P. vivax</i> e a influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO .....	54
5.2.4. Influência da idade e da exposição prévia à malária na resposta de anticorpos contra Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) em pacientes com infecção patente por <i>P. vivax</i> . .....	55
5.2.5. Influência da parasitemia na resposta de IgG e IgM contra Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) em pacientes com infecção patente por <i>P. vivax</i> . .....	56
5.2.6. Associação da resposta de anticorpos anticorpos IgG e IgM anti-Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) a parâmetros clínicos indicativos de morbidade: anemia e trombocitopenia .....	56
5.3. Avaliação do efeito do anticorpo anti- $\alpha$ -Gal na fagocitose de hemácias não infectadas de diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO por células THP-1 .....	58
6. DISCUSSÃO .....	59
7. CONCLUSÕES .....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
9. ANEXOS .....	82

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Situação atual da malária

A malária é uma das doenças parasitárias mais comuns em países localizados nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e é responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade, sendo considerada uma das doenças infecciosas de maior relevância em termos de saúde pública (MILLER et al., 2002; KESTEMAN et al., 2014; MURRAY et al., 2014). Porém, devido à implementação, em grande escala, de medidas visando o controle e a eliminação da malária em todo o mundo, nas últimas duas décadas houve um grande progresso no combate a essa doença.

De acordo com o relatório mundial sobre o paludismo, elaborado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016, entre os anos 2000 e 2015, a incidência de casos de malária diminuiu em 41% e a taxa de mortalidade diminuiu em 62%. No início de 2016, a malária foi considerada endêmica em 91 países e territórios, contrastando com os 108 países considerados endêmicos em 2000 (**Figura 1**).



**Figura 1:** Países endêmicos para malária em 2000 e 2016. Fonte: *World Health Organization, World Malaria Report 2016*.

Apesar deste notável progresso, entre 2014 e 2016 ocorreu um aumento substancial na incidência de casos de malária em várias regiões, inclusive na América do Sul. Tal doença continua tendo um impacto devastador na saúde e na vida de muitas pessoas, principalmente no continente africano, onde foram registrados 90% dos casos de malária em 2016, seguido pela região sudeste da Ásia, que foi responsável por 7% dos casos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 3,2 bilhões de pessoas encontram-se sob o risco de adquirir malária e, em 2016, foram registrados 216 milhões de novos casos da doença em todo o mundo, em comparação com os 211 milhões de casos em 2015 e com os 237 milhões de casos em 2010 (WHO, 2017).

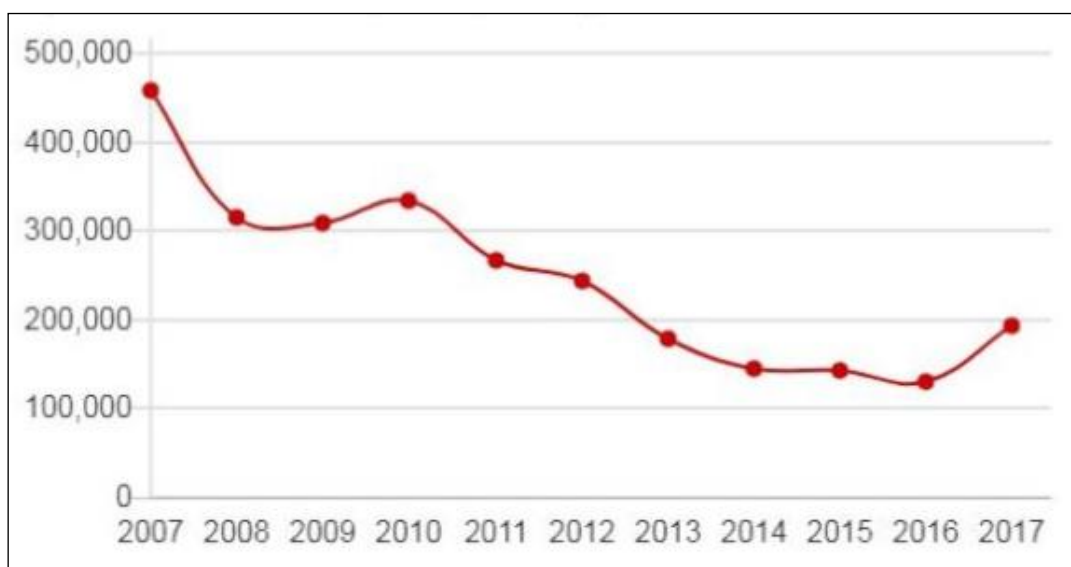
Estima-se que, em 2015, ocorreram 446.000 óbitos devido à malária em todo o mundo, seguido por 445.000 mortes em 2016. Embora no período compreendido entre 2010 e 2016 todas as regiões do globo tenham apresentado uma redução nas taxas de mortalidade, entre 2015 e 2016 houve um aumento dessa taxa em regiões da América do Sul e do Mediterrâneo (WHO, 2017).

Diante da necessidade de acelerar os progressos na redução dos impactos causados pela doença, a Organização Mundial da Saúde desenvolveu a “Estratégia Técnica Global para Malária 2016-2030”, que visa diminuir a transmissão da doença em pelo menos dez países a partir de 2016. As estratégias focam em reduzir, em nível mundial, a incidência de casos de malária e as taxas de mortalidade em pelo menos 40% até 2020 e, posteriormente, em 90% até 2030. A OMS também tem como objetivo eliminar a malária em 35 países nos próximos 12 anos. O documento enfatiza a necessidade do alcance universal das medidas de prevenção, diagnóstico e tratamento da malária nas populações de risco. Além de destacar que a vigilância em malária deve ser a principal estratégia. O documento reconhece também a importância da investigação e da inovação para que os objetivos sejam alcançados e resume, ainda, os custos globais estimados para sua implementação.

Cinco espécies de *Plasmodium* são capazes de infectar seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, sendo esta última considerada de caráter zoonótico no continente asiático (COLLINS & BARNWELL, 2009). Há, ainda, outras espécies de *Plasmodium*, como *Plasmodium brasilianum* e *Plasmodium simium*, nas Américas, que infectam primatas não

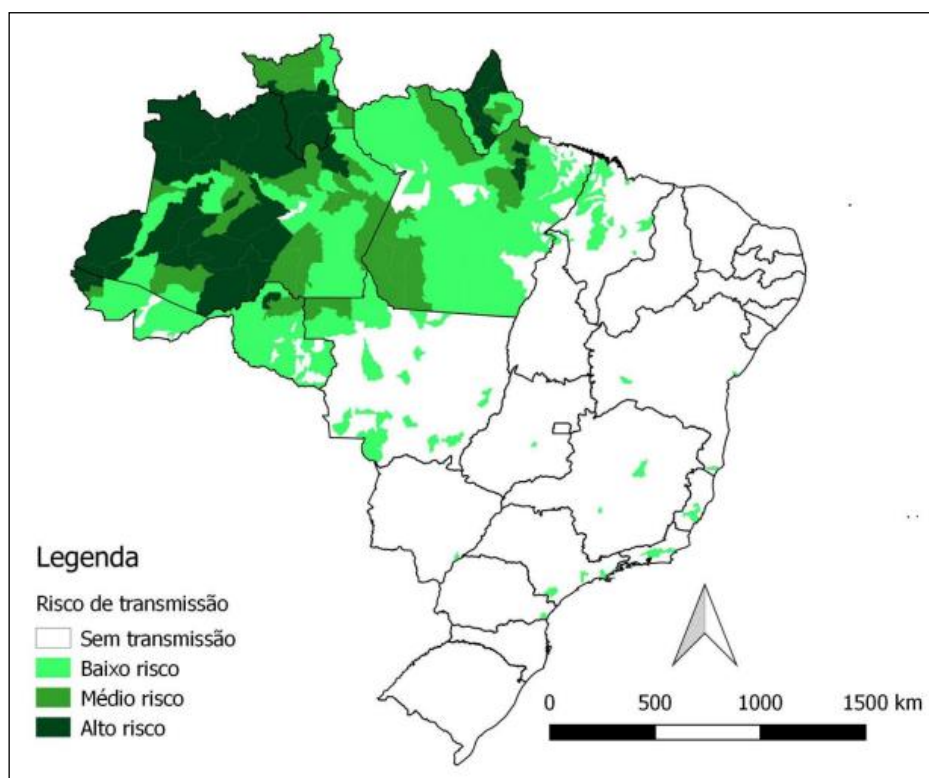
humanos e também têm o potencial de infectar seres humanos (LALREMRUATA et al., 2015; DE ALVARENGA et al., 2018). Devido a sua associação à elevados níveis de mortalidade, *P. falciparum* é considerada a espécie mais virulenta, principalmente no continente africano (GETHING et al., 2016; MURRAY et al., 2012), onde foi responsável por 99% dos casos de malária em 2016 (WHO, 2017). Já *P. vivax*, por sua vez, é a espécie mais amplamente distribuída no mundo (GUERRA et al., 2010) e é responsável por mais de 50% dos casos de malária registrados fora da África (MENDIS et al., 2001). Essa é também a espécie predominante nas Américas, representando 64% dos casos de malária que ocorrem na região (WHO, 2017).

No que se refere ao Brasil, nas últimas décadas tem-se observado uma queda significativa no número de casos de malária, sendo que em 2016 o país registrou o menor número desde 1981, o que pode ser considerado um grande êxito no combate à doença (WALDMAN et al., 1999). No entanto, em 2017 houve uma mudança nesse panorama: o número de casos de malária aumentou novamente, totalizando cerca de 194 mil registros. Isto é, em 2017 houve um aumento de 51% no número de casos da doença comparado com 2016 (SIVEP-Malária/SVS – Ministério da Saúde). Essa intensificação da malária no Brasil ocorreu após seis anos de sucessivas quedas no número de casos da doença no país (**Figura2**).



**Figura 2:** Evolução do número de casos de malária no Brasil entre 2007 e 2017. Fonte: Ministério da Saúde - Sinan/SVS/MS e Sivep - Malaria/SVS/MS.

Portanto, a malária ainda é considerada um grande problema de saúde pública no Brasil, principalmente na região que compreende os estados da Amazônia Legal (conceito político que engloba a totalidade de oito estados: Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins; e parte do estado do Maranhão). Nessa região, em 2016 foram registrados cerca de 128 mil casos da doença e em 2017 foram mais de 193 mil casos. Já em 2018, até o mês de junho já foram notificados 88.340 casos de malária, número 23% maior que o observado no mesmo período em 2017, o que mostra que o quadro epidemiológico desta doença é preocupante (SIVEP-Malária / SVS – Ministério da Saúde) (**Figura 3**). Diante de tal cenário, é preciso refletir sobre o que está contribuindo para o fenômeno recente de expansão da malária na região amazônica. Dentre os diversos fatores que podem estar envolvidos, destaca-se a fragilidade das medidas de controle da doença e, também, a menor importância que o poder público vem atribuindo à malária, tanto nos âmbitos federal, estadual quanto municipal.



**Figura 3:** Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2017. As diferentes cores indicam o risco de transmissão de malária, que foi estimado a partir da IPA = Incidência Parasitária Anual (número de exames positivos de malária por 1000 habitantes em uma determinada área, no período de um ano). Baixo risco (IPA menor que 10 casos/mil hab.), Médio risco (IPA entre 10 e 49

casos/mil hab.) e Alto risco (IPA igual ou maior que 50 casos/mil hab.). Fonte: Ministério da Saúde - Sinan/SVS/MS e Sivep - Malaria/SVS/MS.

Dentre as três espécies que ocorrem no Brasil, *P. vivax* é a espécie predominante, sendo responsável por 83,7% dos casos de malária registrados no país (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). A espécie *P. falciparum* também é encontrada, porém, em menores proporções, cerca de 15% dos casos, enquanto *P. malariae* permanece com transmissão baixa e pontual, correspondendo a menos de 1% dos casos confirmados (SIVEP-Malária / SVS – Ministério da Saúde). Entretanto, vale ressaltar que a real distribuição e prevalência de *P. malariae* permanece desconhecida, uma vez que a utilização da gota espessa para diagnóstico específico da infecção não permite a exata diferenciação entre esta espécie e o *P. vivax*.

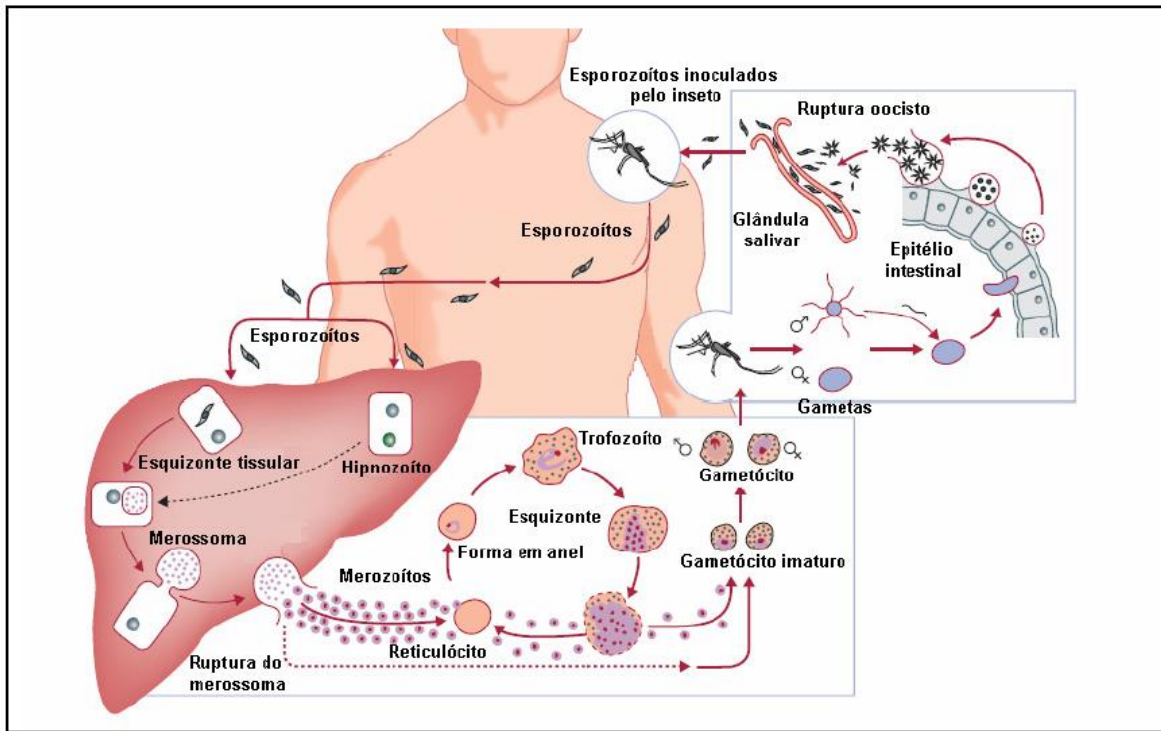
Segundo a Organização Mundial da Saúde, os estados do Acre e Amazonas, juntos, são responsáveis por 45% dos casos da doença verificados no país (WHO, 2017) e é importante lembrar que a transmissão da doença está geralmente relacionada às condições ambientais e socioculturais (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Apesar de as infecções por *P. vivax* raramente resultarem em óbito, esta espécie não deve ser negligenciada, pois, nos últimos anos, o número de casos de malária grave causada por *P. vivax* aumentou consideravelmente (ALEXANDRE et al., 2010; LACERDA et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2015). Além disso, tem sido relatada em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil, a ocorrência de cepas resistentes aos principais antimaláricos utilizados no tratamento da doença (SANTANA FILHO et al., 2007).

Todos os fatos acima mencionados justificam a necessidade de estudar mais esta espécie em uma tentativa de se desenvolver novos métodos e estratégias de intervenção, com o objetivo de controlar efetivamente a malária.

## **1.2. Ciclo Biológico de *Plasmodium***

A malária é uma infecção parasitária cujo agente etiológico pertence ao filo Apicomplexa, família Plasmodidae, gênero *Plasmodium*. O ciclo de vida desse parasito (**Figura 4**) inicia-se quando sua forma infectante, denominada esporozoíto, é inoculada na

pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo realizado por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* parasitadas. Esporozoítos são formas evolutivas alongadas com núcleo central e extremidades afiladas, podendo ser inoculados, juntamente com a saliva, de 15 a 200 esporozoítos (MEDICA & SINNIS, 2005).



**Figura 4:** Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*. Fonte: Adaptado de MUELLER et al., 2009.

Cerca de uma hora após a infecção, em torno de 50% do total de esporozoítos inoculados na pele do hospedeiro deixam o local da picada, sendo que aproximadamente 30% deles alcançam os vasos linfáticos, de onde são drenados até os linfonodos mais próximos, e a maioria é degradada e destruída por células dendríticas. Os outros 70% dos esporozoítos, por sua vez, podem migrar e alcançar a corrente sanguínea, sendo transportados passivamente até o fígado (AMINO et al., 2006; EJIGIRI & SINNIS, 2009). Para que a infecção por *Plasmodium* seja estabelecida, os esporozoítos devem alcançar, via circulação sanguínea, o endotélio do fígado e invadir as células-alvo, os hepatócitos, onde vão se desenvolver, dando início à fase hepática (ou exo-eritrocítica) da infecção. Para isso, o parasito deve ser capaz de atravessar o estreito espaço existente entre os capilares sinusóides e os hepatócitos (espaço de

Disse), onde estão presentes as células de Kupffer, que são os macrófagos residentes no fígado. Essa travessia é realizada por meio da migração ativa dos esporozoítos, que, dessa maneira, conseguem atravessar a barreira endotelial e entrar nos hepatócitos. Tal capacidade desenvolvida pelos esporozoítos, de migrar ativamente, é fundamental para que o parasito possa invadir as células do fígado (VANDERBERG & STEWART, 1990; ISHINO et al., 2004; DOUGLAS et al., 2015).

A interação entre o parasito e as células hepáticas pode ocorrer de diferentes maneiras. Foi demonstrado que, inicialmente, os esporozoítos atravessam os hepatócitos dentro de vacúolos transitórios que antecedem a formação do vacúolo parasitóforo, em um processo que não requer a remodelação da membrana do vacúolo nem a liberação de organelas do parasito envolvidas no processo de invasão. Em seguida, os esporozoítos são internalizados por meio de uma junção móvel, que originará o vacúolo parasitóforo (RISCO-CASTILLO et al., 2015). Os esporozoítos podem, também, induzir o rompimento da membrana plasmática do hepatócito e atravessá-la, deslizando através do seu citoplasma (MOTA et al., 2001; MOTA et al., 2002; MOTA & RODRÍGUEZ, 2004). Em um trabalho realizado em 2014, FORMAGLIO e colaboradores monitoraram, *in vivo*, a atividade migratória dos esporozoítos na pele, assim como avaliaram a integridade da membrana celular ao longo do tempo, e observaram que a maioria das células atravessadas não sobrevive após a passagem do parasito, possivelmente devido ao comprometimento da permeabilidade de suas membranas (FORMAGLIO et al., 2014).

Apesar de não apresentarem cílios ou flagelos, os esporozoítos são capazes de se movimentar através da reorientação da proteína Circum-esporozoíto (CS – *Circumsporozoite*) e da Proteína Adesiva Associada à Trombospondina (TRAP – *Thrombospondin-Related Anonymus Protein*), que são fundamentais para a interação entre o parasito e as células do hospedeiro. Tais proteínas permitem que o parasito possa deslizar sobre substratos sólidos, incluindo superfícies de células hospedeiras. Essa movimentação, característica de organismos Apicomplexa, recebe o nome de *gliding motility* (“deslizamento”) e é definida pela ausência de qualquer modificação na forma da célula em movimento, como a formação de pseudópodes, e pela dependência de um substrato (MÉNARD, 2001).



A proteína CS é uma molécula multifuncional que desempenha um papel crucial em diversas etapas do ciclo de vida do *Plasmodium*, por exemplo, no desenvolvimento do parasito no interior do vetor, na invasão das glândulas salivares do mosquito e também na invasão de células do fígado do hospedeiro vertebrado, sendo a proteína mais abundante na superfície dos esporozoítos. Tal proteína interage com os proteoglicanos de heparan-sulfato presentes nos hepatócitos, facilitando assim a internalização do parasito (FREVERT et al., 1993; EJIGIRI & SINNIS, 2009). Já a proteína TRAP contribui para o deslocamento (*gliding*) dos esporozoítos e para o reconhecimento de receptores nas glândulas salivares dos mosquitos e nas células hepáticas, além de ser essencial para que o parasito possa invadir os hepatócitos (AKHOURI et al., 2008).

