

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

**ANTICORPOS IgG DIRECIONADOS A PROTEÍNAS DE MEMBRANA  
DE HEMÁCIAS E SUA ASSOCIAÇÃO À ANEMIA EM INFECÇÕES  
POR *Plasmodium vivax*.**

LUIZA CARVALHO MOURÃO

BELO HORIZONTE – MG  
MARÇO 2015

LUIZA CARVALHO MOURÃO

**ANTICORPOS IgG DIRECIONADOS A PROTEÍNAS DE MEMBRANA  
DE HEMÁCIAS E SUA ASSOCIAÇÃO À ANEMIA EM INFECÇÕES  
POR *Plasmodium vivax*.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Parasitologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Érika Martins Braga  
Co-orientador: Dr. Marcelo Porto Bemquerer

BELO HORIZONTE – MG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFMG  
MARÇO 2015

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Malária, Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a orientação da Profa. Dra. Érika Martins Braga e co-orientação do Dr. Marcelo Porto Bemquerer, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília/DF). Parte deste estudo foi realizada em colaboração com as seguintes pesquisadores/professores: Prof. Dr. Cor Jesus Fontes (Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT); Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira (Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ); Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade (ICB/UFMG); Dr. Thiago de Castro Gomes (ICB/UFMG); Dra. Priscila Grynberg (Embrapa/DF); Dr. Rodrigo de Paula Baptista (ICB/UFMG); e Dra. Paula Magda da Silva Roma (Departamento de Física – ICEX/UFMG). Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG (PPM-00057-13 2013-2015), Conselho Nacional de Pesquisa/CNPq – Bolsa de doutorado (2011/2015) e Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde – PDTIS/Fiocruz. Projeto aprovado no Comitê de Ética (CAAE: 01496013.8.0000.5149, parecer 519.481).

Ao Rafael, meu grande amor,  
por tornar os meus dias mais coloridos e divertidos.

Aos meus pais, Marcelo e Zenaide, meus primeiros mestres,  
pelo amor incondicional e pelas lições de vida.

Ao meu querido irmão, Marcelo,  
pelo carinho, companheirismo e pelos momentos compartilhados.

Sem vocês eu nada seria!

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco;  
à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida.”

Johann Wolfgang van Goethe

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida e da sabedoria.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Parasitologia, por propiciarem a realização deste trabalho.

Às agências de fomento, FAPEMIG e CNPq, pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos pacientes, que se entregaram ao desconhecido, em busca da luz do conhecimento.

A todos os servidores das unidades de saúde localizadas em áreas endêmicas para a malária, em especial Júnia, Sandra e Dona Lourdes, por terem nos recebido de braços abertos, e por terem nos ajudado sempre de boa vontade.

À Profa. Dra. Érika Martins Braga, pelo exemplo de orientadora, de mãe e de amiga, pela confiança, pelas oportunidades, pela determinação, pelo espírito inovador, por me dar “asas para voar” e, principalmente, por contribuir imensamente para o meu crescimento pessoal e profissional ao longo desses seis anos de convivência.

Ao Dr. Marcelo Porto Bemquerer, pelo exemplo, pela competência, pela dedicação, pela seriedade, pelo espírito crítico, pela criatividade, pelas discussões científicas, por ter me ensinado a trabalhar com espectrometria de massa, pela amizade e por ter sido um pai durante a minha estadia na Embrapa.

À Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira, pela seriedade, pela dedicação, pelo rigor, pela paciência, pela amizade, pela agradável convivência, por ter me acolhido tão bem em seu laboratório e por ter me ensinado a trabalhar com imunoproteômica.

À Dra. Héliida Monteiro de Andrade, pela disponibilidade e pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Cor Jesus Fontes, da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), por fornecer os soros e os resultados do hemograma dos pacientes com malária.

Ao Prof. Dr. Marcelo Urbano, por propiciar toda a infraestrutura para a estadia e o trabalho em uma área endêmica de malária.

Ao Dr. Thiago de Castro Gomes, pelo companheirismo, pelo rigor, pelo espírito crítico e, principalmente, pela empolgação científica.

À Dr. Paula Magda Roma, pela amizade, pela colaboração, pela disponibilidade, pela paciência e por tentar me ensinar Física.

Ao Dr. Rodrigo de Paula Baptista e à Dra. Priscila Grynberg, pela colaboração, pela eficiência, pela presteza, pela disponibilidade e pela empolgação científica.

À Zélia Barbosa de Almeida, grande companheira de trabalho, pelo exemplo, pela disponibilidade, pela seriedade, pela dedicação, pelo zelo, pelo bom humor, pela amizade e pela excelente convivência.

À Maíra Mazzoni Pucci, pela amizade, pela dedicação, pela seriedade, pela responsabilidade, pelo rigor, pela atenção, pelo zelo e por me estender as mãos sempre que eu precisei de ajuda.

À Ingrid Carla de Oliveira, pela prazerosa convivência, pela amizade, pela disponibilidade, pela presteza, pela simplicidade, pelo companheirismo e pelas aventuras no Acre.

À Carolina Januário, pela dedicação, pela paciência, pela ajuda e pelas discussões científicas.

À Lídia Bonfim Vilela, pela ajuda e pelas conversas.

Ao Gabriel Moreira Félix, pela boa convivência, pelo espírito crítico e pelas discussões científicas fervorosas.

Aos demais colegas do Laboratório da Malária, Alcina Zitha, Adriana Fernandes, Camila Maia, Daniela de Angeli, Farlen Miranda, Francisco Ferreira, Natália Crispim, Nayara Belo, Newton Pimentel e Patrícia Silveira, pela excelente convivência.

À Bruna Soares e ao Luiz Carlos Júnior, do Laboratório de Leishmanioses, ICB/UFMG, pela ajuda com as análises de imagens.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Parasitologia, pelos ensinamentos durante a minha formação acadêmica.

À Sumara e à Sibebe, secretárias da Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia, pelo carinho, atenção e ajuda.

Aos colegas da Pós-graduação, pela colaboração e troca de conhecimentos.

À Magali Rodrigues, pela amizade, pelo carinho, pelo cuidado e por tornar a minha estadia em Brasília mais agradável e divertida.

Às queridas amigas Danielle, Fernanda, Luciana e Virgínia, companheiras fiéis que continuarão acompanhando os meus passos ao longo desta caminhada.

Aos amigos de Viçosa, Ana, Karla, Luciana e Luísa, pelos momentos compartilhados e por estarem sempre presentes, independentemente da distância, torcendo pelo meu sucesso.

A todos os familiares, por me apoiarem e por me incentivarem sempre.

A todos os outros que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Enfim, agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém, e reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom da auto-suficiência. Ninguém e nada crescem sozinhos, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor”.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO .....	xix
ABSTRACT .....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Situação atual da malária.....	23
1.2. Agente etiológico e ciclo evolutivo .....	26
1.3. <i>Plasmodium vivax</i> .....	33
1.4. A anemia na malária .....	35
1.5. Estudos proteômicos e malária.....	43
1.6. Microscopia de desfocalização.....	51
2. JUSTIFICATIVA.....	54
3. OBJETIVOS.....	56
3.1. Objetivo geral.....	56
3.2. Objetivos específicos.....	56
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1. Área e população de estudo.....	57
4.2. Estratificação dos indivíduos para o preparo dos <i>pools</i> de soros.....	59
4.3. Preparo do extrato de proteínas de membrana de hemácias humanas O <sup>+</sup> não infectadas .....	60
4.4. Determinação da concentração de proteínas no extrato de hemácias .....	63
4.5. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 1D).....	64
4.6. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 2-D).....	64
4.6.1. Primeira dimensão: focalização isoeletrica.....	65
4.6.2. Segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	66
4.7. Coloração dos géis.....	68
4.7.1. Coloração dos géis por prata.....	68
4.7.2. Coloração dos géis por azul de coomassie coloidal G-250.....	68
4.8. Western Blot Bidimensional.....	69
4.9. Análise das imagens .....	70
4.10. Excisão dos spots e digestão tripsínica das proteínas.....	71
4.11. Concentração e purificação dos peptídeos em ponteiras ZipTip®, contendo coluna de carbono 18 (C18).....	72
4.12. Análise por espectrometria de massa MALDI-ToF/ToF.....	73

4.12.1.	Determinação das massas moleculares dos peptídeos por MALDI-TOF/MS e fragmentação dos peptídeos por MALDI-ToF/ToF .....	73
4.12.2.	Identificação das proteínas em banco de dados por <i>Peptide Mass Fingerprint, MS/MS Ion Search</i> , sequenciamento dos peptídeos .....	75
4.13.	Busca genômica de proteínas de <i>P. vivax</i> candidatas ao mimetismo molecular com proteínas de hemácias humanas .....	77
4.14.	Microscopia de desfocalização .....	78
5.	RESULTADOS .....	81
5.1.	Extração e dosagem das proteínas de membrana de hemácias humanas não infectadas .....	81
5.2.	Eletroforese bidimensional de proteínas de membrana de hemácias humanas normais.....	82
5.3.	Deteção e identificação das proteínas de hemácias não infectadas reconhecidas pelos diferentes grupos de soros .....	84
5.4.	Identificação genômica de proteínas de <i>P. vivax</i> candidatas ao mimetismo molecular com proteínas de hemácias humanas .....	97
5.5.	Avaliação, por meio da Microscopia de Desfocalização (MD), dos efeitos dos anticorpos anti-hemácia e anti-banda 3 na membrana da hemácia.....	99
6.	DISCUSSÃO .....	104
7.	CONCLUSÃO.....	113
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	114
9.	APÊNDICE .....	141
10.	ANEXO .....	146

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição mundial da malária em 2013: países ou áreas com risco de transmissão (Fonte: *National Malaria Control Programme Reports - World Health Organization*, 2014).....23
- Figura 2.** Mapa de risco da malária no Brasil, por município de infecção, em 2013. A classificação das áreas foi realizada de acordo com a incidência parasitária anual (IPA). A IPA indica o número de exames positivos de malária por mil habitantes, em determinado espaço geográfico, no ano considerado. Portanto, ela estima o risco de ocorrência anual de malária em áreas endêmicas com graus de risco expressos em valores do IPA: risco baixo (IPA < 10/1000 habitantes), risco médio (IPA entre 10,0 e 49,9/1000 habitantes) e alto (IPA > 50,0/1000 habitantes) (Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/outubro/30/IPA-2013.pdf>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2015 às 22:00 horas).....26
- Figura 3. A.** Fase pré-eritrócítica do ciclo de vida *Plasmodium*. **EEF:** formas exoeritrocíticas. **B** Liberação de um merossomo em um sinusoide representada em uma seção de corte semifino (barra = 10 µm) ou em uma imagem proveniente de microscopia intravital (**C**) (barra = 10 µm). (Fonte: PRUDÊNCIO et al., 2006; BAER et al., 2007; MÉNARD et al., 2013).....27
- Figura 4.** Ciclo de vida de *Plasmodium vivax* (Fonte: Adaptado de MUELLER et al., 2009).....31
- Figura 5.** Anemia na malária vivax. Possíveis mecanismos imunológicos associados à destruição de hemácias infectadas e não infectadas. **A.** Durante o desenvolvimento no reticulócito, *P. vivax* provoca uma série de alterações que acabam levando à ruptura da célula parasitada. Parasitos, antígenos, e debris são liberados na circulação. Em resposta a essas moléculas, o hospedeiro induz uma forte resposta imune que pode danificar a membrana de hemácias e, ainda, provocar a hemólise ou a fagocitose, tanto de hemácias infectadas, quanto de não infectadas. Com o desenvolvimento de resistência de *P. vivax* à cloroquina, ocorre um atraso na remoção do parasito, e isso acaba contribuindo para a anemia. **B.** Mediadores

imunes também podem atuar na medula óssea e baço, provocando efeitos tóxicos em linhagens eritróides e levando à diseritropoiese. Além disso, reticulócitos infectados por *P. vivax* parecem capazes de se aderir a células endoteliais dos órgãos mencionados anteriormente e também à placenta. Outra rota possível para a perda de hemácias é via formação de roseta. Tem sido sugerido que esses agregados de hemácias podem interferir negativamente na eritropoiese ou, então, que as hemácias não infectadas aderidas a uma hemácia infectada são destruídas de alguma maneira. Entretanto, os mecanismos que associam a citoaderência/formação de roseta à anemia permanecem desconhecidos. CSA (“*chondroitin sulfate A*”); HÁ (“*hyaluronic acid*”) (Fonte: CASTRO-GOMES et al., 2014).....38

**Figura 6.** Métodos de ionização (A) Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) (B) Ionização por eletropulverização (ESI) (Fonte: STEEN & MANN, 2004).....46

**Figura 7.** Nomenclatura proposta por ROEPSTORFF & FOHLMANN, 1984 e BIEMANN, 1988 para classificar os fragmentos obtidos de um determinado peptídeo (Fonte: STEEN & MANN, 2004).....48

**Figura 8.** **A.** Foto do microscópio utilizado na técnica de microscopia de desfocalização. **B.** Imagem do contraste do objeto de fase acima do plano focal da objetiva ( $\Delta f = 2 \mu\text{m}$ ). **C.** Plano médio da célula ( $\Delta f = 0 \mu\text{m}$ ). **D.** Imagem do contraste do objeto de fase abaixo do plano focal da objetiva ( $\Delta f = -2 \mu\text{m}$ ). **E.** Representação de uma hemácia com o referencial entre o plano médio da célula e o plano focal da objetiva  $z_{\text{rbc}}$ ;  $h_1$  corresponde à distância entre  $z_{\text{rbc}}$  e a membrana superior, e  $h_2$  corresponde à distância entre  $z_{\text{rbc}}$  e a membrana inferior.  $\Delta f$ : distância entre o plano médio da célula e o plano focal da objetiva  $z_{\text{rbc}}$  (Fonte: Adaptado de ROMA, 2014).....52

**Figura 9.** Esquema ilustrando as etapas de um experimento de imunoproteômica. ....76

**Figura 10.** Pipeline de mimetismo utilizado no presente estudo. \*O mascaramento foi realizado utilizando o programa computacional de predição de peptídeos sinais Phobius.....77

<b>Figura 11.</b> Determinação do índice $k$ . $d_c$ é a espessura do centro da hemácia; $d_r$ é a metade do raio da hemácia (Fonte: TISHKO et al., 2012).....	80
<b>Figura 12.</b> SDS-PAGE 12% do extrato de proteínas de membrana de eritrócitos humanos O <sup>+</sup> não infectados. O gel foi corado por <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i> . <b>1:</b> Marcador de massa molecular (kDa) <i>Broad Range Protein Molecular Weight Markers</i> (Promega); <b>2:</b> 10 µg de extrato; <b>3:</b> 20 µg de extrato; <b>4:</b> 40 µg de extrato; <b>5:</b> 60 µg de extrato.....	81
<b>Figura 13.</b> Padronização da eletroforese bidimensional, utilizando-se fitas de IPG com gradiente de pH 4-7. <b>(A)</b> Gel 2D contendo 10 µg de extrato de membrana de hemácias humanas saudáveis O <sup>+</sup> corado pela prata. <b>(B)</b> Gel 2D contendo 100 µg de extrato corado por azul de coomassie coloidal. Avaliação da reprodutibilidade entre os géis do quinto experimento. <i>Scatter Plot</i> representando (eixo X) a relação entre os valores de % de volume de cada <i>spot</i> com os valores (eixo Y) de % de volume do gel usado como referência para a comparação. Corr: Índice de Correlação; <i>Count</i> : Quantidade de <i>match</i> entre os géis.....	82
<b>Figura 14.</b> Perfil bidimensional do extrato de proteínas de membrana de hemácias humanas normais O <sup>+</sup> . Os géis 2DE foram obtidos após a separação de 100µg de extrato por eletroforese bidimensional (primeira dimensão: IEF pH 4-7; segunda dimensão: 12% SDS-PAGE) e corados com azul de Coomassie coloidal.....	84
<b>Figura 15.</b> Perfil de reatividade de IgG contra proteínas de hemácias saudáveis O <sup>+</sup> frente a quatro grupos de soros: <b>A.</b> não infectado sem anemia (NINA); <b>B.</b> não infectado com anemia por outras etiologias (NIAN); <b>C.</b> malária vivax e sem anemia (PvNA); <b>D.</b> malária vivax e anemia (PvAN).....	87
<b>Figura 16.</b> Alinhamento da sequência de espectrina, proteína selecionada como candidata ao mimetismo entre <i>P. vivax</i> e hemácia humana, com a seqüência obtida pelo ensaio de imunoproteômica. Os aminoácidos representados em vermelho e azul correspondem, respectivamente, às regiões com alto e baixo grau de conservação compartilhado. Em preto, regiões neutras (presentes em uma seqüência e ausentes em outra).....	98

<b>Figura 17.</b> Avaliação dos efeitos dos anticorpos IgG anti-banda 3 e IgG anti-hemácia no volume das hemácias. As barras indicam a média e o desvio padrão do volume. O tamanho amostral dos grupos avaliados foi, respectivamente, n = 25, n = 30 e n = 30. Teste t para amostras independentes *****: $p \leq 0,0001$ .....	100
<b>Figura 18.</b> Reconstrução tridimensional da espessura de uma hemácia à qual se adicionou IgG anti-hemácia. Não houve alteração na forma da célula embora tenha ocorrido alteração no volume.....	101
<b>Figura 19.</b> Avaliação da interferência do intervalo de tempo do experimento na amplitude média das flutuações em altura ( $u_{rms}$ ) da membrana da hemácia. As barras indicam a média e o desvio padrão da $u_{rms}$ durante os três diferentes intervalos de tempo testados: tempo zero, 30 minutos e 60 minutos. Foram avaliadas 10 hemácias por grupo. <i>One Way ANOVA</i> , $p = 0,1572$ .....	102
<b>Figura 20.</b> Avaliação dos efeitos dos anticorpos na amplitude média das flutuações em altura ( $u_{rms}$ ) da membrana da hemácia. As barras indicam a média e o desvio padrão da amplitude das flutuações em altura da membrana. Foram avaliadas oito hemácias por grupo. * $p = 0,0103$ ; ** $p = 0,0078$ .....	103
<b>Figura 21.</b> Representação esquemática mostrando algumas das proteínas identificadas por espectrometria de massa (Fonte: Adaptado de SALOMÃO et al., 2008).....	105
<b>Figura 22.</b> Modelo proposto para explicar alterações nas propriedades viscoelásticas da membrana das hemácias associadas à ligação de anticorpos anti-banda 3.....	111

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Manifestações clínicas e achados laboratoriais encontrados nos pacientes infectados por *P. vivax* incluídos neste estudo. IQR: intervalo interquartil.....58
- Tabela 2.** Comparação entre os grupos de indivíduos infectados anêmicos (PvAN) e não anêmicos (PvNA). Os valores apresentados para cada parâmetro representam a mediana e o intervalo interquartil. <sup>a</sup> valor de  $P = 0,0006$  e <sup>b</sup> valor de  $P = 0,0023$ .....60
- Tabela 3.** Dados hematológicos do indivíduo doador de hemácias não infectadas.....61
- Tabela 4.** Parâmetros utilizados na focalização isoelétrica das proteínas de membrana de hemácias humanas sadias O<sup>+</sup>, realizada no equipamento Protean<sup>®</sup> IEF Cell (BioRad).....66
- Tabela 5.** Proteínas de hemácias humanas saudáveis O<sup>+</sup> reconhecidas por soros dos diferentes grupos; NINA: indivíduos saudáveis; NIAN: indivíduos com anemia por outra etiologia; PvNA: pacientes infectados por *P. vivax* sem anemia; PvAN: pacientes infectados por *P. vivax* com anemia. As buscas de identidade foram realizadas no SwissProt e no NCBIInr. Exp.: experimental; Teor.: teórico. Em negrito, os *spots* reconhecidos somente pelos anticorpos do grupo PvAN.....88
- Tabela 6.** Proteínas confirmadas por sequenciamento manual dos espectros de MS/MS. m/z: razão massa carga. Exp.: experimental; Teor.: teórica.....95

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACN** – Acetonitrila
- AMA-1** – *Apical Membrane Antigen 1*/ Antígeno 1 da membrana apical
- BFU-E** – *Burst-Forming Unit-Erythron*/ Unidades formadoras de “explosão” eritroide
- BSA** – *Bovine serum albumin*/ Albumina de soro bovino
- CD59** – *Membrane Inhibitor of Reactive Lysis*/ Inibidor de lise reativa da membrana
- CFU-E** – *Colony-Forming Erythron*/ Unidades formadoras de colônia eritroide
- CHAPS** – 3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amônio]-propano sulfonato
- CHCA** – Ácido  $\alpha$ -cyano-hidroxicinâmico
- CLLF** – Capacidade latente de ligação do ferro
- CTLF** – Capacidade total de ligação do ferro
- CR1/CD35** – *Complement Receptor 1*/ Receptor 1 do complemento
- CS** – *Circum-sporozoite*/ Circum-esporozoíto
- Da** – Dalton
- DAF/CD55** – *Decay-Accelerating Factor*/ Fator acelerador do decaimento
- DARC** – *Duffy antigen/chemokine receptor*/ Antígeno Duffy/receptor para quimiocina
- dL** – Decilitro
- DTT** - Dithiothreitol
- EBA** – *Erythrocyte binding antigen*/ Antígeno de ligação ao eritrócito
- EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ESI** – *Electrospray*/ Eletropulverização
- fl** – Femtolitro
- g** – Grama
- GFP** – *Green Fluorescent Protein*/ Proteína verde fluorescente
- Hb** – Hemoglobina
- HCl** – Ácido clorídrico
- HCM** – Hemoglobina corpuscular média
- HEPES** – N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
- HGF** – *Hepatocyte Growth Factor*/ Fator de crescimento do hepatócito
- HIV** – Vírus da imunodeficiência humana
- ICB** – Instituto de Ciências Biológicas
- IEF** – *Isoelectric Focusing*/ Focalização isoelétrica

**IL-10** – Interleucina 10

**INF- $\gamma$**  – Interferon gama

**IPG** – *Immobilized pH gradient*/ Gradiente de pH imobilizado

**IQR** – *Interquartile Range*/ Intervalo interquartil

**IST** – Índice de saturação da transferrina

**MALDI** – *Matrix assisted laser desorption/ionization*/ Ionização/dessorção a laser assistida por matriz

**MD** – Microscopia de Desfocalização

**$\mu\text{L}$**  – Microlitro

**mL** – Mililitro

**$\text{mm}^3$**  – Milímetro cúbico

**mmol** – Milimol

**mM** – Milimolar

**MS** – *Mass spectrometry*/ Espectrometria de massa

**MS/MS** – Espectrometria de massa em tandem

**MT** – Mato Grosso

**m/z** – Razão massa/carga

**NaCl** – Cloreto de sódio

**ng** – Nanograma

**NIAN** – Não infectado anêmico

**NINA** – Não infectado não anêmico

**NO** – Óxido nítrico

**PCR** – Reação em Cadeia de Polimerase

**pg** – Picograma

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**PIB** – Produto Interno Bruto

**PMF** – *Peptide Mass Fingerprint*

**p/v** – Peso por volume

**PvMSP-3a** – *Plasmodium vivax merozoite surface protein 3a*/ Proteína 3a da superfície de merozoíto de *P. vivax*

**PvAN** – Infectado por *P. vivax* anêmico

**PVDF** – *Poluvinylidene fluoride*/Fluoreto de polivinilideno

**PvNA** – Infectado por *P. vivax* não anêmico

**RON2** – *Rhoptry neck protein 2*/ Proteína 2 de roptria

**rpm** – Rotação por minuto  
**SDS** – Dodecil-Sulfato de Sódio  
**SDS-PAGE** – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*  
**TBS/T** – Tampão Tris salina/Tween  
**TEMED** – N, N, N', N' - tetra metilenodiamina  
**TFA** – Ácido trifluoroacético  
**TOF** – *Time of flight*/ Tempo de voo  
**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa  
**TRAP** – *Thrombospondin Related Anonymous Protein*/ Proteína anônima relacionada à trombospondina  
**Tris** – Trishidroximetilaminometano  
**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais  
 **$u_{rms}$**  – Amplitude média das flutuações em altura das superfícies de objeto de fase  
**VD** – Vacúolo Digestivo  
**VCM** – Volume corpuscular médio  
**V** – Voltz  
**v/v** – Volume por volume  
**WB** – *Western blot*  
**WHO** – *World Health Organization*/ Organização Mundial da Saúde  
**2D** – Duas dimensões  
**2DE** – *2-Dimensional gel Electrophoresis*/ Eletroforese Bidimensional  
**4HNE** – 4-Hidroxinonenal  
 **$\mu\text{A}$**  – Microamper  
 **$\mu\text{m}^3$**  – Micrometro cúbico  
**%** – Porcentagem  
 **$^{\circ}\text{C}$**  – Grau centígrado

## RESUMO

A destruição das hemácias não infectadas é um dos principais componentes da anemia em infecções por *Plasmodium vivax*. Para cada hemácia parasitada, estima-se que 32 hemácias normais sejam destruídas, embora as moléculas e os mecanismos imunológicos que participam desse processo ainda não sejam bem compreendidos na malária vivax. Nesse sentido, a hipótese investigada neste estudo é a de que autoanticorpos direcionados a proteínas de membrana de hemácias estão envolvidos na remoção de hemácias não infectadas, levando à anemia em infecções por *P. vivax*. Assim, a partir de uma abordagem imunoproteômica, a resposta global de IgG contra proteínas de hemácias não infectadas foi comparada entre os soros de quatro grupos diferentes: (i) não infectados saudáveis; (ii) não infectados com anemia por etiologias diferentes de malária; (iii) infectados por *P. vivax* sem anemia e (iv) infectados por *P. vivax* com anemia. As proteínas reconhecidas pelas IgGs desses grupos foram identificadas por meio de espectrometria de massa do tipo MALDI-ToF/ToF. O repertório de antígenos reconhecidos por soros de pacientes com malária vivax mostrou-se bastante diversificado, e isso foi ainda mais evidente para o grupo de indivíduos anêmicos. Soros de pacientes com malária reconheceram proteínas de citoesqueleto como a anquirina, a dematina, a banda 7 e a proteína 4.2. Além disso, tais soros reconheceram, intensamente, as espectrinas, a actina e a banda 3. Interessantemente, soros de pacientes infectados e anêmicos reconheceram essas proteínas ainda mais intensamente, sendo que o reconhecimento da proteína banda 3 foi, nitidamente, mais evidente. Para investigar se a presença de elevados níveis desses anticorpos poderia estar relacionada ao compartilhamento de antígenos entre o parasito e o hospedeiro, utilizamos ferramentas bioinformáticas e evidenciamos que as espectrinas apresentaram alta sintonia com os bancos de dados de *P. vivax* e do hospedeiro, indicando uma possível participação do mimetismo molecular na produção de elevados níveis de anticorpos na malária. Para avaliar se a ligação do anticorpo anti-banda 3 altera as propriedades geométricas e mecânicas da membrana da hemácia, foi utilizada a técnica de microscopia de desfocalização. A opsonização de hemácias não infectadas por anticorpo anti-banda 3 modificou o volume da célula e alterou as amplitudes médias das flutuações em altura da membrana, apontando para uma menor deformabilidade da célula, o que poderia facilitar a sua remoção por macrófagos em capilares estreitos da microcirculação. Nossos resultados evidenciam uma associação entre anticorpos IgG anti-hemácia e a anemia na malária vivax. Os dados gerados poderão ampliar a compreensão sobre os mecanismos envolvidos na anemia

e poderão direcionar as pesquisas para estratégias de tratamento, vacinação e diagnóstico mais apropriadas.

---

## ABSTRACT

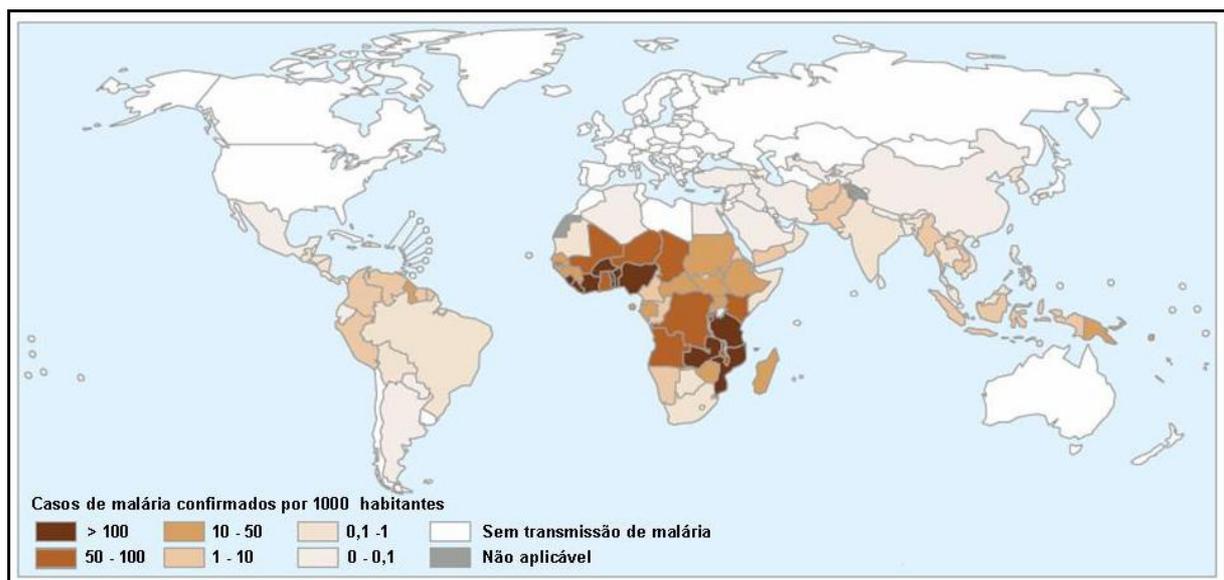
The destruction of uninfected erythrocytes is one of the leading causes of anemia in *P. vivax* infections. It has been estimated that about thirty-two non-parasitized red blood cells (RBCs) are destroyed for each parasitized RBC. Nevertheless, the molecules and the immunological mechanisms involved in the outcome of anemia during vivax malaria are still unknown. In this direction, the hypothesis investigated here is that autoantibodies induced to RBC membrane proteins are associated with this massive removal of uninfected RBC, leading to anemia in *P. vivax* infections. In order to answer this question, we used an immunoproteomic approach to elucidate differences in the global IgG response directed to non-infected RBCs proteins among sera from four distinct groups of individuals – (i) healthy, (ii) non-infected with anemia by other etiologies, (iii) *P. vivax* infected patients without anemia and, finally, (iv) *P. vivax* infected patients with anemia. Proteins recognized by antibodies from these groups were identified by MALDI-ToF/ToF mass spectrometry. Distinct reactivity panels were detected, since antibodies from patients with vivax malaria reacted against a diverse antigen repertoire and this was even more evident in the anemic group. Sera from malaria patients recognized cytoskeleton proteins such as ankyrin, dematin, erythrocyte band 7 and protein 4.2. Furthermore, antibodies from malaria patients strongly reacted with spectrins, actin and band 3 protein. Sera from malaria anemic patients recognized these proteins even more strongly than sera from non-anemic infected individuals. Binding to band 3 was the most evident immunoproteomic result for the anemic patients with malaria. Aiming to determine whether high levels of such antibodies could be related to the sharing of antigens between the parasite and its host, we used bioinformatics tools and showed that spectrins have a high synteny with both *P. vivax* and host databases, highlighting the possible involvement of molecular mimicry in the production of high levels of antibodies in malaria. We also evaluate if anti-band 3 antibodies could change the geometric and mechanical properties of RBC membrane using defocusing microscopy. Interestingly, the non-infected RBC opsonization by anti-band 3 antibodies modified the RBC volume as well as the average of red cell surface membrane fluctuations, pointing to a decrease in red cell deformability. We speculate that this reduction could facilitate RBCs removal in the narrow capillary microcirculation. Our results clearly show that there is an association between anti-red blood cell antibodies and anemia in vivax malaria. Data generated here will contribute towards a better understanding of

mechanisms involved in anemia, besides guiding research to deeper investigation about treatment, vaccination and diagnostics strategies.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Situação atual da malária

A malária é uma infecção parasitária que apresenta uma grande importância em termos de saúde pública, já que ameaça cerca de 3,2 bilhões de pessoas que residem em áreas onde existe o risco de infecção, número este que representa uma parcela expressiva da população mundial. Em relatório sobre o paludismo, elaborado pela Organização Mundial da Saúde [WHO – World Health Organization] em 2014, estimou-se em 97 o número de países e territórios endêmicos para a malária no ano de 2013, dentre os quais a maioria se localiza em áreas tropicais e subtropicais (Figura 1), onde a temperatura e a pluviosidade propiciam o desenvolvimento dos parasitos do gênero *Plasmodium*, os causadores da malária, em insetos do gênero *Anopheles*, os vetores da doença (WHO, 2014).



**Figura 1.** Distribuição mundial da malária em 2013: países ou áreas com risco de transmissão (Fonte: *National Malaria Control Programme Reports - World Health Organization*, 2014).

Embora a interação entre parasitos do gênero *Plasmodium* e o homem seja conhecida há longa data, as estratégias de controle desenvolvidas até o presente momento para minimizar os efeitos da infecção por esses parasitos ainda não foram capazes de eliminar a malária, que permanece como uma das doenças infecciosas mais importantes pelo fato de estar associada à elevada morbidade e mortalidade (MILLER et al., 2002).

Uma vez que muitos pacientes não procuram e/ou não recebem ajuda médica, ou mesmo porque seu caso não é confirmado em laboratório, ou, ainda, porque não é incluído nas estatísticas dos governos (GREENWOOD et al., 2008), torna-se extremamente complicado determinar o fardo mundial da malária. Entretanto, vários esforços têm sido desenvolvidos nesse sentido, já que diferentes estudos têm elaborado mapas que mostram a intensidade da endemicidade de *P. vivax* em diferentes partes do mundo. Esses estudos utilizam como base, dados numéricos provenientes de vários estudos, nos quais comunidades distintas foram testadas para a prevalência de infecções por *P. vivax*. Essas informações são valiosas, visto que podem direcionar as políticas públicas de saúde para a implementação e o monitoramento de um plano de controle mais eficiente (SNOW et al., 2005; GUERRA et al., 2010, GETTING et al., 2012).

Segundo estimativas da WHO (WHO, 2014), em 2013, foram registrados cerca de 198 milhões de casos e a morte de 584 mil pessoas devido à malária. A maioria desses casos (82%) e a maior parte das mortes (90%) ocorreram na África, onde a faixa etária mais atingida foi a de crianças com idade inferior a cinco anos. Nesse continente, aproximadamente 437 mil crianças morreram devido aos efeitos da doença; dados estes bastante expressivos e que refletem a enorme importância da malária.

Ainda com relação a esse continente, verificou-se que as maiores taxas de mortalidade foram registradas em países com as mais elevadas taxas de pobreza extrema (proporção da população cuja renda é inferior a US\$ 2 por dia), onde as comunidades têm menos acesso aos serviços efetivos de prevenção, ao diagnóstico e ao tratamento (WHO, 2014).

Aliando-se os dados apresentados acima às projeções macroeconômicas, é possível perceber que, onde a malária predomina, as sociedades humanas prosperam menos. Logo, existe uma associação direta entre a malária e a pobreza, já havendo sido estimado que, em países onde a malária é endêmica, a doença é responsável pela redução do Produto Interno Bruto (PIB) em cerca de 1,3 % a cada ano, o que, no curso de décadas, resulta em um enorme impacto no desenvolvimento econômico desses países. O fardo financeiro da malária na África, por exemplo, tem sido estimado em cerca de US\$ 12 bilhões por ano. Esses custos estão relacionados à perda de produtividade devido à doença; redução na produtividade após retorno ao trabalho; tempo perdido com o cuidado dado ao paciente e custo deste cuidado; efeitos físicos da doença a longo prazo; redução da escolaridade; e impacto na demografia, no comércio, no turismo e no investimento externo indireto (SACHS & MALANEY, 2002). Por

tudo isso, o controle da malária em regiões altamente malarígenas oferece a possibilidade de iniciar-se um ciclo virtuoso, no qual melhorias na saúde estimulam o crescimento econômico.

Nas Américas, estima-se que 120 milhões de pessoas, em 21 países, residem em áreas onde existe algum risco de transmissão da malária (Figura 1). Em 2013, 427.000 casos dessa infecção foram confirmados na região, sendo que 72% deles ocorreram em três países: Brasil (42%), Venezuela (18%) e Colômbia (12%). Em termos de mortalidade, a malária foi responsável pela morte de 82 pessoas, nesse mesmo ano, o que evidencia um declínio de 79% em relação ao número de mortes observado no ano de 2000. Dentre os países que integram essa região, o Brasil contribui com metade dessas mortes (WHO, 2014).

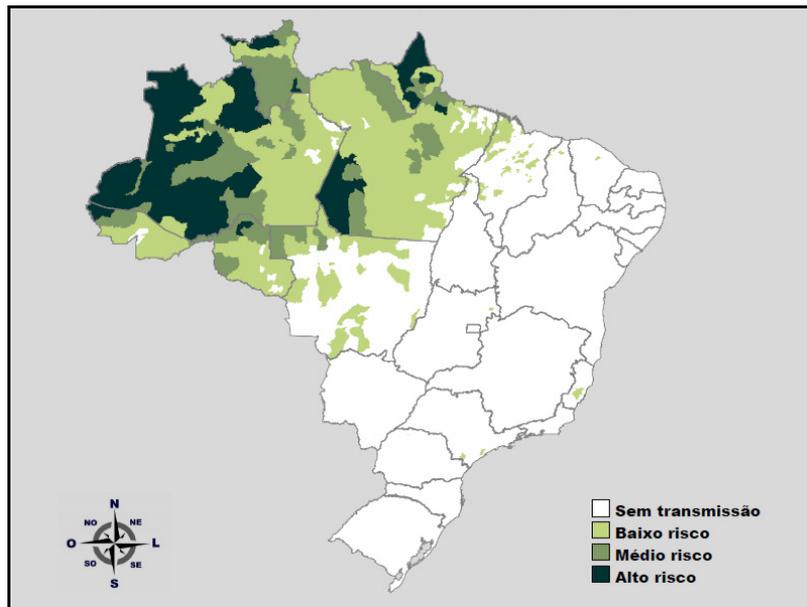
No Brasil, embora tenha havido uma redução no número de casos confirmados de malária nos últimos anos (em 2012 foram notificados 242.758 casos, ao passo que, em 2013, 178.547 casos), o quadro epidemiológico desta doença ainda é preocupante, uma vez que ela é responsável por 3.328 internações hospitalares (Ministério da Saúde, 2014).

Por essa razão, a malária ainda persiste como uma das principais questões, principalmente na região que compreende os estados da Amazônia Legal: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Figura 2), área na qual se concentraram 99,7% de todos os casos notificados no período de 2000 a 2011 (Sivep-Malária/SVS/MS, 2013), e onde a transmissão da doença geralmente está relacionada às condições ambientais e socioculturais (GIL et al., 2007; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Dados do Programa Nacional de Controle da Malária revelaram que, em 2011, apenas seis estados dessa região, Pará, Amazonas, Amapá, Rondônia, Acre e Roraima, registraram cerca de 300 mil casos, valor esse que corresponde a 98% das ocorrências de malária registradas no País (Sivep-Malária/SVS/MS, 2013).

Entretanto, é na região extra-amazônica que se observa a maior letalidade da malária, seja devido ao diagnóstico tardio, ou, ainda, devido ao manejo inadequado dos casos esporádicos importados de áreas endêmicas ou mesmo autóctones em poucos estados (SIVEP/Ministério da Saúde, 2010).

Dentre as três espécies de *Plasmodium* que são transmitidas no Brasil, *Plasmodium vivax* é a espécie responsável por 86,81% dos casos, embora *Plasmodium falciparum* (11,93%) e *Plasmodium malariae* (1,21%) também sejam encontradas, porém em menores proporções (Sivep-Malária/SVS/MS, 2013).

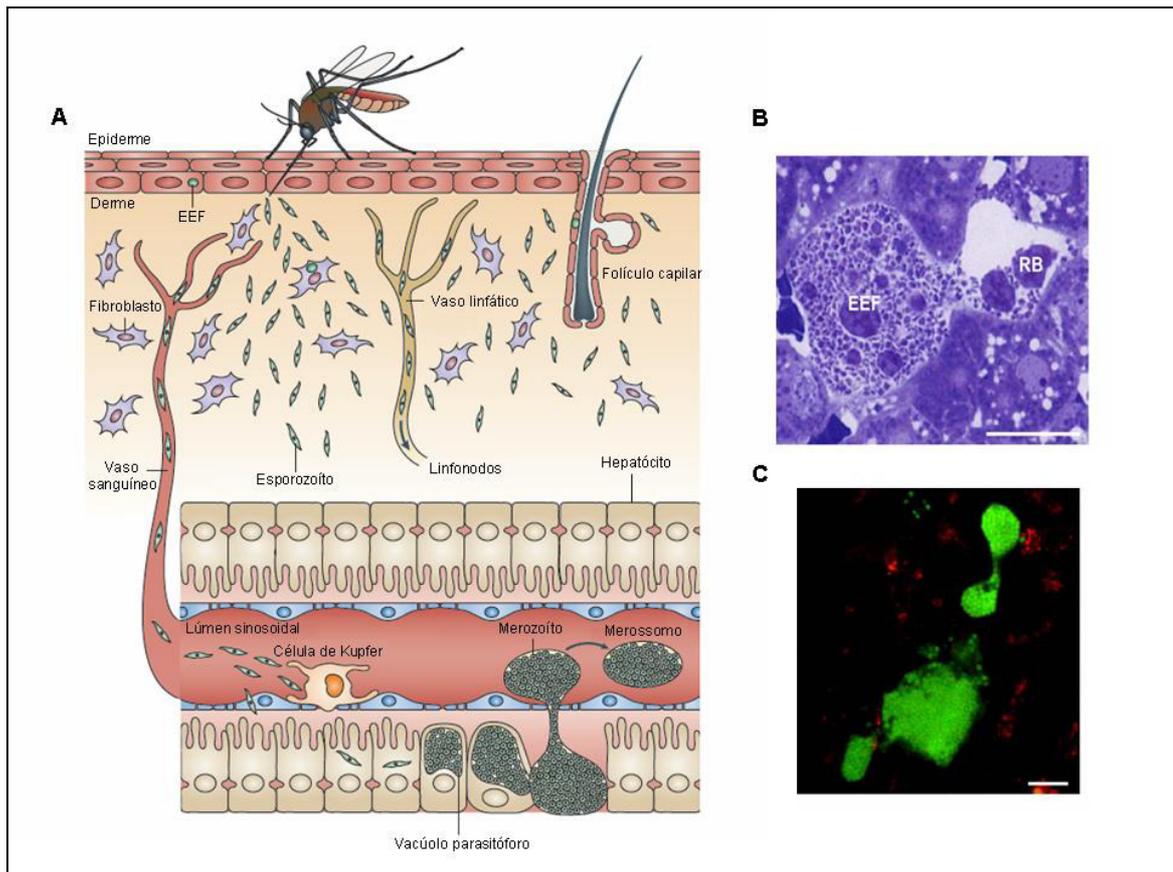


**Figura 2.** Mapa de risco da malária no Brasil, por município de infecção, em 2013. A classificação das áreas foi realizada de acordo com a incidência parasitária anual (IPA). A IPA indica o número de exames positivos de malária por mil habitantes, em determinado espaço geográfico, no ano considerado. Portanto, ela estima o risco de ocorrência anual de malária em áreas endêmicas com graus de risco expressos em valores do IPA: risco baixo (IPA < 10/1000 habitantes), risco médio (IPA entre 10,0 e 49,9/1000 habitantes) e alto (IPA > 50,0/1000 habitantes) (Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/outubro/30/IPA-2013.pdf>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2015 às 22:00 horas).

## 1.2. Agente etiológico e ciclo evolutivo

A malária é uma infecção parasitária que tem como agente etiológico protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodiadae, gênero *Plasmodium*. Dentre as diferentes espécies conhecidas, quatro delas são capazes de parasitar naturalmente o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Recentemente, outra espécie, *P. knowlesi*, que circula entre símios em áreas florestais do sudeste asiático, foi reconhecida como o quinto parasito humano (COX-SINGH et al., 2008; COLLINS & BARNWELL, 2009). Uma vez que o ciclo de transmissão homem-homem ainda não foi esclarecido para essa espécie de parasito, a malária knowlesi tem sido considerada uma infecção de caráter zoonótico (COX-SINGH et al., 2008).

A transmissão da malária ocorre por meio da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas, que contêm esporozoítos (formas evolutivas alongadas, com extremidades afiladas, núcleo central, e membrana constituída por dupla camada) de *Plasmodium* em suas glândulas salivares. Ao exercer o repasto sanguíneo, os anofelinos inoculam, junto com a saliva, esporozoítos nas regiões avasculares da pele do hospedeiro (Figura 3A).



**Figura 3.** A. Fase pré-eritrócítica do ciclo de vida *Plasmodium*. **EEF:** formas exoeritrocíticas. **B** Liberação de um merossomo em um sinusoide representada em uma seção de corte semifino (barra = 10  $\mu\text{m}$ ) ou em uma imagem proveniente de microscopia intravital (**C**) (barra = 10  $\mu\text{m}$ ). (Fonte: PRUDÊNCIO et al., 2006; BAER et al., 2007; MÉNARD et al., 2013).

Há algum tempo, acreditava-se que os esporozoítos migravam rapidamente do seu sítio de inoculação para o fígado, logo após a picada do anofelino. Entretanto, essa visão tem sido questionada por alguns pesquisadores. YAMAUCHI e colaboradores (2007) estabeleceram a cinética dessa migração e observaram que a maioria dos esporozoítos ainda permanecia na derme por uma hora após a inoculação. Entretanto, uma redução significativa no número de esporozoítos era observada três horas após a infecção, sugerindo duas

possibilidades: a migração dos esporozoítos do sítio de inoculação ou a destruição dos parasitos pelas células de defesa do hospedeiro. Resultado semelhante foi obtido em estudo de microscopia intravital realizado com *Plasmodium berghei* expressando a proteína verde fluorescente [GFP – *Green Fluorescent Protein*]. Nesse trabalho, foi estimado que, em uma hora, cerca de 50% dos esporozoítos inoculados deixavam o sítio da picada e alcançavam o sangue (~ 70%) ou os vasos linfáticos (~ 30%) (Figura 3A), sendo que uma proporção importante de esporozoítos ainda era detectada na derme por um período de até sete horas após a picada (Figura 3A). Foi também verificado que a maioria dos esporozoítos drenados pelos vasos linfáticos terminava a sua jornada no linfonodo proximal, onde eram degradados dentro de células dendríticas, e uma minoria conseguia manter-se e diferenciar-se parcialmente em formas exo-eritrocíticas (Figura 3A) (AMINO et al., 2006).

Para que a infecção por *Plasmodium* se estabeleça, é necessário que os esporozoítos, após atravessarem a barreira endotelial de um vaso sanguíneo cutâneo, alcancem, pela circulação sanguínea, o fígado, e invadam as suas células-alvo, os hepatócitos, onde proliferam e desenvolvem (Figura 3A). Para isso, o parasito deve ser capaz de atravessar o estreito espaço que existe entre os capilares sinusóides e os hepatócitos (espaço de Disse). Três modelos têm sido propostos para explicar essa passagem. O primeiro deles sugere que os esporozoítos atravessam esse espaço via fenestrações existentes no endotélio sinusoidal. As outras hipóteses seriam: a travessia por meio de células de Kupfer ou a migração por motilidade ativa (Figura 3A) (VANDERBER & STEWART, 1990; ISHINO et al., 2004).

Após superar esse obstáculo, a infecção do hepatócito é o próximo desafio. Diferentes estudos têm mostrado que a interação entre o parasito e as células hepáticas pode ocorrer de maneiras variadas: o esporozoíto pode ser internalizado por meio da formação de um vacúolo parasitóforo, ou, pode, ainda, induzir o rompimento da membrana plasmática do hepatócito e, atravessá-la, deslizando através de seu citoplasma (MOTA et al., 2001; MOTA et al., 2002; MOTA et al., 2004).

Até então, acreditava-se que essa habilidade de atravessar diferentes células era uma atividade acompanhada pela regeneração da membrana celular. Entretanto, em um estudo recente, FORMAGLIO e colaboradores (2014) monitoraram a atividade migratória dos esporozoítos *in vivo*, na pele, avaliando a integridade da membrana ao longo do tempo, e verificaram que a maioria das células atravessadas não sobrevive à travessia, fato este que pode estar relacionado ao comprometimento da permeabilidade de suas membranas (FORMAGLIO et al., 2014).

Tem sido sugerido que a migração celular é essencial para o parasito completar o seu ciclo de vida. Isso porque, ao atravessar o citosol de várias células, os esporozoítos estimulariam a secreção de fator de crescimento dos hepatócitos [HGF – *Hepatocyte Growth Factor*], uma cadeia proteica liberada na forma inativa e que é ativada por clivagem proteolítica, formando um heterodímero ligado por uma ponte dissulfeto. Esse heterodímero se liga à Met, o receptor da tirosina quinase, ativando-a. Como consequência dessa ligação, o domínio citoplasmático da Met recruta uma variedade de proteínas que iniciam uma cascata de eventos de sinalização que resulta na proliferação e sobrevivência do hepatócito, tornando essa célula suscetível à infecção e, ainda, resistente à apoptose, por super regular MAPK e Akt. Assim, os esporozoítos ativariam as vias necessárias à invasão e ao futuro desenvolvimento do parasito no hepatócito apropriado à infecção (MOTA et al., 2001; MOTA et al., 2002; MOTA et al., 2004). Essa hipótese, entretanto, tem gerado controvérsias, pois ensaios de invasão celular *in vitro*, envolvendo esporozoítos transgênicos deficientes para o gene *spect* – que codifica uma proteína da micronema essencial para a migração –, mostraram que, embora a deficiência em tal proteína interfira na migração celular, ela não influencia na infectividade do esporozoíto, a qual se mantém semelhante à do tipo selvagem. Esse resultado sugere que a ausência de migração celular não exerce influência na infectividade dos hepatócitos e, portanto, é possível que os esporozoítos alterem o seu modo de invasão em função de outros fatores que ainda não são conhecidos (ISHINO et al., 2004).

Um dos sinais moleculares que poderia modular o comportamento dos esporozoítos de *Plasmodium* é o contato do parasito com proteoglicanos de heparana-sulfato presentes nas membranas celulares, conforme foi mostrado em um estudo de malária murina realizado com *P. berghei*. Nesse estudo, verificou-se que o contato dos esporozoítos com células que expressavam níveis elevados de proteoglicanos de heparan-sulfato ativava o início do processo de invasão, ao passo que o contato com células que expressavam quantidades menores de tais moléculas resultava em migração contínua pelas células. Concluiu-se, pois, que elevados níveis desses proteoglicanos eram capazes de ativar a alteração do fenótipo dos esporozoítos, de migratório para invasivo, graças à ação de proteínas cinases dependentes de cálcio (COPPI et al., 2007; revisto por EJIGIRI & SINNIS, 2009).

Várias proteínas de *Plasmodium* parecem desempenhar um papel crucial nessa interação entre parasito e célula hospedeira. A proteína circum-esporozoíto (CS), por exemplo, é abundante na superfície do esporozoíto e parece interagir com os proteoglicanos de heparana-sulfato presentes no hepatócito, facilitando a internalização do parasito

(PRUDÊNCIO et al., 2006; EJIGIRI & SINNIS, 2009). Já a proteína adesiva relacionada à trombospondina de *Plasmodium* [TRAP – *Thrombospondin Related Anonymous Protein*] tem sido associada à invasão, pelo fato de mediar a ligação entre o citoesqueleto do parasito e a célula hospedeira. Isso porque a porção extracelular da TRAP contém domínios adesivos altamente conservados que podem se ligar à célula hospedeira, e a sua cauda citoplasmática pode interagir com a actina do parasito, via aldolase, por meio de motivos definidos de resíduos de aminoácidos, ligação esta que afeta tanto a atividade da enzima quanto a motilidade celular (MORAHAN et al., 2009).

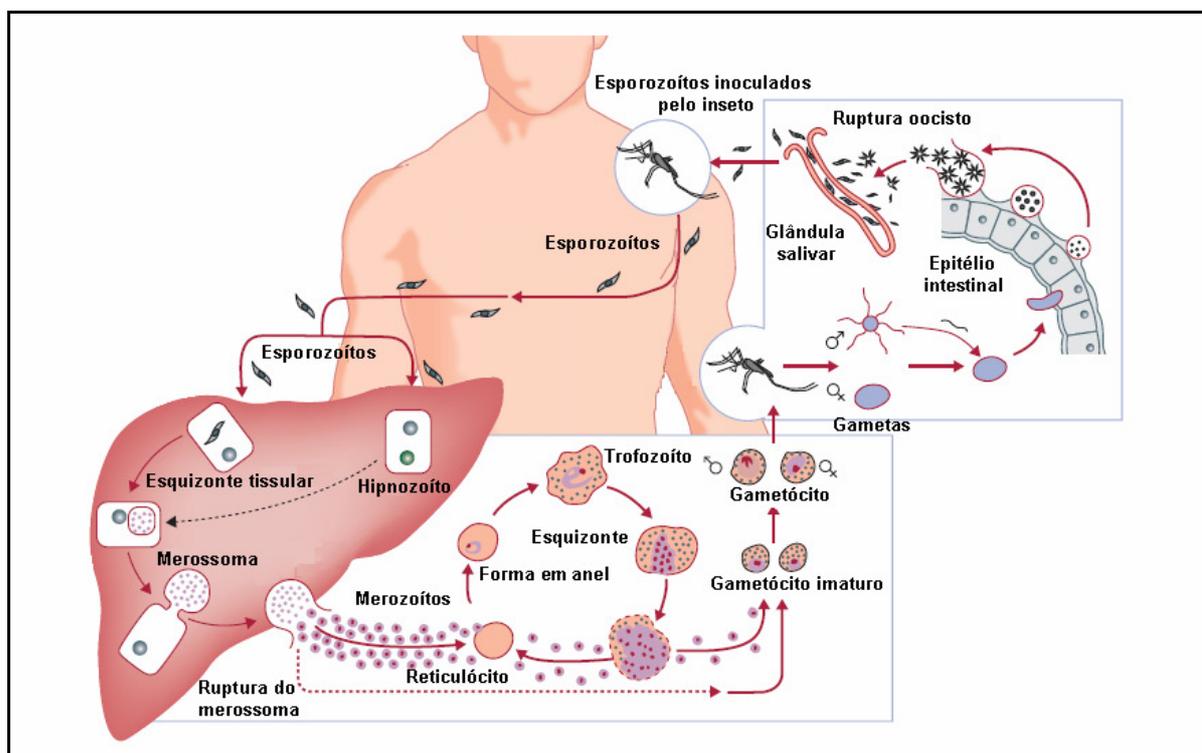
Após a migração por diferentes hepatócitos, o esporozoíto penetra em um hepatócito, perde as organelas do complexo apical e se estabelece dentro do vacúolo parasitóforo, onde passa por um processo de diferenciação, originando formas arredondadas exo-eritrocíticas, os trofozoítos. Os trofozoítos, por sua vez, multiplicam-se, por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem ao esquizonte multinucleado (forma evolutiva grande e redonda, composta por uma massa citoplasmática e vários núcleos filhos) que, ao se romper, libera milhares de merozoítos, que são morfologicamente semelhantes aos esporozoítos, porém com tamanho inferior (1 a 5  $\mu\text{m}$  de comprimento por 2  $\mu\text{m}$  de largura) e forma mais arredondada. Para ter acesso aos eritrócitos e garantir a sua sobrevivência, os merozoítos hepáticos precisam, obrigatoriamente, alcançar o lúmen dos sinusoides hepáticos. Como existe o risco dos merozoítos serem rapidamente reconhecidos e engolfados por células de Kupffer e outras células fagocíticas, eles precisam manipular, de alguma maneira, a célula hospedeira, de forma a garantir a sua proteção durante a migração do fígado para a circulação sanguínea (STURM et al., 2006).