Tem sido demonstrado que os esporozoítos atravessam diversos hepatócitos antes de se estabelecerem e se desenvolverem no interior de uma dessas células, de modo que essa rápida migração parece ser fundamental para que o parasito possa evadir do sistema imune do hospedeiro durante a fase inicial da malária (MOTA et al., 2001; MOTA et al., 2002; AMINO et al., 2008). Estudos têm sugerido que a proteína CS também estaria envolvida na modulação do perfil invasor dos esporozoítos. COPPI e colaboradores, em 2011, mostraram que tal proteína apresenta dois estados conformacionais diferentes: uma conformação na qual o domínio C-terminal está exposto, o que favorece a invasão dos hepatócitos, e uma conformação na qual a região N-terminal encobre esse domínio, mantendo os esporozoítos em um estado migratório (COPPI et al., 2011). Alguns estudos sugerem que o início do processo de invasão está associado aos níveis de proteoglicanos de heparan-sulfato presentes na superfície dos hepatócitos. Assim, o contato dos esporozoítos de *Plasmodium* com células que expressam níveis aumentados desses proteoglicanos ativaria o processo de invasão, alterando o fenótipo dos esporozoítos de migratório para invasor. Por outro lado, o contato dos esporozoítos com células que expressam menores níveis de proteoglicanos de heparan-sulfato resultaria em uma migração contínua dos esporozoítos através das células, com ausência de invasão (COPPI et al., 2007; EJIGIRI & SINNIS, 2009).

Após invadir o hepatócito e formar o vacúolo parasitóforo, onde se estabelece, os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos pré-eritrocíticos, que durante a reprodução assexuada se multiplicam, por esquizogonia, originando esquizontes teciduais. Tais esquizontes são formas evolutivas arredondadas, multinucleadas e com citoplasma único, que

se transformam em milhares de merozoítos (SILVIE et al., 2008). Estes, por sua vez, são liberados por meio dos “merossomos”, que são vesículas formadas a partir da evaginação da membrana dos hepatócitos. Ao chegarem aos vasos sanguíneos, a membrana dos merossomos desintegra-se, liberando os merozoítos na corrente sanguínea. São os merossomos que possibilitam aos merozoítos sua evasão do sistema imune do hospedeiro durante sua migração do fígado até a circulação sanguínea, garantindo, assim, que a infecção das células sanguíneas ocorra de forma eficiente (STURM et al., 2006). É importante destacar que *P. vivax* apresenta algumas particularidades em seu ciclo de vida, por exemplo, a capacidade de alguns esporozoítos permanecerem nos hepatócitos por longos períodos, como formas dormentes denominadas “hipnozoítos”, antes de iniciar a infecção sanguínea. Isso explica as recaídas tardias que podem ocorrer após a cura da infecção (WHITE, 2011).

Inicia-se, então, a fase sanguínea (ou eritrocítica), na qual os merozoítos infectam os eritrócitos de maneira específica, sendo que *P. vivax* infecta preferencialmente reticulócitos, enquanto *P. falciparum* é capaz de invadir hemácias de todas as idades. Os receptores denominados antígenos do grupo sanguíneo Duffy (Fy), presentes na superfície dos eritrócitos, são importantes para que o *P. vivax* possa invadir essas células (HANS et al., 2005). Em um estudo realizado com soros de indivíduos do Brasil, em 2011, foi mostrado que um polimorfismo (Fy<sup>a</sup> / Fy<sup>b</sup>) no antígeno Duffy dos eritrócitos reduz a suscetibilidade à malária causada por *P. vivax*, uma vez que essa mutação diminui consideravelmente a ligação do parasito à superfície do eritrócito (KING et al., 2011).

O contato entre merozoítos e eritrócitos é mediado por interações de baixa afinidade entre as proteínas de superfície das hemácias e do parasito. A membrana do eritrócito envolve o merozoíto, que se reorienta, fazendo com que sua extremidade apical entre em contato direto com a membrana do eritrócito. Em seguida, interações específicas ligante-receptor mediadas por proteínas das famílias EBA (*Erythrocyte Binding Antigens*) e PfRh (*P. falciparum Reticulocyte-binding protein Homologs*) dão início ao processo de invasão. Tal processo está associado ao fluxo de cálcio para dentro da hemácia, o que permite a deposição do complexo de proteínas RON (*Rhoptry Neck protein*) no interior da membrana do eritrócito e a ligação direta da proteína AMA-1 (*Apical Membrane Antigen-1*), formando uma junção móvel. O parasito, então, empurra a membrana da hemácia ao mesmo tempo em que o

conteúdo das roptrias é liberado, formando a membrana do vacúolo parasitóforo, que irá envolver o merozoíto (COWMAN et al., 2016).

Após invadir os eritrócitos, os merozoítos transformam-se em trofozoítos jovens e, em seguida, transformam-se em trofozoítos maduros. O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito se dá por esquizogonia, seguida pela formação de esquizontes. Com o rompimento do esquizonte e consecutiva ruptura da membrana do eritrócito, são liberados na corrente sanguínea os merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, dentro do eritrócito infectado ocorre a diferenciação do parasito em gametócito masculino e feminino, isto é, o estágio sexuado do parasito que infecta as fêmeas do mosquito *Anopheles*, dando início à fase sexuada do ciclo. A fase eritrocítica é responsável pelas manifestações clínicas da doença, devido ao rompimento dos eritrócitos e consequente liberação de antígenos, pigmento malárico e do próprio parasito.

Durante seu desenvolvimento, os gametócitos apresentam cinco estágios morfológicos distintos. Inicialmente, os estágios I e II são morfológicamente parecidos, sendo que ao final do segundo estágio já é possível distinguir os gametócitos de trofozoítos assexuados. Os estágios III e IV são mais alongados, enquanto gametócitos do estágio V apresentam extremidades mais arredondadas. Sabe-se que hemácias parasitadas com gametócitos são sequestradas na medula óssea, de onde migram para o espaço extravascular. O aumento da rigidez dos gametócitos imaturos favorece sua maturação no sistema hematopoiético. Os gametócitos maduros deixam este microambiente, provavelmente devido à restauração de sua deformabilidade, e retornam para a circulação sanguínea, sendo preferencialmente sequestrados nos microcapilares da pele, onde tornam-se facilmente acessíveis ao mosquito vetor (DE NIZ et al., 2018).

No ciclo sexuado, os gametócitos formados no hospedeiro vertebrado são ingeridos por um mosquito anofelino fêmea durante a hematofagia. Somente hemácias contendo gametócitos conseguem sobreviver no intestino do mosquito anofelino, onde ocorre hemólise e as outras formas do parasito são destruídas. Para que o processo de gametogênese ocorra é necessário que o gametócito saia da hemácia, então, devido à temperatura menor que 30°C e ao aumento do pH no intestino médio do mosquito, o gametócito feminino transforma-se em um macrogameta e o gametócito masculino dá origem a oito microgametas. Ainda nesse

órgão, ocorre a fusão do macrogameta com um microgameta, formando o ovo (zigoto), que após 24 horas se transforma em uma forma móvel capaz de se movimentar por meio das contrações do corpo do inseto, recebendo o nome de oocineto. Esse atravessa a matriz peritrófica e migra até a parede do intestino médio do inseto, onde se adere na camada epitelial do órgão e passa a ser chamado de oocisto.

Então, dá-se início o processo de divisão esporogônica e, após 9 a 14 dias à partir da infecção, ocorre a ruptura da parede do oocisto e são liberados na hemolinfa do anofelino os esporozoítos formados durante a esporogonia. Os esporozoítos são carregados até as glândulas salivares do mosquito, migram para o canal central da glândula e posteriormente para o ducto salivar, onde serão inoculados no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva, durante o próximo repasto sanguíneo infectante, reiniciando o ciclo (MUELLER et al., 2009).

### **1.3. A anemia na malária vivax**

O quadro de manifestações clínicas na malária é amplo, variando desde infecções assintomáticas até casos de doença grave e óbito (ANSTEY et al., 2012). A apresentação clínica da doença está relacionada a diversos fatores: do parasito, como espécie, taxa de multiplicação, polimorfismos e resistência a drogas; do hospedeiro, como imunidade e aspectos genéticos; e também fatores geográficos e sociais, como intensidade da transmissão, aspectos culturais e econômicos, políticas de saúde e acesso ao tratamento (MILLER et al., 2002; QUINTERO et al., 2011).

Sabe-se que *P. falciparum* é a mais virulenta dentre as espécies de *Plasmodium* que infectam humanos e a maior patogenicidade atribuída a essa espécie está relacionada a sua capacidade de aderir ao endotélio dos capilares sanguíneos de órgãos vitais, como cérebro e pulmão. A citoaderência de eritrócitos infectados por essa espécie envolve múltiplos fatores do parasito e do hospedeiro, associando-se às complicações clínicas na malária grave, como malária cerebral, malária associada à gravidez e a síndrome do desconforto respiratório (WASSMER et al., 2015). Interessantemente, CARVALHO e colaboradores, em 2010, demonstraram que eritrócitos infectados por *P. vivax* também são capazes de se aderir a diferentes receptores de células endoteliais pulmonares, cerebrais e da microvasculatura

placentária, porém, em menores taxas quando comparado com *P. falciparum* (CARVALHO et al., 2010).

Embora as infecções por *P. vivax* tenham sido consideradas benignas durante muitos anos, estudos realizados em diversos países têm mostrado que *P. vivax* também pode causar manifestações clínicas graves, como malária cerebral, falência renal, síndrome respiratória e anemia grave, além de outras complicações, mostrando que o termo “benigna” não é mais apropriado para a malária vivax (ANSTEY et al., 2009; KASLIWAL et al., 2009, WASSMER et al., 2015).

Além disso, já foi relatado em diversos países, inclusive no Brasil, a ocorrência de cepas resistentes à cloroquina, que é uma das principais drogas utilizadas no tratamento da doença (BAIRD et al., 2011; CHEHUAN et al., 2013). Tal fato constitui um grande problema, uma vez que o desenvolvimento de novos fármacos é dificultado devido a ausência de um bom sistema de cultivo *in vitro* para *P. vivax*.

Assim como na malária causada por *P. falciparum*, indivíduos expostos à malária vivax tendem a desenvolver uma imunidade protetora, de forma que as manifestações clínicas graves da doença são observadas principalmente em crianças menores de cinco anos de idade (MUELLER et al., 2009). Sabe-se que infecções por *P. vivax* provocam um quadro clínico de febre, mesmo em infecções com baixas parasitemias, e estão associadas à produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, porém, pouco se sabe sobre o papel da resposta imune do hospedeiro na patologia das infecções por essa espécie (MILLER et al., 2002).

A anemia é uma manifestação clínica típica de infecções por *P. vivax* e é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, principalmente em gestantes e crianças com menos de cinco anos de idade que residem em áreas endêmicas (GENTON et al., 2008). Sabe-se que eritrócitos são destruídos durante o desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito, mas tal fato não é suficiente para explicar a anemia como manifestação clínica da malária. Principalmente em infecções causadas por *P. vivax*, uma vez que esta espécie infecta apenas reticulócitos, que correspondem a cerca de 1 a 2% do número total de eritrócitos (KITCHEN et al., 1938). Além disso, estudos realizados com *P. falciparum* mostraram que não há relação direta entre a carga parasitária e a gravidade da infecção em áreas endêmicas (DONDORP et

al., 1999), o que sugere que outros mecanismos podem contribuir para o desenvolvimento da anemia em infecções causadas por *P. vivax*.

A destruição de hemácias não parasitadas é uma característica marcante na malária vivax. Estudos estimaram que em infecções causadas por *P. vivax*, para cada célula infectada, aproximadamente 32 hemácias normais são destruídas (COLLINS et al., 2003), enquanto que em infecções causadas por *Plasmodium falciparum* esta proporção é menor: cerca de nove hemácias não infectadas são removidas da circulação para cada célula infectada por esta espécie (JAKEMAN et al., 1999). Sendo assim, se faz necessário investigar quais seriam os mecanismos envolvidos na destruição de hemácias não parasitadas, uma vez que a patogênese da anemia associada à malária é complexa e multifatorial. Embora os mecanismos envolvidos na remoção precoce de células vermelhas normais ainda não estejam esclarecidos, acredita-se que esta remoção pode estar relacionada a diversos fatores como antígenos do parasito, citoaderência, citocinas, estresse oxidativo e auto-anticorpos (CASTRO-GOMES et al., 2014).

Assim como em outras doenças infecciosas que podem causar anemia, durante a malária também ocorre a produção de auto-anticorpos contra uma grande variedade de antígenos, como proteínas do citoesqueleto (TERNYNCK et al., 1991), proteínas de membrana (ARESE et al., 2005), enzimas (RITTER et al., 1993), fosfolipídios (CONSIGNY et al., 2002) e motivos de carboidratos, como o epítipo  $\alpha$ -Gal (RAVINDRAN et al., 1988). No entanto, estudos com *P. vivax* sobre esse tema são escassos e a relação entre auto-imunidade e anemia na malária vivax ainda é pouco conhecida, principalmente acerca do papel desempenhado pelas imunoglobulinas G (IgG) e M (IgM) nesse contexto.

Alguns estudos verificaram uma associação entre os níveis de autoanticorpos e a sintomatologia clínica na malária, sugerindo a utilização dessas moléculas como biomarcadores de gravidade. Já foi demonstrado, por exemplo, que os níveis de autoanticorpos IgG contra antígenos do cérebro estão aumentados em pacientes de regiões endêmicas infectados por *P. falciparum*, relacionando tais imunoglobulinas com a gravidade da doença (GUIEYEDI et al., 2007; BANSAL et al., 2009). Também já foi relatada a produção de autoanticorpos em infecções maláricas, correlacionando essas moléculas à

patogênese da anemia associada à doença (FACER, 1980; BERZINS et al., 1983; FONTAINE et al., 2010).

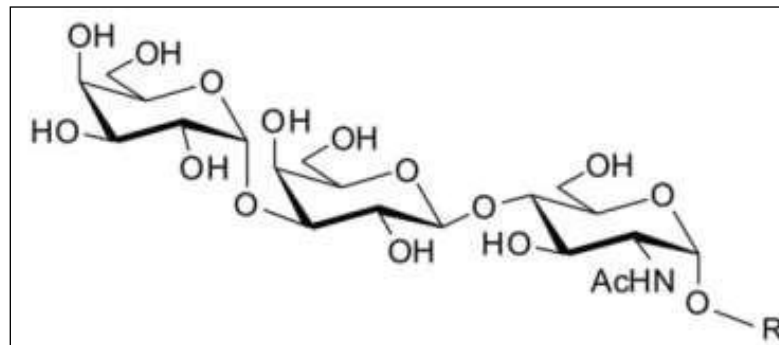
Em um estudo realizado com modelo murino, foi observado que a infecção por *P. yoelii* induz a produção de autoanticorpos anti-fosfatidilserina que se ligam à superfície de eritrócitos não infectados, contribuindo para a anemia. Neste mesmo trabalho foi mostrado que pacientes infectados por *P. falciparum* também apresentam tais anticorpos, sendo os mesmos correlacionados com a anemia pós malária (FERNANDEZ-ARIAS et al., 2016). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa verificaram que pacientes anêmicos infectados por *P. vivax* apresentam maiores níveis de anticorpos contra proteínas de hemácias quando comparados com pacientes infectados não anêmicos. Tais anticorpos foram associados à maior rigidez na membrana das hemácias, o que diminui a flexibilidade dessas células, bem como ao aumento da fagocitose por macrófagos, contribuindo, assim, para a anemia na malária vivax (ZITHA, 2014; MOURÃO et al., 2016; MOURÃO et al., 2018).

Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado a aquisição de proteção clínica associada à produção de anticorpos IgG contra antígenos da superfície de merozoítos, em indivíduos de áreas de transmissão endêmica na Papua Nova Guiné e no Brasil (KING et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2006). Uma vez que indivíduos que residem em áreas endêmicas para malária são repetidamente expostos à múltiplos antígenos, a caracterização dos padrões de resposta imune induzidos por diferentes antígenos e a associação dessa resposta à parâmetros indicativos de morbidade podem contribuir para o desenvolvimento de vacinas, além de ampliar nosso conhecimento acerca dos aspectos imunológicos envolvidos na malária.

Além disso, diante da atual escassez de dados sobre os mecanismos envolvidos na patogênese da anemia na malária vivax, faz-se necessário investigar mais profundamente quais fatores estão envolvidos neste processo, contribuindo, assim, para o desenvolvimento de novas estratégias de controle para a malária.

#### **1.4. O epítipo $\alpha$ -Gal**

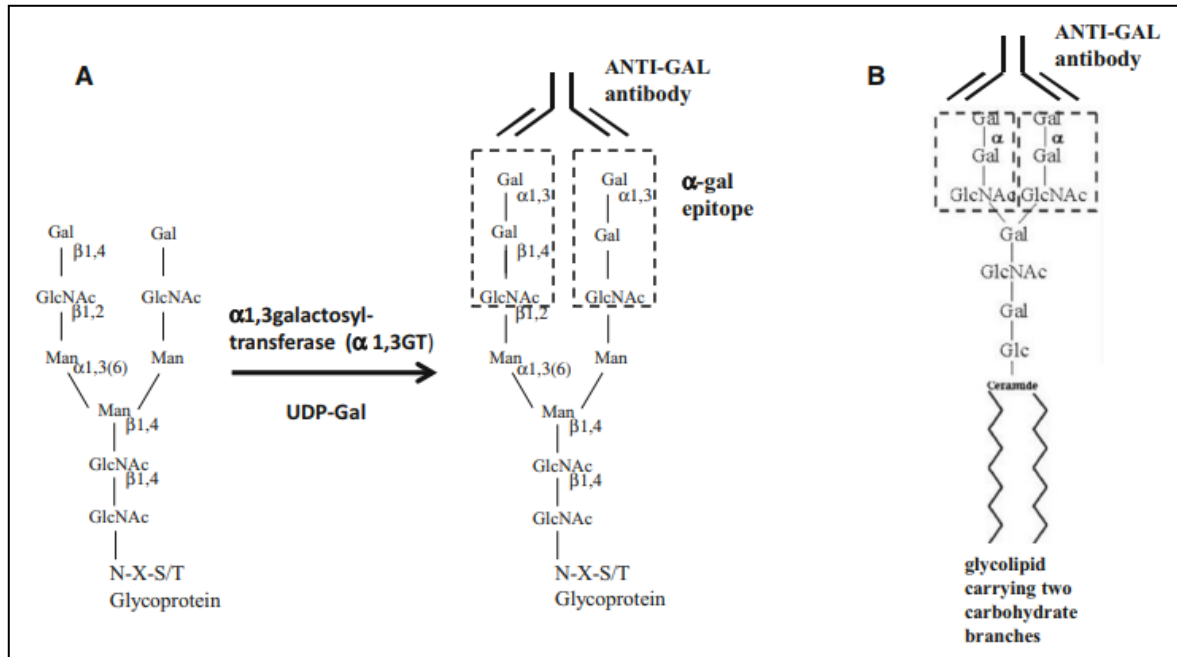
Epítopo  $\alpha$ -Gal é a nomenclatura atribuída ao carboidrato de fórmula molecular Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R (**Figura 5**). Tal molécula está presente nas cadeias de carboidratos dos glicolípídeos e glicoproteínas de macacos do Novo Mundo, prosímios e de mamíferos não primatas. Em contraste, o epítopo  $\alpha$ -Gal não é expresso em células de seres humanos e macacos do Velho Mundo, sendo estes organismos capazes de produzir, naturalmente, grandes quantidades de anticorpos contra o epítopo  $\alpha$ -Gal (GALILI et al., 1987; GALILI et al., 1988).



**Figura 5:** Fórmula estrutural do epítopo  $\alpha$ -Gal (Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R). Fonte: Adaptado de SCHOCKER et al, 2016.