Foi demonstrado que merozoítos de *Plasmodium* não são liberados pela ruptura do hepatócito, como anteriormente se pensava, mas sim pela formação de merossomos (Figura 3B), vesículas arredondadas que se evaginam da membrana do hepatócito (STURM et al., 2006; BAER et al., 2007). Segundo BAER e colaboradores (2007), essas vesículas são formadas 46 a 50 horas após a inoculação dos esporozoítos e, apresentam tamanho relativamente uniforme (12 – 18  $\mu\text{m}$ ), contendo entre 100 e 200 merozoítos cada. Tem sido sugerido que merossomos de tamanhos diferentes evaginam do hepatócito infectado e entram na circulação hepática (Figura 3B). Camuflados pela membrana da célula hospedeira, os merossomos não são reconhecidos pelas células de Kupfer e, via circulação, são transportados para outros órgãos. Forças de cisalhamento existentes no interior das veias hepáticas e de outras grandes veias provocam a subdivisão dos merossomos em unidades menores, que,

então, disseminam-se, passando pelo coração e acumulando-se nos capilares dos pulmões. Neste órgão, os merossomos desintegram-se e os merozoítos são liberados na microcirculação pulmonar. Do ponto de vista evolutivo, essa estratégia parece ser vantajosa para o parasito, pois a baixa densidade de macrófagos nesse local, bem como a velocidade reduzida do fluxo sanguíneo devido à oclusão capilar pelos merossomos, resulta em um empacotamento denso de eritrócitos, facilitando o sucesso da infecção dessas células (BAER et al., 2007).

Embora características apoptóticas, como a condensação do núcleo e a perda do potencial da membrana mitocondrial, sejam observadas no hepatócito parasitado, acredita-se que os plasmódios inibem a exposição de fosfatidilserina na superfície da membrana dos merossomos, por meio do consumo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  presentes no meio intracelular, prevenindo, assim, a destruição do hepatócito infectado por células fagocíticas durante o seu percurso até os sinusoides hepáticos (STURM et al., 2006; revisto por PRUDÊNCIO et al., 2006; BAER et al., 2007).

O primeiro contato entre o merozoíto e o eritrócito é outro passo crucial, uma vez que o parasito precisa distinguir, dentre os eritrócitos, aqueles competentes para a invasão. É importante destacar que *Plasmodium vivax* apresenta tropismo por reticulócitos (KITCHEN et al., 1938) (Figura 4), ao passo que *Plasmodium falciparum* é capaz de invadir hemácias de todas as idades (SIMPSON et al., 1999).



**Figura 4.** Ciclo de vida de *Plasmodium vivax* (Fonte: MUELLER et al., 2009).

O processo de reconhecimento e entrada na célula hospedeira ocorre em cinco etapas – (1) adesão; (2) reorientação das organelas do complexo apical; (3) formação da junção móvel (junção de ligação entre a extremidade apical do merozoíto e a membrana do eritrócito, por meio da qual o parasito é impulsionado para o interior da célula hospedeira, deslocando-se, da extremidade anterior de seu corpo para a posterior, via motor de actina-miosina); (4) invasão; e, finalmente, (5) junção das membranas do vacúolo e do eritrócito (SIBLEY et al., 2004; MILLER et al., 2013) – e ocorre em um período relativamente curto, de 60 segundos, já que os antígenos presentes na superfície da forma extracelular do parasito são particularmente vulneráveis ao ataque do sistema imune (COWMAN & CRABB, 2006).

O reconhecimento e a aderência primária entre o merozoíto e o eritrócito consiste em um evento reversível de baixa afinidade (COWMAN & CRABB, 2006).

Esse processo de aderência do parasito à célula hospedeira inicia-se quando moléculas do parasito interagem com ligantes presentes na superfície das hemácias. No caso de *P. falciparum*, por exemplo, essa interação envolve proteínas da superfície de merozoíto – EBA175 e EBA140 [EBA – *erythrocyte-binding antigen*] – que se ligam às sialoglicoproteínas da membrana do eritrócito, bem como às glicoforinas A e C (TOLIA et al., 2005). Alternativamente, o parasito pode, ainda, utilizar a via de invasão dependente de ácido siálico. Já a invasão de *P. vivax* depende da interação com o antígeno/receptor Duffy para quimiocinas (DARC) (HANS et al., 2005). Esse evento de aderência é seguido pela reorientação do parasito, que rola sobre a hemácia até que a sua extremidade apical se posicione de forma adjacente ao eritrócito. Uma série de proteínas provenientes de organelas do complexo apical é, então, secretada, auxiliando na formação da junção móvel. Dentre essas proteínas, cita-se o antígeno 1 da membrana apical [AMA-1 – *Apical Membrane Antigen 1*], uma proteína produzida nas micronemas. Experimentos realizados com merozoítos de *P. berghei* inativados para a AMA-1 mostraram que a deficiência dessa proteína dificulta a ligação do parasito à célula hospedeira, reduzindo a eficiência da invasão, embora a penetração ocorra de forma semelhante à observada para o tipo selvagem (BARGIERI et al., 2013). Outra proteína importante é a proteína 2 de roptria [RON2 – *Rhoptry neck protein 2*]. Tem sido sugerido que a associação entre essas duas proteínas é essencial para a formação da junção, uma vez que, na presença de peptídeo solúvel RON2 ou de anticorpos anti-AMA-1, tal ligação é bloqueada, e não ocorre a invasão (SRINIVASAN et al., 2011; revisto por MILLER et al., 2013).

Fatores desconhecidos estimulam o motor actina-miosina do parasito, e, dessa forma, o merozoíto é impulsionado para o interior da hemácia. À medida que a junção se move, os ligantes mediadores da invasão são liberados e inicia-se a formação do vacúolo parasitóforo pela fusão da membrana do parasito à do hospedeiro. Forma-se, assim, um ambiente favorável, onde o parasito se desenvolve (COWMAN & CRABB, 2006; MILLER et al., 2013).

Uma cascata regulada de atividades dos merozoítos em maturação prepara os eritrócitos infectados e as membranas do vacúolo parasitóforo para a liberação do parasito. A formação de novos merozoítos e a decomposição progressiva do citoesqueleto do eritrócito originam o esquizonte (Figura 4). Esses eventos, juntamente com um aumento no volume intracelular, contribuem para a transformação do esquizonte em estruturas arredondadas, de curta duração. Uma série de estágios morfológicos direcionados por eventos intracelulares forma uma via pela qual o rompimento, de modo explosivo, da membrana fragilizada da célula hospedeira que envolve os merozoítos resulta na vesiculação abrupta da membrana do eritrócito. Dessa forma, os merozoítos, separados uns dos outros, abandonam o vacúolo e, também, as outras membranas intracelulares que são simultaneamente expelidas durante a ruptura. Os merozoítos liberados podem, então, iniciar o próximo *round* de infecção, e, assim, sucessivamente (Figura 4). Nota-se que essa via, além de possibilitar uma boa disseminação desses parasitos (GLUSHAKOVA et al., 2005), é a responsável pela patogenia da doença.

Outra via possível é a diferenciação de parte desses merozoítos em estágios sexuais, os gametócitos (Figura 4). Estes, ao serem ingeridos por anofelinos durante o repasto sanguíneo, iniciam o ciclo sexuado do parasito, que inclui a liberação de gametas masculinos e femininos, a fertilização, e a formação de um oocineto, que, depois de atravessar o epitélio intestinal, diferencia-se em oocisto, a forma replicativa (Figura 4). O rompimento do oocisto libera milhares de esporozoítos, e estes invadem as glândulas salivares do inseto vetor, onde ficam retidos até serem inoculados em um hospedeiro vertebrado, reiniciando o ciclo (Figura 4) (revisto por MUELLER et al., 2009).

### 1.3. *Plasmodium vivax*

Embora *P. falciparum* seja considerada a espécie mais virulenta devido aos níveis elevados de mortalidade aos quais se encontra associada, principalmente na África (MENDIS

et al., 2001), *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo (GUERRA et al., 2010).

GUERRA e colaboradores, em um estudo realizado em 2010, combinaram dados fornecidos pelos sistemas de informação de saúde com regras biológicas de exclusão de transmissão e informações médicas, em um sistema de informação geográfica que determinou os limites espaciais desta espécie de parasito e estimou em cerca de 2,85 bilhões o número de pessoas que residem em áreas sob o risco de malária vivax. A maioria delas (2,59 bilhões, 91,0%) vive na faixa tropical que inclui o centro e o sudeste da Ásia, e uma minoria reside nas Américas (5,5%) e África (3,4%) (GUERRA et al., 2010).

Nas Américas, onde *P. vivax* é a espécie responsável por mais de 70% dos casos de malária, foi registrado um total de 5.507.167 casos de infecção por este parasito no período compreendido entre os anos de 2000 e 2007 (OPS, 2010).

No Brasil, *P. vivax* também é a principal espécie associada a esta doença, e, nos últimos anos, tem sido observado um crescimento expressivo no número de pacientes com essa infecção, que necessitam de admissão hospitalar, sugerindo que essa tendência pode ser decorrente do aumento na gravidade das infecções provocadas por esse parasito (SANTOS-CIMINERA et al., 2007, ALEXANDRE et al., 2010).

Além disso, estudos realizados em diferentes locais do mundo têm mostrado que a infecção por essa espécie também pode gerar manifestações clínicas graves, incluindo falência renal, síndrome respiratória e anemia grave, além de outras complicações, mostrando que a malária vivax não é tão benigna como anteriormente se pensava (KOCHAR et al., 2005; ANSTEY et al., 2007; ANSTEY et al., 2009; KASLIWAL et al., 2009).

Para agravar ainda mais essa situação, tem sido relatada em vários países, inclusive no Brasil, a ocorrência de cepas resistentes à cloroquina, uma das principais drogas utilizadas no tratamento (BAIRD et al., 2004; SANTANA-FILHO et al., 2007; BAIRD et al., 2011; CHEHUAN et al., 2013), o que constitui um grande problema, já que o desenvolvimento de novos fármacos se torna um obstáculo diante da dificuldade de se manter em laboratório um sistema de cultivo *in vitro* para *P. vivax*.

Nesse sentido, torna-se de extrema importância o desenvolvimento de novos métodos e estratégias de intervenção para bloquear a sua transmissão. Nota-se, contudo, que *P. vivax* apresenta algumas particularidades em seu ciclo de vida que o diferenciam de *P. falciparum* e que dificultam a interrupção de sua transmissão. Para exemplificar, cita-se, dentre outras, a

sua capacidade de persistir como hipnozoítos dormentes nos hepatócitos por meses ou anos antes de iniciar uma infecção sanguínea, o que explica as recaídas tardias após a cura da infecção original (Figura 4). Entretanto, ainda não são conhecidos os fatores do parasito ou do hospedeiro que determinam o número e a duração dessas recaídas. Além disso, os gametócitos de *P. vivax* desenvolvem-se rapidamente, logo no início da infecção, e podem ser detectados na circulação periférica antes ou no início do aparecimento dos sintomas clínicos. Dessa forma, um indivíduo infectado, porém assintomático e, portanto, não tratado, pode servir de reservatório e transmitir com sucesso a infecção, o que dificulta a eliminação dessa doença (MUELLER et al., 2009).

Por todas essas razões, é necessário que mais estudos sejam realizados com essa espécie de *Plasmodium*, o que fornecerá informações importantes no que se refere à biologia, epidemiologia, manifestações clínicas, diagnóstico, terapêutica, entre outras áreas.

#### **1.4. A anemia na malária**

Os parasitos causadores da malária passam grande parte de sua vida no meio intracelular, principalmente em eritrócitos do hospedeiro vertebrado, onde se multiplicam. Como resultado do desenvolvimento do parasito durante o ciclo de vida eritrocítico, ocorrem alterações estruturais, bioquímicas e funcionais nos eritrócitos, que acabam se rompendo (GLUSHAKOVA et al., 2005; MAIER et al., 2009; MILLHOLLAND et al., 2011). Conseqüentemente, os parasitos, bem como os seus metabólitos, são liberados na circulação, gerando uma resposta do hospedeiro que pode ou não levar à doença clínica.

O fenótipo clínico da malária é amplo, variando desde uma infecção assintomática até doença grave e morte (GENTON et al., 2008; TJITRA et al., 2008; ANSTEY et al., 2012; CASTILLO et al., 2012). A modelagem dessa apresentação clínica está relacionada a diferentes fatores: do parasito (espécie, endemicidade, resistência a drogas, taxa de multiplicação parasitária, polimorfismos), do hospedeiro (imunidade, características genéticas e bioquímicas), bem como a fatores geográficos e sociais (acesso a tratamento, fatores culturais e econômicos, políticas de saúde, intensidade de transmissão) (MILLER et al., 2002; QUINTERO et al., 2011).

Dentre as manifestações clínicas comuns em pacientes com malária, a anemia é uma das principais complicações (WICKRAMASINGHE & ABDALLA, 2000; GENTON et al., 2008; TJITRA et al., 2008; VAN HENS BROEK et al., 2010), e é responsável por morbidade e mortalidade elevadas, principalmente de gestantes e de crianças com idade inferior a cinco anos que residem em áreas endêmicas (MURPHY & BREMAN, 2001; TJITRA et al., 2008). Mas, apesar do seu enorme impacto na saúde pública, a anemia associada à malária tem sido alvo de poucos estudos quando comparada a outras áreas do conhecimento como resposta imune, desenvolvimento de vacinas e genômica (CHANG et al., 2004). Por essa razão, a sua patogênese ainda é pouco compreendida, principalmente no que se refere às infecções por *P. vivax*, espécie que foi, por muito tempo, negligenciada pela comunidade científica.

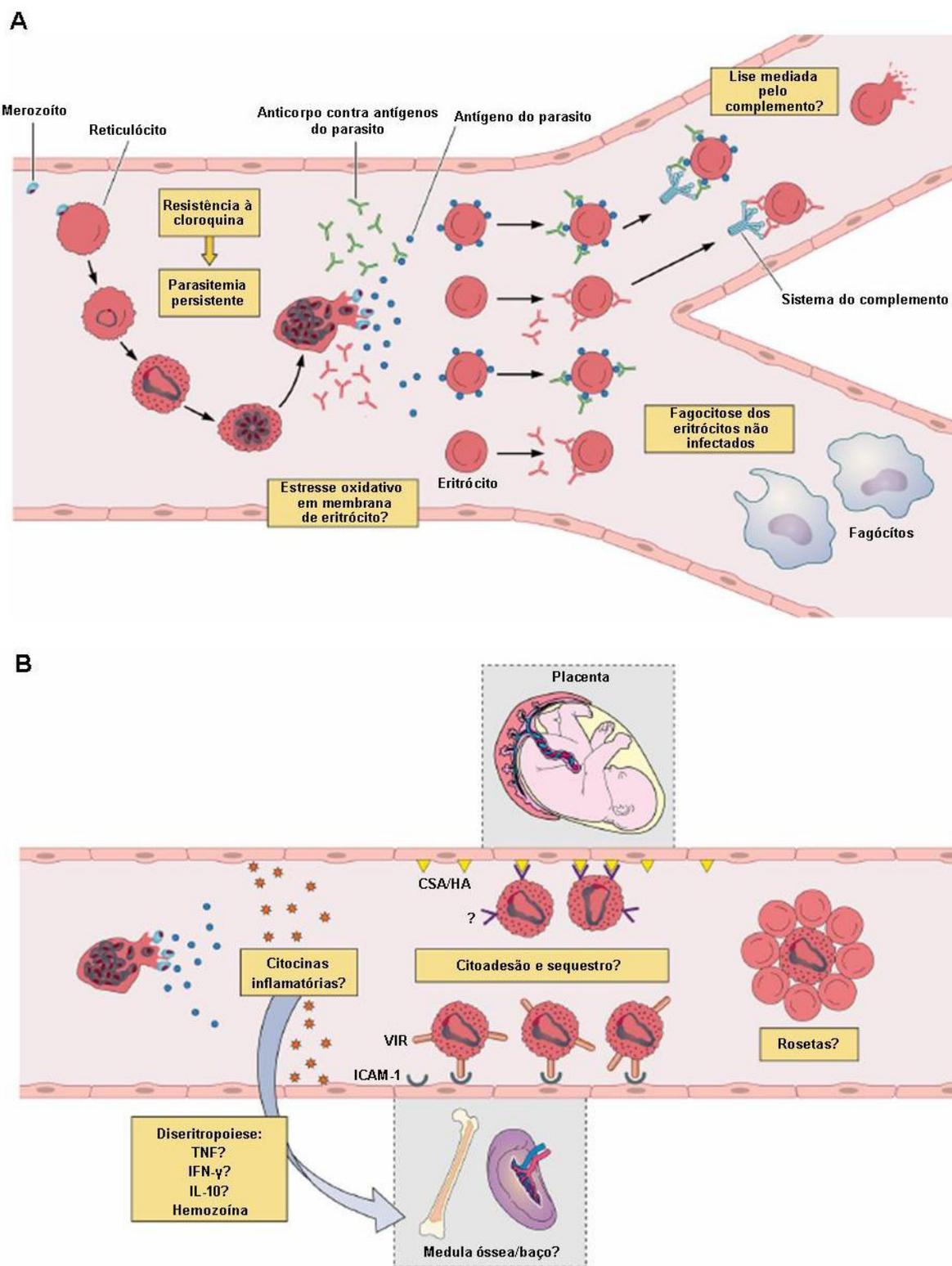
Embora se aceite que a destruição dos eritrócitos ocorre como efeito direto do desenvolvimento do parasito, este mecanismo, por si só, não explica a anemia, uma vez que, em áreas endêmicas, a carga parasitária detectada nem sempre se correlaciona à gravidade da infecção (DONDORP et al., 1999). Essa ausência de correlação entre anemia e parasitemia torna-se ainda mais evidente em infecções por *P. vivax*, espécie que infecta preferencialmente reticulócitos, que correspondem a cerca de 1% do total de eritrócitos (KITCHEN et al., 1938). Nesse nível de infecção, a massa de eritrócitos destruída seria facilmente substituída por meio da eritropoiese (QUINTERO et al., 2011). Entretanto, a destruição de eritrócitos pode persistir até a fase convalescente da infecção, quando os parasitos já foram completamente removidos da circulação ou, até mesmo, durante um período de dias ou semanas após o tratamento (CAMACHO et al., 1998). E, na maioria das vezes, os níveis de hemoglobina não retornam aos valores mensurados no período pré-infecção (COLLINS et al., 2003). Todas essas circunstâncias sugerem que a redução acentuada nos níveis de hemoglobina não pode ser atribuída, exclusivamente, à destruição física dos eritrócitos, sendo que outros mecanismos devem operar (CASTRO-GOMES et al., 2014).

Experimentos envolvendo modelagem matemática de dados hematológicos e de parasitemia obtidos de pacientes com infecção induzida por *P. falciparum* para o tratamento de neurosífilis estimaram que, para cada hemácia parasitada, cerca de nove não parasitadas eram removidas da circulação, sugerindo que essa destruição de eritrócitos não infectados seria o principal componente da anemia (JAKEMAN et al., 1999). Essa razão é ainda mais evidente em infecções por *P. vivax*, em relação às quais se estima que, para cada célula infectada, aproximadamente 32 hemácias normais são destruídas (COLLINS et al., 2003).

Sabe-se que fatores como hemólise, infecções concomitantes por helmintos intestinais, hemoglobinopatias, bem como deficiências nutricionais podem contribuir para a anemia. A deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase, por exemplo, pode predispor à hemólise grave quando o paciente é submetido ao tratamento anti-malárico com primaquina, a droga direcionada para o hipnozoíto, podendo, ainda, contribuir para a anemia na população afetada, com frequências que variam dependendo do *background* étnico. É importante mencionar, ainda, que à medida que a resistência a outras drogas, como a cloroquina, se espalha, infecções crônicas, recrudescência e atraso na remoção do parasito se tornam mais frequentes, contribuindo, também para aumentar a anemia (Figura 5A) (TAVARES, 2013).

Já foi demonstrado, experimentalmente, que o período de sobrevivência de hemácias não parasitadas é menor em pacientes que se recuperam tanto da malária por *P. falciparum* quanto por *P. vivax*, mesmo após a destruição dos parasitos (LOOAREESUWAN et al., 1987). Embora ainda não se conheçam os mecanismos envolvidos na remoção prematura de hemácias não infectadas, acredita-se que ela ocorra devido a alterações na membrana dessas células, induzidas por diferentes fatores como: antígenos do parasito, auto-anticorpos, citocinas e estresse oxidativo (Figura 5A). No que se refere aos antígenos do parasito, já foi evidenciado, em estudo realizado *in vitro*, que culturas de *P. falciparum* liberam exo-antígenos termolábeis capazes de modular a deformabilidade das hemácias, ligando-se a elas e formando protusões na membrana (NAUMANN et al., 1991).

Além disso, durante a infecção subprodutos do metabolismo do parasito, como a hemozoína, um metabólito resultante da digestão da hemoglobina (JARAMILLO et al., 2004), além de outros antígenos como o glicosilfosfatidilinositol (BRATTIG et al., 2008), são liberados na circulação, podendo aderir-se, de forma não específica, a eritrócitos infectados e não infectados e, ainda, a seus precursores, levando à rigidificação dessas células, conforme previamente relatado para proteínas de roptrias associadas a *P. falciparum* (LAYEZ et al., 2005; STERKERS et al., 2007; AWAH et al., 2009). Como resultado, as membranas de eritrócitos contendo algum desses produtos liberados pelo parasito são reconhecidas por anticorpos e removidas da circulação por meio de fagocitose ou por lise mediada pelo complemento (Figura 5A) (AWAH et al., 2009; AWAH et al., 2011).



**Figura 5.** Anemia na malária vivax. Possíveis mecanismos imunológicos associados à destruição de hemácias infectadas e não infectadas. **A.** Durante o desenvolvimento no reticulócito, *P. vivax* provoca uma série de alterações que acabam levando à ruptura da célula parasitada. Parasitos, antígenos, e debris são liberados na circulação. Em resposta a essas moléculas, o hospedeiro induz uma forte resposta imune que pode danificar a membrana de hemácias e, ainda, provocar a hemólise ou a

fagocitose, tanto de hemácias infectadas, quanto de não infectadas. Com o desenvolvimento de resistência de *P. vivax* à cloroquina, ocorre um atraso na remoção do parasito, e isso acaba contribuindo para a anemia. **B.** Mediadores imunes também podem atuar na medula óssea e baço, provocando efeitos tóxicos em linhagens eritróides e levando à diseritropoiese. Além disso, reticulócitos infectados por *P. vivax* parecem capazes de se aderir a células endoteliais dos órgãos mencionados anteriormente e também à placenta. Outra rota possível para a perda de hemácias é via formação de roseta. Tem sido sugerido que esses agregados de hemácias podem interferir negativamente na eritropoiese ou, então, que as hemácias não infectadas aderidas a uma hemácia infectada são destruídas de alguma maneira. Entretanto, os mecanismos que associam a citoaderência/formação de roseta à anemia permanecem desconhecidos. CSA (“*chondroitin sulfate A*”); HÁ (“*hyaluronic acid*”) (Fonte: CASTRO-GOMES et al., 2014).

Com relação às infecções por *P. vivax*, já foi demonstrado que uma versão recombinante da proteína 3 da superfície de merozoíto (PvMSP-3 $\alpha_{359-798}$ ), um importante candidato vacinal, era capaz de induzir uma resposta específica de anticorpos que podia ser associada à anemia em pacientes da Amazônia Brasileira. Entretanto, o uso de uma proteína recombinante em tal estudo, bem como a inexistência, na literatura, de um ensaio funcional ideal para mensurar a atividade dos anticorpos, impossibilitaram verificar se a resposta específica de anticorpos observada poderia ou não estar envolvida na anemia (MOURÃO et al., 2012).

Outros elementos que também podem desempenhar um papel importante na destruição precoce de hemácias não infectadas são os auto-anticorpos (Figura 5A). A presença de imunoglobulinas direcionadas contra os eritrócitos tem sido relatada em uma série de estudos realizados tanto com *P. falciparum* (FACER et al., 1979; FACER, 1980; PHANUPHAK et al., 1983) quanto com *P. vivax* (BERZINS et al., 1983).

Acredita-se que, durante o curso da infecção, esses anticorpos são formados como resultado de uma série de fatores: ativação policlonal de linfócitos B (FREEMAN & PARISH, 1978; PANUPHAK et al., 1983; KORIR et al., 2012); reatividade cruzada entre moléculas do parasito e do hospedeiro (LUDIN et al., 2011; CUSICK et al., 2012); e, ainda, presença de antígenos próprios do hospedeiro que são modificados durante a infecção (VOLLER, 1974; KAY et al., 1979; TURRINI et al., 1991). Alguns estudos têm sugerido que a infecção plasmodial pode induzir reações autoimunes no hospedeiro, que acabam levando às diferentes manifestações clínicas. Nesse sentido, os auto-anticorpos podem ser associados à anemia (ZUCKERMAN et al., 1964; LEFRANÇOIS et al., 1981; BANIC et al., 1991), nefrite (WOZENCRAFT et al., 1990), trombocitopenia (SORENSEN et al., 1984) e, mais

recentemente, à malária cerebral (GALLIEN et al., 2011). Entretanto, a relação entre malária e autoimunidade ainda é pouco compreendida devido à escassez de estudos nesse sentido.

O desequilíbrio de mediadores inflamatórios é outro importante fator do quadro de anemia, ainda mais em infecções por *P. vivax*, nas quais a resposta inflamatória é mais intensa (HEMMER et al., 2006; YEO et al., 2010). Uma vez que os produtos de *Plasmodium* estimulam a resposta imune, o hospedeiro libera diferentes citocinas (Figura 5B) (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2003). Dependendo do perfil, da magnitude e da duração da liberação dos mediadores inflamatórios, a resposta imune pode controlar a parasitemia (KARUNAWEERA et al., 2003; MENDIS & CARTER, 1992) ou induzir dano no hospedeiro, por exemplo, suprimindo a resposta eritropoiética (CLARK & CHAUDRI, 1988).

Níveis elevados de TNF- $\alpha$ , sozinho, ou em combinação com outras citocinas/quimiocinas, têm sido associados à inibição de células progenitoras eritroides dos tipos BFU-E (*Burst-Forming Unit-Erythron* – unidades formadoras de “explosão” eritroide) e CFU-E (*Colony-Forming Erythron* – unidades formadoras de colônia eritroide) (ROODMAN et al., 1987; WICKRAMASINGHE, 2000). O IFN- $\gamma$  também é um potente inibidor da eritropoiese (LIBREGTS et al., 2011). Já a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que parece prevenir a anemia grave. De fato, elevadas razões TNF- $\alpha$ /IL-10 nos soros de indivíduos com malária têm sido associadas à anemia grave em diferentes estudos (OTHORO et al., 1999; THUMA et al., 2011).

Outro fator importante que merece ser comentado é o fato de que, em resposta à citocinas inflamatórias, diferentes tipos celulares podem aumentar sua produção de óxido nítrico [NO• – *nitric oxide*], composto envolvido em diferentes processos fisiológicos e patológicos. Na malária, o papel do NO• é controverso. Já se observou, por exemplo, que moléculas derivadas de NO• inibiam o crescimento de *P. falciparum in vitro*, conferindo proteção contra o parasito (ROCKETT et al., 1991). Por outro lado, quando detectado em níveis muito elevados, o NO• resultava em efeitos adversos como a apoptose de células progenitoras da medula óssea (MACIEJEWSKI et al., 1995) e a anemia (ANSTEY et al., 1999; GYAN et al., 2002).