Dentro do aparelho de Golgi das células de mamíferos não primatas, a enzima  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferase ( $\alpha$ -1,3-GT) produz o epítopo  $\alpha$ -Gal em cadeias de glicoproteínas, glicolípídeos e proteoglicanos (GALILI, 2013). Essa enzima catalisa a transferência do resíduo de galactose fornecido por um açúcar, a Uridina difosfato galactose (UDP-Gal), ao radical exposto de N-acetilglicosamina (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R), gerando o epítopo  $\alpha$ -Gal (BLANKEN & VAN den EIJDEN, 1985; GALILI et al., 2015), como pode ser visto na **figura 6**.





**Figura 6:** Síntese do epítipo  $\alpha$ -Gal (identificado por retângulos com linhas tracejadas) em glicoproteínas (A) e em glicolipídios (B), e também a ligação de anticorpos anti- $\alpha$ -Gal. Fonte: GALILI, 2015.

A inativação do gene que codifica a enzima  $\alpha$ -1,3-GT é responsável pela não expressão do epítipo  $\alpha$ -Gal em macacos do Velho Mundo e homínídeos (grupo dos Catarrhini) e ocorreu há aproximadamente 28 milhões de anos. Tem sido especulado que um patógeno, possivelmente um vírus, bactéria ou protozoário, endêmico da Eurásia e África pode ter exercido uma pressão evolutiva que favoreceu os primatas que não expressavam o epítipo  $\alpha$ -Gal em suas células (GALILI & SWANSON, 1991; GALILI, 2015). Assim, esses primatas desenvolveram a capacidade de produzir, naturalmente, elevados títulos de anticorpos contra o epítipo  $\alpha$ -Gal como um mecanismo de proteção contra determinados patógenos que expressassem este epítipo (MACHER & GALILI, 2008).

RAMASAMY e colaboradores, em um estudo realizado em 1977, sugeriram que uma espécie de *Plasmodium* (provavelmente parasito de aves ou répteis), adaptou-se para infectar primatas no Velho Mundo. A capacidade de algumas populações de primatas produzirem anticorpos contra o epítipo  $\alpha$ -Gal desse parasito pode ter conferido uma proteção significativa contra a malária, sem indução de autoimunidade, e ter favorecido a sobrevivência dessas

populações, o que mais tarde pode ter levado à inativação da enzima  $\alpha$ -1,3-GT nos hospedeiros (RAMASAMY et al., 1997). Uma razão alternativa para a inativação do gene que codifica a enzima  $\alpha$ -1,3-GT pode ter sido o uso do epítipo  $\alpha$ -Gal como um receptor celular por um patógeno, por exemplo, bactérias que produzem toxinas. Desse modo, a infecção endêmica de primatas do Velho Mundo com determinada cepa de bactérias, que produziria uma toxina capaz de se ligar ao  $\alpha$ -Gal, pode ter induzido uma pressão seletiva para a evolução de primatas que não expressavam o epítipo  $\alpha$ -Gal e, portanto, não eram suscetíveis aos efeitos dessa toxina (MACHER & GALILI, 2008).

A inativação do gene para a enzima  $\alpha$ -1,3-GT em um ancestral de macacos do Velho Mundo parece ser um evento relativamente recente na evolução dos mamíferos, uma vez que, embora seja estimado que a divergência entre mamíferos placentários e marsupiais tenha ocorrido há aproximadamente 125 milhões de anos, o epítipo  $\alpha$ -Gal está presente em ambos os grupos (MACHER & GALILI, 2008). Tal evento é extraordinário na evolução dos mamíferos, visto que foi acompanhado pela produção de grandes quantidades de imunoglobulinas contra o epítipo  $\alpha$ -Gal eliminado. Tais anticorpos podem ter proporcionado proteção imunológica contra agentes infecciosos endêmicos do Velho Mundo que eram prejudiciais aos primatas e que expressavam o epítipo  $\alpha$ -Gal (GALILI, 2013).

### **1.5. Anticorpos anti- $\alpha$ -Gal**

Os anticorpos anti- $\alpha$ -Gal são produzidos naturalmente em seres humanos em grandes quantidades, representando cerca de 1% das imunoglobulinas G (IgG) circulantes no soro, sendo também encontrado nos isotipos IgM, IgA (GALILI et al., 1984; HAMANOVA et al., 2015) e IgE (CHUNG et al., 2008). Ao longo da vida, a produção desse anticorpo é estimulada pela contínua exposição aos componentes de bactérias gastrointestinais da microbiota normal que expressam o epítipo  $\alpha$ -Gal, sendo que aproximadamente 1% dos linfócitos B circulantes é capaz de produzir esse anticorpo (GALILI et al., 1988; GALILI et al., 1993a; MACHER & GALILI, 2008).

Uma vez que os anticorpos anti- $\alpha$ -Gal são constantemente produzidos ao longo da vida, tais imunoglobulinas foram identificadas e isoladas com o objetivo, inicialmente, de

serem utilizadas como uma potencial ferramenta para a avaliação da resposta imune, visto que desordens em sua produção poderiam indicar uma imunodeficiência humoral (GALILI et al., 1984; GALILI et al., 1988). Esses anticorpos reconhecem o resíduo terminal  $\alpha$ -Galactosil em glicoproteínas e glicolípídios, apresentando uma grande especificidade de ligação por terminais Gal $\alpha$ 1-3Gal, como mostra a **figura 6** (GALILI et al., 1985).

Os anticorpos anti- $\alpha$ -Gal são responsáveis pela barreira imunológica que impede o xenotransplante de órgãos de porcos em seres humanos. Tais imunoglobulinas se ligam ao epítipo  $\alpha$ -Gal presente nas células desses animais e induzem a sua destruição por meio da lise celular mediada pelo sistema do complemento e por citotoxicidade celular dependente de anticorpo (CCDA) (GALILI, 1993c; MACHER & GALILI, 2008). Tal rejeição ao xenotransplante tem sido eliminada devido à criação de animais *Knockout* para a enzima  $\alpha$ -1,3-GT ( $\alpha$ -1,3-GT-KO) (TSENG et al., 2005; STONE et al., 2007).

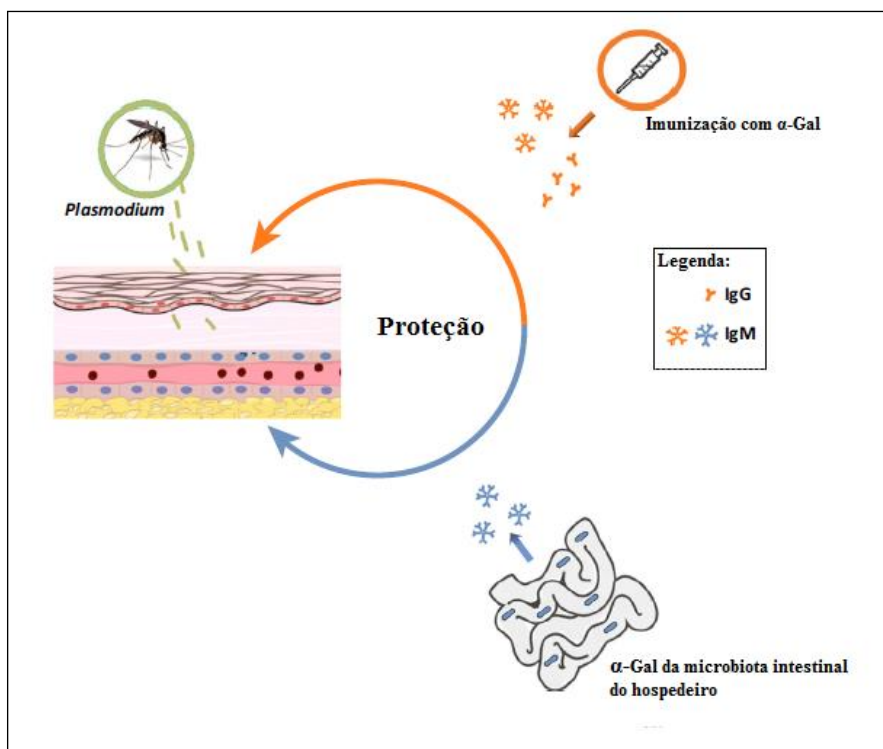
Devido a abundância de anticorpos anti- $\alpha$ -Gal em humanos imunocompetentes, tais imunoglobulinas têm potencial para serem utilizadas atualmente em diversas aplicações clínicas, como em vacinas antivirais e antitumorais. A presença deste epítipo, por exemplo, em vacinas contra os vírus Influenza e HIV, bem como em vacinas de células tumorais autólogas processadas para expressar o epítipo  $\alpha$ -Gal, é capaz de direcionar as células apresentadoras de antígeno para o sítio de vacinação, aumentando, assim, a imunogenicidade dessas vacinas (ABDEL-MOTAL et al., 2010; MACHER & GALILI, 2008). Além de atuarem em uma primeira linha de defesa contra agentes infecciosos, os anticorpos anti- $\alpha$ -Gal parecem contribuir para a remoção de eritrócitos normais e patologicamente senescentes, opsonizando essas células para a fagocitose realizada pelos macrófagos (GALILI, 1993b).

A expressão do epítipo  $\alpha$ -Gal foi constatada em vários agentes patogênicos, incluindo vírus envelopados (REPIK et al., 1994; WELSH et al., 1998) e bactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Salmonella*, *Streptococcus*, e *Escherichia coli* (GALILI et al., 1988; POSEKANY et al., 2002; HAN et al., 2012). Protozoários dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* também apresentam estruturas semelhantes ao epítipo  $\alpha$ -Gal (AVILA et al., 1989; ALMEIDA et al., 1991; SCHNEIDER et al., 1994). Já foi mostrado que anticorpos anti- $\alpha$ -Gal se ligam ao epítipo  $\alpha$ -Gal presente em *Trypanosoma cruzi* e induzem a lise do parasito mediada pelo

sistema do complemento, sugerindo que tais imunoglobulinas podem contribuir para a proteção do hospedeiro na fase aguda da doença de Chagas (GAZZINELI et al., 1991).

Outros estudos, ainda, têm sugerido a presença do epítopo  $\alpha$ -Gal na superfície de esporozoítos de *P. falciparum*, *P. berguei* e *P. yoelii* (YILMAZ et al., 2014). Também foi verificada a presença de resíduos  $\alpha$ -Gal nas cadeias de carboidrato de antígenos glicoproteicos, em trofozoítos e esquizontes de *Plasmodium falciparum*, sugerindo que esses resíduos  $\alpha$ -Gal apresentam um papel essencial na ligação de anticorpos às glicoproteínas do parasito (RAMASAMY & REESE, 1986). A produção aumentada de anticorpos anti- $\alpha$ -Gal nas infecções por *P. falciparum* pode ser importante contra os estágios eritrocíticos do parasito, uma vez que antígenos com determinantes  $\alpha$ -Gal foram identificados na superfície de eritrócitos infectados por *P. falciparum* e no sobrenadante de cultivo *in vitro* (RAVINDRAN et al., 1988).

YILMAZ e colaboradores, em 2014, verificaram que quando o intestino de camundongos foi colonizado por *Escherichia coli* O86:B7, uma bactéria encontrada normalmente no trato gastrointestinal de seres humanos, esses camundongos exibiram resistência à infecção malárica transmitida por anofelinos infectados com *P. berguei*, sendo tal resistência associada ao aumento nos níveis de anticorpos IgM anti- $\alpha$ -Gal (**Figura 7**). Tais animais foram geneticamente modificados, sendo, portanto, capazes de produzir anticorpos anti- $\alpha$ -Gal. Do mesmo modo, foi observada uma associação entre os níveis de IgM anti- $\alpha$ -Gal e proteção à infecção por *P. falciparum* em indivíduos que residem em áreas endêmicas para a malária. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que tanto anticorpos IgG anti- $\alpha$ -Gal quanto IgM podem conferir proteção contra a transmissão da malária causada por *P. berguei*, após a imunização dos camundongos com membrana de hemácias de coelhos e também com o epítopo  $\alpha$ -Gal sintético conjugado com BSA (**Figura 7**). Além disso, foi sugerido que anticorpos IgM e algumas subclasses de IgG (IgG2 e IgG3) são capazes de inibir a migração através dos hepatócitos e a invasão dessas células por esporozoítos de *P. berguei in vitro* (YILMAZ et al., 2014).



**Figura 7:** Interação entre a microbiota intestinal do hospedeiro, o vetor e a resposta imune ao Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R ( $\alpha$ -Gal). Fonte: Adaptado de CABEZAS-CRUZ et al., 2015.

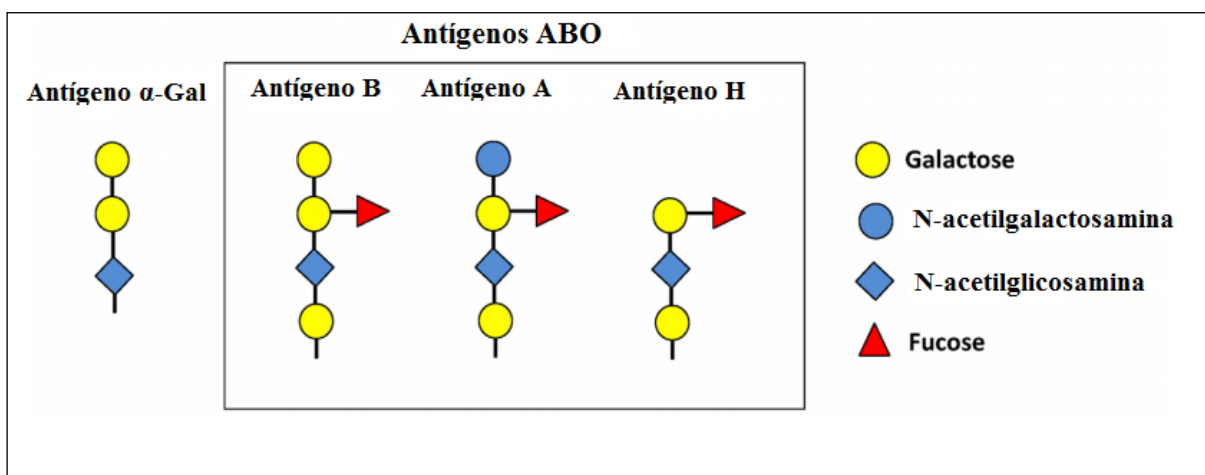
Uma vez que a presença do epítipo  $\alpha$ -Gal na superfície de *Plasmodium spp.* tem sido demonstrada e relacionada aos efeitos dos anticorpos anti- $\alpha$ -Gal em infecções por *P. falciparum*, CABEZAS-CRUZ e colaboradores investigaram se a incidência da malária está correlacionada com a resposta protetora desses anticorpos em indivíduos expostos à infecção, residentes no Senegal. Observou-se, então, que os níveis de IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal são significativamente maiores entre os indivíduos não infectados, sugerindo que há uma correlação negativa entre a incidência da doença e a resposta protetora de anticorpos IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal (CABEZAS-CRUZ et al., 2017).

Embora os anticorpos anti- $\alpha$ -Gal sejam alvo, atualmente, de vários estudos em diferentes áreas do conhecimento, pouco se sabe sobre o papel desses anticorpos na malária, principalmente no que se refere às infecções causadas por *P. vivax*, espécie que foi, por muito tempo, negligenciada pela comunidade científica. Dessa forma, compreender melhor os mecanismos imunes envolvidos na resposta ao epítipo  $\alpha$ -Gal em indivíduos com malária

vivax pode contribuir para a elucidação do papel desses anticorpos durante a infecção, bem como possibilitar a criação de novas metodologias de controle e prevenção da doença.

### 1.6. Grupos sanguíneos do Sistema ABO e a malária

O sistema ABO de grupo sanguíneo consiste em dois antígenos (A e B) e quatro tipos de sangue (A, B, AB e O), dentre os quais A, B e O são os tipos sanguíneos mais frequentes entre humanos, sendo O o tipo mais comum. O grupo sanguíneo O resulta da herança homocigótica dos alelos A e B, genes co-dominantes entre si e dominantes em relação ao alelo recessivo O, e indivíduos deste grupo expressam o antígeno H, que é o precursor dos antígenos A e B (**Figura 8**) (COOLING, 2015). A diversidade fenotípica do sistema ABO deve-se à diferença estrutural do gene das glicosiltransferases, que são enzimas responsáveis pela transferência dos resíduos específicos de açúcar ao substrato H. Enquanto a enzima N-acetilgalactosamina transferase converte o substrato H ao antígeno A, a enzima N-galactosiltransferase converte esse mesmo substrato ao antígeno B (YOSHIDA et al., 1979).



**Figura 8:** Estrutura dos antígenos de grupos sanguíneos e  $\alpha$ -Gal. Indivíduos que apresentam o tipo sanguíneo B, A e O expressam os antígenos B, A e H, respectivamente. Fonte: Adaptado de CABEZAS-CRUZ & DE LA FUENTE, 2017.

Os antígenos ABH são carboidratos ligados à glicolipídios e glicoproteínas presentes na membrana dos eritrócitos, podendo também ser encontrados em uma grande variedade de

células como plaquetas, endotélio capilar, células sinusoidais do baço, mucosa gastrointestinal e outros fluidos como saliva, urina e leite (SCHENKEL-BRUNNER et al., 2000). De maneira geral, seres humanos produzem anticorpos contra os antígenos A ou B ausentes. Assim, os indivíduos do grupo sanguíneo A produzem anticorpos contra o antígeno B, mas não contra o antígeno próprio A, e os indivíduos do grupo sanguíneo B produzem anticorpos contra o antígeno A, mas não contra o antígeno próprio B. Já indivíduos do grupo O produzem anticorpos contra ambos os antígenos (COOLING, 2015). A origem dos anticorpos anti-A ainda é controversa, já os anticorpos anti-B, por outro lado, tem sido associados à resposta imune estimulada pela microbiota intestinal (GALILI et al., 1988).

Estruturalmente, o antígeno B é bastante semelhante ao antígeno  $\alpha$ -Gal (**Figura 8**), uma vez que ambos compartilham o dissacarídeo Gal $\alpha$ 1-3Gal. Tal molécula é crucial e suficiente para que haja o reconhecimento deste epítopo por anticorpos anti- $\alpha$ -Gal. Além disso, já foi observado que indivíduos com tipo sanguíneo B apresentam menor resposta de anticorpos contra antígenos relacionados ao epítopo  $\alpha$ -Gal (RISPENS et al., 2013; MUTHANA & GILDERSLEEVE, 2016). Por essa razão, tem sido questionado se a autotolerância ao sangue do tipo B pode afetar a resposta imune ao  $\alpha$ -Gal, o que por sua vez, poderia aumentar ou diminuir a suscetibilidade desses indivíduos à doenças infecciosas causadas por patógenos que apresentam o epítopo  $\alpha$ -Gal em sua superfície, como o *Plasmodium sp.*

Sabe-se que os grupos sanguíneos ABO estão correlacionados à suscetibilidade e à gravidade em algumas doenças, dentre elas, a malária. No entanto, até o momento, a maioria dos mecanismos que relacionam tais grupos sanguíneos às doenças infecciosas são baseados em interações entre as células do hospedeiro e o parasito. Por exemplo, o tipo sanguíneo O tem sido associado à proteção contra a malária grave, em infecções por *P. falciparum*, devido à formação de rosetas, isto é, a adesão de eritrócitos parasitados a eritrócitos não parasitados, formando um agrupamento de células que se assemelha a uma roseta. Tem sido verificado, *in vitro*, que eritrócitos do tipo O formam um número inferior de rosetas, e de tamanho reduzido, quando comparados à eritrócitos infectados dos tipos sanguíneos A e B. Tal decréscimo na formação de rosetas diminui a obstrução microvascular, que pode estar envolvida na patogênese da malária grave (ROWE et al., 2007; MERCEREAU-PUJALON et al., 2008). Por outro lado, indivíduos do grupo sanguíneo A são mais suscetíveis à malária grave, visto

que polipeptídeos expressos na superfície de eritrócitos infectados por *P. falciparum* (*Repetitive Interspersed Families of Polypeptides* - RIFINs) se ligam mais eficientemente à eritrócitos do grupo sanguíneo A, aumentando, assim, a formação de rosetas (GOEL et al., 2015).

Recentemente, CABEZAS-CRUZ e colaboradores investigaram se a frequência dos tipos sanguíneos A, B, O e AB, em populações da África, Ásia, Europa e América, pode estar relacionada com a incidência de malária, tuberculose e dengue. Então, observou-se que a frequência do tipo sanguíneo B está positivamente correlacionada com a incidência de malária e tuberculose, cujos agentes etiológicos apresentam  $\alpha$ -Gal em sua superfície, mas não há correlação com a incidência de dengue, cujo vírus não produz tal antígeno. Por outro lado, constatou-se uma correlação negativa entre a frequência do tipo sanguíneo A e a incidência de malária e tuberculose (YILMAZ et al., 2014; CABEZAS-CRUZ et al., 2017).

Em conformidade com tais resultados, um estudo prospectivo realizado com crianças residentes em área endêmica para malária mostrou que crianças dos grupos sanguíneos B e AB apresentaram maiores taxas de incidência da doença, comparando-se com crianças dos grupos sanguíneos A e O (LOPERA-MESSA et al., 2015). E, ainda, foi observado que a redução da incidência de malária em países do continente africano, entre os anos de 2000 e 2015, está correlacionada com a diminuição da frequência do tipo sanguíneo B nessas populações (CABEZAS-CRUZ et al., 2017).

No entanto, deve-se ressaltar que todas essas informações foram relatadas em infecções causadas por *P. falciparum*, ao passo que poucos estudos têm sido realizados no que se refere à *P. vivax*. Nota-se, portanto, uma escassez de informações em relação a essa espécie. Assim, uma vez que a produção de anticorpos anti- $\alpha$ -Gal pode estar associada à diversos mecanismos imunológicos, como a destruição de eritrócitos não infectados, é importante investigar uma possível associação entre esses anticorpos e os grupos sanguíneos do sistema ABO.



## 2. JUSTIFICATIVA

Diante do reconhecimento do potencial patogênico de *P. vivax* e da ampla distribuição apresentada por essa espécie, faz-se necessário ampliar os estudos acerca desse parasito a fim de se determinar os possíveis mecanismos imunológicos envolvidos na determinação dos quadros clínicos de malária vivax. Além disso, a identificação de biomarcadores associados à infecção poderá contribuir para uma melhor compreensão desta patologia e permitir, assim, o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção para a malária.

Os autoanticorpos têm sido considerados importantes componentes da resposta imune durante a infecção por *P. vivax*, podendo exercer tanto um papel protetor, participando da destruição dos parasitos, quanto desencadeador de efeitos deletérios durante a infecção, participando, principalmente, da destruição de eritrócitos saudáveis e contribuindo, assim, para a anemia. A existência de dados controversos na literatura justifica a necessidade de se conduzir mais estudos com o intuito de esclarecer o papel dos autoanticorpos na infecção por *P. vivax*.

Autoanticorpos anti- $\alpha$ -Gal são produzidos naturalmente em seres humanos devido à exposição contínua aos componentes de bactérias gastrointestinais da microbiota normal, que expressam o epítopo  $\alpha$ -Gal, e representam em torno de 1% da produção de IgG circulantes. Antígenos com domínios  $\alpha$ -Gal já foram identificados em estágios sanguíneos de *P. falciparum* (RAMASAMY et al., 1986) e a produção de anticorpo anti- $\alpha$ -Gal foi associada à proteção contra a doença (YILMAZ et al., 2014). Entretanto, em infecções por *P. vivax*, não se reconhece a possível associação entre esses anticorpos e fatores determinantes de morbidade e/ou suscetibilidade à infecção.

A caracterização do perfil de resposta imune induzida pelo epítopo  $\alpha$ -Gal, bem como a associação dessa resposta à exposição ao parasito, à parasitemia e aos parâmetros hematológicos de morbidade como anemia e trombocitopenia, podem contribuir para o melhor entendimento da imunopatogênese da infecção e possibilitar, a longo prazo, o desenvolvimento de estratégias de controle da malária vivax em países endêmicos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Caracterizar o perfil da resposta imune humoral contra o antígeno  $\alpha$ -Gal em pacientes infectados com *Plasmodium vivax*.

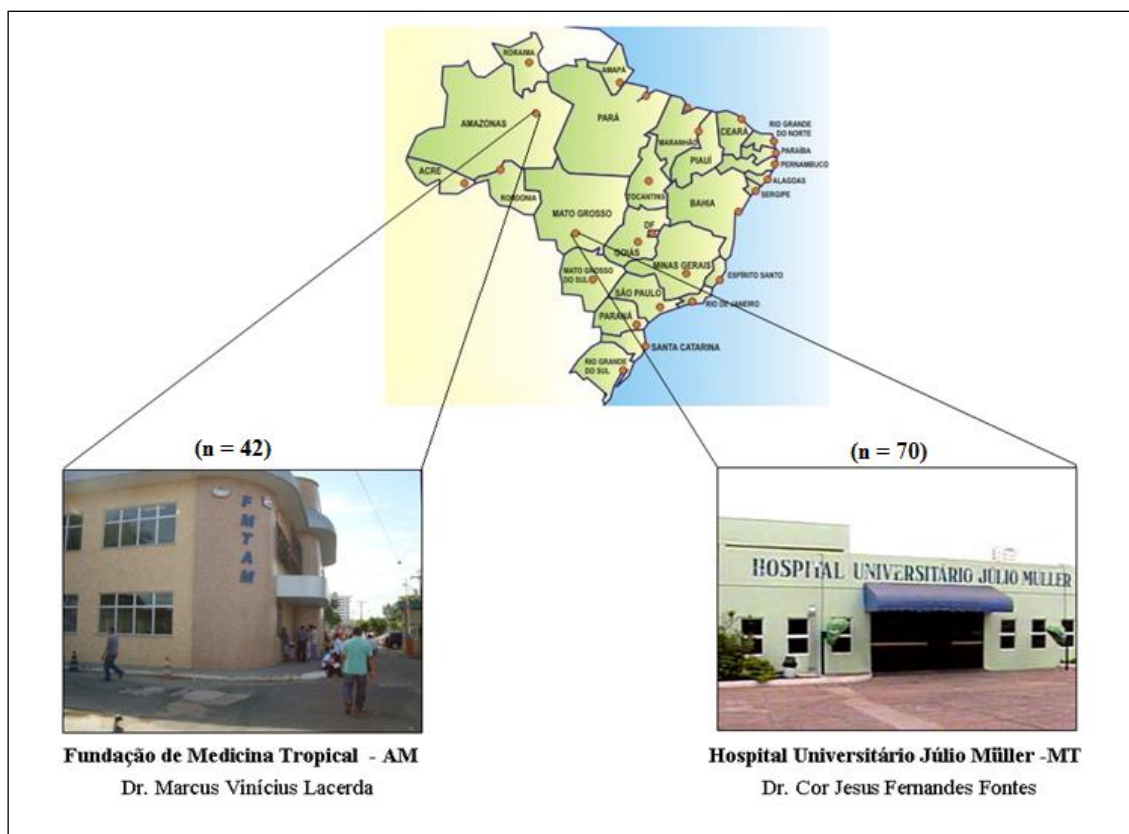
#### **3.2. Objetivos específicos**

- 1- Determinar o perfil da resposta de anticorpos IgG e IgM que se ligam ao epítopo  $\alpha$ -Gal, presentes no plasma de pacientes com infecção patente por *P. vivax*;
- 2- Associar as respostas de anticorpos IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal às variáveis demográficas (idade) e àquelas relacionadas à exposição à malária (número de episódios prévios), à parâmetros parasitológicos (parasitemia) e à parâmetros de morbidade (anemia, trombocitopenia).
- 3- Avaliar a participação dos anticorpos IgG anti- $\alpha$ -Gal na indução da fagocitose de eritrócitos não infectados oriundos de doadores saudáveis, utilizando células THP-1 *in vitro*.
- 4- Analisar a influência dos grupos sanguíneos A, B e O (Sistema ABO) nas taxas de eritrofagocitose estimulada por IgG anti- $\alpha$ -Gal.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. População de estudo

Amostras de sangue foram coletadas de 112 indivíduos adultos com infecção patente por *Plasmodium vivax* que procuraram o atendimento médico no Hospital Universitário Júlio Muller, em Cuiabá, no Mato Grosso (n = 70) ou na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus, Amazonas (n = 42), no período compreendido entre os meses de Fevereiro de 2006 a Janeiro de 2017 (**Figura 9**). Infecções por *P. vivax* foram diagnosticadas por meio do exame microscópico de gota espessa e confirmadas pela amplificação do gene 18s SSU rRNA de *Plasmodium* (SCOPEL et al., 2004). A parasitemia (parasitos/ $\mu$ L de sangue) foi determinada a partir do exame de cem campos microscópicos, utilizando-se um aumento de 10x na lente ocular e de 100x na lente objetiva, sob imersão em óleo.



**Figura 9:** Mapa do Brasil evidenciando as áreas de estudo e os centros de referência em atendimento de pacientes com malária.

Todos os pacientes foram examinados por um médico experiente que aplicou um questionário padrão previamente testado e elaborado, contendo perguntas relacionadas à história clínica e ao perfil demográfico dos indivíduos (Anexo 1). Os pacientes positivos para malária foram tratados conforme as recomendações preconizadas pelo Ministério da Saúde no Manual de Terapêutica da malária (Ministério da Saúde, 2010). Pacientes apresentando desnutrição grave ou infecções como HIV ou hepatite foram excluídos deste estudo. Como controle, utilizou-se plasma de 20 indivíduos saudáveis que residem em área não endêmica (Belo Horizonte, Minas Gerais) e que nunca foram expostos à malária. É importante mencionar que para a participação no presente estudo, a assinatura do termo de consentimento foi obtida de todos os indivíduos avaliados, conforme normatiza o Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, CAAE: 01496013.8.0000.5149, parecer 519.481).

#### **4.2. Tipagem sanguínea ABO**

A determinação dos grupos sanguíneos (sistema ABO) dos indivíduos incluídos neste estudo foi realizada por meio de prova direta ou prova reversa. Para isso, foram utilizados, respectivamente, reagentes Anti-A, Anti-B e Anti-AB (Prothemo, Brasil) ou o kit Revercel / Revercel Plus (Fresenius Kabi, Brasil), de acordo com as recomendações dos fabricantes.

#### **4.3. Preparo das Q $\beta$ *Virus-like Particles* (Q $\beta$ – VLP)**

O antígeno Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) utilizado no presente trabalho foi gentilmente cedido pelo professor Alexandre Ferreira Marques, do Laboratório de Imunoproteoma e Biologia de Parasitos – ICB/UFMG.

O vírus bacteriófago Q $\beta$  foi utilizado como modelo para a síntese da Q $\beta$  – VLP, produzida em colaboração com o Dr. M. G. Finn, do Georgia Institute of Technology, em Atlanta, Georgia, EUA. Aproximadamente 150 mg de partículas purificadas foram isoladas por litro de cultura, a partir do sistema de expressão em bactérias *E. coli*. As partículas foram preparadas como detalhado por Fiedler e colaboradores (FIEDLER et al., 2010). De acordo com a análise por espectrometria de massa, cerca de 540 unidades do epítipo  $\alpha$ -Gal foram

ligadas por partícula, sendo a estrutura do capsídeo altamente estável, o que possibilita seu armazenamento a longo prazo.

#### **4.4. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

A reatividade dos soros dos indivíduos incluídos neste estudo ao antígeno Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) foi avaliada por meio de Ensaio Imunoenzimático (ELISA), conforme descrito abaixo.

Primeiramente, foram realizados testes de padronização com duas concentrações diferentes (10ng/orifício e 20ng/orifício) do antígeno Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) e também com duas diluições diferentes (1:100 e 1:200) dos soros a serem testados. Para isso, microplacas de 96 orifícios (Costar, Cambridge, MA) foram sensibilizadas com 50 $\mu$ L do antígeno em questão, em uma das duas concentrações mencionadas acima, diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6; 50 mM) e incubadas por 18 horas, a 4°C. Após a incubação, o conteúdo das microplacas foi desprezado e adicionou-se 200 $\mu$ L/orifício de PBS, pH 7,4, contendo 1% de BSA (Sigma, Aldrich). As placas foram, então, incubadas por 50 minutos, a 37°C. Após o bloqueio, o conteúdo foi descartado e 50 $\mu$ L das amostras de soros foram adicionadas a cada orifício, em duplicatas, diluídos 1:100 e 1:200 em PBS com 1% de BSA.

Após incubação de 1 hora e 30 minutos, a 37°C, as placas foram lavadas três vezes com PBS, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBST). O anticorpo secundário, anti-IgG e anti-IgM humano biotilado foi, então, adicionado (50 $\mu$ L/orifício), na diluição de 1:4000 e 1:5000, respectivamente, em PBS com 1% de BSA, seguindo-se por incubação a 37°C, por 30 minutos. Após esse intervalo de tempo, uma etapa adicional foi realizada, uma vez que utilizou-se anticorpo secundário biotilado. Essa etapa consistiu em três lavagens, acompanhada pela adição de estreptavidina conjugada à peroxidase (1:4000 em PBS com 1% de BSA) e incubação a 37°C, por 30 minutos. Transcorrido esse período, as placas foram lavadas quatro vezes. A revelação foi realizada por meio da adição de OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride substrate* – Sigma, EUA), diluído em tampão citrato-fosfato, pH 5,0, contendo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (100 $\mu$ L/well). Em seguida, as placas foram incubadas em temperatura ambiente e protegidas da luz por 15 minutos, até a reação ser interrompida pela adição de 50 $\mu$ L de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Os valores de absorbância

(densidade óptica - DO) das microplacas foram quantificados a 492 nm, em um leitor de ELISA automático (SpectraMax 240 PC, Molecular Devices).

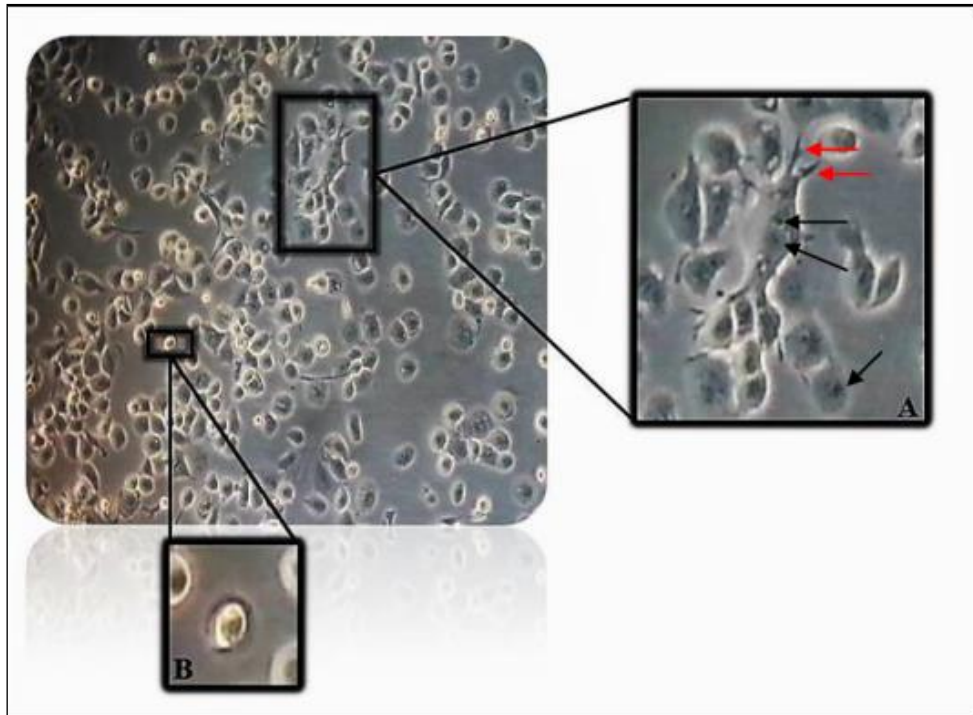
#### **4.5. Eritrofagocitose por macrófagos THP-1**

##### **4.5.1. Cultivo de células THP-1**

Células provenientes de uma linhagem de monócito humana (THP-1) foram cultivadas (5% de CO<sub>2</sub> a 37°C) em garrafas de 75cm<sup>2</sup> (Corning Flask, Corning Incorporation, Corning, NY, USA) com meio RPMI 1640 (Merck–Millipore, Darmstadt, Germany) contendo 300mg/L de L-Glutamina, 25mM de HEPES e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado a 56 °C por 1 hora (FBS, Sigma-Aldrich), 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B. As células foram repicadas a cada dois dias e mantidas em uma densidade próxima a 3,0×10<sup>5</sup> células/mL. Por se tratar de um aminoácido rapidamente degradado, a L-Glutamina (*L-Glutamine*, Gibco-Thermo Fisher Scientific, Loughborough, UK) foi reposta a cada 15 dias no meio de cultura.

As células THP-1, por serem monócitos, necessitam de ativação para se diferenciarem em macrófagos, que apresentam maior potencial fagocítico. Para isso, as células foram ressuspendidas para uma concentração final de 5x10<sup>5</sup> células/mL e incubadas em meio RPMI 1640 contendo 100 nM de PMA (*phorbol12-myristate-13-acetate*) em concentração de 1µl/mL durante 72 horas, que é o tempo considerado ótimo para a ativação dos monócitos (MEDEIROS, 2016) . A suspensão de células foi, então, transferida para lâminas de cultivo com quatro poços (*Slide Cell Culture, 4 Well*, Millicell-Thermo Fisher Scientific) e mantida em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Ao final das 72 horas, utilizou-se um microscópio invertido para avaliar as características morfológicas das células e confirmar a diferenciação celular. Vale ressaltar que os monócitos são pequenos, arredondados e não formam pseudópodes. Os macrófagos, por sua vez, são maiores, com formato amebóide, emitem pseudópodes e apresentam um grande número de vesículas em seu interior (**Figura 10**).



**Figura 10:** Células THP-1 visualizadas em microscópio óptico invertido 72 horas após a adição de PMA. (A) Macrófagos são maiores, com formato irregular, emitem pseudópodes (setas vermelhas) e apresentam vesículas em seu interior (setas pretas). Já os monócitos (B) são mais arredondados, não emitem pseudópodes e não possuem vesículas em seu interior. Fonte: Medeiros, 2016.

#### 4.5.2. Preparo dos eritrócitos e eritrofagocitose

Para a obtenção dos eritrócitos, foram coletados 3 mL de sangue venoso, em tubos Vacutainer contendo heparina (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), de nove doadores voluntários saudáveis cujos parâmetros clínicos estavam dentro dos índices de normalidade, excluindo-se, portanto, qualquer tipo de anemia. O sangue desses indivíduos foi tipado quanto ao sistema sanguíneo ABO utilizando-se kit comercial. Dos nove doadores, três pertenciam ao grupo A, três ao grupo B e três ao grupo O.

O volume de sangue colhido foi, então, transferido para um tubo de 15 mL (Falcon 2074, BD Biosciences) e centrifugado, à temperatura ambiente, a 200g, por 10 minutos. O plasma foi removido e a papa de eritrócitos foi lavada com cinco volumes de tampão fosfato-salina (Phosphate Buffered Saline [PBS], pH 7.4, NaCl 150 mM). Em seguida, os eritrócitos foram novamente centrifugados a 200g, por 10 minutos em temperatura ambiente e foram realizadas outras três lavagens. Os eritrócitos foram contados em câmara de Neubauer e

ressuspendidos para uma concentração final de  $5 \times 10^6$  células/mL em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (Sarstedt, Nümbrecht, GER) contendo PBS.

Para a realização de três ensaios de eritrofagocitose independentes, em um primeiro momento, foram realizados testes de padronização utilizando-se duas concentrações diferentes (2% e 4% v/v) de um anticorpo IgG anti- $\alpha$ -Gal (gentilmente cedido pelo professor Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli, do Laboratório de Imunoparasitologia – ICB/UFMG), a fim de avaliar qual das duas concentrações mencionadas seria a ideal para os ensaios de eritrofagocitose.