Além do NO•, outras espécies reativas de oxigênio também podem ser produzidas durante a infecção, esgotando os mecanismos de defesa das hemácias, que envolve enzimas intracelulares como a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona (EREL et al., 1997; BILGIN et al., 2012). Diferentes proteínas associadas ao estresse oxidativo têm sido detectadas em níveis elevados em indivíduos infectados e anêmicos (BACHMANN et al.,

2014). Algumas delas, como a superóxido dismutase, têm, inclusive, sido sugeridas como possíveis marcadores de malária vivax grave (ANDRADE et al., 2010), mostrando que as alterações no estado redox desempenham um importante papel na patogênese da doença, incluindo a anemia (KELLER et al., 2004).

Outras vias possíveis de perda excessiva de hemácias estariam associadas à formação de rosetas (aderência de eritrócitos infectados a eritrócitos não infectados), e, à geração de 4-hidroxinonenal (4-HNE), - um composto resultante da peroxidação de lipídeos -, catalisada por hemozoína nas hemácias parasitadas (UYOGA et al., 2012). Essas vias já foram estudadas em eritrócitos normais tratados com 4-HNE e verificou-se que, nas rosetas, esse composto poderia ser transferido das hemácias infectadas para as não infectadas, alterando-as e induzindo a remoção fagocítica de grande parte delas (UYOGA et al., 2012). Como essa via foi sugerida para infecções por *P. falciparum*, ainda não se sabe se ela também é válida para infecções por *P. vivax*.

Estudos recentes realizados com gestantes da Amazônia Brasileira têm fornecido evidências em favor da existência de uma correlação inversa entre a formação de rosetas e os valores de hematócrito ou hemoglobina durante infecções por *P. vivax*, sugerindo que a formação de rosetas é um fenótipo de citoaderência frequente na malária vivax, que pode contribuir para o desenvolvimento da anemia (MARIN-MENÉNDEZ et al., 2013).

Recentemente, outra via de perda de eritrócitos não infectados foi sugerida por DASARI et al. (2014) para *P. falciparum*. Segundo os autores, durante a ruptura do esquizonte, o vacúolo digestivo (VD) do parasito é liberado na circulação e ativa a via alternativa do complemento. Como consequência, as convertases C3 e C5 são montadas nessa estrutura e, no momento em que o VD colide com eritrócitos não infectados presentes na vizinhança, ocorre a deposição de C3b e C5b-9 na superfície dessas células, que são, então, fagocitadas por macrófagos, em uma via dependente de C3 (DASARI et al., 2014). Resta saber se essa via também contribui para a anemia em infecções por *P. vivax*.

De uma forma geral, todos os fatores mencionados acima parecem alterar, de alguma maneira, a membrana dos eritrócitos não infectados, estimulando a remoção dessas células por meio de fagocitose. De fato, já se constatou que a remoção de hemácias por macrófagos do baço aumenta na malária aguda, sendo considerada um importante indicador de anemia em infecções por *P. falciparum* (DONDORP et al., 1999). No caso da malária vivax, uma proporção significativa (15%) de eritrócitos não parasitados é destruída após a passagem em

condições microfluídicas que simulam o filtro do baço e dos seus leitos capilares finos (HANDAYANI et al., 2009).

Levando-se em consideração o fato de que as hemácias são frequentemente expostas a diferentes mediadores da resposta imune, seria esperado que elas possuíssem mecanismos de proteção para evitar danos à membrana, principalmente no que se refere à atuação do sistema do complemento. Nesse sentido, sabe-se que as hemácias expressam, em sua superfície, moléculas que atuam em diferentes etapas da cascata de ativação do complemento, prevenindo a sua atuação. Essas moléculas são conhecidas como proteínas reguladoras do complemento e incluem as seguintes moléculas: o receptor de complemento do tipo 1 [CR1 ou CD35 - *Complement Receptor 1*] (MEDOF et al., 1987), o fator acelerador de decaimento [DAF/CD55 - *Decay-Accelerating Factor*] (LUBLIN et al., 2005) e o inibidor de lise reativa da membrana [CD59 - *Membrane Inhibitor of Reactive Lysis*] (FARKAS et al., 2002). Estudos nessa área de pesquisa têm sugerido que deficiências herdadas ou adquiridas nessas proteínas estão envolvidas na patogênese de algumas formas de anemia hemolítica imune, inclusive na anemia associada à malária (WAITUMBI et al., 2000; STOUTE et al., 2003; WAITUMBI et al., 2004; OWUOR et al., 2008; GWAMAKA et al., 2011). Entretanto, todos esses trabalhos têm se focado em pacientes infectados por *P. falciparum*, e, portanto, ainda não se sabe se essas informações também se aplicam a infecções por *P. vivax*.

Diante de todo esse panorama, nota-se que, apesar de a anemia ser considerada uma das manifestações clínicas mais comuns na malária, os mecanismos envolvidos em sua patogênese ainda não são completamente compreendidos, embora se aceite que eles sejam complexos e multifatoriais.

Atualmente, o tratamento da anemia grave consiste em medicação anti-malárica e está associado, muitas vezes, à necessidade de transfusão sanguínea, principalmente durante a infância. Entretanto essa última estratégia tem sido bastante questionada (FENDEL et al., 2010), pois além de oferecer o risco de transmissão de doenças, problemas em termos de logística como a refrigeração inadequada do sangue, erros na entrada de dados, falha de equipamentos e a inexistência de programas de controle de qualidade são apenas alguns dos fatores que prejudicam e tornam onerosa a realização de tal procedimento (MOORE et al., 2001). Por todas essas razões, transfusões sanguíneas urgentes muitas vezes não são possíveis, e cerca de 60% das crianças com anemia grave associada à malária morrem antes de receber o sangue (BOJANG et al., 1997).

Uma opção para superar esses problemas seria o desenvolvimento de tratamentos alternativos, porém isso se torna um grande desafio, uma vez que a etiologia da anemia ainda não é totalmente conhecida, principalmente no que se refere à malária vivax. Nesse sentido, a investigação dos fatores envolvidos na anemia por *P. vivax*, bem como a identificação dos biomarcadores relacionados à sua patogênese poderão fornecer informações importantes para a compreensão dessa patologia e, também, para o desenvolvimento de novos métodos e estratégias de prevenção para esta importante enfermidade.

## 1.5. Estudos proteômicos e malária

Apesar dos grandes avanços da ciência no que se refere à elucidação da base molecular de diferentes doenças, ainda existem lacunas na compreensão da patogênese, bem como no desenvolvimento de estratégias para o diagnóstico precoce e o tratamento. Isso se justifica pelo fato de que a informação gênica obtida com o sequenciamento dos genomas de diferentes seres vivos, por si só, não é suficiente para explicar como esses organismos são estruturados nem como eles funcionam (HARRY et al., 2000).

Nesse sentido, tornou-se necessário o uso de outra estratégia para completar tais lacunas e permitir uma melhor compreensão do status de uma célula em uma determinada condição: a proteômica (LIST et al., 2008). O termo “proteoma” [*Proteome – PROTein complement of a genOME*] foi utilizado, pela primeira vez, por WILKINS e colaboradores (1996) para referir-se ao conjunto de proteínas expressas por um determinado genoma em uma dada célula, tecido ou sistema biológico. Porém, diferentemente do que se observa para o genoma, o proteoma é dinâmico, uma vez que o seu perfil se altera sob diferentes condições e, também, em diferentes tecidos de um mesmo organismo, devido, por exemplo, à flutuações no perfil temporal de expressão proteica e à ocorrência de modificações pós-traducionais, além de outras modificações químicas, como aquelas causadas por espécies reativas de oxigênio, anteriormente discutidas (WILKINS et al., 1996). Estudos proteômicos têm gerado resultados importantes no que se refere à compreensão de diversas doenças, uma vez que permitem a análise comparativa da expressão de proteínas em condições normais e alteradas (HANASH, 2003).

De uma forma geral, a análise proteômica associa uma técnica de separação de proteínas – a eletroforese ou a cromatografia –, à identificação dessas biomoléculas por meio de espectrometria de massa.

Uma das abordagens proteômicas clássicas utiliza a eletroforese bidimensional em gel [2DE – *2-Dimensional gel Electrophoresis*] para separar as proteínas de uma amostra de interesse, as quais são posteriormente clivadas em peptídeos, por meio de uma digestão enzimática e, então, identificadas por espectrometria de massa. Um dos pontos positivos dessa técnica é fornecer um mapa de proteínas que reflete alterações nos níveis de expressão, isoformas e, ainda, mudanças pós-traducionais ou por agentes químicos (GORG et al., 2004).

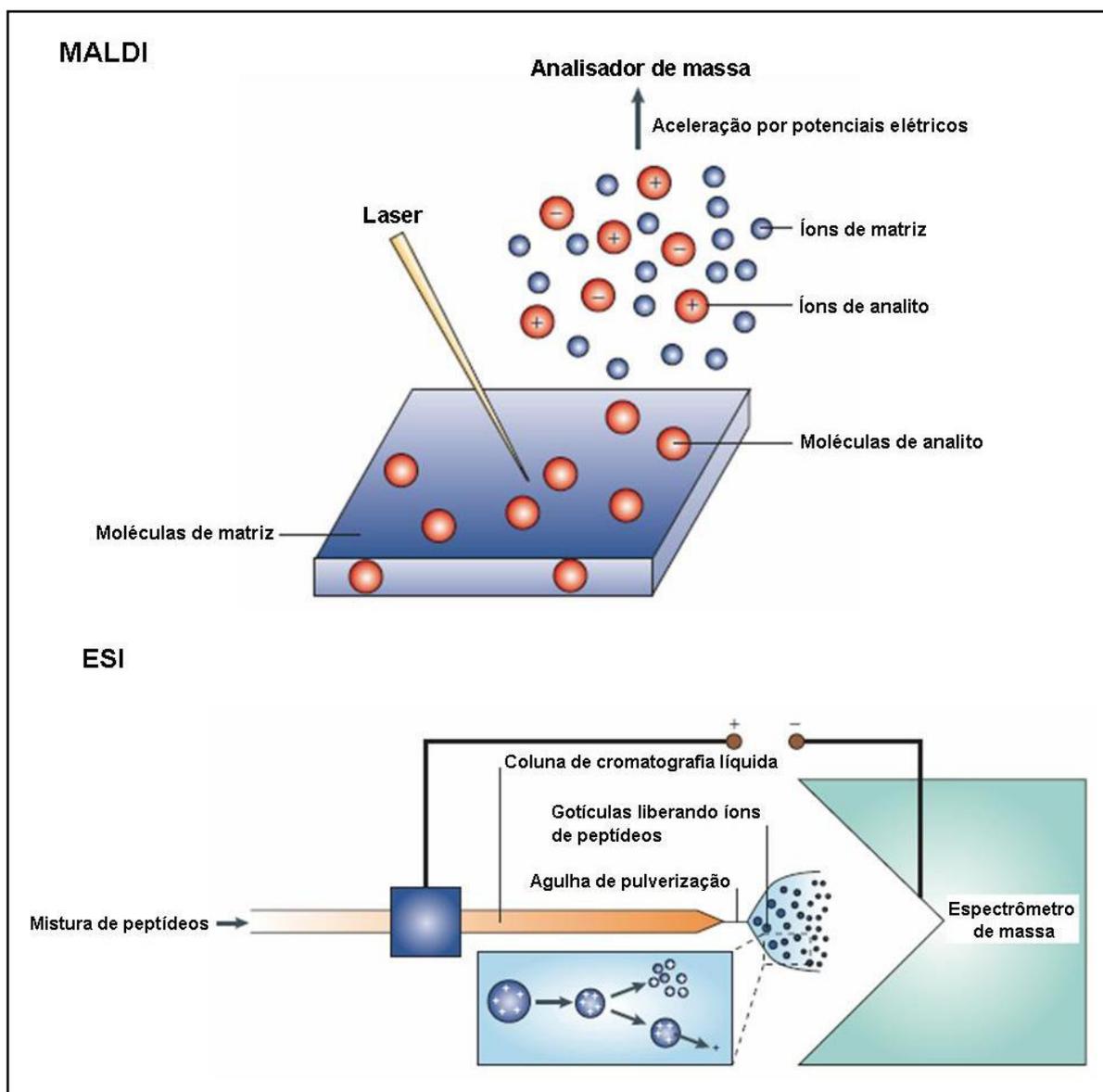
Na 2DE, a primeira dimensão consiste na focalização isoeétrica [IEF – *Isoelectric Focusing*]. Nesta etapa, as proteínas são separadas, em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente de pH imobilizado [IPG – *Immobilized pH gradient*], de acordo com o ponto isoeletrico. Na segunda dimensão, as proteínas separadas pela IEF são submetidas a uma eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Essa etapa permite a separação das proteínas em função de suas massas moleculares (O'FARRELL, 1975; KLOSE, 1975).

Após a etapa de separação, as proteínas de interesse são excisadas do gel e digeridas com uma enzima, por exemplo, a tripsina, uma peptidase estável em faixa ampla de pH e em temperaturas até 45 °C, que cliva, com muita especificidade, as proteínas, na extremidade carbóxi-terminal dos seus resíduos de lisina (R) e arginina (K) (STEEN & MANN, 2004), desde que não sucedidos por prolina (P). Os peptídeos gerados são, então, identificados por meio de espectrometria de massa [MS – *Mass Spectrometry*], usualmente sem necessidade de separação cromatográfica. De uma forma sintética, essa técnica consiste na ionização dos peptídeos, a sua transferência de uma fase condensada para uma fase gasosa e a detecção de peptídeos carregados, os quais têm suas massas mensuradas seguindo-se suas trajetórias específicas em um sistema à pressão reduzida (STEEN & MANN, 2004; PAIZ & SUHAI, 2005).

Técnicas de ionização brandas como a ionização/dessorção a laser assistida por matriz [*Matrix assisted laser desorption/ionization* – MALDI] ou a ionização por eletropulverização [*Electrospray* – ESI] são as mais utilizadas para converter as moléculas de uma amostra em íons, bem como para transferi-las para a fase gasosa (Figura 6) .

No primeiro tipo de ionização (Figura 6), o peptídeo/analito é misturado com uma solução saturada de matriz orgânica que, geralmente, é um ácido aromático de baixa massa molecular, como o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, capaz de absorver luz em comprimentos de onda na região ultravioleta do espectro magnético. Quando a matriz seca, ela cristaliza-se, juntamente com o analito, na placa a ser inserida no espectrômetro de massa. Acredita-se que com a energia proveniente da incidência de um feixe de laser em um comprimento de onda adequado nesse sistema, o excesso de moléculas de matriz sublima e passa a um estado excitado eletronicamente, no qual a sua acidez aumenta em relação ao estado fundamental. Deste modo, os seus íons transferem prótons para as moléculas de analito, que passam para a fase gasosa (revisto por STEEN & MANN, 2004). Entretanto, essa transferência de prótons da matriz para o analito tem sido questionada, uma vez que alguns estudos têm evidenciado que o analito já pode estar pré-ionizado antes da dessorção (KARAS et al., 2000).

No segundo tipo de ionização, a ESI, os íons são gerados a partir de macromoléculas presentes em meio líquido (Figura 6). Para isso, a solução contendo os analitos de interesse é forçada a atravessar uma agulha de metal submetida a um intenso campo elétrico, gerando um processo de natureza eletroquímica (FENN et al., 1990). Nessa condição, o efluente líquido contendo os peptídeos se dispersa eletrostaticamente, gerando microgotículas altamente carregadas. Graças a um fluxo de gás inerte aquecido, que flui no sentido inverso ao da dispersão, o solvente presente em volta das moléculas se evapora. Com isso, ocorre uma redução no tamanho das gotículas e um aumento na densidade de cargas, as quais passam a repelir-se. A repulsão eletrostática eleva-se de tal forma que supera a tensão superficial da gotícula. Como consequência, as gotículas desintegram-se, gradativamente, até que se formem gotículas ainda menores contendo apenas um íon do analito. Devido ao intenso campo elétrico, os íons do analito acabam se desprendendo da superfície da gota (STEEN & MANN, 2004; GRAHAM et al., 2007). Em resumo, uma combinação de fenômenos de repulsão eletrostática e evaporação promove a dessolvatação completa do íon da biomolécula.



**Figura 6.** Métodos de ionização (A) Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) (B) Ionização por eletropulverização (ESI) (Fonte: STEEN & MANN, 2004).

Após a ionização dos peptídeos por meio de uma das duas técnicas citadas acima, a razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons gerados pode ser precisamente e rapidamente mensurada, graças a analisadores de massa. Diferentes tipos de analisadores estão disponíveis comercialmente e o que os diferencia é o princípio que cada um utiliza para caracterizar as razões de  $m/z$  dos íons gerados. Os analisadores de massa mais utilizados para acompanhar os sistemas de ionização citados anteriormente são: o tempo de voo [*Time of flight* – TOF] e o quadrupolo.

No sistema TOF, a análise de massa é realizada a partir do tempo requerido para íons de diferentes massas percorrerem uma distância fixa. Para isso, as moléculas ionizadas são

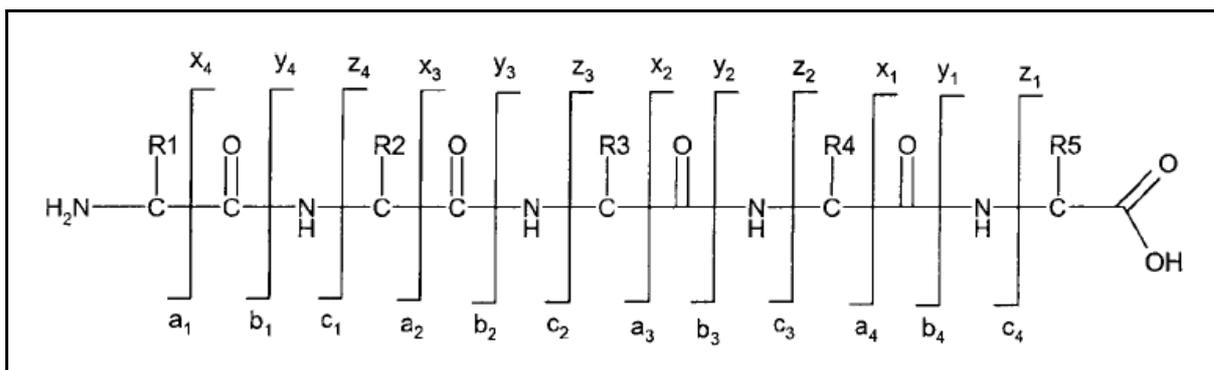
aceleradas por um potencial gerado entre dois eletrodos, e, lançadas em um tubo longo reto, sob pressão reduzida, e sem campo elétrico, até atingirem um detector, situado na outra extremidade do tubo, a uma distância fixa do ponto onde os íons foram acelerados. Uma vez que todos os íons recebem o mesmo impulso inicial do campo elétrico, e, como o tempo de voo é proporcional a  $(m/z)^{1/2}$ , as moléculas são separadas, ao longo do tubo, como resultado de suas energias cinéticas, e conseqüentemente velocidades diferentes, uma vez que alcançam o detector em diferentes intervalos de tempo. Assim, os íons que possuem menores massas atingem o detector em um intervalo de tempo inferior ao observado para os íons que apresentam massas mais elevadas (TANAKA, 2003).

Já nos analisadores do tipo Quadrupolo, a estabilidade da trajetória de diferentes íons em um campo elétrico é o fator responsável por sua separação. Nesse sistema, a presença de quatro eletrodos metálicos dispostos simetricamente com cargas opostas e paralelas é responsável pela condução das moléculas ionizadas. Para isso, os íons gerados na fonte de ionização são introduzidos no centro da região entre os quatros eletrodos, com velocidade constante, em direção paralela aos pólos (direção z). No instante em que se aplica, simultaneamente, uma voltagem de corrente contínua e uma voltagem variável de radiofrequência aos pólos, os íons passam a oscilar nas direções x e y, de forma que apenas aqueles com uma determinada razão m/z seguem uma trajetória estável ao longo desse analisador, alcançando o detector. Os demais apresentam uma trajetória instável e, conseqüentemente, acabam sendo desviados ao colidir com os pólos, não atingindo, portanto, o detector (DAWSON, 1986).

Após estabelecerem-se as razões m/z e as intensidades para todos os picos do espectro, é possível obter informações sobre a estrutura primária (seqüência) desses peptídeos. Experimentos nesse sentido requerem equipamentos que associam dois tipos de analisadores de massa em série (MS/MS) (PAPAYANNOPOULOS, 1995). Nesses equipamentos, um filtro de massa seleciona o íon parental de interesse, o qual sofre fragmentação ao colidir-se com um gás inerte ou por meio de uma mudança abrupta de energia cinética do íon por meio de aceleração em um campo elétrico (SUCKAU et al., 2003). A seguir, o espectro de massa dos íons filhos resultantes é analisado por um segundo filtro.

O padrão de fragmentação depende de diferentes parâmetros como: composição de aminoácidos, tamanho do peptídeo, modo de ionização, escala de tempo do instrumento, estado de carga do íon, entre outros.

Sabe-se que, durante a ionização, os peptídeos em fase gasosa podem ser protonados em diferentes sítios, tais como: grupo amino terminal, oxigênios e nitrogênios do grupo amida, ou, ainda, grupos da cadeia lateral. A fragmentação da cadeia peptídica é dirigida pela protonação, que deve ocorrer no nitrogênio da ligação peptídica que será clivada, a qual ainda é assistida por um ataque nucleofílico conduzido por átomo de oxigênio, nitrogênio ou enxofre presente na cadeia (PAIZ & SUHAI, 2005; MEDZIHRADESKY & CHALKLET, 2014). Deste modo, ocorre uma quebra preferencial da própria ligação peptídica em relação às outras ligações da cadeia que, por sua vez, ocorrem com menor probabilidade. Devido a esta natureza probabilística dos sítios de fragmentação da cadeia peptídica, foi elaborada uma nomenclatura para classificar os diferentes fragmentos peptídicos que podem ser obtidos, de forma a auxiliar a interpretação dos espectros de MS/MS (ROEPSTORFF & FOHLMANN, 1984; BIEMANN, 1988) (Figura 7).



**Figura 7.** Nomenclatura proposta por ROEPSTORFF & FOHLMANN, 1984 e BIEMANN, 1988 para classificar os fragmentos obtidos de um determinado peptídeo (Fonte: STEEN & MANN, 2004).

De acordo com tal nomenclatura, os íons são sequencialmente classificados, a partir da extremidade amino terminal original do peptídeo, em: a<sub>m</sub>, quando a quebra ocorre nas ligações CH-CO da cadeia principal; b<sub>m</sub>, quando a quebra ocorre nas ligações CO-NH da cadeia principal; e, c<sub>m</sub>, quando a quebra ocorre nas ligações NH-CH da cadeia principal. Os íons podem, ainda, ser nomeados, em sequência, a partir da extremidade carbóxi-terminal original em: z<sub>(n-m)</sub>, y<sub>(n-m)</sub> e x<sub>(n-m)</sub>, sucessivamente, para clivagens das ligações CH-CO, CO-NH, NH-CH da cadeia principal, onde n representa o número total de resíduos no peptídeo, e m indica o número de resíduos correspondentes aos íons a, b ou c (ROEPSTORFF & FOHLMANN, 1984; BIEMANN, 1988; STEEN & MANN, 2004; CANTÚ et al., 2008).

Segundo o modelo de mobilidade do próton, que descreve o modo como os peptídeos protonados se dissociam após a excitação, as vias de menor energia são, geralmente, favorecidas. Por essa razão, a maior parte das fragmentações tende a ocorrer nas ligações amida, levando à formação de íons da série b, quando a carga é retida pelo fragmento amino-terminal, ou, aos íons da série y, quando o próton é retido pelo fragmento carbóxi-terminal. A partir da diferença de massa entre fragmentos sucessivos de íons de uma mesma série (por exemplo:  $b_n$  e  $b_{n-1}$  ou  $y_n$  e  $y_{n-1}$ ), os resíduos de aminoácidos podem ser determinados, fornecendo-se a sequência de um determinado peptídeo de interesse (ROEPSTORFF & FOHLMANN, 1984, PAIZ & SUHAI, 2005; STEEN & MANN, 2004; CANTÚ et al., 2008). Entretanto, a distinção entre leucina e isoleucina somente é possível em métodos que levem a clivagens específicas da cadeia lateral e a distinção entre glutamina e lisina depende da utilização de analisadores de massa de alta resolução.

Uma das subáreas da proteômica que tem-se desenvolvido bastante nos últimos anos, e gerado informações importantes no que se refere à caracterização de biomarcadores de doença, bem como de antígenos-alvo para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas, é a imunoproteômica (PEDERSEN et al., 2005; DENNEHY & McCLEAN, 2012; BISWAS et al., 2013). Essa área de pesquisa tem por objetivo mais específico detectar e identificar, em uma preparação proteica, as proteínas e os peptídeos imunoativos derivados de patógenos invasores, células hospedeiras ou moléculas de sinalização imune. A imunoproteômica utiliza muitas das técnicas que foram desenvolvidas para os estudos de proteômica (FALISSE-POIRRIER et al., 2006) e, dentre elas, nota-se que a 2DE associada ao *Western Blot* tem sido uma das estratégias utilizadas pela comunidade científica para separar e caracterizar os constituintes antigênicos de uma amostra de interesse (KLADÉ et al., 2002; FALISSE-POIRRIER et al., 2006; BISWAS et al., 2013). As moléculas reconhecidas por anticorpos presentes em um determinado soro constituem o principal foco de estudo da imunoproteômica, uma vez que eles podem sugerir os alvos da resposta imune. Uma das vantagens de trabalhar-se com esse tipo de material biológico está relacionada ao fato de os anticorpos serem moléculas altamente estáveis quando comparados às demais proteínas do soro. Além disso, graças à cascata de amplificação realizada pelo sistema imune humoral, um excesso de anticorpos circulantes geralmente é detectado após o aparecimento do antígeno correspondente, mesmo que este se apresente em baixa abundância (TJASMA et al., 2008).

No caso da malária, os primeiros estudos envolvendo proteômica datam de, aproximadamente, trinta anos atrás, quando proteínas de *P. falciparum* isoladas de indivíduo

infectado foram comparadas, pela primeira vez, por 2DE, antes e após o tratamento do paciente com mefloquina (PINSWASDI et al., 1987). Com o avanço das técnicas de espectrometria de massa, foi possível estudar o proteoma de *P. falciparum* em seus diferentes estágios de vida, utilizando-se tecnologias diversificadas (FLORENS et al., 2002; LASONDER et al., 2002). As modificações induzidas por essa espécie de parasito no proteoma do hospedeiro também já foram alvo de investigação. FONTAINE e colaboradores (2012), por exemplo, compararam o proteoma de membranas de hemácias não parasitadas ao de eritrócitos parasitados por duas cepas distintas de *P. falciparum*, e determinaram as alterações que ocorriam devido à infecção (FONTAINE et al., 2010; FONTAINE et al., 2012). Os perfis de carbonilação de proteínas de membrana de hemácias parasitadas e não parasitadas por essa mesma espécie de parasito também já foram avaliados, por meio de estudos protômicos do tipo redox, em eritrócitos obtidos de indivíduos de diferentes tipos sanguíneos (MÉNDEZ et al., 2012).

Outro material que tem sido bastante investigado é o soro humano de pacientes com malária, visto que as proteínas presentes nesse fluido biológico exibem uma alteração rápida no seu perfil de expressão em resposta à doença (RAY et al., 2012a; RAY et al., 2012b). Nesse sentido, já se investigaram as proteínas diferencialmente expressas no plasma e, também, no fluido cérebro-espinhal de crianças diagnosticadas com malária cerebral por *P. falciparum*, como tentativa de compreender melhor esse quadro clínico e, conseqüentemente, desenvolver métodos de diagnósticos mais específicos (GITAU et al., 2013). A reatividade dos soros obtidos de indivíduos com malária contra um extrato contendo proteínas totais de *P. falciparum* também já foi testada, a fim de identificar as principais proteínas imunogênicas desse parasito (COSTA et al., 2013).

Nota-se, assim, um grande avanço nos estudos de proteômica envolvendo *P. falciparum*. Porém, os estudos proteômicos avançaram menos para *P. vivax*, espécie para a qual esse conhecimento é limitado, uma vez que o cultivo desse parasito em laboratório é muito difícil (ACHARYA et al., 2011). Outras dificuldades encontradas ao estudar-se a proteômica em *P. vivax* estão relacionadas às baixas parasitemias (geralmente < 0,5%), uma vez que esses parasitos infectam apenas reticulócitos, que correspondem a 1-3% do total de hemácias e, também, devido à possibilidade de as proteínas abundantes do hospedeiro mascararem as do parasito. Mas, apesar de todos esses desafios, estudos recentes têm examinado o proteoma de parasitos isolados diretamente de pacientes com malária vivax (ROOBSOONG et al., 2011; ACHARYA et al., 2011), bem como o proteoma do soro de

indivíduos infectados por *P. vivax*, mostrando que existem nítidas diferenças na expressão de proteínas em relação à *P. falciparum* (RAY et al., 2012a, RAY et al., 2012b). Por essa razão, a biologia de *P. vivax* precisa ser mais estudada para que a comunidade científica possa explorar suas características únicas de forma mais eficiente.

Diante dessa escassez de ensaios proteômicos/imunoproteômicos que se observa na literatura para *P. vivax*, nota-se que estudos envolvendo pacientes com doença branda ou grave são extremamente necessários para entender-se melhor a dinâmica hospedeiro-parasito, o que irá facilitar a identificação de fatores moleculares importantes para as manifestações clínicas da malária e, ainda, direcionar as pesquisas para os quimioterápicos e estratégias de vacinação mais apropriadas (ACHARYA et al., 2011).

## 1.6. Microscopia de desfocalização

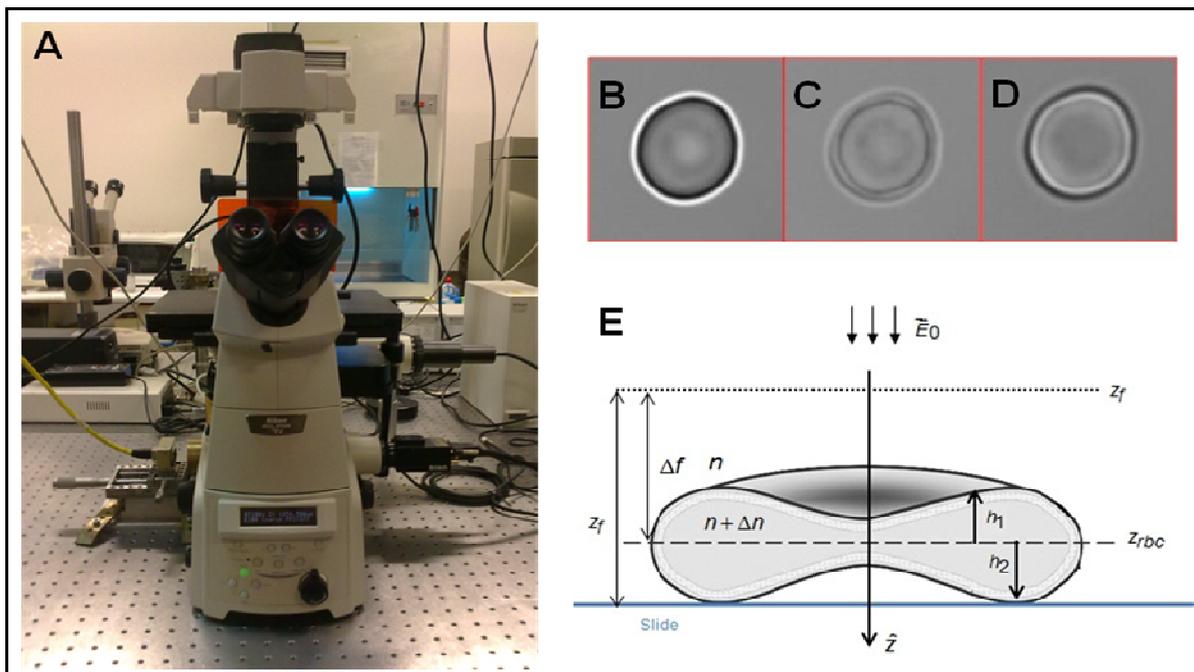
A Microscopia de Desfocalização (MD) é uma técnica de microscopia óptica que permite a observação de objetos de fase (objetos transparentes) através de um microscópio óptico operando em campo claro (Figura 8A). O ato de desfocalizar<sup>1</sup> introduz uma fase entre a luz difratada e a não difratada transmitida, de modo que, a partir da mensuração do contraste de intensidade das imagens em duas posições focais distintas (Figuras 8C, 8D, 8E), é possível obter informação da fase do campo elétrico óptico e reconstruir o perfil de altura do objeto de fase (Figura 8E). A partir dessa informação, outros parâmetros que também caracterizam a geometria e a mecânica do objeto de fase podem ser determinados tais como volume, área superficial, índice de refração e índice de esfericidade. A reconstrução tridimensional total do objeto e, ainda, as determinações de amplitudes médias das flutuações térmicas da membrana em altura ( $u_{rms}$ , em que *rms* significa *root mean square*) podem ser obtidas.

As hemácias são consideradas objetos de fase interessantes para a aplicação da MD pelo fato de serem desprovidas de núcleo e de organelas, e, ainda, por apresentarem um índice de refração com valor próximo ao da solução onde essas células estão imersas (solução fisiológica). Além disso, a MD apresenta uma série de vantagens: não é invasiva, não requer o uso de marcadores como agentes de contraste, é fácil de ser implantada e utilizada, já que

---

<sup>1</sup> A desfocalização pode ser feita movendo-se a objetiva, ou movendo-se a própria amostra, utilizando o nanodeslocador acoplado ao estágio do microscópio, ou movendo-se a câmera utilizando um micrômetro, acoplada a uma das saídas do microscópio.

requer um aparato experimental relativamente simples (um microscópio operando em campo claro, uma objetiva, um filtro vermelho e uma câmera monocromática) quando comparada a outras técnicas de microscopia óptica que necessitam de um aparato sofisticado e complexo, incluindo, por exemplo, o uso de lasers e outros componentes ópticos. Além disso, os métodos desenvolvidos para análise são de fácil manuseio experimental (ROMA et al., 2014) em relação a outros já descritos (KIM et al., 2014).



**Figura 8.** **A.** Foto do microscópio utilizado na técnica de microscopia de desfocalização. **B.** Imagem do contraste do objeto de fase acima do plano focal da objetiva ( $\Delta f = 2 \mu\text{m}$ ). **C.** Plano médio da célula ( $\Delta f = 0 \mu\text{m}$ ). **D.** Imagem do contraste do objeto de fase abaixo do plano focal da objetiva ( $\Delta f = -2 \mu\text{m}$ ). **E.** Representação de uma hemácia com o referencial entre o plano médio da célula e o plano focal da objetiva  $z_{rbc}$ ;  $h_1$  corresponde à distância entre  $z_{rbc}$  e a membrana superior, e  $h_2$  corresponde à distância entre  $z_{rbc}$  e a membrana inferior.  $\Delta f$ : distância entre o plano médio da célula e o plano focal da objetiva  $z_{rbc}$  (Fonte: Adaptado de ROMA, 2014).

Devido a essas vantagens, a MD tem sido utilizada, por exemplo para descrever as modificações que ocorrem na membrana da hemácia em condições normais e sob condições de estresse osmótico (LAPA, 2014), bem como para avaliar as mudanças na curvatura de fibroblastos devido ao sequestro de colesterol (HISSA et al., 2013).

Diante do exposto, nota-se que a MD é uma técnica interessante sob o ponto de vista biológico por permitir a caracterização de parâmetros morfológicos e elásticos de hemácias, propriedades essas que refletem a deformabilidade e interferem na função da célula. Portanto, a MD é ideal para avaliar o efeito da ligação de diferentes ligantes extracelulares, como os anticorpos, sobre a membrana da hemácia.

## 2. JUSTIFICATIVA

Embora a interação entre parasitos do gênero *Plasmodium* e o homem já seja conhecida há longa data, a malária continua sendo considerada um grave problema de saúde pelo fato de estar associada à elevada morbidade e mortalidade (MILLER et al., 2002). Estima-se que mais de três bilhões de pessoas (o que equivale à metade da população mundial) residem em áreas onde existe o risco de transmissão dessa doença, que é responsável por, aproximadamente, 219 milhões de casos clínicos e 660 mil mortes (WHO, 2013).

Dentre as cinco espécies de *Plasmodium* que são capazes de infectar humanos, *P. falciparum* é considerada a mais virulenta devido aos elevados níveis de mortalidade aos quais se encontra associada e, por essa razão, é a mais estudada. Embora a ênfase em *P. falciparum* seja apropriada, o fardo da malária vivax não pode ser desconsiderado, uma vez que *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo, e uma causa potencial de morbidade entre os 2,85 bilhões de pessoas que residem em áreas de risco (GUERRA et al., 2010).

No Brasil, *P. vivax* é a principal espécie associada à infecção, contribuindo com 86,8% dos casos registrados (Sivep-Malária/SVS/MS, 2013). Nos últimos anos, tem sido relatado um aumento significativo no número de internações hospitalares devido a essa espécie de parasito, sugerindo um aumento na gravidade das infecções (SANTOS-CIMINERA et al., 2007; ALEXANDRE et al., 2010). Somam-se a isso relatos de diferentes regiões do mundo mostrando que manifestações graves como malária cerebral, falência renal, síndrome respiratória e anemia grave, complicações estas anteriormente relatadas apenas em infecções por *P. falciparum*, também podem ocorrer durante a infecção por *P. vivax* (KOCHAR et al., 2005; ANSTEY et al., 2007; ANSTEY et al., 2009; KASLIWAL et al., 2009).

Dentre essas manifestações clínicas, a anemia é a principal causa de mortalidade em crianças e gestantes (MURPHY & BREMAN, 2001; TJITRA et al., 2008). Mas, apesar do seu enorme impacto na saúde pública, a anemia associada à malária, principalmente no que se concerne a *P. vivax*, tem sido alvo de poucos estudos quando comparada a outras áreas do conhecimento (CHANG et al., 2004). Por essa razão, a sua patogênese ainda é pouco compreendida.

Embora se aceite que a destruição de hemácias ocorra como uma consequência direta do desenvolvimento do parasito, esse mecanismo, por si só, não explica a anemia uma vez

que, em áreas endêmicas, o grau de anemia nem sempre se correlaciona às cargas parasitárias detectadas (DONDORP et al., 1999).

A anemia provocada por *P. vivax* mostra-se, de fato, um tema intrigante quando se observa, por exemplo, a proporção de hemácias destruídas em comparação ao número de células parasitadas. Estima-se que, para cada hemácia parasitada, aproximadamente 32 hemácias normais são destruídas em infecções por *P. vivax* (COLLINS et al., 2003). Embora poucos estudos tenham mensurado diretamente a sobrevivência de hemácias em humanos, a redução do tempo de vida de eritrócitos normais já foi demonstrada em pacientes com malária, corroborando tais estimativas (LOOAREESUWAN et al., 1987). Todas essas observações sugerem que a destruição de eritrócitos não infectados é o principal fator envolvido na anemia – contudo, os mecanismos moleculares e imunológicos envolvidos nessa remoção de células normais ainda não são conhecidos.

Nesse sentido, ensaios imunoproteômicos poderão fornecer informações importantes sobre a resposta imune de indivíduos com diferentes fenótipos clínicos de malária. Esses ensaios permitirão triar, isolar, identificar e caracterizar as proteínas de membrana de eritrócitos não infectados que constituem alvos da resposta imune. Essa estratégia, associada a ferramentas bioinformáticas e a técnicas de microscopia que permitem a análise de hemácias em tempo real, permitirão avaliar o papel de auto-anticorpos anti-hemácias na patologia da anemia por *P. vivax*, o que ainda é controverso. Os resultados provenientes desses estudos ampliarão a nossa compreensão sobre os mecanismos envolvidos na patogênese da anemia, podendo direcionar as pesquisas científicas para os quimioterápicos e estratégias de vacinação mais apropriadas.

### 3. OBJETIVOS

A hipótese avaliada neste estudo é a de que autoanticorpos anti-hemácia participam da destruição de hemácias normais, levando à anemia em infecções por *P. vivax*. Para testar essa hipótese, foram propostos diferentes objetivos.

#### 3.1. Objetivo geral

Investigar os alvos preferenciais e o papel dos autoanticorpos na destruição de hemácias normais e sua relação com a anemia em infecções por *P. vivax*.

#### 3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Comparar, por meio de imunoproteômica, o padrão de reconhecimento de proteínas de hemácias não infectadas pelos anticorpos presentes nos soros de quatro grupos distintos de indivíduos: (i) não infectados sem anemia, (ii) não infectados com anemia, (iii) infectados por *P. vivax* sem anemia e (iv) infectados por *P. vivax* com anemia;

3.2.2. Identificar, por meio de separação por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF e MALDI-TOF/TOF, as proteínas reconhecidas pelos soros dos diferentes grupos;

3.2.3. Identificar, por meio de um programa computacional de identificação de mimetismo, proteínas de *P. vivax* que apresentam similaridade de sequência com proteínas de hemácias humanas, e compará-las às sequências das proteínas identificadas na imunoproteômica;

3.2.4. Avaliar, por meio de microscopia de desfocalização, os efeitos de alguns dos anticorpos anti-hemácia diferencialmente reconhecidos na imunoproteômica sobre a morfologia e a mecânica da membrana de hemácias normais de indivíduo não infectado.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Área e população de estudo

Neste estudo, foram avaliados quatorze indivíduos com infecção patente por *P. vivax*, sendo seis deles do gênero feminino (42,9%) e oito do masculino (57,1%). A faixa etária do grupo oscilou entre 21 e 68 anos ( $40,6 \pm 15,2$  anos). Esses pacientes procuraram atendimento médico, no período compreendido entre os meses de fevereiro de 2006 a janeiro de 2008, no Hospital Universitário Júlio Muller, em Cuiabá (MT), onde não ocorre transmissão ativa de malária. Como esses pacientes relataram visitas de curta duração a outras áreas da Amazônia onde a malária é endêmica, existe a possibilidade de que eles tenham se infectado nesses locais.

Todos os pacientes foram examinados e entrevistados por um médico experiente, que aplicou um questionário padrão previamente testado e elaborado, contendo perguntas sobre dados pessoais, clínicos, parasitológicos e epidemiológicos (Anexo 1). Essa etapa do trabalho foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes (Universidade Federal do Mato Grosso).

Durante o atendimento médico, os pacientes infectados por *P. vivax* relataram diferentes manifestações clínicas. Dentre elas, as mais frequentes foram: febre (100%), calafrio (92,9%), cefaléia (92,9%), fraqueza (92,9%) e mialgia (92,9%), embora epigastralgia (85,7), náusea (71,4%), tonteira (71,4%) e vômito (64,4%) também tenham sido relatados (Tabela 1).

O diagnóstico de malária foi realizado por meio de exame microscópico de gota espessa e, ainda, por PCR (SKOPEL et al., 2004), que excluiu infecções simples provocadas por outras espécies de *Plasmodium*, bem como infecções mistas. Para a determinação da parasitemia (expressa como parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue), foram examinados cem campos microscópicos, com um aumento de 1000x (10x na lente ocular e 100x na lente objetiva) sob imersão em óleo.

O exame de gota espessa revelou que a mediana da densidade parasitária encontrada nessa população foi 4.176 (IQR: 1.260 – 7.900) parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue (Tabela 1).

**Tabela 1.** Manifestações clínicas e achados laboratoriais encontrados nos pacientes infectados por *P. vivax* incluídos neste estudo. IQR: intervalo interquartil.

<b>Características clínicas</b>	
<b>Sintomas (n = 14)</b>	<b>n (%)</b>
Calafrio	13 (92,9)
Cefaléia	13 (92,9)
Epigastralgia	12 (85,7)
Febre	14 (100,0)
Fraqueza	13 (92,9)
Mialgia	13 (92,9)
Náusea	10 (71,4)
Tonteira	10 (71,4)
Vômito	9 (64,3)
<b>Achado laboratorial</b>	<b>Mediana (IQR)</b>
Parasitemia (parasitos/ $\mu$ L sangue)	4.176 (1.260 – 7.900)
Hemoglobina (g/dL)	11,4 (10,6 – 13,4)
Hematócrito (%)	33,7 (31,9 – 39,3)
Plaquetas (células/ $\text{mm}^3$ de sangue)	74.000 (48.500 – 111.750)
Leucócitos (células/ $\text{mm}^3$ de sangue)	6.150 (5.275 – 6.850)

Antes de se iniciar o tratamento anti-malárico, o sangue desses pacientes foi colhido, por punção venosa, em tubos Vacutainer contendo EDTA ou heparina, e utilizado para os hemogramas, e para a realização de outros exames laboratoriais de rotina, baseados em *kits* comerciais para teste rápido, de forma a excluir infecções como hepatite e HIV. O sangue foi também utilizado para a obtenção dos soros, que foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios de imunoproteômica.

A avaliação dos hemogramas mostrou que, quanto à dosagem de hemoglobina, os pacientes em questão apresentaram, em mediana, 11,4 (IQR: 10,6 – 13,4) g/dL e, em relação ao hematócrito, 33,7 (IQR: 31,9 – 39,3) %. No que se refere à contagem de plaquetas e de leucócitos, verificou-se que essa população apresentou, em mediana, respectivamente, 74.000 (IQR: 48.500 – 111.750) plaquetas/ $\text{mm}^3$  de sangue e 6.150 (IQR: 5.275 – 6.850) leucócitos/ $\text{mm}^3$  de sangue (Tabela 1).

Todos os pacientes que participaram deste estudo assinaram o termo de consentimento, norma do Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e todos foram tratados conforme as recomendações preconizadas pelo Ministério da Saúde no Manual de Terapêutica da Malária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

#### **4.2. Estratificação dos indivíduos para o preparo dos *pools* de soros**

Para o preparo dos *pools* de soros, os quatorze indivíduos incluídos neste estudo foram divididos em dois diferentes grupos, levando-se em consideração a ausência/presença de anemia. É importante destacar que, embora a Organização Mundial da Saúde defina a anemia como níveis de hemoglobina inferiores a 13 g/dL para o sexo masculino e inferiores a 12 g/dL para o sexo feminino, esse critério não foi utilizado neste estudo. Isso porque, em reuniões de pesquisa da área, diferentes malariologistas (comunicação pessoal) sugeriram definir a anemia como a presença de níveis de hemoglobina iguais ou inferiores a 11 g/dL, para ambos os sexos, para aumentar o rigor do estudo. Além disso, para este estudo, a anemia também foi classificada em relação ao Volume Corpuscular Médio (VCM) em: microcítica (VCM < 80 fl), normocítica ( $80 \leq \text{VCM} \leq 96$  fl) ou macrocítica (VCM > 96 fl); e, ainda, em relação à concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), em: hipocrômica (HCM < 32 g/dL), normocrômica ( $32 \leq \text{HCM} \leq 36$  g/dL) ou hiperocrômica (HCM > 36 g/dL).

Com base nesses parâmetros, os quatorze indivíduos infectados foram divididos em dois grupos: sete indivíduos com infecção patente por *P. vivax* não anêmicos (PvNA) e sete indivíduos com infecção patente por *P. vivax* anêmicos (PvAN) (Tabela 2).

Como controles, foram incluídos dois grupos: (i) não infectado não anêmico (NINA), constituído por indivíduos que apresentavam todos os parâmetros hematológicos dentro dos valores de referência; e (ii) não infectado com anemia (NIAN), constituído por indivíduos que apresentaram anemia normocítica e normocrômica após a perda de sangue em cirurgias realizadas por diferentes razões. É importante mencionar que os indivíduos incluídos em ambos os grupos residiam em Belo Horizonte, Minas Gerais, área não endêmica para a malária no Brasil.

Todos os indivíduos anêmicos incluídos neste estudo apresentaram parâmetros como Volume Corpuscular Médio e Hemoglobina Corpuscular Média dentro dos índices de

normalidade, e, por essa razão, a anemia observada nesses indivíduos foi classificada como normocítica e normocrômica, estratégia esta utilizada para representar melhor o tipo de anemia característico da malária.

Após a categorização dos indivíduos, foram preparados quatro *pools* de soros correspondendo aos grupos mencionados acima, os quais foram aliquotados e estocados em *freezer* -20°C até a realização dos experimentos de imunoproteômica.

**Tabela 2.** Comparação entre os grupos de indivíduos infectados anêmicos (PvAN) e não anêmicos (PvNA) antes do tratamento com anti-malárico. Todos os indivíduos infectados anêmicos utilizados neste estudo apresentavam anemia normocítica e normocrômica. Os valores apresentados para cada parâmetro representam a mediana e o intervalo interquartil. <sup>a</sup> valor de  $P = 0,0006$  e <sup>b</sup> valor de  $P = 0,0023$ .

Característica	PvAN (Hb ≤ 11 g/dl)	PvNA (Hb > 11 g/dl)
Idade (anos)	31 (27 – 58)	44 (25 – 50)
Número de episódios prévios de malária	0 (0 – 2)	1 (1 – 5)
Parasitemia (parasitos/μL de sangue)	4.941 (800 – 8.740)	3.410 (1.346 – 7.620)
Hemoglobina <sup>a</sup> (g/dL)	10,6 (10,2 – 10,8)	13,3 (12,9 – 14,7)
Hematócrito <sup>b</sup> (%)	32,0 (30,7 – 33,6)	39,0 (36,0 – 45,0)
Plaquetas (células/mm <sup>3</sup> de sangue)	107.000 (49.000 – 138.000)	72.000 (47.000 – 95.000)
Leucócitos (células/mm <sup>3</sup> de sangue)	6.700 (4.600 – 7.000)	5.900 (5.500 – 6.300)

#### 4.3. Preparo do extrato de proteínas de membrana de hemácias humanas O<sup>+</sup> não infectadas

O extrato de proteínas de membrana de hemácias foi preparado a partir do sangue (aproximadamente 120 mL) obtido de um indivíduo não infectado, do tipo sanguíneo O<sup>+</sup>, do sexo feminino, com 30 anos de idade, residente em Belo Horizonte, Minas Gerais, área considerada não endêmica para a malária no Brasil. O exame hematológico realizado com o sangue desse indivíduo indicou que todos os parâmetros avaliados: hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), *red cell distribution width*

(RDW), reticulócitos, ferro, ferro sérico, capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), capacidade total de ligação do ferro (CTLF), índice de saturação da transferrina (IST), ferritina, vitamina B12, ácido fólico, leucócitos e plaquetas, apresentaram-se dentro dos valores de referência (Tabela 3). A eletroforese de hemoglobina, por sua vez, permitiu excluir possíveis hemoglobinopatias e talassemias. Com essas estratégias, excluímos a possibilidade de esse indivíduo portar algum tipo de anemia.

**Tabela 3.** Dados hematológicos do indivíduo doador de hemácias não infectadas.

<b>Hemograma (Valores de referência)</b>	
Hemácias (4,00 a 5,30 milhões/mm <sup>3</sup> )	4.600.000/mm <sup>3</sup>
Hemoglobina (11,0 a 16,0 g/dL)	14,6 g/dl
Hematócrito (36,0 a 46,0%)	43,4%
Volume Corpuscular Médio (VCM) (80 a 96 fl)	94,3 fl
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) (27,0 a 34,0 pg)	31,8 pg
Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (32 a 36 g/dL)	33,7 g/dl
<i>Red Cell Distribution Width</i> (RDW) (11,3 a 15,3%)	12,0%
Reticulócitos (25.000 a 75.000/ mm <sup>3</sup> )	45.000/mm <sup>3</sup>
Ferro (40 a 150 mcg/dL)	139 mcg/dL
Ferro sérico (40 a 150 mcg/dL)	130 mcg/dL
Capacidade latente de ligação do ferro (CLLF) (140 a 280 mcg/dL)	278 mcg/dL
Capacidade total de ligação de ferro (CTLF) (250 a 410 mcg/dL)	408 mcg/dL
Índice de saturação da transferrina (IST) (20 a 50%)	31,9 %
Ferritina (13,0 a 150,0 ng/mm <sup>3</sup> )	14,3 ng/mL
Vitamina B12 (211 a 946 pg/mL)	228 pg/mL
Ácido fólico (4,8 a 37,3 ng/mL)	10,31 ng/mL
Leucócitos (3.800 a 10.000/ mm <sup>3</sup> )	8.100/mm <sup>3</sup>
Plaquetas (150.000 a 450.000/mm <sup>3</sup> )	227.000/mm <sup>3</sup>
Hemoglobina A1 (95,0 a 98,2%)	96,4 %
Hemoglobina A2 (1,8 a 3,5%)	2,8 %
Hemoglobina F (até 2,0%)	0,8 %

Como as proteínas presentes no plasma representam os principais contaminantes nas análises de proteômica de hemácias (PASINI et al., 2010), o sangue colhido foi, inicialmente,

submetido a uma centrifugação em gradiente de densidade que permitiu a remoção desse fluido biológico e, também, a remoção de outros componentes celulares que poderiam interferir neste estudo. Para isso, um volume correspondente a 15 mL de sangue total foi adicionado, vagarosamente, a um tubo de polipropileno (Falcon 2074, BD Biosciences, EUA) contendo 10 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, EUA), e centrifugado a 400 g (1.200 rpm), por 40 minutos, a 18°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido, e cerca de três mililitros do precipitado de hemácias foram transferidos para um tubo de centrífuga (R20A2 *Centrifuge Ware Hitachi Koki*), ao qual foram adicionados 30 mL de solução de lise hipotônica gelada (tampão Tris-HCl a 5 mmol/L, pH 7,2, 0,1 mmol/L EDTA) com 10 µL/mL de coquetel de inibidores de peptidases (GE, Healthcare, Upsala, Sweden), homogeneizando-se em seguida. Para a sedimentação das membranas, os tubos foram centrifugados a 15.000 rpm, durante 45 minutos a 4°C. O sobrenadante de cada tubo foi removido e adicionaram-se mais 30 mL de solução de lise ao material sedimentado. Essa etapa foi realizada várias vezes até o sobrenadante perder a cor e o precipitado ficar claro, de forma a garantir-se a total remoção da hemoglobina (PEKER et al., 2011). O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se, ao precipitado, trinta mililitros de meio RPMI 1640, tampão HEPES 25 mmol/L pH 7,4 (GibcoBRL, Carlsbad, CA, EUA), homogeneizando-se em seguida. Os tubos foram submetidos a uma outra etapa de centrifugação, a 15.000 rpm, por 45 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi coletado, de cada tubo, e transferido para um tubo único, obtendo-se um volume final de extrato correspondente a 30 mL. Esse tubo contendo os 30 mL de extrato foi, então, centrifugado, a 15.000 rpm, durante 45 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi transferido para um tubo de polipropileno (Falcon 2074, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e incubado, *overnight*, a -20°C. No dia seguinte, o extrato foi submetido à liofilização. Após esse procedimento, o extrato foi ressuscitado em 5 mL de tampão de lise para eletroforese bidimensional (ureia 8 mol/L, tiourea 2 mol/L, Tris 30 mmol/L, CHAPS 4% p/v, DTT 65 mmol/L). O extrato foi, então, incubado, sob agitação, à temperatura ambiente, durante aproximadamente 3 horas, para que ocorresse a solubilização das proteínas. Após esse intervalo de tempo, o extrato foi submetido ao 2-D *Clean-Up Kit* (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, EUA), seguindo-se as recomendações sugeridas pelo fabricante e utilizando-se microtubos de máxima recuperação de 1,7 mL (*Axygen MaxyClear Microcentrifuge Tubes*, Axigen, Union City, CA, EUA). O uso desse kit permitiu concentrar as proteínas e remover as substâncias indesejadas como detergentes, sais, lipídeos, fenóis e ácidos nucleicos, as quais poderiam interferir, de forma negativa, na eletroforese bidimensional. Para isso, as proteínas

foram precipitadas por meio de centrifugação e, o precipitado foi lavado para remover os contaminantes não proteicos. Após uma segunda centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em 5 mL de tampão de lise para a eletroforese bidimensional (ureia 8 mol/L, tiourea 2 mol/L, Tris 30 mmol/L, CHAPS 4% p/v, DTT 65 mmol/L), aliquotado e estocado a -20 °C até a realização dos ensaios de imunoproteômica.