Posteriormente, os eritrócitos já lavados foram opsonizados por meio da incubação de  $5,0 \times 10^6$  eritrócitos/mL com 2% v/v de IgG anti- $\alpha$ -Gal em PBS, por 1 hora a 37°C, sob agitação. Como controle positivo, utilizou-se anticorpo comercial policlonal anti-eritrócito humano ( *$\alpha$ -Red Blood Cells –  $\alpha$ -RBCs*) e, como controle negativo, utilizou-se PBS. Após a incubação, os eritrócitos foram então centrifugados a 200g, por 10 minutos, à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Uma etapa de lavagem com PBS, seguida por centrifugação a 200g, por 10 minutos, à temperatura ambiente foi realizada para remover os anticorpos que não se ligaram aos eritrócitos. O sobrenadante foi novamente descartado e os eritrócitos opsonizados, de cada um dos três tratamentos, foram ressuspendidos em meio RPMI 1640 completo e adicionados a cada orifício de uma câmara LabTek (Merck–Millipore) contendo macrófagos THP-1 previamente ativados, sendo então incubados em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, por 2 horas.

Após esse intervalo de tempo, os eritrócitos não fagocitados foram lisados por meio da adição de 1 mL de água destilada gelada durante 30 segundos e, em seguida, foram realizadas mais duas lavagens com PBS. Assim que as câmaras Labtek secaram, as lâminas foram separadas do restante do aparato e coradas com Giemsa (Merck–Millipore, Darmstadt, GER) por 25 minutos. As lâminas fixadas e coradas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus CH30) em aumento de 100x, sob imersão em óleo, por dois microscopistas diferentes. Cada contagem refere-se ao total de 400 macrófagos e considerou-se eritrofagocitose quando foi observada a presença de eritrócitos no citoplasma do macrófago.

A taxa de Eritrofagocitose (TE) foi determinada pela seguinte fórmula:



$$TE = \frac{\text{Número de macrófagos contendo eritrócitos fagocitados (fagocitose)}}{\text{Número total de macrófagos contados (400)}} \times 100$$

#### 4.6. Análise Estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad Software*, Califórnia, USA). A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste estatístico de D' Agostino – Pearson. A intensidade da resposta de anticorpos IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal, em pacientes com e sem infecção patente por *P. vivax*, foi analisada utilizando-se o teste exato de Fisher. Para comparar a resposta de anticorpos IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal entre os diferentes grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis, acompanhado pelo teste *post hoc* de Dunns. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

Para analisar o efeito da opsonização de eritrócitos não infectados, por anticorpos IgG anti- $\alpha$ -Gal, nas taxas de eritrofagocitose e a influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO utilizou-se, também, o teste estatístico de Kruskal-Wallis, acompanhado pelo teste *post hoc* de Dunns. Em ambos os casos, valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Descrição da população de estudo

A população estudada no presente trabalho consistiu em 112 indivíduos, com média de idade de 37,7 ( $\pm$  15,2) anos. Durante o exame médico, constatou-se que as manifestações clínicas mais relatadas dentre os 112 pacientes infectados por *P. vivax* foram: febre (90,8%), calafrio (80,0%), cefaleia (79,0%), mialgia (81,8%), epigastralgia (51,8%), náusea (51,8%) e vômito (32,7%) (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** Manifestações clínicas relatadas pelos pacientes infectados por *P. vivax* durante o exame médico.

Manifestação clínica	n	%
Febre	99	90,8
Calafrio	88	80,0
Cefaléia	87	79,0
Mialgia	90	81,8
Epigastralgia	57	51,8
Náusea	57	51,8
Vômito	36	32,7

Em relação à exposição, avaliada neste estudo por meio da variável “número de episódios prévios de malária”, verificou-se que esses pacientes apresentaram, em média, cerca de  $3,3 \pm 4,4$  episódios anteriores de malária (**Tabela 2**). O exame microscópico de gota espessa revelou que a média de parasitemia detectada na população deste estudo foi de 5.531 parasitos/ $\mu$ L de sangue. No que se refere aos parâmetros hematológicos, constatou-se que os pacientes em questão apresentaram, em média, níveis de hemoglobina iguais a 12,7 g/dL e de hematócrito igual a 38,4%. A avaliação dos hemogramas revelou, ainda, que os pacientes em questão apresentaram uma contagem média de plaquetas igual a 124.353 plaquetas/ $\text{mm}^3$

sangue e uma contagem média de leucócitos equivalente a 5.471 leucócitos/mm<sup>3</sup> de sangue (Tabela 2).

**Tabela 2:** Caracterização da população de estudo.

Parâmetro	Média ± Desvio Padrão
Idade (anos)	37,7 ± 15,2
Número de episódios prévios de malária	3,3 ± 4,4
Parasitemia (parasitos/μL sangue)	5.531 ± 12.154
Hemoglobina (g/dL)	12,7 ± 2,8
Hematócrito (%)	38,4 ± 8,1
Plaquetas (células/mm <sup>3</sup> sangue)	124.353 ± 66.483
Leucócitos (células/mm <sup>3</sup> sangue)	5.471 ± 1.800

Com base no resultado do hemograma, os pacientes com infecção patente por *P. vivax* foram separados em dois grupos: i) com anemia e ii) sem anemia (Tabela 3).

**Tabela 3:** Comparação entre os pacientes infectados por *P. vivax* anêmicos e não anêmicos.

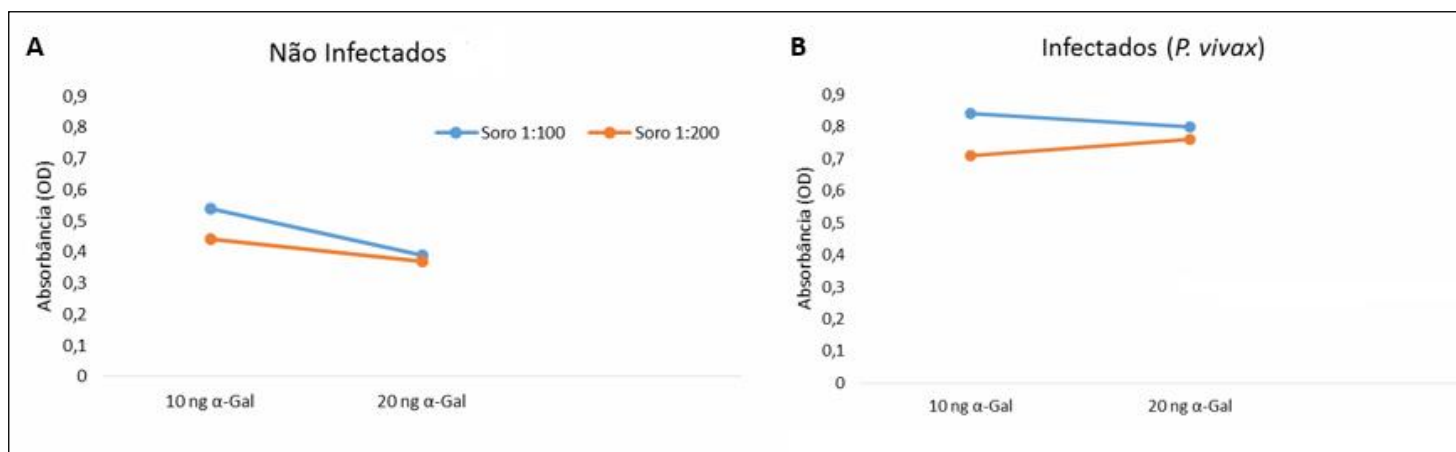
Parâmetro	Anêmicos	Não anêmicos	Valor p
Idade (anos)	36,0 ± 16,2	38,2 ± 14,6	0,4429
Número de episódios prévios de malária	2,6 ± 3,7	3,7 ± 4,7	0,0985
Parasitemia (Parasitos/ μL sangue)	6.556 ± 9.825	5011 ± 13314	0,1247
Hemoglobina (g/dL)	9,5 ± 1,9	14,4 ± 1,5	< 0, 0001
Hematócrito (%)	29,5 ± 4,8	43,3 ± 4,7	< 0, 0001
Plaquetas (células/mm <sup>3</sup> )	118.761 ± 82.498	127.643 ± 57.140	0,1638
Leucócitos (células/mm <sup>3</sup> )	5.187 ± 1.619	5645 ± 1881	0,2372

No presente estudo, a anemia foi definida como a presença de níveis de hemoglobina iguais ou inferiores a 11 g/dL e apenas os pacientes com anemia normocítica (volume corpuscular médio igual a 80-95 fL) e normocrômica (concentração de hemoglobina corpuscular média de 32-36 g/dL) foram incluídos.

## 5.2. Detecção de anticorpos anti-Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) em plasmas de pacientes infectados por *P. vivax*

### 5.2.1. Padronização da ELISA para a detecção de anticorpos anti-Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal)

Para determinar as melhores condições de trabalho para a detecção de anticorpos anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) no plasma de pacientes infectados por *P. vivax*, foram realizados testes de padronização utilizando-se duas concentrações diferentes do antígeno Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) (10ng/orifício e 20ng/orifício) e também duas diluições distintas (1:100 e 1:200) dos plasmas de indivíduos saudáveis (n = 3) ou de indivíduos infectados por *P. vivax* (n = 6). A **figura 11** apresenta a média da leitura da densidade óptica da titulação de anticorpos anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) empregando-se plasmas negativos (**Figura 11-A**) e positivos (**Figura 11-B**) para a malária vivax, utilizando-se o anticorpo anti-IgG humano como anticorpo secundário.



**Figura 11:** Padronização do ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos IgG contra o epítipo  $\alpha$ -Gal, testando-se duas concentrações diferentes de antígeno (10 ng e 20 ng), bem como duas

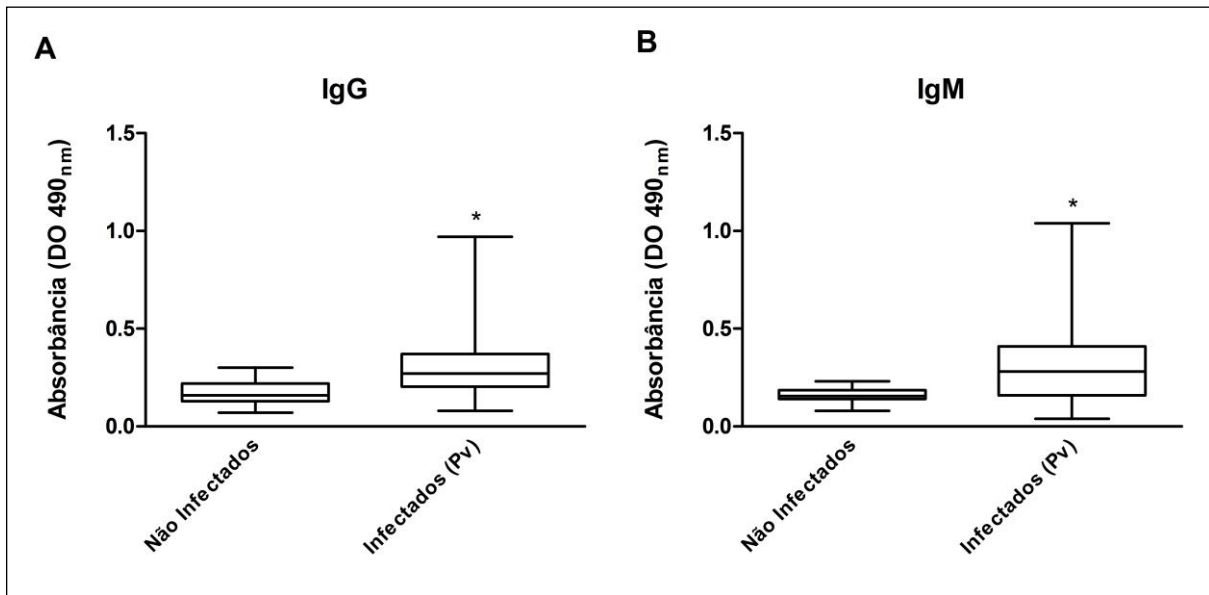
diluições distintas do plasma (1:100 e 1:200) de indivíduos controle (A) e de pacientes com infecção patente por *P. vivax* (B).

Em relação à concentração do antígeno, verificou-se que não houve diferença entre a reatividade dos plasmas nas duas concentrações testadas e, por essa razão, optou-se por utilizar 10ng/orifício, já que essa concentração de antígeno foi capaz de detectar anticorpos nas duas diluições dos plasmas de indivíduos positivos para a malária vivax. No que se refere à diluição dos plasmas, a diluição ótima foi estabelecida como 1:100, uma vez que nessa diluição houve maior diferença entre a densidade ótica dos plasmas positivos e para ambas as concentrações do antígeno. Os mesmos testes de padronização foram realizados utilizando-se o anticorpo anti-IgM humano como anticorpo secundário e resultados semelhantes foram obtidos (dados não mostrados). Portanto, essas condições foram definidas como padrão e utilizadas para os demais experimentos.

### **5.2.2. Comparação entre os níveis de anticorpos IgG e IgM anti-Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) de indivíduos saudáveis e de pacientes com infecção patente por *P. vivax*.**

Para determinar se anticorpos IgG anti-Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) estariam aumentados durante a infecção por *P. vivax*, os níveis de tais imunoglobulinas foram analisados, por meio de ELISA, utilizando-se plasmas de pacientes infectados (n = 112) e de indivíduos saudáveis nunca expostos à malária (n = 20). Verificou-se que os níveis de IgG anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) detectados para os pacientes infectados por *P. vivax* foram maiores (mediana DO: 0,27; intervalo interquartil: [0,20-0,37]) que aqueles detectados para os indivíduos controle não infectados (mediana DO: 0,16; intervalo interquartil: [0,13-0,22]) (Mann Whitney, p < 0,0001) (**Figura 12-A**).

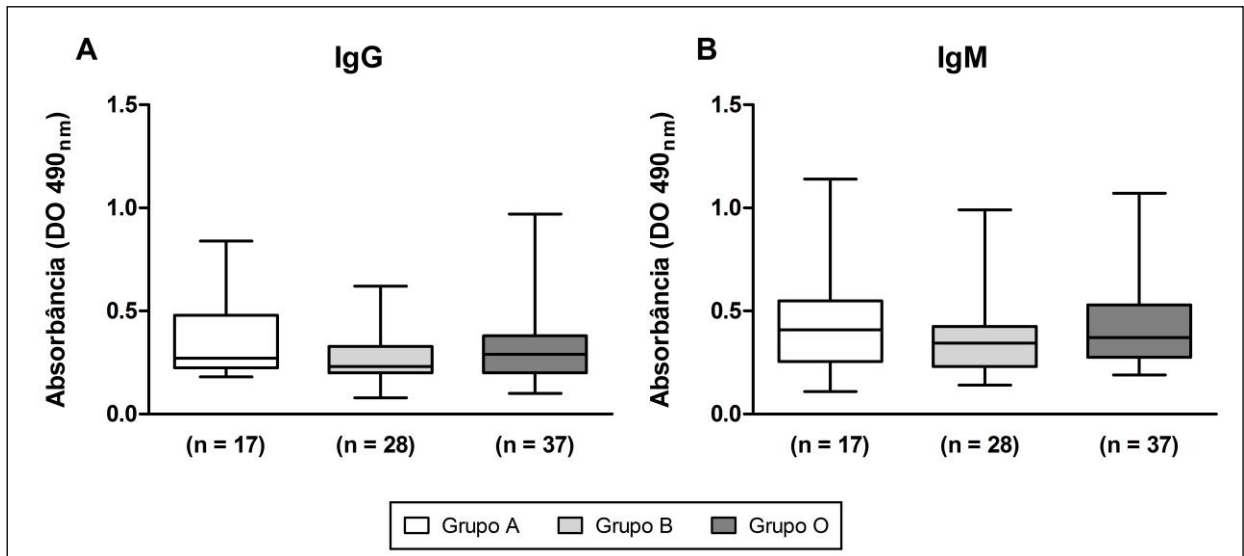
Essa mesma análise também foi realizada para IgM anti-Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal). Os resultados dessa análise mostraram que os pacientes infectados por *P. vivax* apresentaram níveis de IgM anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) superiores aos observados para o controle (0,28 [0,16-0,41]) *versus* (0,15 [0,14-0,18]), respectivamente (Mann-Whitney, p = 0,0005) (**Figura 12-B**).



**Figura 12:** Resposta de IgG e IgM contra o antígeno Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) em indivíduos controle (n = 20) e em pacientes com infecção patente por *P. vivax* (n = 112). Os níveis de anticorpos anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) foram detectados por ELISA e expressos como valores de densidade óptica. As linhas centrais nos boxes representam a mediana e as barras flutuantes indicam os valores máximos e os mínimos. Significância estatística foi determinada por meio do teste estatístico de Mann-Whitney.\* Indica um valor de p < 0.05.

### 5.2.3. Comparação entre os níveis de anticorpos IgG e IgM anti-Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) de pacientes com infecção patente por *P. vivax* e a influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO.

Após a realização da tipagem dos grupos sanguíneos utilizando-se plasmas de indivíduos infectados por *P. vivax*, esses pacientes foram divididos em três grupos distintos: tipo A (n = 17), tipo B (n = 28) e tipo O (n = 37). Avaliou-se, então, a influência desses três tipos sanguíneos na resposta de anticorpos IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal e não foi observada nenhuma associação entre os níveis de tais imunoglobulinas e o grupo sanguíneo apresentado pelos pacientes (valores de p = 0,1740 e p = 0,2811, respectivamente) (**Figura 13**). Para esta análise, nem todas as 112 amostras puderam ser utilizadas devido à ausência ou pouca quantidade das mesmas, resultando em um menor tamanho amostral. Além disso, foram excluídos os pacientes pertencentes ao grupo sanguíneo AB.



**Figura 13:** Influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO na resposta de anticorpos IgG e IgM contra o antígeno  $\alpha$ -Gal. Cada caixa representa o intervalo que contém os 50% centrais dos dados, sendo que a linha central representa a mediana. As linhas acima e abaixo da caixa indicam, respectivamente, os valores máximos e mínimos. As diferenças entre os níveis de anticorpos IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal apresentados pelos pacientes infectados por *P. vivax* foram analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis, acompanhado pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

#### 5.2.4. Influência da idade e da exposição prévia à malária na resposta de anticorpos contra Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) em pacientes com infecção patente por *P. vivax*.

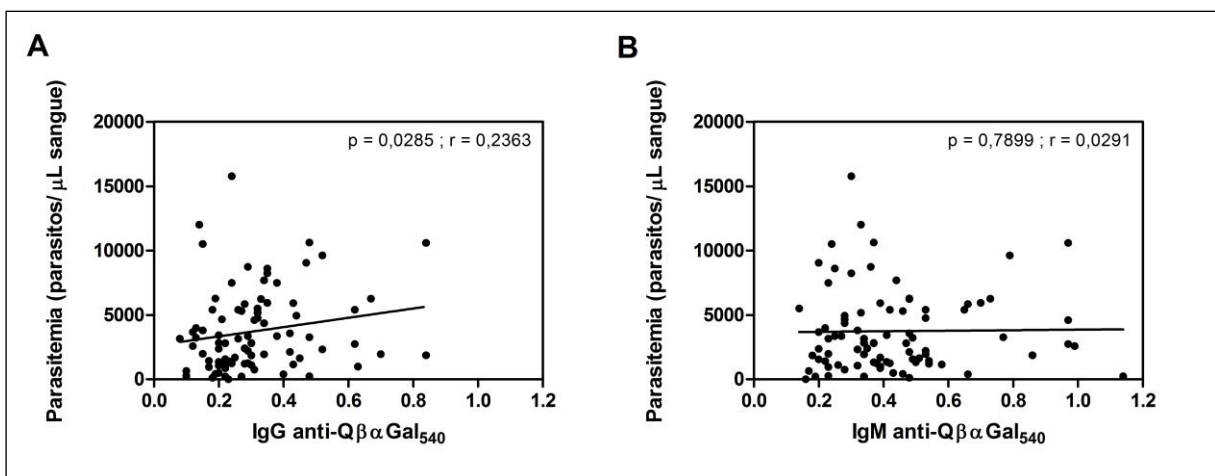
Uma vez que a idade e a intensidade de exposição à malária são variáveis que afetam a magnitude da resposta de anticorpos anti- $\alpha$ -Gal em infecções por *P. falciparum* (AGUILAR et al., 2018), também investigamos, neste estudo, a relação entre tais parâmetros e a resposta de anticorpos IgG ou IgM contra a Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) na infecção por *P. vivax*.

No que se refere à resposta de IgG, nenhuma correlação foi encontrada entre idade e níveis de IgG anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) (Correlação de Spearman:  $r = 0,2023$ ,  $p = 0,0603$ ). Também não se observou qualquer associação entre os níveis de IgG anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) e exposição prévia à malária (Correlação de Spearman:  $r = -0,1339$ ,  $p = 0,2163$ ) (dados não mostrados).