#### 4.4. Determinação da concentração de proteínas no extrato de hemácias

A concentração de proteínas presente no extrato de membrana de hemácias foi determinada utilizando-se o método desenvolvido por Bradford (1976), com algumas modificações. A curva de calibração foi construída com soroalbumina bovina [BSA – *bovine serum albumin*] (Sigma, St Louis, EUA), utilizando-se duplicatas de diferentes concentrações: 0,2 µg/µL; 0,4 µg/µL; 0,8 µg/µL; 1,0 µg/µL e 1,5 µg/µL de BSA. Para o preparo do reagente de Bradford, foram dissolvidos 20 mg de Coomassie G-250 em 10 mL de etanol absoluto e, em seguida, adicionaram-se 20 mL de ácido ortofosfórico 85 %, e água MilliQ™ para um volume final de 200 mL. A solução foi, então, filtrada em filtro de papel e estocada em frasco âmbar na geladeira.

Para a dosagem, foram adicionados a um tubo de 5 mL, 80 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ™, 10 µL de HCl 0,1 mol/L, 3,4 mL do reagente de Bradford diluído 1:4 em água, e, 10 µL da amostra ou do padrão de dosagem. Duzentos microlitros de cada reação foram transferidos para uma microplaca, que foi incubada, à temperatura ambiente, por cinco minutos. Os valores de densidade óptica (DO), a 595 nm, da amostra testada, foram obtidos em um leitor de microplaca automático (SpectraMax 240 PC, *Molecular Devices*) e comparados aos da curva de calibração.

A fim de garantir-se a confiabilidade da dosagem de proteínas, utilizou-se, ainda, o *2-D Quant Kit* (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, EUA), seguindo-se as recomendações sugeridas pelo fabricante.

#### **4.5. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 1D)**

Após a dosagem de proteínas totais, quantidades diferentes do extrato (10 µg, 20 µg, 40 µg e 60 µg) foram aplicadas em um gel de poliacrilamida e submetidas à separação eletroforética unidimensional para avaliar a qualidade do extrato obtido. Primeiramente, foi preparado o gel de separação a 12%, contendo: tampão Tris-HCl a 1,5 mol/L (pH 8,8); SDS a 10% em massa; acrilamida-bisacrilamida na proporção 30%/0,8% em massa; N, N, N, N,-tetrametilenodiamina (TEMED); e persulfato de amônia (APS) 10%. O gel de empilhamento a 4% foi preparado utilizando-se Tris-HCl a 0,5 mol/L (pH 6,8), acrilamida-bisacrilamida na proporção 30%/0,8% em massa, SDS 10% em massa, APS 10 % e TEMED. Paralelamente à aplicação da amostra, e a fim de fazer a inferência das massas moleculares relativas às bandas presentes no extrato em questão, aplicaram-se, ainda, 10 µL do padrão de massa molecular *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega, Madison, WI, EUA). O sistema utilizado para a eletroforese foi o Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A migração das proteínas foi realizada em tampão Laemmli (Tris Base 25 mmol/L, glicina 192 mmol/L e SDS 0,1%), a 50 V, durante os primeiros 30 minutos, e a 100V, até o corante azul de bromofenol atingir a porção inferior do gel, ponto estabelecido como o final da corrida.

#### **4.6. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 2-D)**

A partir do momento em que se constatou a qualidade do extrato obtido, as proteínas de membrana de hemácias humanas sadias O<sup>+</sup> foram separadas por eletroforese bidimensional (2DE). Conforme comentado em outra seção, nesse tipo de eletroforese, as proteínas são separadas considerando-se dois diferentes parâmetros. Na primeira dimensão, a separação ocorre em função do ponto isoelétrico, ao passo que, na segunda dimensão, a migração está relacionada à massa molecular da proteína.

#### 4.6.1. Primeira dimensão: focalização isoeétrica

A primeira dimensão, a focalização isoeétrica [IEF – *isoelectric focusing*] das proteínas, foi realizada em fitas com gradiente de pH imobilizado [IPG – *Immobilized pH gradient*] (*ReadyStrip™ IPG strips*, BioRad, Hercules, CA, EUA). Para a padronização dessa etapa, utilizaram-se, inicialmente, fitas de IPG de 7 cm, com faixa de pH 3-10 não linear. Porém, conforme será apresentado posteriormente, constatou-se que essa faixa não permitiu uma boa separação das proteínas, e, por essa razão, optou-se pelo uso de fitas de IPG de 7 cm com faixa de pH 4-7.

Para a focalização isoeétrica, 100 µg do extrato de proteínas de membrana de hemácias humanas não infectadas O<sup>+</sup> foram diluídos em solução de reidratação (ureia 8 mol/L, tiourea 2 mol/L, CHAPS 4% em massa, azul de bromofenol 0,0025 % em massa, DTT a 65 mmol/L e anfólitos *Bio-Lyte 3-10 buffer* BioRad 1X) para um volume final equivalente a 125 µL. Em seguida, essas amostras foram incubadas, sob agitação, em vórtex *Genie 2*, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação, a amostra foi centrifugada, a 16.000 g, durante 30 minutos, a 22 °C, para permitir a sedimentação dos componentes não solubilizados. O sobrenadante obtido de cada tubo foi, então, aplicado em uma canaleta da bandeja de focalização. Em seguida, as fitas de IPG foram acondicionadas, após a cuidadosa remoção do plástico que as protege, em cada uma dessas canaletas, com o lado contendo o gel posicionado para baixo, em contato direto com a amostra anteriormente adicionada e também com os eletrodos da placa.

Durante esse procedimento, tomou-se cuidado para evitar a introdução ou formação de bolhas de ar, uma vez que elas interferem na migração das proteínas. As fitas de IPG foram mantidas em repouso durante dez minutos para permitir a sua hidratação. Após esse período, 750 µL de óleo mineral (*Mineral Oil Biotechnology Grade*, BioRad, Hercules, CA, EUA) foram gotejados, em cada uma das fitas de IPG, para evitar a evaporação de solventes da amostra, bem como o seu superaquecimento durante a eletrofocalização. A eletrofocalização foi realizada no equipamento *Protean® IEF Cell* (BioRad, Hercules, CA, EUA), sendo as condições de temperatura e amperagem estabelecidas em, respectivamente, 20°C e 50 µA/fita de IPG. A separação das proteínas, na primeira dimensão, iniciou-se pela reidratação passiva das fitas de IPG. Essa etapa durou quatro horas e foi realizada para melhorar a entrada das proteínas de alto peso molecular nas fitas de IPG. A etapa seguinte, a reidratação ativa, foi

realizada a 50 V, por 12 horas. A aplicação de uma baixa voltagem nessa etapa inicial teve como objetivo remover os íons de sal e os outros contaminantes carregados que poderiam estar presentes na amostra. A focalização isoeletrica, por sua vez, consistiu nos seguintes passos: 500 V por 30 minutos, 1.000 V por 30 minutos, 4.000 V por uma hora e 4.000 V até acumular 16.000 V/hora. Uma etapa final, a 50 V, foi utilizada, até a corrida ser parada, a fim de se prevenir a difusão das proteínas focalizadas e, também, para evitar a deposição de artefatos sobre as fitas de IPG. Todas essas etapas estão apresentadas, de forma sintética, na Tabela 4. Após o término da focalização isoeletrica, retirou-se o excesso de óleo das fitas de IPG, e estas foram transferidas para outra bandeja, onde foram congeladas, a  $-70^{\circ}\text{C}$ , até a posterior análise por SDS-PAGE.

**Tabela 4.** Parâmetros utilizados na focalização isoeletrica das proteínas de membrana de hemácias humanas sadias  $\text{O}^+$ , realizada no equipamento Protean<sup>®</sup> IEF Cell (BioRad).

Passos	Voltagem (V)	Tempo (h) ou V/hora	Rampa de voltagem	Temperatura
Reidratação passiva	-	4 horas	-	20°C
1	50V	12 horas	Rápida	
2	500V	30 minutos	Rápida	
3	1000V	30 minutos	Rápida	
4	4000V	1 hora	Linear	
5	4000V	16000 V/hora	Rápida	
6	50V	24 horas	Rápida	

#### 4.6.2. Segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Após a focalização isoeletrica, as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), com o objetivo de separá-las em função de suas massas moleculares. Inicialmente, adicionaram-se, a cada uma das fitas de IPG, 2,5 mL de solução de equilíbrio (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,8, ureia 6 mol/L, SDS 2% p/v, glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0,001% p/v), à qual foi acrescentado, no momento do uso, 2% p/v de ditioneitol (DTT). As fitas de IPG foram mantidas nessa solução por 10 minutos, sob agitação lenta, e à temperatura ambiente, para permitir a redução das pontes

dissulfeto presentes nas proteínas. Transcorridos os dez minutos, a solução de equilíbrio contendo DTT foi substituída pela solução de equilíbrio contendo 2,5% p/v de iodoacetamida, e outra incubação, por 10 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação lenta, foi realizada, a fim de se alquilar os grupos SH presentes nas proteínas.

A realização dessas duas etapas (etapas de equilíbrio) é de extrema importância, pois além de elas contribuírem para o aumento da eficiência da digestão pela tripsina, procedimento este que será apresentado em breve, elas favorecem uma maior cobertura da sequência da proteína e, ainda, garantem a identificação de proteínas que possuem muitas pontes dissulfeto em sua estrutura, evitando-se, ainda, a formação de adutos de cisteína com acrilamida ou com oligômeros de acrilamida (GRANVOGL et al., 2007).

Paralelamente à realização da etapa de equilíbrio, um volume de 10  $\mu$ L do padrão de massa molecular conhecida – *BenchMark™ Prestained Protein Ladder* (Invitrogen™ - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (6 – 180 kDa) – foi aplicado em um pedaço de papel filtro de aproximadamente 5 mm de largura. O papel filtro embebido no padrão foi, então, posicionado sobre a extremidade superior esquerda do gel de poliacrilamida 12% e, em seguida, selado com solução de agarose 0,5% diluída em tampão Laemmli (Tris base a 25 mmol/L, glicina a 192 mmol/L e SDS a 0,1%, p/v) e contendo 0,003%, p/v, de azul de bromofenol. Depois, as fitas de IPG foram lavadas em tampão Laemmli (Tris-base a 25 mmol/L, glicina a 192 mmol/L e SDS a 0,1%, p/v) para remover os resquícios das soluções de equilíbrio utilizadas anteriormente e tiveram as suas extremidades cortadas (partes que não continham gel) para facilitar o seu perfeito posicionamento na parte superior do gel de poliacrilamida 12%. Cabe, aqui, destacar que a acomodação das fitas de IPG sobre o gel foi realizada de forma que a face da fita que contém as proteínas focalizadas ficasse voltada para a parte da frente do aparato de eletroforese. E, assim como o padrão de massa molecular, as fitas de IPG também foram seladas com solução de agarose 0,5%, p/v, diluída em tampão Laemmli (Tris base a 25 mmol/L, glicina a 192 mmol/L e SDS a 0,1%, p/v) contendo 0,003% de azul de bromofenol, componente essencial para acompanhar-se a migração das proteínas durante a eletroforese. A migração das proteínas foi realizada em um sistema do tipo Mini-Protean II (BioRad, Hercules, CA, EUA), a 50 V, durante os primeiros 30 minutos, e a 100 V, até o final da corrida, que foi definido como o ponto inferior do gel atingido pelo corante.

É importante destacar que, para avaliar o perfil de reconhecimento das proteínas de membrana de hemácias não infectadas por anticorpos IgG obtidos dos diferentes grupos incluídos no presente estudo, na etapa seguinte, foram preparados dois géis-2D para cada

gupo de paciente testado. Um dos géis foi utilizado para a transferência das proteínas para uma membrana de PVDF e posterior ensaio de *western blot*. O outro gel foi corado por azul de Coomassie coloidal e, dele, excisaram-se os *spots* que apresentaram reatividade no *western blot*. Logo após a coloração, esse gel foi escaneado, utilizando-se o densitômetro GS-800 (BioRad, Hercules, CA, EUA) e mantido em solução de sulfato de amônio a 25% p/v, a 4°C, até a excisão dos *spots*.

## 4.7. Coloração dos géis

### 4.7.1. Coloração dos géis por prata

Para a coloração por impregnação de prata, os géis foram, primeiramente, fixados, em uma solução aquosa contendo 40% de etanol e 10% ácido acético, durante 30 minutos. Essa etapa foi repetida mais duas vezes. A seguir, os géis foram lavados em uma solução aquosa de etanol a 20% em volume, durante 10 minutos, e, posteriormente, em H<sub>2</sub>O MilliQ™, por um período de tempo semelhante. Em seguida, os géis foram incubados em solução de ditionito de sódio a 0,3 g/L por um minuto, seguido de duas lavagens, de um minuto cada, em H<sub>2</sub>O MilliQ™. Após essa etapa, os géis foram incubados em uma solução de nitrato de prata 2 g/L, durante 40 minutos, acompanhada por uma lavagem de 10-20 segundos com H<sub>2</sub>O MilliQ™. Para a revelação, utilizou-se uma solução contendo carbonato de potássio 30 g/L, formaldeído 250 µL/L e tiosulfato de sódio 10 mg/L, na qual os géis foram incubados até o aparecimento das bandas/*spots*. Essa reação foi bloqueada, utilizando-se uma solução contendo 40 g/L de Tris-base e ácido acético a 2% p/v por trinta minutos. Ao final do bloqueio, os géis foram escaneados em um densitômetro de alta resolução do tipo GS-800 *Imaging Densitometer* (Bio-Rad) e, em seguida, incubados em 20% de etanol e estocados a 4°C.

### 4.7.2. Coloração dos géis por azul de coomassie coloidal G-250

Como alguns dos géis preparados neste estudo seriam utilizados para a excisão de proteínas e a posterior identificação dessas moléculas por espectrometria de massa após a digestão com tripsina, optou-se pelo protocolo de coloração por azul de coomassie coloidal/G-

250, que é compatível com tal técnica. Para isso, inicialmente, adicionaram-se ao gel 200 mL de uma solução contendo ácido ortofosfórico 2% (v/v) e etanol 30% (v/v), a qual foi mantida, sob agitação, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Essa etapa foi repetida duas vezes. Após esse intervalo de tempo, a solução foi descartada, e, em seguida, adicionaram-se 200 mL de ácido ortofosfórico 2% (v/v), por 10 minutos. Esse passo foi repetido duas vezes. A seguir, a solução de ácido ortofosfórico foi removida, e adicionaram-se 200 mL de uma solução contendo ácido ortofosfórico 2% (v/v), etanol 18% (v/v) e sulfato de amônio 15% (p/v), por 30 minutos. Após esse período de tempo, foram adicionados a essa solução 2 mL de uma solução estoque de azul de coomassie coloidal (G-250) 2% p/v em H<sub>2</sub>O MilliQ. O gel foi, então, mantido nessa solução por 72 horas, sob leve agitação, e no escuro. Ao final desse período, o excesso de coomassie coloidal foi removido, utilizando-se solução aquosa de etanol 20% por, no máximo, cinco minutos, e o gel corado foi escaneado em um densitômetro de alta resolução do tipo GS-800 *Imaging Densitometer* (Bio-Rad) e, em seguida, estocado em uma solução de sulfato de amônio a 25% (p/v), a 4°C.

#### 4.8. Western Blot Bidimensional

Após o SDS-PAGE 2DE, os géis foram transferidos para uma membrana de PVDF (*Immun-Blot<sup>TM</sup> PVDF Membrane for Protein Blotting*, 0,2 µm, BioRad), em tampão de transferência (Tris base 25 mmol/L, glicina 0,2 mol/L, metanol 20% v/v, pH 8,5), por duas horas, a 100 V, no sistema *Protean Blotting* (BioRad, Hercules, CA, EUA), que foi acondicionado em uma caixa de isopor contendo gelo. Ao final dessa etapa, as membranas foram lavadas em 100 mL de tampão tris-salina (Tris base 20 mmol/L, NaCl 140 mmol/L, pH 7,6), durante cinco minutos, sob agitação, e à temperatura ambiente. Ao final dos cinco minutos, as membranas foram bloqueadas, por duas horas, à temperatura ambiente, sob agitação, em tampão tris-salina contendo 0,1% (v/v) Tween (TBS/T) e 5% (p/v) de leite em pó desnatado Molico (Nestlé, Brasil). Em seguida, as membranas foram lavadas, quatro vezes, com TBS-T. Cada lavagem durou cinco minutos e foi realizada, sob agitação, em temperatura ambiente. As membranas foram, então, incubadas com os diferentes *pools* de soros humanos (NINA, NINA, PvNA e PvAN), diluídos 1:200 em TBST contendo 1% (p/v) de BSA. Essa etapa foi realizada, *overnight*, a 4°C, sob agitação. No dia seguinte, as membranas foram submetidas a outro ciclo de quatro lavagens, nas condições mencionadas acima, e incubadas,

por 90 minutos, à temperatura ambiente, e sob agitação, com o anticorpo secundário, anti-IgG humano conjugado à peroxidase (Sigma, St Louis, MO, EUA), diluído 1:6.000, em TBS/T contendo 1% (p/v) de BSA. Transcorrido esse tempo, um novo ciclo de quatro lavagens foi realizado, e, a seguir, as membranas foram colocadas dentro de um plástico transparente e reveladas. A revelação das membranas foi feita utilizando-se 2 mL de *Immobilon<sup>TM</sup> Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore-Merck, Bilerica, MA, EUA). Imediatamente após a revelação, as membranas, protegidas da luz, foram transferidas para o equipamento capaz de capturar quimiluminescência *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, EUA).

#### 4.9. Análise das imagens

Para a análise das imagens dos géis, bem como das membranas, contamos com a colaboração da Prof. Dra. Héli da Monteiro de Andrade, do Laboratório de Leishmanioses, do ICB/UFMG.

Primeiramente, as imagens digitalizadas dos géis e das membranas foram importadas via *software ImageMaster 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, EUA), no formato .png. A primeira parte da análise consistiu na detecção dos *spots*. Essa etapa incluiu a seleção de três parâmetros: suavidade (*smooth*), área mínima (*min area*) e saliência (*saliency*). A suavidade remove o ruído, preservando o contorno e os pequenos detalhes da imagem; a área mínima elimina os *spots* que têm uma área menor que a especificada pelo limite de corte; a saliência, por sua vez, é uma medida baseada na curvatura do *spot* e está relacionada à sua altura. É importante enfatizar que, para homogeneizar essa detecção, utilizamos sempre os mesmos parâmetros para todos os géis e todas as membranas: suavidade 2, área mínima 5 e saliência 100.000. Após essa etapa, realizamos uma revisão e uma edição manual minuciosa para remover os artefatos. Partimos, a seguir, para o pareamento, que consistiu na sobreposição virtual dos géis/géis, géis/membranas e membranas/membranas, uns em relação aos outros. Dessa maneira, os *spots* que apresentam as mesmas coordenadas x e y foram considerados os mesmos.

#### 4.10. Excisão dos *spots* e digestão tripsínica das proteínas

Os *spots* pareados foram, então, selecionados para a excisão e a posterior identificação por espectrometria de massa (*Mass Spectrometry* – MS).

Para a excisão dos *spots*, os géis foram colocados sobre placas de vidro com iluminação adequada. Com o auxílio de ponteiros estéreis, os *spots* de interesse foram localizados, excisados do gel, e transferidos para microtubos de máxima recuperação de 0,6 mL (*Axygen MaxyClear Microcentrifuge Tubes*, Union City, CA, EUA), pré-lavados com metanol – água MilliQ™ – metanol. Na sequência, os *spots* excisados foram descorados, por um ciclo constituído por três lavagens, em 400 µL de uma solução contendo acetonitrila (ACN) (50% v/v) e bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 25 mmol/L, pH 8,0, durante 15 minutos, sob agitação vigorosa e em temperatura ambiente. A seguir, os *spots* foram desidratados em 200 µL de acetonitrila (ACN) pura, durante cinco minutos (tempo necessário para que eles adquirissem um aspecto opaco e esbranquiçado), à temperatura ambiente, e colocados em um sistema de centrifugação à pressão reduzida (*SpeedVac*), por 15 minutos, para secarem completamente. Aos *spots* secos, foram adicionados 10 µL de solução de tripsina (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade*, Promega, Madison, WI, EUA). Para isso, a tripsina foi ressuspensa em solução aquosa de ácido acético 50 mmol/L para uma concentração de 1 µg/µL. Em seguida, essa solução de tripsina foi diluída para uma concentração final de uso de 20 µg/mL em solução 40 mmol/L de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> e 10 % (v/v) de acetonitrila. Os tubos foram, então, incubados no gelo, por dez minutos, período após o qual se adicionou, a cada um deles, um volume correspondente a 20 µL de uma solução contendo ACN (10% v/v) e NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 40 mmol/L, pH 8,0. A digestão tripsínica foi realizada em estufa, a 37°C, *overnight* (17 horas). No dia seguinte, as amostras foram submetidas a um breve *spin* (13.000 rpm, 30 segundos), após o qual, o sobrenadante (os 30 µL de solução contendo tripsina) foi removido e transferido para um microtubo novo (de 0,6 mL e máxima recuperação), pré-lavado em metanol – água MilliQ™ – metanol, utilizando-se ponteiros de máxima recuperação (*Axygen*, Union City, CA, EUA). Para a extração dos peptídeos, acrescentaram-se, ao gel restante no tubo, 30 µL de uma solução contendo ácido fórmico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (5% v/v) e ACN (50% v/v). Essas amostras foram incubadas, à temperatura ambiente, sob agitação constante, por 30 minutos. Finalizado esse tempo, os tubos foram submetidos a um outro *spin* (13000 rpm, 30 segundos), e o sobrenadante, contendo os peptídeos extraídos, foi removido e transferido para o tubo contendo os 30 µL colhidos

anteriormente. Essa extração foi repetida mais uma vez, e o sobrenadante gerado, combinado aos anteriores, totalizando cerca de 90  $\mu\text{L}$  de cada amostra. As amostras foram, então, concentradas à pressão reduzida, em *SpeedVac*, até atingirem um volume correspondente a 10  $\mu\text{L}$ .

#### **4.11. Concentração e purificação dos peptídeos em ponteiras ZipTip®, contendo coluna de carbono 18 (C18)**

Os peptídeos gerados pela digestão tríptica das proteínas de interesse foram concentrados e purificados utilizando-se ponteiras ZipTip® (Millipore, Millipore-Merck, Bilerica, MA). Essas ponteiras contêm, aproximadamente, 0,6  $\mu\text{L}$  de leito de meio cromatográfico fixado em sua extremidade, permitindo a realização de uma cromatografia de fase reversa. Nesse caso, a resina orgânica ligada a grupos octadecila ( $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ) corresponde à fase estacionária. Portanto, no momento em que as amostras contendo os peptídeos de interesse são aplicadas na ZipTip C18, eles se ligam à coluna, por meio de hidrofobicidade, permitindo, assim, a remoção de possíveis contaminantes através de lavagens com diferentes soluções. Nesse caso, utiliza-se, como solução eluente, na fase polar ou hidrofílica, um ácido orgânico, o ácido trifluoroacético (TFA), em baixa concentração, para neutralizar as cargas das carboxilas e atuar como contra-íon dos grupamentos amino e outros. Em seguida, na fase apolar ou hidrofóbica, submete-se a coluna cromatográfica a um gradiente de ACN, solvente orgânico capaz de desprender os peptídeos.

Para a concentração e a purificação dos peptídeos, seguiu-se o protocolo sugerido pelo fabricante. Primeiramente, as microcolunas presentes nas ponteiras ZipTip® foram lavadas em 10  $\mu\text{L}$  de ACN 100%, por meio da realização de dez ciclos de preenchimento e dispensa. Em seguida, as colunas foram equilibradas com 10  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de TFA a 0,1% em volume, durante três ciclos de preenchimento e dispensa. Após o equilíbrio, cada uma das colunas foi carregada com 10  $\mu\text{L}$  de uma amostra de peptídeos provenientes de um *spot* diferente. Para isso, foram realizados dez ciclos de aspiração e dispensa. Na etapa seguinte, as colunas foram novamente submetidas à lavagem com solução aquosa de TFA 0,1% (10  $\mu\text{L}$ ), durante três ciclos de preenchimento e dispensa. A etapa final, a eluição dos peptídeos, foi realizada aspirando-se e dispensando-se, dez vezes, 5  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo ACN 50% (v/v) e TFA 0,1% (v/v), em um microtubo novo de 0,6 mL e máxima

recuperação (*Low Binding Tubes* - Axygen), pré-lavado em metanol – H<sub>2</sub>O MilliQ™ – metanol. É importante destacar que, durante todo o procedimento descrito acima, a pipetagem foi realizada lentamente, para garantir o máximo contato entre as soluções utilizadas e a resina e, também, para evitar a formação de bolhas de ar, que diminuem, significativamente, a recuperação dos peptídeos. Por fim, as amostras purificadas foram colocadas em *SpeedVac* até a completa evaporação do líquido.

Todas as etapas relativas aos experimentos de imunoproteômica, descritas nesta seção de material e métodos, foram realizadas no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, no Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, com a colaboração da Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira.

#### **4.12. Análise por espectrometria de massa MALDI-ToF/ToF**

A identificação das proteínas por espectrometria de massa foi realizada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília (DF), e contou com a colaboração do Dr. Marcelo Porto Bemquerer.

Os peptídeos obtidos por tripsinólise foram analisados em espectrômetro de massa modelo Autoflex Speed, ou, alternativamente, no equipamento Ultraflex III, ambos de marca BRUKER (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), que emprega a tecnologia MALDI-ToF/ToF.

##### **4.12.1. Determinação das massas moleculares dos peptídeos por MALDI-TOF/MS e fragmentação dos peptídeos por MALDI-ToF/ToF**

Para a análise das amostras no espectrômetro de massa, os peptídeos dessalinizados em ZipTip® C18 foram, primeiramente, ressuspensos em 3 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ™. Para o preparo da solução de matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico, CHCA), 5 mg de CHCA foram pesados e transferidos para um tubo de prolipropileno de 1,5 mL. O sólido foi dissolvido em 250 µL de acetonitrila, 200 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ™ e 50 µL de solução aquosa de ácido trifluoroacético a 3% para a obtenção de uma solução de CHCA a 10 mg.mL<sup>-1</sup> (50

mmol.L<sup>-1</sup>). Em seguida, as amostras ressuspendidas foram adicionadas, na proporção de 1:3 (v/v) na solução da matriz e aplicadas nos orifícios de uma placa de aço (MTP AnchorChip 800/384, Bruker Daltonics, Bilerica, MA, EUA), previamente lavada com H<sub>2</sub>O MilliQ™, metanol e 2-propanol. A placa de aço foi, então, mantida à temperatura ambiente, por alguns minutos, para que ocorresse a cocristalização da matriz e do analito. Em seguida, a placa foi inserida e analisada no espectrômetro de massa. O programa utilizado para a aquisição dos espectros foi o *Flex Control 2.0* (Bruker Daltonics, Bilerica, MA, EUA). A calibração externa do modo MS foi realizada utilizando-se o *Peptide Calibration Standard II* (Bruker Daltonics, Bilerica, MA, EUA), que é constituído por uma mistura de nove peptídeos: *Bradykinin 1-7* (m/z = 757.4); *Angiotensin II* (m/z = 1046.5); *Angiotensin I* (m/z = 1296.7); *Substance P* (m/z = 1347.7); *Bombesin* (m/z = 1619.8); *Renin Substrate* (m/z = 1758.9); *ACTH clip 1-17* (m/z = 2093.1); *ACTH clip 18-39* (m/z = 2465.2); e *Somatostatin 28* (m/z = 3147.5). A faixa de análise de massa variou de m/z 500 a m/z 4.000 e a operação do ToF foi conduzida em modo refletido, de acordo com as especificações do fabricante. Todos os espectros foram obtidos no modo positivo de ionização. Para o modo MS, os espectros de massa foram adquiridos utilizando-se o método RP PepMix.par, com os seguintes parâmetros de voltagem: ION SOURCE 1: 25,0 kV; ION SOURCE 2: 21,5 kV; LENS: 9,0 kV REFLECTOR: 26,3 kV REFLECTOR 2: 13,7 kV.