Quando se avaliou a resposta de IgM anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) também não foram encontradas correlações significativas entre os níveis dessas imunoglobulinas e idade (Correlação de Spearman:  $r = -0,0269$ ,  $p = 0,8042$ ) ou número de episódios prévios de malária (Correlação de Spearman  $r = -0,1714$ ,  $p = 0,1124$ ) (dados não mostrados).

### 5.2.5. Influência da parasitemia na resposta de IgG e IgM contra Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) em pacientes com infecção patente por *P. vivax*.

Uma vez que os plasmódios expressam resíduos  $\alpha$ -Gal em sua superfície, outra relação investigada no presente estudo foi a influência da parasitemia na resposta de IgG e IgM anti-Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal). Verificou-se uma correlação direta entre os níveis de IgG anti-Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) e a parasitemia (**Figura 14-A**) (Correlação de Spearman:  $r = 0,2363$ ,  $p = 0,0285$ ). Quando se avaliou a resposta de IgM, nenhuma correlação foi encontrada (Correlação de Spearman:  $r = 0,0291$ ,  $p = 0,7899$ ) (**Figura 14-B**).



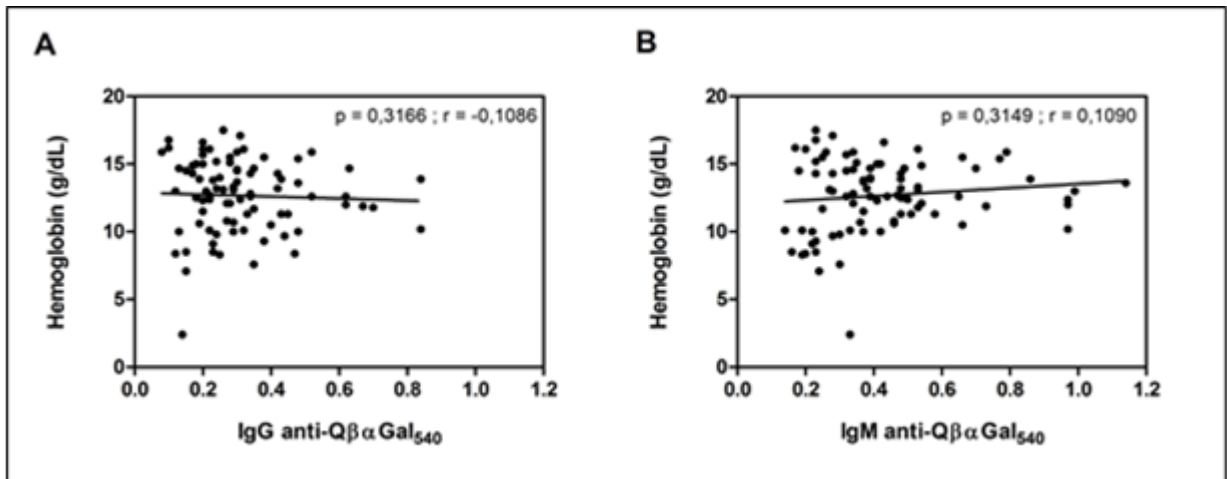
**Figura 14:** Correlação de Spearman entre a resposta de IgG (A) e IgM (B) anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) e a parasitemia.

### 5.2.6. Associação da resposta de anticorpos anticorpos IgG e IgM anti-Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal) a parâmetros clínicos indicativos de morbidade: anemia e trombocitopenia

Atualmente, no Brasil, tem sido observado um maior número de internações hospitalares em infecções por *P. vivax*, o que revela que os casos de malária grave causadas por essa espécie têm aumentado no país. Como as alterações hematológicas são frequentemente relatadas nos casos de malária grave, nós também investigamos, neste estudo, as associações entre a resposta de IgG e IgM anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) e a anemia ou a trombocitopenia, parâmetros clínicos indicativos de morbidade, em infecção patente por *P. vivax*. Levando-se em consideração a anemia, nenhuma associação foi encontrada entre os níveis de hemoglobina e os de IgG anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) (Correlação de Spearman:  $r = -0,1086$ ,  $p =$

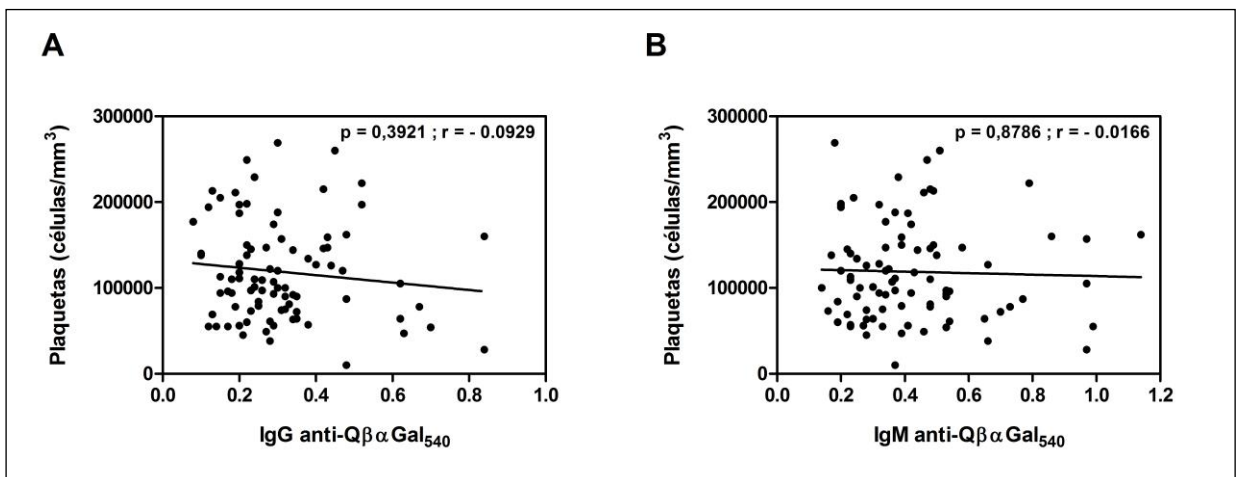


0,3166) (**Figura 15-A**). No que se refere à IgM anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal), não houve correlação entre os níveis dessas imunoglobulinas e a anemia (Correlação de Spearman:  $r = 0,1090$ ,  $p = 0,3149$ ) (**Figura 15-B**).



**Figura 15:** Correlação de Spearman entre a resposta de IgG (A) e IgM (B) anti-Q $\beta$  ( $\alpha$ -Gal) e os níveis de hemoglobina.

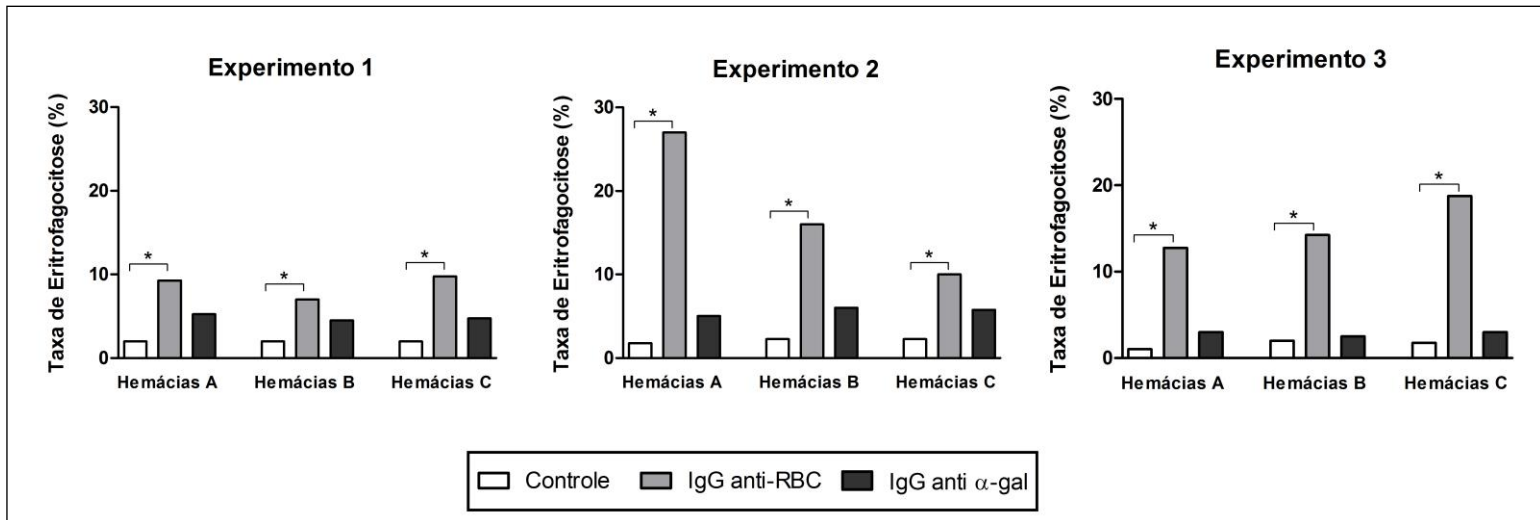
Quando se avaliou a influência dos níveis de plaquetas na resposta de anticorpos anti-Q $\beta$ ( $\alpha$ -Gal), não houve correlação tanto para IgG (Correlação de Spearman:  $r = -0,0929$ ,  $p = 0,3921$ ) (**Figura 16-A**) quanto para IgM (Correlação de Spearman:  $r = -0,0166$ ,  $p = 0,8786$ ) (**Figura 16-B**).



**Figura 16:** Correlação de Spearman entre a resposta de IgG (A) e IgM (B) anti-Q $\beta$   $\alpha$ -Gal e os níveis de plaquetas.

### 5.3. Avaliação do efeito do anticorpo anti- $\alpha$ Gal na fagocitose de hemácias não infectadas de diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO por células THP-1

Foi observado, em três experimentos independentes realizados, que o anticorpo anti- $\alpha$ Gal produzido em camundongos não exerce influência na fagocitose de hemácias não infectadas. Além disso, eritrócitos dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO são igualmente fagocitados, indicando que o grupo sanguíneo não interfere nesse mecanismo (Figura 17).



**Figura 17:** Fagocitose, por macrófagos THP-1, de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO opsonizadas com IgG anti-hemácia ou IgG anti- $\alpha$ -Gal. Hemácias não opsonizadas tratadas com PBS foram utilizadas como controle. A taxa de eritrofagocitose foi determinada como a razão entre o número de macrófagos contendo eritrócitos fagocitados dividido pelo número total de macrófagos contados, multiplicada por 100.

## 6. DISCUSSÃO

Em termos de resposta imune adaptativa, os anticorpos são as principais moléculas efetoras que participam das interações parasito-hospedeiro, podendo agir em conjunto com outros fatores. Além disso, o papel protetor ou patogênico dos anticorpos está relacionado não apenas à magnitude da resposta, mas também à função efetora que eles exercem (CASTRO-GOMES et al., 2014). E nesse cenário, deve-se considerar a possibilidade de anticorpos produzidos durante a infecção por *P. vivax* exercerem um duplo papel na malária vivax.

Uma das principais características da resposta imune durante a malária é o aumento nos níveis de imunoglobulinas no soro, tanto em humanos quanto em modelos murinos, sendo que parte dessas imunoglobulinas não é direcionada à antígenos do parasito e, sim, à diferentes antígenos do hospedeiro (ABELE et al., 1965; TERNYNCK et al., 1991). Diversos estudos realizados tanto com *P. falciparum* quanto com *P. vivax* já demonstraram, por exemplo, a presença de imunoglobulinas direcionadas à eritrócitos (FACER, 1980; BERZINS et al., 1983). Assim como em outras doenças infecciosas que podem causar anemia, durante a malária também ocorre a produção de autoanticorpos contra diferentes antígenos do hospedeiro, como proteínas do citoesqueto (TERNYNCK et al., 1991), proteínas de membrana (ARESE et al., 2005), enzimas (RITTER et al., 1993), fosfolipídios (CONSIGNY et al., 2002) e motivos de carboidratos, como o epítipo  $\alpha$ -Gal (RAVINDRAN et al., 1988). Tais anticorpos podem se ligar a hemácias não infectadas, mediando a fagocitose dessas células e contribuindo, assim, para a anemia. No entanto, ainda não está esclarecido se estes autoanticorpos desempenham um papel protetor contra os estágios sanguíneos do parasito ou se tais moléculas exercem um papel patogênico ou, ainda, se desempenham um papel duplo na malária.

Nos últimos anos, anticorpos anti- $\alpha$ -Gal têm sido intensamente estudados devido às suas diversas aplicações clínicas. Tais anticorpos são continuamente produzidos em seres humanos em consequência da constante estimulação antigênica por bactérias da flora intestinal normal, constituindo de 1 a 5% das imunoglobulinas IgG e IgM circulantes. Visto que anticorpos anti- $\alpha$ -Gal estão presentes em grandes quantidades em humanos

imunocompetentes, sua utilização tem sido considerada promissora a fim de se aumentar a imunogenicidade de vacinas antivirais e antitumorais.

Uma vez que já foi constatada a presença do epítopo  $\alpha$ -Gal na superfície de *P. falciparum*, *P. berguei* e *P. yoelli* (YILMAZ et al., 2014) e, principalmente, considerando-se a escassez de estudos relacionados ao papel desses anticorpos na malária vivax, faz-se necessário investigar a resposta de anticorpos contra esse epítopo em indivíduos com infecção patente por *P. vivax*, bem como uma possível associação com a idade desses indivíduos, com o número de episódios prévios de malária, com parâmetros hematológicos e com os parâmetros clínicos indicadores de morbidade, como anemia e trombocitopenia. Tais informações serão úteis para elucidar a resposta imune do hospedeiro contra o epítopo  $\alpha$ -Gal, bem como poderão contribuir para validar ou não os anticorpos anti- $\alpha$ -Gal como bons biomarcadores de infecção.

Recentemente, foi demonstrado que anticorpos anti- $\alpha$ -Gal podem conferir proteção contra *Plasmodium spp.*, reduzindo a transmissão da doença pelo mosquito anofelino. Neste mesmo trabalho foi mostrado também que os níveis de IgG e IgM tendem a aumentar com a idade, tanto em crianças quanto em adultos (YILMAZ et al., 2014). Embora, no presente estudo, não tenha sido observada uma correlação entre a idade dos pacientes e os níveis de anticorpos anti- $\alpha$ -Gal apresentados, recentemente foi mostrado que tal resposta pode variar de acordo com a idade, em crianças. Aguilar e colaboradores investigaram a resposta de anticorpos IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal em crianças de dois países africanos, área de transmissão endêmica da malária, e observaram que tal resposta varia, principalmente, de acordo com a idade e localização geográfica das crianças. Outros fatores, como exposição prévia à doença, também influenciaram tal resposta. Os autores também mostraram que a magnitude da resposta de IgM anti- $\alpha$ -Gal está associada à proteção, enquanto os níveis de IgG estão correlacionados ao risco de infecção (AGUILAR et al., 2018).

No presente estudo, verificou-se que os níveis de anticorpos IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal, em pacientes infectados por *P. vivax* residentes em área endêmica, são superiores quando comparados com indivíduos saudáveis nunca expostos. Tal achado indica que esses anticorpos podem desempenhar um papel importante em infecções por essa espécie, uma vez que estão relacionados à opsonização e à remoção de eritrócitos (GALILI et al, 1985a;

(GALILI, 1993b). Resultado semelhante foi observado em infecções por *P. falciparum*, uma vez que pacientes avaliados durante a fase aguda da doença também apresentaram maiores níveis de IgG anti- $\alpha$ -Gal. Além disso, estes autores sugeriram que tais anticorpos podem desempenhar um papel protetor contra o parasito, visto que pacientes com malária cerebral apresentaram menores níveis de anticorpos contra este carboidrato (RAVINDRAN et al., 1988). Entretanto, não se sabe qual é o papel – patogênico ou protetor – desempenhado pelos anticorpos anti- $\alpha$ -Gal nas infecções por *P. vivax* nem quais mecanismos podem estar envolvidos. Nesse sentido, cabe ressaltar a escassez de estudos relacionados ao tema, o que torna necessário uma investigação mais aprofundada acerca da resposta de anticorpos anti- $\alpha$ -Gal durante a malária vivax.

Considerando-se que grupos sanguíneos do sistema ABO têm sido associados à gravidade da doença em infecções por *P. falciparum*, também se avaliou, no presente estudo, se os grupos sanguíneos do sistema ABO poderiam influenciar a resposta de anticorpos anti- $\alpha$ -Gal em pacientes infectados por *P. vivax*. Nessa perspectiva, Cabezas-Cruz e colaboradores mostraram que o grupo sanguíneo B está associado a uma menor resposta anti- $\alpha$ -Gal, resultando em uma maior suscetibilidade à doenças infecciosas causadas por patógenos que apresentam  $\alpha$ -Gal em sua superfície, como é o caso da malária (CABEZAS-CRUZ et al., 2017).

Em um estudo realizado com pacientes brasileiros infectados por *P. vivax* foi demonstrado que o grupo sanguíneo O está correlacionado com baixos níveis de hemoglobina e hematócrito quando comparado ao grupo sanguíneo A, o que sugere que os grupos sanguíneos ABO podem contribuir para a anemia na malária vivax (RESENDE et al., 2017). No entanto, no presente trabalho, não foi observada nenhuma associação entre os níveis de IgG e IgM contra o antígeno  $\alpha$ -Gal e o tipo sanguíneo apresentado pelos pacientes. Tal resultado pode indicar que, durante a malária vivax, outros anticorpos, não IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal, contribuiriam para a anemia entre indivíduos dos diferentes grupos sanguíneos ABO.

De acordo com Galili, os anticorpos anti- $\alpha$ -Gal estariam envolvidos na remoção de eritrócitos normais e patologicamente senescentes, por meio da opsonização dessas células, que serão então fagocitadas pelos macrófagos (GALILI, 1993b). A destruição de hemácias não infectadas é um evento característico em infecções por *P. vivax*, sendo um dos fatores

envolvidos na patogênese da anemia, que é complexa e multifatorial. Eritrócitos não infectados podem ser reconhecidos por anticorpos e removidos da circulação por meio de fagocitose ou por lise celular mediada pelo sistema do complemento (AWAH et al., 2009; AWAH et al., 2011; CASTRO-GOMES et al., 2014). Estudos realizados com *P. falciparum* sugerem que imunoglobulinas G podem se ligar aos antígenos de *P. falciparum* depositados na membrana de eritrócitos não infectados (FACER et al., 1980; MENDIS et al., 1988; AWAH et al., 2009; AWAH et al., 2011). Além disso, anticorpos IgG também podem se ligar à moléculas modificadas da membrana destes eritrócitos, como a proteína Banda 3, culminando, em ambos os casos, na eritrofagocitose (GIRIBALDI et al., 2001; MOURÃO et al., 2018).

Diante disso, investigamos se anticorpos IgG anti- $\alpha$ -Gal seriam capazes de estimular a fagocitose de hemácias de doadores saudáveis e constatamos que tais imunoglobinas não exerceram nenhuma influência nas taxas de eritrofagocitose por células THP-1 *in vitro*. Este resultado corrobora nosso achado anterior, que mostra não haver correlação entre os níveis de anticorpos IgG anti- $\alpha$ -Gal e os níveis de hemoglobina em pacientes infectados. Desta forma, podemos inferir que tais anticorpos não participam dos mecanismos imunológicos determinantes da anemia na malária vivax.

Tendo em vista que diversos estudos têm demonstrado que a aquisição de uma imunidade protetora está associada a uma contínua exposição à picadas infectantes de anofelinos (DUBOIS & DA SILVA, 1995; SHI et al., 1996), avaliou-se, neste estudo, o efeito da exposição na resposta de anticorpos IgG e IgM contra o antígeno  $\alpha$ -Gal. Entretanto, não foi encontrada nenhuma associação significativa, sugerindo que a produção de anticorpos anti- $\alpha$ -Gal parece não depender da exposição prévia à malária. YILMAZ e colaboradores também sugeriram que a resposta de IgG anti- $\alpha$ -Gal não está correlacionada com a exposição à malária nem tão pouco associada à proteção. Por outro lado, anticorpos IgM anti- $\alpha$ -Gal foram associados à proteção contra a doença e correlacionados à incidência de malária por *P. falciparum*, em crianças de Mali (África) (YILMAZ et al., 2014).

No que se refere à parasitemia, nossos resultados mostraram que esta variável está diretamente correlacionada aos níveis de anticorpos IgG anti- $\alpha$ -Gal, contrastando com os achados de Facer e colaboradores. Esses autores demonstraram que, ao submeter crianças

africanas infectadas por *P. falciparum* ao Teste Direto de Coombs, que avalia a presença de anticorpos fixados sobre as hemácias, não foi encontrada nenhuma correlação entre a positividade do teste e os níveis de parasitemia (FACER et al., 1979). No nosso caso, podemos inferir que a parasitemia pode ser um fator determinante para a produção de anticorpos IgG contra  $\alpha$ -Gal. Por outro lado, nenhuma associação foi observada entre os níveis de anticorpos IgM anti- $\alpha$ -Gal e essa mesma variável, contrariando novamente a literatura atual. Visto que foi constatada uma correlação negativa entre os níveis de IgM contra antígenos de *P. falciparum* e a densidade parasitária, em crianças e adolescentes residentes em área endêmica, apontou-se um possível papel protetor dos anticorpos IgM durante a malária (BOUDIN et al., 1993), o que, de acordo com nossos resultados, não pode ser atribuído às imunoglobulinas IgM anti- $\alpha$ -Gal.

Considerando a semelhança estrutural entre o carboidrato  $\alpha$ -Gal e o antígeno B do sistema ABO, resolvemos investigar, ainda, se os diferentes grupos sanguíneos A, B e O, por si só, exercem alguma influência nas taxas de eritrofagocitose estimulada por anticorpos IgG anti- $\alpha$ -Gal. Todos os mamíferos que sintetizam o epítipo  $\alpha$ -Gal são imunotolerantes a ele, isto é, não produzem anticorpos anti- $\alpha$ -Gal. Essa tolerância ao  $\alpha$ -Gal pode ser induzida, provavelmente, em nível de desenvolvimento de células B na medula óssea, por deleção ou adição de receptor. Tal mecanismo tem sido sugerido baseado em estudos realizados com células B de indivíduos dos grupos sanguíneos A ou B, que apresenta estrutura antigênica semelhante ao epítipo  $\alpha$ -Gal (GALILI, 2013). Embora o pressuposto mais óbvio seja o de que hemácias do tipo sanguíneo B sejam menos reconhecidas por anticorpos anti- $\alpha$ -Gal devido à similaridade na estrutura molecular desses dois antígenos, não observamos diferença na indução de eritrofagocitose quando utilizamos hemácias dos tipos A, B ou O. Tal resultado sugere que a opsonização dos eritrócitos saudáveis por imunoglobulinas IgG anti- $\alpha$ -Gal independe dos antígenos do sistema ABO presentes na superfície dessas células, ainda que diferenças na expressão de antígenos dos grupos sanguíneos possam aumentar ou diminuir a susceptibilidade à muitas infecções (COOLING et al., 2015).

Desde o início dos anos 90, glicoproteínas e glicolípidos naturais têm se mostrado importantes componentes do repertório adaptativo. Atualmente, não há vacinas em uso contra parasitos humanos mais complexos, o que leva à necessidade de expandir o conhecimento acerca de alvos da imunidade protetora contra a malária e outras doenças negligenciadas. A

investigação acerca dos anticorpos anti- $\alpha$ -Gal pode fornecer possibilidades para a descoberta de novos candidatos vacinais contra essas doenças. Além disso, um melhor entendimento sobre a resposta imune de anticorpos IgG e IgM em infecções por *P. vivax* pode contribuir para elucidar o papel da resposta imunológica ao epítipo  $\alpha$ -Gal como um importante fator para a transmissão da malária.



## 7. CONCLUSÕES

- Indivíduos com infecção patente por *P. vivax* apresentam níveis elevados de anticorpos IgG e IgM anti- $\alpha$ -Gal.
- Níveis de IgG anti- $\alpha$ -Gal se correlacionam positivamente com a parasitemia apresentada por pacientes infectados com *P. vivax*, porém, com baixo valor de r.
- A opsonização de eritrócitos não infectados por anticorpos IgG anti- $\alpha$ -Gal não exerce influência na fagocitose por macrófagos *in vitro*.
- Os diferentes fenótipos do sistema ABO de grupos sanguíneo não influenciam a eritrofagocitose *in vitro*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MOTAL UM, WANG S, AWAD A, LU S, WIGGLESWORTH K, GALILI U. Increased immunogenicity of HIV-1 p24 and gp 120 following immunization with gp 120/p24 fusion protein vaccine expressing  $\alpha$ -gal epitopes. *Vaccine*, v. 28, p. 1758-1765, 2010.

ABELE DC, TOBIE JE, HILL GJ, CONTACOS PG, EVANS CB. Alterations in serum proteins and 19S antibody production during the course of induced malarial infections in man. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 14, p. 191-197, 1965.

AGUILAR R, UBILLOS I, VIDAL M, BALANZA N, CRESPO N, JIMÉNEZ A, NHABOMBA A, JAIROCE C, DOSOO D, GYAN B, AYESTARAN A, SANZ H, CAMPO JJ, GOMEZ-PEREZ GP, IZQUIERDO L, DOBANO C. Antibody responses to  $\alpha$ -Gal in African children vary with age and site and are associated with malaria protection. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1-15, 2018.

AKHOURI RR, SHARMA A, MALHOTRA P, SHARMA A. Role of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein in host-cell interactions. *Malaria Journal*, v. 7, p. 1-11, 2008.

ALEXANDRE MA, FERREIRA CO, SIQUEIRA AM, MAGALHÃES BL, MOURÃO MPG, LACERDA MV, ALECRIM MGC. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, p. 1611-1614, 2010.

ALMEIDA IC, MILANI SR, GORIN PA, TRAVASSOS LR. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *The Journal of Immunology*, v. 146, p. 2394-2400, 1991.

AMINO R, THIBERGE S, MARTIN B, CELLI S, SHORTE S, FRISCHKNECHT F, MÉNARD R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*, v. 12, p. 220-224, 2006.

AMINO R, GIOVANNINI D, THIBERGE S, GUEIRARD P, BOISSON B, DUBREMETZ JF, PREVOST MC, ISHINO T, YUDA M, MÉNARD R. Host cell traversal is importante for

progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe*, v. 3, p. 88-96, 2008.

ANSTEY NM, DOUGLAS NM, POESPOPRODJO JR, PRICE RN. *Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Advances in Parasitology*, v. 80, p. 151-201, 2012.

ANSTEY NM, RUSSELL B, YEO TW, PRICE RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends in Parasitology*, v. 25, p. 220-227, 2009.

ARESE, P, TURRINI F, SCHWARZER, E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 16, p. 133–146, 2005.

AVILA JL, ROJAS M, GALILI U. Immunogenic Gal alpha 1-3 Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic American *Trypanosoma* and *Leishmania*. *The Journal of Immunology*, v. 142, p. 2828-2834, 1989.

AWAH NW, BALOGUN H, ACHIDI E, MARUIUBA LA, NOGUEIRA PA, ORLANDI P, TROYE-BLOMBERG M, GYSIN J, BERZINS K. Antibodies to the *Plasmodium falciparum* rhopty protein RAP-2/RSP-2 in relation to anaemia in Cameroonian children. *Parasite Immunology*, v. 33, p. 104-115, 2011.

AWAH NW, TROYE-BLOMBERG M, BERZINS K, GYSIN J. Mechanisms of malarial anaemia: potential involvement of the *Plasmodium falciparum* low molecular weight rhopty-associated proteins. *Acta Tropica*, v. 112, p. 295-302, 2009.

BAIRD JK. Resistance to chloroquine unhinges vivax malaria therapeutics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 1827-1830, 2011.

BANSAL D, HERVERT F, LIM P, DESHPANDE P, BÉCA VIN C, GUIYEDI V, MARIA I, ROUSSELLE JC, NAMANE A, JAIN R, CAZENAVE P, MISHRA GC, FERLINI C, FESEL C, BENECKE A, PIED S. IgG autoantibody to brain beta tubulin III associated with cytokine cluster-II discriminate cerebral malaria in central India. *PLoS One*, v. 4, p. 1-13, 2009.

BERZINS K, WAHLGREN M, PERLMANN P. Studies on the specificity of anti-erythrocyte antibodies in the serum of patients with malaria. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 54, p. 313-318, 1983.

BLANKEN WM & VAN den EIJDEN DH. Biosynthesis of terminal Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNac-R oligosaccharide sequences on glycoconjugates. Purification and acceptor specificity of a UDP-Gal:N-acetyllactosaminide  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3-Galactosyltransferase from calf thymus. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 260, p. 12927-12934, 1985.

BOUDIN C, CHUMPITAZI B, DZIEGIEL M, PEYRON F, PICOT S, HOGH B, AMBROISE-THOMAS P. Possible role of specific immunoglobulin M antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens in immunoprotection of humans living in a hyperendemic area, Burkina Faso. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 636-641, 1993.

CABEZAS-CRUZ A & DE LA FUENTE J. Immunity to  $\alpha$ -Gal: the opportunity for malaria and tuberculosis control. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1-4, 2017.

CABEZAS-CRUZ A, MATEOS-HERNÁNDEZ L, ALBERDI P, VILLAR M, RIVEAU G, HERMANN E, SCHACHT AM, KHALIFE J, CORREIA-NEVES M, GORTAZAR C, DE LA FUENTE J. Effect of blood type on anti- $\alpha$ -Gal immunity and the incidence of infectious diseases. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 49, p. 1-7, 2017.

CABEZAS-CRUZ A, MATEOS-HERNÁNDEZ L, PÉREZ-CRUZ M, VALDÉS JJ, MERA IGF, VILLAR M, DE LA FUENTE J. Regulation of the immune response to  $\alpha$ -Gal and vector-borne diseases. *Trends in Parasitology*, v. 31, p. 470-476, 2015.

CARVALHO BO, LOPES SCP, NOGUEIRA PA, ORLANDI PP, BARGIERI DY, BLANCO YC, MAMONI R, LEITE JA, RODRIGUES MM, SOARES IS, OLIVEIRA TR, WUNDERLICH G, LACERDA MVG, DEL PORTILLO HA, ARAÚJO MOG, RUSSELL B, SUWANARUSK R, SNOUNOU G, RÉNIA L, COSTA FTM. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 202, p. 638-647, 2010.

CASTRO-GOMES T, MOURÃO LC, MELO GC, MONTEIRO WM, LACERDA MVG, BRAGA EM. Potential immune mechanisms associated with anemia in *Plasmodium vivax* malaria: a puzzling question. *Infection and Immunity*, v. 82, p. 3990–4000, 2014.

CHEHUAN YF, COSTA MRF, COSTA JC, ALECRIM MGC, NOGUEIRA F, SILVEIRA H, BRASIL LW, MELO GC, MONTEIRO WM, LACERDA MVG. In vitro chloroquine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon. *Malaria Journal*, v. 12, p. 226, 2013.

CHUNG CH, MIRAKHUR B, CHAN E, QUYNH-THU LE, BERLIN J, MORSE M, MURPHY BA, SATINOVER SM, HOSEN BSJ, MAURO D, SLEBOS RJ, ZHOU Q, GOLD D, HATLEY T, HICKLIN DJ, PLATTS-MILLS TAE. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose- $\alpha$ -1,3-Galactose. *The New England Journal of Medicine*, v. 358, p. 1109-1117, 2008.

COLLINS W & BARNWELL JW. *Plasmodium knowlesi*: finally being recognized. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 199, p. 1107-1108, 2009.

COLLINS WE, JEFFERY GM, ROBERTS JM. A retrospective examination of anemia during infection of humans with *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 68, p. 410-412, 2003.

CONSIGNY PH, CAUQUELIN B, AGNAMEY P, COMBY E, BRASSEUR P, BALLETT JJ, ROUSSILHON C. High prevalence of co-factor independent anticardiolipin antibodies in malaria exposed individual *Clinical & Experimental Immunology*, v. 127, p. 158–164, 2002.

COOLING L. Blood groups in infection and host susceptibility. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, p. 801-870, 2015.

COPPI A, NATARAJAN R, PRADEL G, BENNETT BL, JAMES ER, ROGGERO MA, CORRADIN G, PERSSON C, TEWARI R, SINNIS P. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 208, p. 341-356, 2011.

COPPI A, TEWARI R, BISHOP JR, BENNET BL, LAWRENCE R, ESKO JD, BILLKERO, SINNIS P. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host & Microbe*, v. 2, p. 316-327, 2007.

COWMAN AF, HEALER J, MARAPANA D, MARSH K. Malaria: Biology and disease. *Cell*, v. 167, p. 610-624, 2016.

DE ALVARENGA DAM, CULLETON R, PINA-COSTA A, RODRIGUES DF, BIANCO JR. C, SILVA S, NUNES AJD, SOUZA JR. JC, HIRANO ZMB, MOREIRA SB, PISSINATTI A, ABREU FVS, AREAS ALL, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, ZALIS MG, FERREIRA-DA-CRUZ MF, BRASIL P, DANIEL-RIBEIRO CT, BRITO CFA. An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1-10, 2018.

DE NIZ M, MEIBALAN E, MEJIA P, MA S, BRANCUCCI NMB, AGOP-NERSESIAN C, MANDT R, NGOTHO P, HUGHES K, WATERS AP, HUTTENHOWER C, MITCHELL JR, MARTINELLI R, FRISCHKNECHT F, SEYDEL KB, TAYLOR T, MILNER D, HEUSSLER VT, MARTI M. *Plasmodium* gametocytes display homing and vascular transmigration in the host bone marrow. *Science Advances*, v. 4, p. 1-15, 2018.

DONDORP AM, ANGUS BJ, CHOTIVANICH K, SILAMUT K, RUANGVEERAYUTH R, HARDEMAN MR, KAGER PA, VREEKEN J, WHITE NJ. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 60, p. 733 -737, 1999.

DOUGLAS RG, AMINO R, SINNIS P, FRISCHKNECHT F. Active migration and passive transport of malaria parasites. *Trends in Parasitology*, v. 31, p. 357-362, 2015.

DUBOIS P & DA SILVA LP. Towards a vaccine against asexual blood stage infection by *Plasmodium falciparum*. *Research Immunology*, v. 146, p. 263-275, 1995.

EJIGIRI I & SINNIS P. *Plasmodium* sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Current Opinion in Microbiology*, v. 12, p. 1-7, 2009.

- FACER CA. Direct Coombs antiglobulin reactions in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. II – Specificity of erythrocyte-bound IgG. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 39, p. 279-288, 1980.
- FACER CA, BRAY RS, BROWN J. Direct Coombs antiglobulin reactions in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. I – Incidence and class specificity. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 35, p. 119-127, 1979.
- FERNANDEZ-ARIAS C, RIVERA-CORREA J, GALLEGU-DELGADO J, RUDLAFF R, FERNANDEZ C, ROUSSEL C, GOTZ A, GONZALEZ S, MOHANTY A, MOHANTY S, WASSMER S, BUFFET P, NDOUR PA, RODRIGUEZ A. Anti-self phosphatidylserine antibodies recognize uninfected erythrocytes promoting malarial anemia. *Cell Host Microbe*, v. 19, p. 194-203, 2016.
- FIEDLER JD, BROWN SD, LAU JL, FINN MG. RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angewandte Chemie*, v. 49, p. 9648-9651, 2010.
- FONTAINE A, POPHILLAT M, BOURDON S, VILLARD C, BELGHAZI M, FOURQUET P, DURAND C, LEFRANC D, ROGIER C, FUSAI T, ALMERAS L. Specific antibody responses against membrane proteins of erythrocytes infected by *Plasmodium falciparum* of individuals briefly exposed to malaria. *Malaria Journal*, v. 9, p. 276, 2010.
- FORMAGLIO P, TAVARES J, MÉNARD R, AMINO R. Loss of host cell plasma membrane integrity following cell traversal by Plasmodium sporozoites in the skin. *Parasitology International*, v. 63, p. 237-244, 2014.
- FREVERT U, SINNIS P, CERAMI C, SHREFFLER W, TAKACS B, NUSSENZWEIG V. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med*, v. 177, p. 1287-1298, 1993.
- GALILI U. Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogeneses and clinical benefits. *John Wiley & Sons Ltd, Immunology*, v. 140, p. 1-11, 2013.
- GALILI U. Evolution and pathophysiology of the human natural anti-  $\alpha$ -galactosyl IgG (anti-Gal) antibody. *Springer Seminars in Immunopathology*, v. 15, p. 155-171, 1993b.

- GALILI U. Interaction of the natural anti-Gal antibody with  $\alpha$ -galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunology Today*, v. 14, p. 480-482, 1993c.
- GALILI U. Significance of the evolutionary  $\alpha$ 1, 3-galactosyltransferase (GGTA1) gene inactivation in preventing extinction of apes and old world monkeys. *Journal of Molecular Evolution*, v. 80, p. 1-9, 2015.
- GALILI U, ANARAKI F, THALL A, HILL-BLACK C, RADIC M. One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. *Blood*, v. 82, p. 2485-2493, 1993a.
- GALILI U, CLARK MR, SHOHET SB, BUEHLER J, MACHER BA. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal  $\alpha$  1-3Gal epitope in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)*, v. 84, p. 1369-1373, 1987.
- GALILI U & SWANSON K. Gene sequences suggest inactivation of  $\alpha$ 1-3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, v. 88, p. 7401-7404, 1991.
- GALILI U, FLECHNER I, RACHMILEWITZ EA. A naturally occurring anti-alpha-galactosyl IgG recognizing senescent human red cells. *Progress in Clinical and Biological Research*, v. 195, p. 263-278, 1985a.
- GALILI U, MACHER BA, BUEHLER J, SHOHET SB. Human natural anti- $\alpha$ -Galactosyl IgG II. The specific recognition of  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3)-linked galactose residues. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 162, p. 573-582, 1985.
- GALILI U, MANDRELL RE, HAMADEH RM, SHOHET SB, GRIFFISS JM. Interaction between human natural anti- $\alpha$ -galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infection and Immunity*, v. 56, p. 1730-1737, 1988.
- GALILI U, RACHMILEWITZ EA, PELEG A FLECHNER I. A unique natural human IgG antibody with anti- $\alpha$ -Galactosyl specificity. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 160, p. 1519-1531, 1984.



GAZZINELI RT, PEREIRA MES, ROMANHA A, GAZZINELI G, BRENER Z. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. *Parasite Immunology*, v. 13, p. 345-356, 1991.

GENTON B, D'ACREMONT V, RARE L, BAEA K, REEDER JC, ALPERS MP, MULLER I. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Medicine*, v. 5, p. e127, 2008.

GETHING PW, CASEY DC, WEISS DJ, BISANZIO D, BHATT S, CAMERON E et al. Mapping *Plasmodium falciparum* mortality in Africa between 1990 and 2015. *The New England Journal of Medicine*, v. 375, p. 2435-2445, 2016.

GIRIBALDI G, ULLIERS D, MANNU F. Growth of *Plasmodium falciparum* induces stage dependent haemichrome formation, oxidative aggregation of band 3, membrane deposition of complement and antibodies, and phagocytosis of parasitized erythrocytes. *British Journal of Haematology*, v. 113, p. 492-499, 2001.

GOEL S, PALMKVIST M, MOLL K, JOANNIN N, LARA P, AKHOURI RR, MORADI N, OJEMALM K, WESTMAN M, ANGELETTI D, KJELLIN H, LEHTIO J, BLIXT O, IDESTROM L, GAHMBERG CG, STORRY JR, HULT AK, OLSSON ML, HEIJINE GV, NILSSON IM, WAHLGREN M. RIFINs are adhesins implicated in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature Medicine*, v. 21, p. 314-317, 2015.

GUERRA CA, HOWES RE, PATIL AP, GETHING PW, VAN BOECKEL TP, TEMPERLEY WH, KABARIA CW, TATEM AJ, MANH BH, ELYAZAR IRF, BAIRD JK, SNOW RW, HAY SI. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PloS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, p. e774, 2010.