Para a calibração do modo MS/MS, os íons parentais em cada um desses peptídeos foram selecionados e fragmentados. As fragmentações foram conduzidas por meio da tecnologia LIFT™ (SUCKAU et al., 2003). A seguir, valores de m/z dos íons filhos resultantes são obtidos no analisador de massas ToF. Dessa forma, obtém-se um espectro MS/MS que consiste em uma lista de intensidades e razões m/z para fragmentos distintos, cujas diferenças em massa correspondem a um único resíduo de aminoácido. As voltagens e demais condições experimentais empregadas para a seleção do íon precursor, fragmentação e análise dos fragmentos gerados foram otimizadas pelo fabricante do equipamento, e os valores para os parâmetros mais importantes empregados foram os seguintes: IS1 = 8,00 kV; IS2 = 7,15 kV; LIFT1=19,00 kV. Os disparos foram realizados com o laser em uma intensidade de no máximo 30%, e somados, até que a intensidade do sinal (i.e., razão sinal/ruído) totalizasse o valor arbitrário de 1 x 10<sup>4</sup> unidades. Todos os espectros de MS/MS foram adquiridos no modo positivo, para os quais os respectivos valores teóricos de [M + H]<sup>+</sup> para o íon precursor foram calculados por meio da ferramenta “MS-Isotope” do Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>). Os espectros de massa foram

analisados e editados por meio dos softwares *Flex Analysis 3.3* e *Biotoools 3.0* (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA).

#### **4.12.2. Identificação das proteínas em banco de dados por *Peptide Mass Fingerprint*, *MS/MS Ion Search*, sequenciamento dos peptídeos**

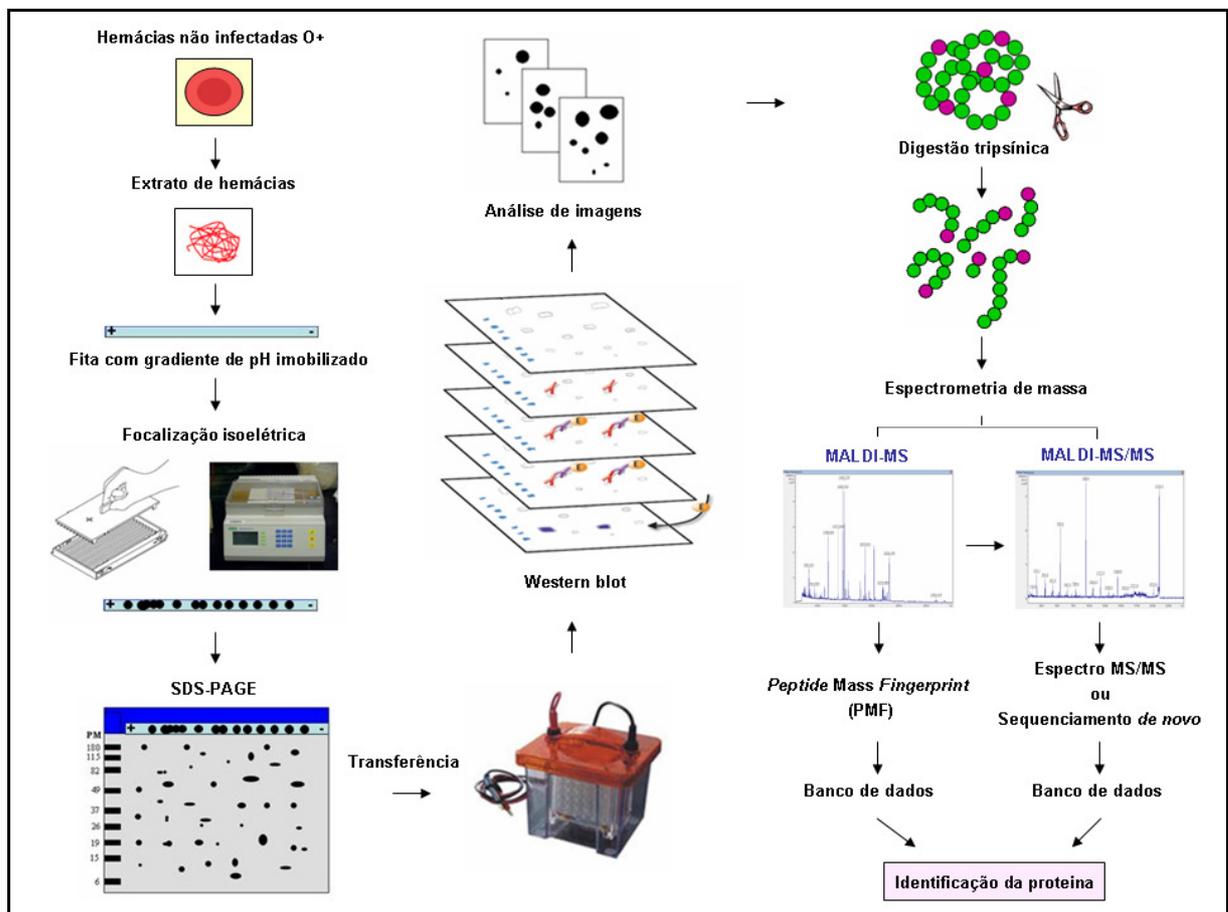
Após a aquisição dos espectros de massa (MS ou MS/MS) dos peptídeos e dos fragmentos, as listas contendo as razões de m/z obtidas experimentalmente foram comparadas aos valores teóricos gerados pela digestão, *in silico*, de todas as sequências de proteínas humanas depositadas no banco de dados *SwissProt*, por meio do programa BioTools v. 3.0 (Bruker Daltonics, Bilerica, MA, EUA) acoplado ao Mascot v. 2.1 ou 2.2.

Primeiramente, submeteram-se os espectros de massa ao *Peptide Mass Fingerprint* (PMF). Para essa busca, os parâmetros selecionados foram: *Homo sapiens* como grupo taxonômico; nenhuma restrição para massa molecular da proteína; tripsina como enzima (máximo de uma clivagem perdida); 0,5 Da de tolerância de erro de massa molecular para os peptídeos (considerando-se a acurácia de massa da ionização por MALDI); e carbamidometilação das cisteínas como modificação fixa. A identificação foi considerada válida apenas para as amostras cujos scores foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). Para as proteínas que não apresentaram um escore significativo nessa análise, utilizou-se, ainda, uma segunda busca, utilizando-se desta vez o banco de dados NCBIInr. Para essa pesquisa, foram selecionados os mesmos parâmetros utilizados para a busca no *SwissProt*.

Os espectros de MS/MS gerados a partir da fragmentação dos peptídeos de cada amostra foram analisados por *MS/MS Ion Search*, utilizando-se a mesma estratégia e os mesmos parâmetros descritos para o PMF.

Por fim, com o objetivo de confirmar as identificações realizadas por meio das estratégias citadas acima, todos os espectros de MS/MS foram interpretados por meio de inspeção manual, levando-se em consideração os mecanismos amplamente aceitos para a fragmentação de peptídeos, bem como os eventos mecanisticamente favorecidos ou desfavorecidos de clivagem (PAIZS & SUHAI, 2005; MEDZIHRADESKY & CHALKLEY, 2014). Assim, a sequência de aminoácidos obtida a partir das análises dos espectros de MS/MS dos íons parentais com maior intensidade sinal/ruído de cada amostra foi submetida

ao Protein BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) para a identificação das proteínas. A pesquisa foi realizada no banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot (swissprot) e, inicialmente, não se preencheu o campo organismo. Em seguida, a sequência de interesse foi procurada na sequência da proteína sugerida pela análise de bioinformática para confirmar se ela realmente estava presente e, também, para verificar se suas extremidades carbóxi-terminal apresentavam os aminoácidos arginina ou lisina, que são característicos da tripsinólise. Para calcular-se a massa molecular teórica da sequência em questão, utilizou-se a ferramenta *MS – Isotope*, do programa *Protein Prospector v 5.10.13* (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>). Todas as etapas de um experimento de imunoproteômica descritas acima estão ilustradas na Figura 9.

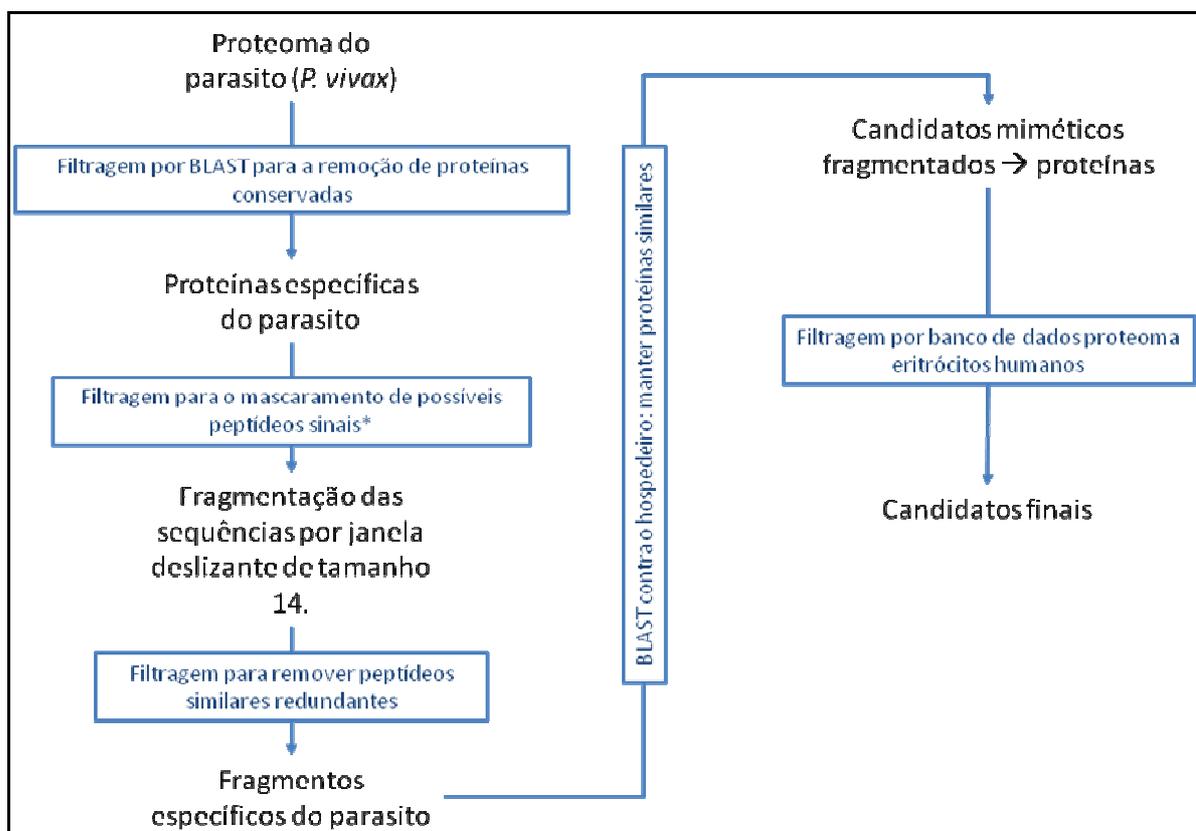


**Figura 9.** Esquema ilustrando as etapas de um experimento de imunoproteômica.

#### 4.13. Busca genômica de proteínas de *P. vivax* candidatas ao mimetismo molecular com proteínas de hemácias humanas

A busca de proteínas de *P. vivax* candidatas ao mimetismo molecular com proteínas de hemácias humanas foi realizada em colaboração com o pós-doutor Rodrigo de Paula Baptista, do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG.

A identificação das possíveis proteínas miméticas de *P. vivax* foi realizada por meio de genômica comparativa, utilizando-se seqüências do genoma disponíveis para *P. vivax* e o hospedeiro. Para essa análise, foi utilizada uma versão do *pipeline* local, em linguagem Perl, criado por LUDIN et al. (2011), e modificado para a identificação de todo o genoma de proteínas candidatas ao mimetismo molecular entre *P. vivax* e eritrócitos humanos (Figura 10).



**Figura 10.** Pipeline de mimetismo utilizado no presente estudo. \*O mascaramento foi realizado utilizando o programa computacional de predição de peptídeos sinais Phobius.

Neste *pipeline*, as sequências do proteoma do parasito foram divididas em fragmentos com sobreposição, e estes foram comparados, por meio de um alinhamento contra o proteoma humano, e tiveram seus hits mais próximos selecionados para a análise. É importante destacar que as sequências dos proteomas de *P. vivax*, de humanos e de eritrócitos humanos utilizadas neste estudo foram obtidas de bancos de dados públicos do uniprot.org e do ncbidbRBC. Os alinhamentos foram feitos utilizando-se o programa BLAST2.2.17 (ALTSCHUL et al., 1990). Durante todo o *pipeline*, etapas de filtragem para a remoção de proteínas conservadas de eucariotos redundantes para a nossa análise foram realizadas, por meio da ferramenta computacional blastp contra os proteomas de organismos eucariotos de vida livre não relacionados a *P. vivax* (*C. elegans*, *C. intestinalis*, *T. adhaerens*, *S. pombe* e *A. thaliana*). Sequências com *hits* de *e-value* menores que  $10^{-10}$  com qualquer uma das sequências deste banco foram filtradas do nosso dataset. As proteínas restantes foram, então, submetidas ao programa de predição Phobius 1.01 (KALL et al., 2004), para o mascaramento de peptídeos sinais. Em seguida, as sequências foram convertidas em uma série de fragmentos com sobreposição de tamanho 14 (quatorze resíduos), e os fragmentos que apresentaram similaridade com o banco de sequências de eucariotos de vida livre também foram removidos. Os fragmentos remanescentes foram submetidos a um BLAST contra o proteoma humano, e os *hits* similares foram mantidos como candidatos miméticos entre *P. vivax* e humano. Para tornar nossa análise ainda mais específica, selecionaram-se, dentre essas sequências peptídicas, apenas as proteínas miméticas aos eritrócitos humanos, as quais foram consideradas os candidatos finais de nosso estudo.

#### 4.14. Microscopia de desfocalização

Os experimentos envolvendo a técnica de microscopia de desfocalização foram realizados no Laboratório de Física de Sistemas Biológicos, no Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais, em colaboração com a Dra. Paula Magda da Silva Roma.

Para esses experimentos, foram utilizados dois microscópios invertidos operando em campo claro: o Nikon TE300, para mensurar o índice de refração da amostra, e, o Nikon TI-E Eclipse, para mensurar as medidas de contraste e flutuação do contraste. Ambos os microscópios foram utilizados com objetivas imersas em óleo (Nikon Plan APO DIC H,

100X, 1.4 NA Nikon Plan APO DIC H, 100X, 1.49 NA; Nikon, Melville, NY, EUA). As imagens das hemácias foram capturadas com uma câmera CMOS (CMOS, Silicon Video® 642M, Epix), utilizando-se uma taxa de captura fixada em 300 *frames* por segundo, por 10 segundos. Os filmes foram salvos em formato.tiff. A distância de desfocalização foi controlada por um deslocador piezoelétrico (P563 – 3CD, Physik Instrumente (PI) GmbH Co, Karlsruhe, Alemanha), acoplado ao estágio do microscópio. Esse instrumento possibilitou deslocamentos nanométricos nos eixos x, y e z, com relação ao seu plano suporte. Um sistema de controle de foco estável (PFS – *Perfect Focus System*) foi utilizado para manter a posição focal estável. Um filtro vermelho ( $\lambda = 0,61 \mu\text{m}$ ) foi inserido na via óptica do microscópio para prevenir efeitos de absorção pelas hemácias.

Para o preparo da amostra, 0,5  $\mu\text{L}$  de sangue fresco foi coletado de um indivíduo não infectado e ressuspendido em 1,5 mL tampão salina fosfato (PBS) (pH 7,4, NaCl 150 mM) com 1,0 mg/mL de albumina de soro bovino (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Essa solução tem um índice de refração de  $n_{\text{solução}} = 1,333 \pm 0,001$  e representa uma solução isotônica (NaCl 0,9% - 300 mOsm/kg), conforme mensurado em um osmômetro (*Advanced Model 3250 Single-Sample Osmometer*). Após o preparo dessa solução, um volume de 490  $\mu\text{L}$  dela foi transferida para um porta amostras e levada ao microscópio. Esse porta amostras é formado por uma lamínula de vidro previamente esterelizada, com espessura de 170  $\mu\text{m}$ , onde se cola, utilizando-se graxa de silicone para alto-vácuo, uma cubeta de acrílico de diâmetro de cerca de 1,5 cm. As hemácias foram filmadas antes de se adicionar o anticorpo e, em seguida, adicionaram-se 10  $\mu\text{L}$  de um dos dois anticorpos comerciais: o anticorpo monoclonal anti-banda 3 [IgG *Anti-band 3 antibody* clone EPR1426 (ab108414); abcam®], cujo imunógeno é um peptídeo sintético correspondente a alguns resíduos da banda 3 humana, ou, ainda, o anticorpo policlonal anti-hemácia [IgG *Anti human red blood cell (RBC) antibody* ABIN238043; antibodies online.com], cujo imunógeno consiste em hemácias humanas lavadas. Após trinta minutos de incubação, a 37°C, as mesmas hemácias filmadas anteriormente foram filmadas novamente a fim de se avaliar possíveis alterações nas membranas.

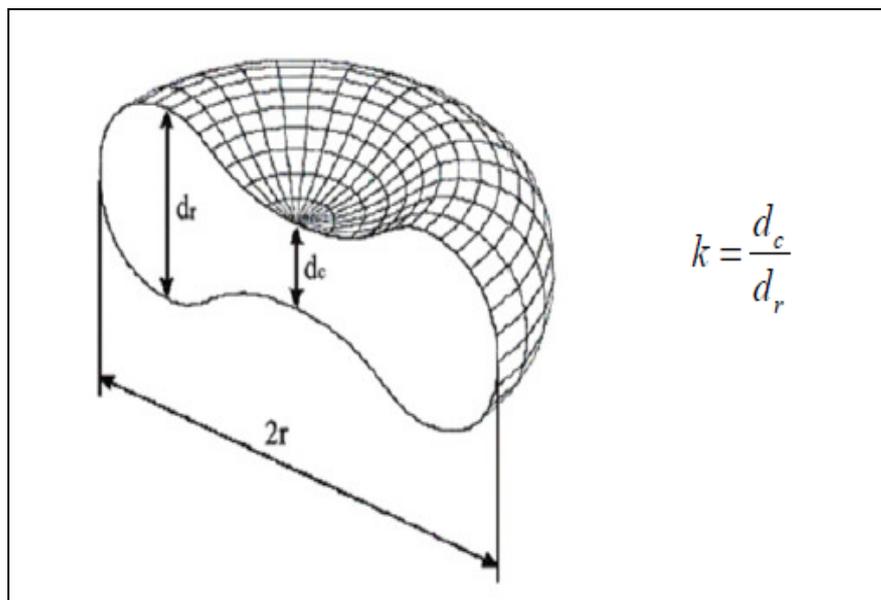
Para a avaliação dos parâmetros geométricos, trabalhamos com 25 hemácias para o grupo controle (sem anticorpo) e 30 hemácias para cada grupo de anticorpo testado. Como referência, utilizamos as medidas de um eritrócito humano padrão: 6,2 a 8,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro; 2,0-2,5  $\mu\text{m}$  de espessura no ponto mais espesso; volume médio em torno de 90  $\mu\text{m}^3$  a 300

mOsmol/kg, podendo aumentar para  $150 \mu\text{m}^3$  em uma forma esférica; superfície com cerca de  $136 \mu\text{m}^2$ .

Os parâmetros geométricos avaliados neste estudo foram o volume e o índice de esfericidade (índice  $k$ ).

O índice  $k$  (Figura 11) representa a razão entre a espessura do centro ( $d_c$ , onde  $c$  é centro) e a espessura na metade do raio ( $d_r$ , onde  $r$  é o raio) e é utilizado para caracterizar a hemácia em: disco bicôncavo ( $k < 1$ ), disco plano ( $k \sim 1$ ) ou esferócito ( $k > 1$ ), ou seja, reflete a forma da célula (Figura 11) (TISHKO et al., 2012).

Já para a avaliação da amplitude das flutuações em altura da membrana, filmamos oito hemácias antes e oito hemácias após a incubação com cada um dos anticorpos. Como a amplitude das flutuações em altura está ligada aos parâmetros elásticos da membrana da hemácia, quanto maiores forem os valores das flutuações medidas, mais flexível estará a célula e o inverso também é verdadeiro.



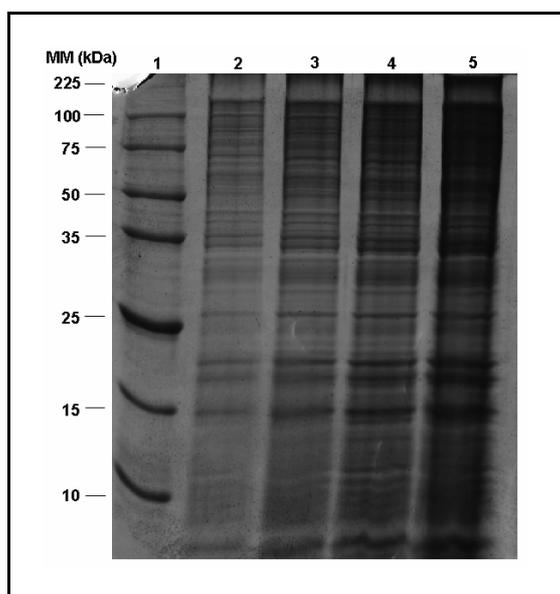
**Figura 11.** Determinação do índice  $k$ .  $d_c$  é a espessura do centro da hemácia;  $d_r$  é a metade do raio da hemácia (Fonte: TISHKO et al., 2012).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Extração e dosagem das proteínas de membrana de hemácias humanas não infectadas

Para a análise imunoproteômica, preparou-se um extrato proteico de membrana de hemácias saudáveis O<sup>+</sup>. Este extrato foi dosado e uma concentração de proteínas de 3,85 µg/µL foi determinada.

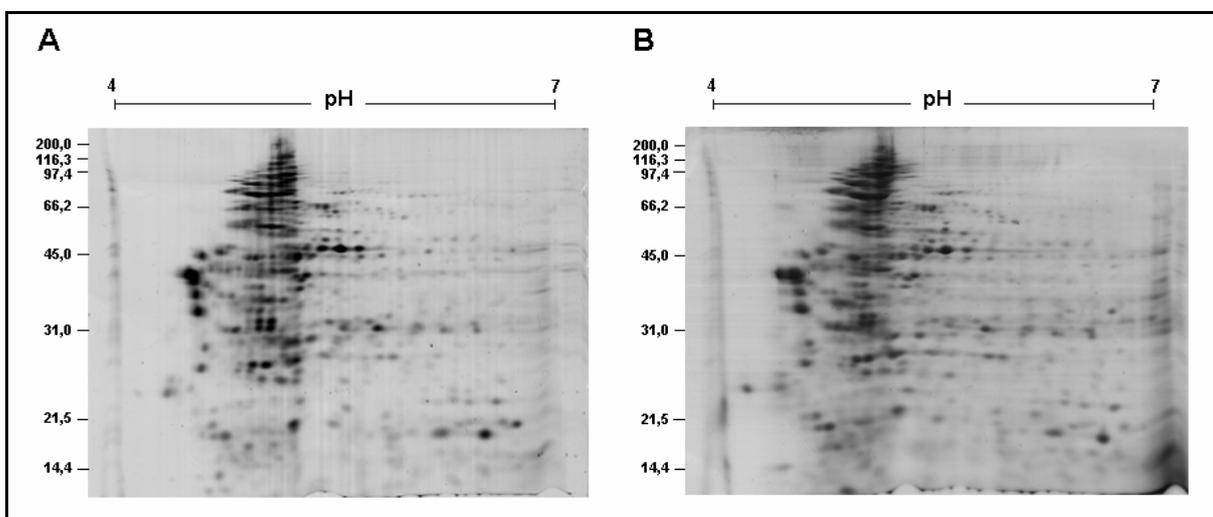
A fim de avaliar a qualidade do extrato obtido e, também, para identificar a concentração de acrilamida que permitiria uma melhor separação das proteínas, diferentes quantidades do extrato (10, 20, 40 e 60 µg) foram submetidas ao fracionamento em SDS-PAGE 10% (resultado não apresentado) e 12% (Figura 12). A presença de bandas bem definidas de diferentes massas moleculares (alta, média e baixa), bem como a ausência de “arraste” constituíram indicativos de um extrato de boa qualidade e sem degradação proteica (Figura 12). Como houve uma melhor separação do extrato no SDS-PAGE 12%, optou-se pelo uso dessa concentração de acrilamida para os experimentos de 2DE.



**Figura 12.** SDS-PAGE 12% do extrato de proteínas de membrana de eritrócitos humanos O<sup>+</sup> não infectados. O gel foi corado por *Coomassie Brilliant Blue G-250*. **1:** Marcador de massa molecular (kDa) *Broad Range Protein Molecular Weight Markers* (Promega); **2:** 10 µg de extrato; **3:** 20 µg de extrato; **4:** 40 µg de extrato; **5:** 60 µg de extrato.

## 5.2. Eletroforese bidimensional de proteínas de membrana de hemácias humanas normais

Primeiramente, alguns testes foram realizados para a padronização da eletroforese bidimensional. Para isso, uma amostra de 10  $\mu\text{g}$  de extrato foi separado por 2DE, utilizando-se, primeiramente, fitas de IPG de 7 cm com gradiente de pH 3-10 NL e o método de coloração pela prata. Um procedimento semelhante foi realizado, porém, utilizando-se 100  $\mu\text{g}$  de extrato e coloração por Azul de Coomassie Coloidal G-250. Embora um elevado número de *spots* tenha sido detectado em ambos os géis, a maioria deles concentrou-se na faixa de pH em torno de 5 (resultados não apresentados), e, por essa razão, foi necessário utilizar fitas de IPG com um gradiente de pH mais estreito para a melhor separação das proteínas que se concentraram nessa região do gel. Dessa forma, outro experimento foi realizado, porém, utilizando-se fitas de IPG de 7 cm com gradiente de pH 4-7 (Figura 13).