GUIYEDI V, CHANSEAUD Y, FESEL C, SNOUNOU G, ROUSSELLE J, LIM P, KOKO J, NAMANE A, CAZENAVE P, KOMBILA M, PIED S. Self-reactivities to the non-erythroid alpha spectrin correlate with cerebral malaria in Gabonese children. *PLoS One*, v. 4, p. 1-10, 2007.

HAMANOVA M, CHMELIKOVA M, NENTWICH I, THON V, LOKAJ J. Anti-Gal IgM, IgA and IgG natural antibodies in childhood. *Immunology Letters*, v. 164, p. 40-43, 2015.

HANS D, PATTNAIK P, BHATTACHARYYA A, SHAKRI AR, YAZDANI SS, SHARMA M, CHOE H, FARZAN M, CHITNIS CE. Mapping binding residues in the *Plasmodium vivax* domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. *Molecular Microbiology*, v. 55, p. 1423-1434, 2005.

HAN W, CAI L, WU B, XIAO Z, CHENG J, WANG PG. The wciN gene encodes an  $\alpha$ -1,3galactosyltransferase involved in the biosynthesis of the capsule repeating unit of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. *Biochemistry*, v. 51, p. 5804-5810, 2012.

ISHINO T, YANON K, CHINZEI Y, YUDA M. Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PloS Biology*, v. 2, p. 77-84, 2004.

JAKEMAN GN, SAUL A, HOGARTH WL, COLLINS WE. Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitology*, v. 119, p. 127-133, 1999.

KASLIWAL P, RAO MS, KUJUR R. *Plasmodium vivax* malaria: an unusual presentation. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, v. 13, p. 103-105, 2009.

KESTEMAN T, RANDRIANARIVELOJOSIA M, MATTERN C, RABOANARY E, POURETTE D, GIROND F, RAHARIMANGA V, RANDRIANASOLO L, PIOLA P, ROGIER C. Nationwide evaluation of malaria infections, morbidity, mortality, and coverage of malaria control interventions in Madagascar. *Malaria Journal*, v. 13, p. 465, 2014.

KING CL, ADAMS JH, XIANLI J, GRIMBERG BT, MCHENRY AM, GREENBERG LJ, SIDDIQUI A, HOWES RE, DA SILVA-NUNES M, FERREIRA MU, ZIMMERMAN PA. Fy(a) / Fy(b) antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, v. 108, p. 20113-20118, 2011.

KING CL, MICHON P, SHAKRI AM, MARCOTTY A, STANISIC D, ZIMMERMAN PA, COLE-TOBIAN JL, MUELLER I, CHITNIS CE. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, v. 105, p. 8363-8368, 2008.

KITCHEN SF. The infection of reticulocytes by *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 1-18, p. 347-359, 1938.

LACERDA MVG, MOURÃO MPG, ALEXANDRE MAA, SIQUEIRA AM, MAGALHÃES BML, MARTINEZ-ESPINOSA FE, FILHO FSS, BRASIL P, VENTURA AMRS, TADA MS, COUTO VSCD, SILVA AR, SILVA RSU, ALECRIM MGC. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malária: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malaria Journal*, v. 11, p. 12, 2012.

LALREMRUATA A, MAGRIS M, VIVAS-MARTÍNEZ S, KOEHLER M, ESEN M, KEMPAIAH P, JEYARAJ S, PERKINS DJ, MORDMULLER B, METZGER WG. Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine*, v. 2, p. 1186-1192, 2015.

LOPERA-MESSA TM, DOUMBIA S, KONATÉ D, ANDERSON JM, DOUMBOUYA M, KEITA AS, DIAKITÉ SA, TRAORÉ K, KRAUSE MA, DIOUF A, MORETZ SE, TULLO GS, MIURA K, GU W, FAY MP, TAYLOR SM, LONG CA, DIAKITÉ M, FAIRHURST RM. Effect of red blood cell variants on childhood malaria in Mali: a prospective cohort study. *The Lancet*, v. 2, p. 140-149, 2016).

MACHER BA & GALILI U. The Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R ( $\alpha$ -Gal) epitope: A carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1780, p. 75-88, 2008.

MEDEIROS CMP. IgGs como mediadoras da eritrofagocitose: possível contribuição na anemia em infecções por *Plasmodium vivax* e influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO. Dissertação de Mestrado em Parasitologia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

MEDICA DL & SINNIS P. Quantitative dynamics of *Plasmodium yoelii* sporozoite transmission by infected anopheline mosquitos. *Infection and Immunity*, v. 73, p. 4363-4369, 2005.

MÉNARD R. Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. *Cell Microbiology*, v. 3, p. 63-73, 2001.

MENDIS KN, THALAMULLA RI, DAVIS PH. Diversity of *Plasmodium vivax*-induced antigens on the surface of infected human erythrocytes. *The American Journal of Medicine Tropical and Hygiene*, v. 38, p. 42-46, 1988.

MENDIS K, SINA BJ, MARCHESINI P, CARTER R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 64, p. 97-106, 2001.

MERCEREAU-PUJALON O, GUILLOTTE M, VIGAN-WOMAS I. Rosetting in *Plasmodium falciparum*: a cytoadherence phenotype with multiple actors. *Transfusion Clinique et Biologique*, v. 15, p. 62-71, 2008.

MILLER LH, BARUCH DI, MARSH K, DUMBO OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, v. 415, p. 673-679, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. 36 p. Brasília, DF.

MOTA MM, HAFALLA JCR, RODRÍGUEZ A. Migration through cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nature Medicine*, v. 8, p. 1318-1322, 2002.

MOTA MM, PRADEL G, VANDERBERG JP, HAFALIA JCR, FREVERT U, NUSSENZWEIG RS, NUSSENZWEIG V, RODRÍGUEZ A. Migration of *Plasmodium* through cells before infection. *Science*, v. 291, p. 141-144, 2001.

MOTA MM & RODRÍGUEZ A. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cellular Microbiology*, v. 6, p. 1113-1118, 2004.

MOURÃO LC, BAPTISTA RP, DE ALMEIDA ZB, GRYNBERG P, PUCCI MM, CASTRO-GOMES T, FONTES CJF, RATHORE S, SHARMA YD, DA SILVA-PEREIRA RA, BEMQUERER MP, BRAGA EM. Anti-band 3 and anti-spectrin antibodies are increased in *Plasmodium vivax* infection and are associated with anemia. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1-12, 2018.

MOURÃO LC, ROMA PM, SULTANE ABOOBACAR JS, MEDEIROS CM, DE ALMEIDA, ZB, FONTES CJ, AGERO U, DE MESQUITA ON, BEMQUERER MP, BRAGA EM. Anti-erythrocyte antibodies may contribute to anaemia in *Plasmodium vivax*

malaria by decreasing red blood cell deformability and increasing erythrophagocytosis. *Malaria Journal*, v. 15, p. 1-9, 2016.

MUELLER I, GALINSKI MR, BAIRD JK, CARLTON JM, KOCHAR DK, ALONSO PL, DEL PORTILLO HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 9, p. 555-566, 2009.

MURRAY CJL, ORTBLAD KF, GUINOVART C, LIM SS, WOLOCK TM, ROBERTS DA et al. Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, v. 384, p. 1005-1070, 2014.

MURRAY CJL, ROSENFELD LC, LIM SS, ANDREWS KG, FOREMAN KJ, HARING D, FULLMAN N, NAGHAVI M, LOZANO R, LOPEZ AD. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *The Lancet*, v. 379, p. 413-431, 2012.

MUTHANA SM & GILDERSLEEVE JC. Factors affecting anti-glycan IgG and IgM repertoires in human serum. *Scientific Reports*, v. 19, p. 1-11, 2016.

NOGUEIRA PA, ALVES FP, FERNANDEZ-BECERRA C, PEIN O, SANTOS NR, SILVA LHP, CAMARGO EP, DEL PORTILLO HA. *Infection and Immunity*, v. 74, p. 2726-2733.

OLIVEIRA-FERREIRA J, LACERDA MVG, BRASIL P, LADISLAU JLB, TAUIL PL, DANIEL-RIBEIRO CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal*, v. 9, p. 115, 2010.

POSEKANY KJ, PITTMAN HK, BRADFIELD JF, HAISCH CE, VERBANAC KM. Induction of cytolytic anti-Gal antibodies in  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase gene knockout mice by oral inoculation with *Escherichia coli* O86:B7 bacteria. *Infection and Immunity*, v. 70, p. 6215-6222, 2002.

QUINTERO JP, SIQUEIRA AM, TOBÓN A, BLAIR S, MORENO A, ARÉVALO-HERRERA M, LACERDA MVG, VALENCIA SH. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, p. 91-104, 2011.

RAMASAMY R & FIELD MC. Terminal galactosylation of glycoconjugates in *Plasmodium falciparum* asexual blood stages and *Trypanosoma brucei* bloodstream trypomastigotes. *Experimental Parasitology*, v. 130, p. 314-20, 2012.

RAMASAMY R & RAJAKARUNA R. Association of malaria with inactivation of  $\alpha$ 1,3-galactosyl transferase in catarrhines. *Biochimica et Biophysica Acta*, p. 241-246, 1997.

RAMASAMY R & REESE RT. Terminal galactose residues and the antigenicity of *Plasmodium falciparum* glycoproteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 19, p. 91-101, 1986.

RAVINDRAN B, SATAPATHY AK, DAS MK. Naturally-occurring anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies in human *Plasmodium falciparum* infections – a possible role for autoantibodies in malaria. *Immunology Letters*, v. 19, p. 137-142, 1988.

REPIK PM, STRIZKI JM, GALILI U. Differential host-dependent expression of  $\alpha$ -galactosyl epitopes on viral glycoproteins: a study of eastern equine encephalitis virus as model. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 1177-1181, 1994.

RESENDE SS, MILAGRES VG, CHAVES DG, FONTES CJF, CARVALHO LH, SOUSA TN, BRITO CFA. Increased susceptibility of blood type O individuals to develop anemia in *Plasmodium vivax* infection. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 50, p. 87-92, 2017.

RISCO-CASTILLO V, TOPÇU S, MARINACH C, MANZONI G, BIGORGNE AE, BRIQUET S, BAUDIN X, LEBRUN M, DUBREMETZ JF, SILVIE O. Malaria sporozoites traverse host cells within transient vacuoles. *Cell Host & Microbe*, v. 18, p. 593-603, 2015.

RISPENS T, DERKSEN NI, COMMINS SP, PLATTS-MILLS TA, AALBERSE RC. IgE production to  $\alpha$ -Gal is accompanied by elevated levels of specific IgG1 antibodies and low amounts of IgE to blood group B. *PloS One*, v. 8, p. 1-7, 2013.

RITTER K, KUHLENCORD A, THOMSEN R, BOMMER W. Prolonged haemolytic anaemia in malaria and auto-antibodies against triose-phosphate isomerase. *The Lancet*, v. 342, p. 1333–1334, 1993.

ROWE JA, HANDEL IG, THERA MA, DEANS AM, LYKE KE, KONÉ A, DIALLO DA, RAZA A, KAI O, MARSH K, PLOWE CV, DOUMBO OK, MOULDS JM. Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced resetting. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, v. 104, p. 17471-17476, 2007.

SANTANA-FILHO FS, ARCANJO ARL, CHEHUAN YM, COSTA MR, MARTINEZ-ESPINOSA FE, VIEIRA JL, BARBOSA MG, ALECRIM WD, ALECRIM MGC. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, v. 13, p. 1125, 2007.

SCHENKEL-BRUNNER H. Human blood groups – Chemical and biochemical basis of antigen specificity. Springer Wien New York, 2ª Edição, 2000.

SCHNEIDER P, SCHNUR LF, JAFFE CL, FERGUSON MAJ, MCCONVILLE MJ. Glycoinositol-phospholipid profiles of four serotypically distinct Old World *Leishmania* strains. *Biochemical Journal*, v. 304, p. 603-609, 1994.

SCHOCKER NS, PORTILLO S, BRITO CR, MARQUES AF, ALMEIDA IC, MICHAEL K. Synthesis of Gal $\alpha$ (1,3)Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc $\alpha$ -, Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc $\alpha$ - and GlcNAc-containing neoglycoproteins and their immunological evaluation in the context of Chagas disease. *Glycobiology*, v. 26, p. 39-50, 2016.

SCOPEL KKG, FONTES CJF, NUNES AC, HORTA MF, BRAGA EM. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás – Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Tropica*, v. 90, p. 61-64, 2004.

SHI YP, SAYED U, OARI SH, ROBERTS JM, UDHAYAKUMAR V, OLOO AJ, HAWLEY WA, KASLOW DC, NAHLEN BL, LAL AA. Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Infection Immunity*, v. 64, p. 2716-2723, 1996.

SILVIE O, MOTA MM, MATUSCHEWSKI K, PRUDÊNCIO M. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Current Opinion in Microbiology*, v. 11, p. 352-359, 2008.

SIQUEIRA AM, LACERDA MVG, MAGALHÃES BML, MOURÃO MPG, MELO GC, ALEXANDRE MAA, ALECRIM MGC, KOCHAR D, KOCHAR S, KOCHAR A, NAYAK

K, DEL PORTILLO H, GUINOVRT C, ALONSO P, BASSAT Q. Characterization of *Plasmodium vivax*-associated admissions to reference hospitals in Brazil and India. *BMC Medicine*, v. 13, p. 57, 2015.

STONE KR, ABDEL-MODAL UM, WALGENBACH AW, TUREK TJ, GALILI U. *Transplantation*, v. 83, p. 211-219, 2007.

STURM A, AMINO R, VAN DE SAND C, REGEN T, RETZLAFF S, RENNENBERG A, KRUEGER A, POLLOK J, MENARD R, HEUSSLER VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, v. 313, p. 1287-1290, 2006.

TERNYNCK T, FALANGA P.B, UNTERKIRSCHER C, GREGOIRE J, DA SILVA LP, AVRAMEAS S. Induction of high levels of IgG autoantibodies in mice infected with *Plasmodium chabaudi*. *International Immunology*, v. 3, p. 29-37, 1991.

TSENG YL, KUWAKI K, DOR FJ, SHIMIZU A, HOUSER S, HISASHI Y, YAMADA K, ROBSON SC, AWWAD M, SCHURMAN HJ, SACHS DH, COOPER DK. Alpha1,3-Galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months. *Transplantation*, v. 80, p. 1493-1500, 2005.

VANDERBERG JP & STEWART MJ. *Plasmodium* sporozoite-host cell interactions during sporozoite invasion. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 68, p. 74-79, 1990.

WALDMAN EA, SILVA LJ, MONTEIRO CA. Trajetória das doenças infecciosas: da eliminação da poliomielite à reintrodução da cólera. *Informe Epidemiológico do SUS*, v. 8, p. 5-47, 1999.

WASSMER SC, TAYLOR TE, RATHOD PK, MISHRA SK, MOHANTY S, AREVALO-HERRERA M, DURAISINGH MT, SMITH JD. Investigating the pathogenesis of severe malaria: a multidisciplinary and cross-geographical approach. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, p. 42-56, 2015.

WELSH RM, O'DONNELL CL, REED DJ, ROTHER RP. Evaluation of the Gal $\alpha$ 1-3Gal epitope as a host modification factor eliciting natural immunity to enveloped viruses. *Journal of Virology*, v. 72, p. 4650-4656, 1998.



WHITE JN. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria Journal*, v. 10, p. 297, 2011.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report, 2016.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report, 2017.

YILMAZ B, PORTUGAL S, TRAN TM, GOZZELINO R, RAMOS S, GOMES J, REGALADO A, COWAN PJ, D'APICE AJF, CHONG AS, DOUMBO OK, TRAORE B, CROMPTON PD, SILVEIRA H, SOARES MP. Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission. *Cell*, v. 159, p. 1277-1289, 2014.

YOSHIDA A, YAMAGUCHI YF, DAVE V. Immunologic homology of human blood group glycosyltransferases and genetic background of blood group (ABO) determination. *Blood*, v. 54, p. 344-350, 1979.

ZHITA A. Caracterização do perfil isotópico de imunoglobulinas G e sua associação à anemia na infecção por *Plasmodium vivax*. Dissertação de Mestrado em Parasitologia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

## 9. ANEXOS

PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO DE TRATAMENTO DE PACIENTES COM MALÁRIA - HJMJ			
Número:	Data: ___/___/___	Nome:	
Endereço de residência (colocar 3 pontos de referência):			
Rua:			
Bairro	<input type="checkbox"/> Cuiabá <input type="checkbox"/> V. Grande <input type="checkbox"/> Outro		
Fone 1:	Fone 2:	Fone 3:	Fone 4:
Solicitar outros nomes e endereços de pessoas para facilitar a localização:			
Idade:	Sexo: 1 <input type="checkbox"/> M 2 <input type="checkbox"/> F	Cor: 1 <input type="checkbox"/> Branca 2 <input type="checkbox"/> Negra 3 <input type="checkbox"/> Amarela 4 <input type="checkbox"/> Parda	
Escolaridade: 1 <input type="checkbox"/> analfabeto 2 <input type="checkbox"/> 1º grau 3 <input type="checkbox"/> 2º grau 4 <input type="checkbox"/> 3º grau			Ocupação:
Se mulher, possibilidade de gestação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Pretende viajar nos próximos 30 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Pretende viajar nos próximos 6 meses? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Quantas malárias já teve na vida?	
Idade da primeira malária:	Há quanto tempo teve a última malária ( <b>em meses</b> )?		
Viajou para área endêmica após o último tratamento? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Tomou corretamente a medicação da última malária? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Teve diarreia ou vômito durante o tratamento? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Espécie da última malária: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista			
Espécies que já teve já vida: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Não sabe			
Quanto tempo você viveu em área endêmica (especificar de foi permanente ou esporádica) ( <b>em dias</b> ):			
Usou algum medicamento nos últimos 10 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Quais?	
Há quantos dias está com sintomas?	<input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Calafrio <input type="checkbox"/> Sudorese <input type="checkbox"/> Cefaléia <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Artralgia <input type="checkbox"/> Epigastralgia <input type="checkbox"/> Tontura <input type="checkbox"/> Náusea <input type="checkbox"/> Vômito <input type="checkbox"/> Fraqueza <input type="checkbox"/> Hiporexia <input type="checkbox"/> Colúria		
Febre nos últimos 7 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	Temperatura axilar se tiver com febre hoje:		
Febre nos últimos 30 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Em qual município pegou malária?			UF:
Deixou de fazer atividades por causa da malária? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Principais achados físicos:			

Peso (Kg):		Baço palpável: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N – a _____ cm do RCE	
Resultado da gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Optimal: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> NF 3 <input type="checkbox"/> Neg		Outro TDR: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> NF 3 <input type="checkbox"/> Neg	Hemograma: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N
Papel-Filtro 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	Guanidina: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	DNA: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	Soro: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N
Fezes: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Tratamento: <input type="checkbox"/> Cloroquina <input type="checkbox"/> Mefloquina <input type="checkbox"/> Primaquina <input type="checkbox"/> Doxicilina <input type="checkbox"/> Quinina <input type="checkbox"/> Artesunato Esquemas (dose e tempo):			
Conclusão do caso: 1 <input type="checkbox"/> Primoinfecção 2 <input type="checkbox"/> Recrudescência 3 <input type="checkbox"/> Reacaída 4 <input type="checkbox"/> Reinfecção			

#### AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO APÓS 7 DIAS (D7)

Resultado gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Outro exame:		Viajou para área endêmica? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	
Diarréia ou vômito até a 1ª hora de medicação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Houve melhora dos sintomas acima: <input type="checkbox"/> Completa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Piora	

#### AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO APÓS 14 DIAS (D14)

Resultado gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Outro exame:		Viajou para área endêmica? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	
Diarréia ou vômito até a 1ª hora de medicação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Houve melhora dos sintomas acima: <input type="checkbox"/> Completa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Piora	

#### AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO APÓS 21 DIAS (D21)

Resultado gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Outro exame:		Viajou para área endêmica? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	
Diarréia ou vômito até a 1ª hora de medicação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Houve melhora dos sintomas acima: <input type="checkbox"/> Completa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Piora	

#### AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO APÓS 28 DIAS (D28)

Resultado gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Outro exame:		Viajou para área endêmica? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	
Diarréia ou vômito até a 1ª hora de medicação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Houve melhora dos sintomas acima: <input type="checkbox"/> Completa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Piora	