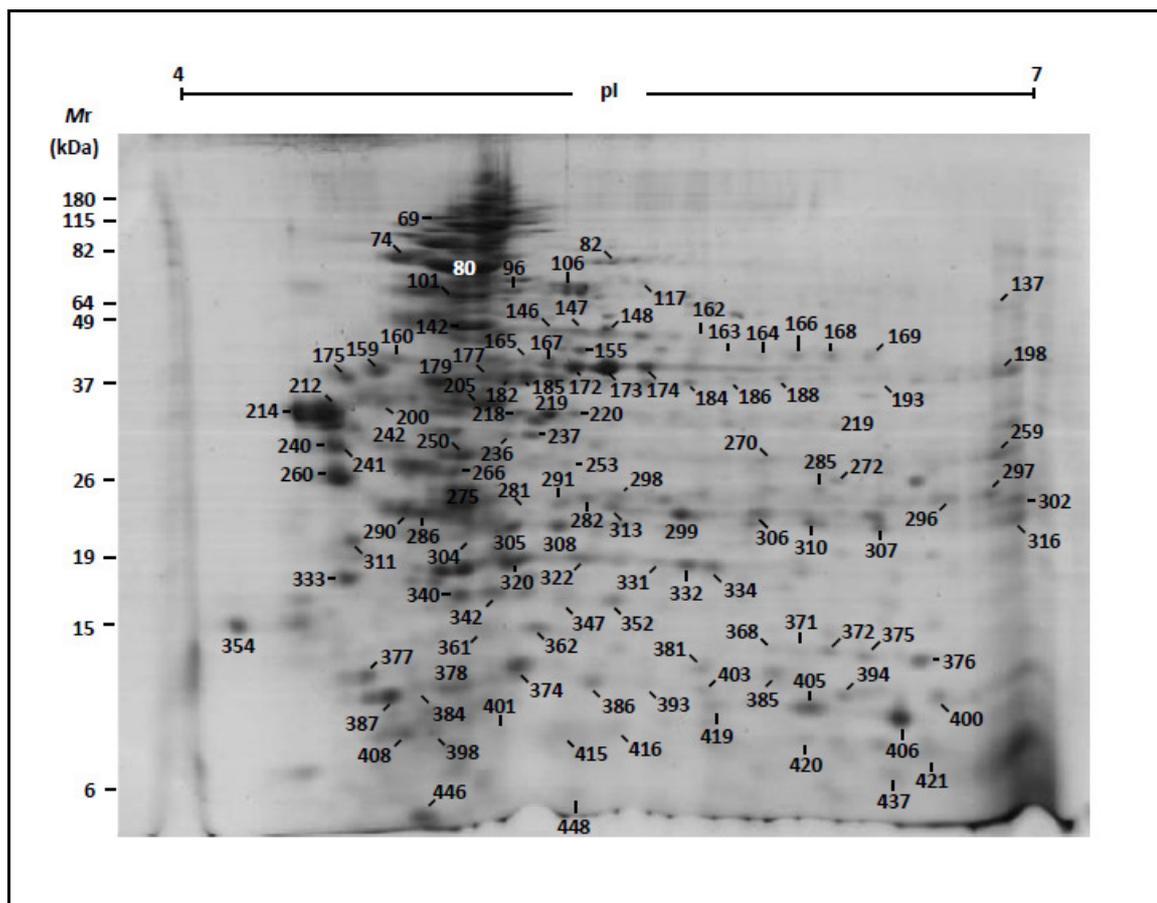


**Figura 13.** Padronização da eletroforese bidimensional, utilizando-se fitas de IPG com gradiente de pH 4-7. (A) Gel 2D contendo 10  $\mu\text{g}$  de extrato de membrana de hemácias humanas saudáveis  $\text{O}^+$  corado pela prata. (B) Gel 2D contendo 100  $\mu\text{g}$  de extrato corado por azul de coomassie coloidal.

Com esse procedimento, verificou-se uma melhor separação e definição das proteínas do extrato. A partir de então, estabeleceu-se como padrão para os experimentos posteriores de 2DE o uso de fitas de IPG de 7 cm com gradiente de pH 4-7.

Uma vez padronizado o protocolo de 2DE para o extrato em questão, partimos para o preparo dos géis que foram utilizados nos experimentos de *Western blot* bidimensional (2DE-WB).

Em cada experimento foram preparados oito géis 2D com 100 µg de extrato cada. Quatro deles foram utilizados para o 2DE-WB com os quatro grupos de soro testados individualmente (NINA, NIAN, PvNA e PvAN), e os outros quatro foram corados com Coomassie coloidal e usados como um mapa de referência para a comparação com os *immunoblots* e a posterior excisão dos *spots* reativos em cada grupo. É importante destacar que géis do mesmo tamanho foram preparados para cada grupo teste; um deles foi utilizado no 2DE-WB e, o outro, corado com Coomassie coloidal. Além disso, os pares de géis foram submetidos à eletroforese em uma mesma cuba, a fim de garantir-se um padrão ideal de reprodutibilidade entre eles. Cabe, ainda, ressaltar que cada experimento foi realizado em quintuplicata. As análises de imagens revelaram um perfil altamente reprodutível no que se refere ao número total de *spots*, bem como em relação às suas posições relativas e intensidade (coeficientes de correlação superiores a 80% entre os diferentes géis). Verificou-se que aproximadamente 227 *spots* puderam ser detectados no gel corado por Coomassie, com uma faixa de massas moleculares variando de 6 a 180 kDa (Figura 14).



**Figura 14.** Perfil bidimensional representativo do extrato de proteínas de membrana de hemácias humanas normais O+. Os géis 2DE foram obtidos após a separação de 100µg de extrato por eletroforese bidimensional (primeira dimensão: IEF pH 4-7; segunda dimensão: 12% SDS-PAGE) e corados com azul de Coomassie coloidal.

### 5.3. Detecção e identificação das proteínas de hemácias não infectadas reconhecidas pelos diferentes grupos de soros

Após a eletroforese bidimensional das proteínas, elas foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF. Cada membrana foi utilizada para a imunodeteção com o *pool* de soros de cada um dos quatro grupos: NINA, NIAN, PvNA, PvAN. Experimentos de padronização do *western blot* bidimensional mostraram que os melhores resultados eram obtidos quando se utilizava o anticorpo primário (soro dos diferentes grupos) diluído 1:200, e o secundário, 1:6.000. Portanto, essas diluições dos anticorpos foram utilizadas nos experimentos posteriores. Além disso, definiu-se que todas as membranas provenientes de um mesmo experimento seriam reveladas simultaneamente e digitalizadas como uma figura

única, a fim de prevenir variações de reatividade decorrentes de diferentes tempos de exposição.

Dentre os cinco experimentos realizados, os três mais informativos foram selecionados para a análise de imagens, visualização e determinação dos *spots* reativos a serem excisados dos géis correspondentes corados com Coomassie coloidal.

A partir da análise comparativa entre os imunoproteomas obtidos para os quatro grupos de soros avaliados, foi possível detectar 136 *spots* imunogênicos. Todos os *spots* reativos em cada membrana que parearam com os *spots* do gel 2D correspondente foram excisados do gel e processados para a espectrometria de massa. Grande parte desses 136 *spots* foi analisada em triplicata. É importante enfatizar que todas as proteínas identificadas em pelo menos um dos experimentos realizados foram incluídas nas análises posteriores.

Dos *spots* imunogênicos analisados, 181 foram identificados, sendo 22 deles reconhecidos por soros de indivíduos não infectados sem anemia (NINA), 11 *spots* foram reconhecidos por soros de indivíduos não infectados anêmicos (NIAN), 64 foram reconhecidos por soros de pacientes infectados não anêmicos (PvNA) e 83 por soros de pacientes anêmicos (PvAN) (Figura 15, Tabela 5).

Os quatro grupos de soros apresentaram anticorpos que reconhecem a actina, as espectrinas (alfa e beta), a proteína banda 3 e a proteína 4.1 (Figura 15, Tabela 5).

Quando a comparação foi realizada entre os grupos com infecção por *P. vivax* (PvNA e PvAN) e os grupos-controle sem malária (NINA e NIAN), verificou-se que os soros dos grupos infectados reconheceram um número maior de *spots*. Alguns desses *spots* corresponderam a proteínas que foram reconhecidas exclusivamente pelos anticorpos dos grupos com malária (PvNA e PvAN) como: anquirina, dematina, *EV15-like protein*, *kynurenine—oxoglutarate transaminase 3*, *long chain fatty acid transport protein 6*, proteína FAM45A, FAM180A, proteína banda 7, proteína 4.2, e TMLHE. Verificou-se, ainda, que grande parte dos *spots* detectados exclusivamente nesse grupo corresponderam às espectrinas (principalmente a beta), à banda 3 e à actina, que embora tenham sido reconhecidas nos controles, reagiram mais intensamente nos soros de pacientes infectados por *P. vivax* (Figura 15, Tabela 5).

A comparação entre os dois grupos de pacientes com malária permitiu constatar que os soros de pacientes anêmicos reconheceram um repertório amplo de *spots* com intensidade mais elevada, principalmente para os *spots* situados na faixa do gel compreendida entre 19 a

115 kDa. Dentre os *spots* que foram reconhecidos apenas por soros deste grupo, a maioria foi identificada como banda 3. Em termos de diversidade, constatou-se que a fibroleucina e a *protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL3* foram as únicas proteínas reconhecidas exclusivamente por este grupo (Figura 15, Tabela 5).

É importante destacar que embora grande parte das proteínas deste estudo tenha sido identificada por *Peptide Mass Fingerprint* ou *MS/MS Ion Search*, as interpretações dos espectros de MS/MS também foram realizadas por inspeção manual dos espectros, levando-se em consideração os mecanismos amplamente aceitos para a fragmentação de peptídeos, bem como os eventos mecanisticamente favorecidos ou desfavorecidos de clivagem (PAIZS & SUHAI, 2005; MEDZIHRADESKY & CHALKLEY, 2014). Com essa estratégia, foi possível sequenciar 8 peptídeos da actina; 12 da anquirina; 2 da dematina; 20 da alfa-espectrina; 24 da beta-espectrina; 7 da proteína 4,1; 2 da proteína 4.2; 9 da proteína banda 3 e 2 da proteína banda 7 (Tabela 6, Anexo 2), confirmando a identificação anterior, que havia sido realizada por meio da busca em bancos de dados. Por essa razão, apenas essas proteínas serão priorizadas na seção da discussão.



**Tabela 5.** Proteínas de hemácias humanas saudáveis O<sup>+</sup> reconhecidas por soros dos diferentes grupos; NINA: indivíduos saudáveis; NIAN: indivíduos com anemia por outras etiologias; PvNA: pacientes infectados por *P. vivax* sem anemia; PvAN: pacientes infectados por *P. vivax* com anemia. As buscas de identidade foram realizadas no SwissProt e no NCBIInr. Exp.: experimental; Teor.: teórico. Em negrito, os *spots* reconhecidos somente pelos anticorpos do grupo PvAN.

Spot	Identidade	Acesso	Massa molecular (kDa)		pI		Número de experimentos em que a proteína foi reconhecida ( n máximo = 3)			
			Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	NINA	NIAN	PvNA	PvAN
74	Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB1_HUMAN	76	247	4,8	5,2	0	1	0	3
80	Alpha-I spectrin, partial [Homo sapiens]	gil338409		61		4,8				
	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1_HUMAN	72	281	5,0	5,0	1	1	1	2
82	Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB1_HUMAN		247		5,2				
	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1_HUMAN	66	281	5,3	5,0	0	0	1	2
96	Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB1_HUMAN		247		5,2				
	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1_HUMAN	63	281	4,9	5,0	1	2	1	2
101	Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB1_HUMAN		247		5,2				
	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1_HUMAN	63	281	5,4	5,0	1	0	2	2
106	Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB1_HUMAN		247		5,2				
	Alpha-I spectrin, partial [Homo sapiens]	gil338409		61		4,8				
142	Beta-spectrin, partial [Homo sapiens]	gil2345081	52	46	4,9	4,7	2	2	2	3
	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1_HUMAN		281		5,0				
146	Protein 4.1	41_HUMAN	50	98	5,4	5,4	1	0	1	1

Spot	Identidade	Acesso	Massa molecular (kDa)		pI		Número de experimentos em que a proteína foi reconhecida ( n máximo = 3)			
			Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	NINA	NIAN	PvNA	PvAN
148	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	49	42	5,6	5,3	0	0	1	3
	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	RL1D1_HUMAN		55		10,1				
<b>159</b>	<b>Beta-spectrin, partial [Homo sapiens]</b>	<b>gil2345081</b>	<b>42</b>	<b>46</b>	<b>4,6</b>	<b>4,7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
160	Band 3 anion transport protein	B3AT_HUMAN	44	102	4,7	5,1	0	0	1	1
	Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB1_HUMAN		247		5,2				
164	Chain A, Structural And Functional Analysis of A putative Substrate Access Tunnel In The Cytosolic Domain Of Human Anion Exchanger 1	gil551701920	43	34	6,1	5,0	0	0	2	2
165	Zinc finger protein 211	ZN211_HUMAN	43	67	5,3	8,8	1	0	2	1
167	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	42	42	5,4	5,3	2	0	2	1
	Actin, cytoplasmic 2	ACTG_HUMAN		42		5,3				
172	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	41	42	5,5	5,3	2	0	2	2
173	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	41	42	5,6	5,3	2	0	1	2
174	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	41	42	5,7	5,3	2	0	3	3
175	Band 3 anion transport protein	B3AT_HUMAN	40	102	4,4	5,1	0	0	1	1
177	Protein FAM57A	FA57A_HUMAN	40	30	5,1	9,6	1	1	2	3
	Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB1_HUMAN		247		5,2				
	Zinc finger protein 211	ZN211_HUMAN		67		8,8				
179	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1_HUMAN	40	281	5,0	5,0	1	0	0	1
	Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB1_HUMAN		247		5,2				

Spot	Identidade	Acesso	Massa molecular (kDa)		pI		Número de experimentos em que a proteína foi reconhecida ( n máximo = 3)			
			Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	NINA	NIAN	PvNA	PvAN
182	Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB1_HUMAN	40	247	5,2	5,2	0	0	1	1
184	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	39	42	5,9	5,3	0	0	2	2
185	Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB1_HUMAN	39	247	5,3	5,2	0	0	1	1
198	Dematin	DEMA_HUMAN	38	47	6,6	8,9	0	0	3	3
200	<b>alpha-I spectrin, partial [Homo sapiens] Chain A, Structural And Functional Analysis Of A Putative Substrate Access Tunnel In The Cytosolic Domain Of Human Anion Exchanger 1</b>	<b>gil338409</b>	<b>37</b>	<b>61</b>	<b>4,6</b>	<b>4,8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
		<b>gil551701920</b>		<b>34</b>		<b>5,0</b>				
205	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN		42		5,3				
	Band 3 anion transport protein	B3AT_HUMAN		102		5,1				
	beta-spectrin, partial [Homo sapiens]	gil2345080	35	34	4,9	4,7	0	0	1	3
	HRIHFB2003 [Homo sapiens]	gil6526769		30		8,8				
	Protein 4.1	41_HUMAN		98		5,4				
Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1_HUMAN	281		5,0						
212	<b>Band 3 anion transport protein</b>	<b>B3AT_HUMAN</b>	<b>35</b>	<b>102</b>	<b>4,3</b>	<b>5,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>
214	<b>Band 3 anion transport protein</b>	<b>B3AT_HUMAN</b>	<b>35</b>	<b>102</b>	<b>4,1</b>	<b>5,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
218	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	35	42	5,3	5,3	0	0	1	1
	Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB1_HUMAN		247		5,2				

Spot	Identidade	Acesso	Massa molecular (kDa)		pI		Número de experimentos em que a proteína foi reconhecida ( n máximo = 3)			
			Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	NINA	NIAN	PvNA	PvAN
			219	Actin, cytoplasmic 1 Beta-spectrin [Homo sapiens] Beta I spectrin form betal sigma 3 [Homo sapiens] Chain A, Crystal Structure Of The Ankyrin-Binding Domain Of Human Erythroid Spectrin Spectrin beta chain, erythrocytic	ACTB_HUMAN gil29497 gil18481635 gil223365863 SPTB1_HUMAN		42 27 118 25 247		5,3 5,2 5,1 4,7 5,2	0
236	Chain A, Crystal Structure Of The Ankyrin-Binding Domain Of Human Erythroid Spectrin	gil223365863	33	25	5,2	4,7	0	0	2	1
237	Beta I spectrin form betal sigma 3 [Homo sapiens]	gil18481635	32	118	5,3	5,1	0	0	2	1
240	Band 3 anion transport protein	B3AT_HUMAN	31	102	4,3	5,1	0	0	1	3
<b>241</b>	<b>Band 3 anion transport protein</b>	<b>B3AT_HUMAN</b>	<b>32</b>	<b>102</b>	<b>4,4</b>	<b>5,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<b>242</b>	<b>Chain A, Structural And Functional Analysis Of A Putative Substrate Access Tunnel In The Cytosolic Domain Of Human Anion Exchanger 1</b>	<b>gil551701920</b>	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>4,6</b>	<b>5,0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
250	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	31	42	5,0	5,3	0	0	1	3
<b>253</b>	<b>Spectrin alpha chain, erythrocytic 1</b>	<b>SPTA1_HUMAN</b>	<b>29</b>	<b>281</b>	<b>5,3</b>	<b>5,0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
259	Dematin	DEMA_HUMAN	29	46	7,0	8,9	0	0	3	2
<b>260</b>	<b>Chain A, Structural And Functional Analysis of A putative Substrate Access Tunnel In The Cytosolic Domain Of Human Anion Exchanger 1</b>	<b>gil551701920</b>	<b>29</b>	<b>34</b>	<b>4,4</b>	<b>5,0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>

Spot	Identidade	Acesso	Massa molecular (kDa)		pI		Número de experimentos em que a proteína foi reconhecida ( n máximo = 3)			
			Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	NINA	NIAN	PvNA	PvAN
			266	Band 3 anion transport protein	B3AT_HUMAN	29	102	5,0	5,1	0
	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN		42		5,3				
270	Flotillin-1	FLOT1_HUMAN	27	48	6,4	7,1	0	0	1	1
272	Flotillin-1	FLOT1_HUMAN	27	48	6,4	7,1	1	0	0	2
275	Band 3 anion transport protein	B3AT_HUMAN	26	102	5,0	5,1	1	0	1	1
286	Chain A, Structural And Functional Analysis of A putative Substrate Access Tunnel In The Cytosolic Domain Of Human Anion Exchanger 1	gil551701920	25	34	4,9	5,0	1	0	3	1
290	Band 3 anion transport protein	B3AT_HUMAN		102		5,1				
	Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB1_HUMAN	25	247	4,7	5,2	1	0	1	2
	Tetratricopeptide repeat protein 33	TTC33_HUMAN		30		5,3				
<b>296</b>	<b>Long-chain fatty acid transport protein 6</b>	<b>S27A6_HUMAN</b>	<b>25</b>	<b>71</b>	<b>6,8</b>	<b>8,8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
297	Long-chain fatty acid transport protein 6	S27A6_HUMAN	25	71	7,0	8,8	0	0	1	1
298	Aspartyl-tRNA synthetase variant [Homo sapiens]	gil62896511	25	58	5,6	6,2	2	0	3	3
299	Gamma-actin, partial [Homo sapiens]	gil178045	24	26	5,9	5,7	2	0	3	3
304	Band 3 anion transport protein	B3AT_HUMAN	23	102	5,1	5,1	3	1	2	3
305	Chain A, Structural And Functional Analysis of A putative Substrate Access Tunnel In The Cytosolic Domain Of Human Anion Exchanger 1	gil551701920	23	34	5,2	5,0	3	1	2	1
306	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	23	42	6,1	5,3	2	1	3	3
308	Protein 4.1	41_HUMAN	23	98	5,4	5,4	3	1	2	1

Spot	Identidade	Acesso	Massa molecular (kDa)		pI		Número de experimentos em que a proteína foi reconhecida ( n máximo = 3)			
			Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	NINA	NIAN	PvNA	PvAN
<b>311</b>	<b>Chain A, Structural And Functional Analysis Of A Putative Substrate Access Tunnel In The Cytosolic Domain Of Human Anion Exchanger 1 Protein 4.1</b>	<b>gil551701920 41_HUMAN</b>	<b>22</b>	<b>34 98</b>	<b>4,5</b>	<b>5,1 5,4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
313	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN		42		5,2				
	Band 3 anion transport protein	B3AT_HUMAN	22	102	5,5	5,1	1	0	1	1
	Protein 4.1	41_HUMAN		98		5,4				
316	Ankyrin-1	ANK1_HUMAN	22	207	7,0	7,7	0	0	1	2
319	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1_HUMAN	20	281	5,1	5,0	0	0	3	1
320	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1_HUMAN	20	281	5,3	5,0	0	0	3	3
322	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1_HUMAN	19	281	5,5	5,0	0	0	2	2
331	Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB1_HUMAN	19	247	5,7	5,2	0	1	1	2
332	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	STOM_HUMAN	19	32	5,9	7,7	0	0	2	3
340	Band 3 anion transport protein	B3AT_HUMAN	18	102	4,9	5,1	0	0	1	0
342	Chain A, Structural And Functional Analysis Of A Putative Substrate Access Tunnel In The Cytosolic Domain Of Human Anion Exchanger 1	gil551701920	18	34	5,0	5,0	0	0	1	1
<b>347</b>	<b>erythrocyte beta-spectrin, partial [Homo sapiens]</b>	<b>gil338334</b>	<b>17</b>	<b>32</b>	<b>5,4</b>	<b>5,4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<b>354</b>	<b>Ankyrin-1</b>	<b>ANK1_HUMAN</b>	<b>17</b>	<b>207</b>	<b>4,1</b>	<b>5,7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>
362	Band 3 anion transport protein	B3AT_HUMAN	16	102	5,3	5,1	0	0	1	2
371	EV15-like protein	EV15L_HUMAN	15	92	6,3	5,3	0	0	2	2

Spot	Identidade	Acesso	Massa molecular (kDa)		pI		Número de experimentos em que a proteína foi reconhecida ( n máximo = 3)			
			Exp.	Teor.	Exp.	Teor.	NINA	NIAN	PvNA	PvAN
			374	hCG15971, isoform CRA_b [Homo sapiens] Actin, cytoplasmic 1	gil119607748 ACTB_HUMAN	14	14 42	5,3	5,2 5,3	0
375	Chain A, D34 Region Of Human Ankyrin-R And Linker	gil27574029	14	46	6,5	7,6	0	0	3	3
376	Ankyrin-1	ANK1_HUMAN	14	207	6,7	5,7	0	0	2	3
<b>377</b>	<b>Spectrin beta chain, erythrocytic</b>	<b>SPTB1_HUMAN</b>	<b>14</b>	<b>247</b>	<b>4,5</b>	<b>5,2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>381</b>	<b>Band 3 anion transport protein</b>	<b>B3AT_HUMAN</b>	<b>14</b>	<b>102</b>	<b>5,9</b>	<b>5,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<b>384</b>	<b>Fibroleukin</b>	<b>FGL2_HUMAN</b>	<b>13</b>	<b>51</b>	<b>4,8</b>	<b>7,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
387	Chain A, Structural And Functional Analysis Of A Putative Substrate Access Tunnel In The Cytosolic Domain Of Human Anion Exchanger 1	gil551701920	12	34	4,6	5,0	0	0	1	2
394	Erythrocyte membrane protein band 4.2	EPB42_HUMAN	11	78	6,4	8,4	0	0	3	1
398	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN	11	42	4,8	5,3	0	0	3	1
400	Protein FAM45A	FA45A_HUMAN	11	40,	6,9	6,2	0	0	3	1
405	TMLHE [Homo sapiens]	gil48146647	11	50	6,3	7,3	0	0	3	3
406	Kynurenine—oxoglutarate transaminase 3	KAT3_HUMAN	10	52	6,6	8,4	0	0	3	3
<b>419</b>	<b>Ankyrin-1</b>	<b>ANK1_HUMAN</b>	<b>9</b>	<b>207</b>	<b>5,9</b>	<b>5,7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>420</b>	<b>Protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL3</b>	<b>MICA3_HUMAN</b>	<b>9</b>	<b>225</b>	<b>6,3</b>	<b>5,4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
421	Protein FAM180A	F180A_HUMAN	9	20	6,7	8,6	0	0	2	1
437	Protein 4.1	41_HUMAN	7	98	6,6	5,4	0	0	2	2
446	Band 3 anion transport protein	B3AT_HUMAN	6	102	4,8	5,1	0	0	2	1

**Tabela 6.** Proteínas confirmadas por sequenciamento manual dos espectros de MS/MS. m/z: razão massa carga. Exp.: experimental; Teor.: teórica.

Proteína	m/z		Sequência do peptídeo
	Exp.	Teor.	
Actina citoplasmática	976,5	976,4	(K) AGFAGDDAPR
	1132,4	1132,5	(R) GYSFTTTAER
	1198,7	1198,7	(R) AVFPSIVGRPR
	1516,1	1515,7	(K) IWHHTFYNELR
	1516,7	1516,7	(K) QEYDESGPSIVHR
	1790,9	1790,9	(K) SYELPDGQVITIGNER
	1954,1	1954,1	(R) VAPEEHPVLLTEAPLNPK
	3184,2	3183,6	(R) TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR
Anquirina	968,4	968,6	(K) MVVELLHK
	1080,3	1080,5	(R) EADAATSFLR
	1323,6	1323,7	(K) LDQVVESPAIPR
	1511,5	1511,8	(K) TKDELTPHLC(cam)AAR
	1634,8	1634,8	(R) ELVNYGANVNAQSQK
	1804,1	1803,9	(R) GYTPLHVASHYGNIK
	1832,1	1832,0	(K) VVTDETSFVLVSDKHR
	1834,7	1834,9	(K) GNTALHIAALAGQDEVVR
	1926,6	1929,9	(K) LVYANEC(cam)ANFTTNVSAR
	1963,0	1963,1	(K) KGNTALHIAALAGQDEVVR
	2047,3	2047,0	(K) GFTPLYMAAQENHLEVVK
	2393,6	2393,4	(K) SGLTPLHLVAQEGHVPVADVLIK
Dematina	1183,8	1183,6	(R) SPGIISQASAPR
	1612,8	1612,8	(K) STSPPPSPEVWADSR
Espectrina alfa	989,4	989,5	(K) FLDAVDPGR
	1088,4	1088,5	(K) HFDENLTGR
	1202,6	1202,6	(R) DVTEAIQWIK
	1273,6	1273,6	(K) DHEDFLASLAR
	1286,7	1286,7	(R) LAQFVEHWEK
	1305,6	1305,6	(K) AEDLFVEFAHK
	1316,7	1316,7	(K) VLETAEEIQR
	1564,0	1563,8	(R) QLLGSAHAVEVFHR
	1597,7	1597,7	(R) LSESHPDATEDLQR
	1606,8	1606,8	(R) FLNVQELAAAHHEK
	1667,8	1667,8	(K) HEALENDFAVHETR
	1709,7	1709,7	(K) HEDFEEAFTAQEEK
	1723,9	1723,9	(K) VEAADHQGIVPAVYVR
	1765,8	1765,8	(K) QDTLDASLQSFQQR
	1807,7	1807,7	(R) FSSDFDELSGWM(oxi)NEK
	1926,1	1926,1	(R) DLVPLGDKVTILGETAER
	1945,9	1945,9	(K) LQLEDDYAFQEFNWK
	1974,1	1974,0	(K) AENTGVELDDVWELQKK
	2027,5	2027,9	(R) SHLSGYDYVGFTNSYFGN
	2056,9	2057,1	(K) VADDLLFEGLLTPEGAQIR
	2156,0	2156,0	(K) MEENLSEPVHC(cam)VSLNEIR
	2240,1	2240,1	(K) TAAINADELPTDVAGGEVLLDR
	2253,3	2253,2	(K) YSTIGLAQQWDQLYQLGLR
	2354,1	2354,1	(R) NQANAC(cam)QQQQAAPVEGVAGEQR
2532,0	2532,1	(R) FQSADETGQDLVNANHEASDEV	

Proteína	m/z		Sequência do peptídeo
	Exp.	Teor.	
Espectrina alfa	2583,3	2583,2	(K) GTQLHEANQQLQFENNAEDLQR
	2896,4	2896,4	(R) VVEVNQYANEC(cam)AEENHPDLPLIQSK
	3662,9	3662,6	(K) HEIDSYDDRFQSADETGQDLVNANHEASDEVK
Espectrina beta	1069,7	1069,6	(R) DLAGIIAIQR
	1172,6	1172,7	(R) FLDLLEPLGR
	1176,4	1176,6	(R) VDNVNAFIER
	1198,7	1198,6	(R) LGHLQSSWDR
	1248,5	1248,6	(K) WISAMEDQLR
	1283,0	1282,6	(R) MLLEVC(cam)QFSR
	1364,7	1364,7	(R) WQAFQTLVSR
	1403,8	1403,7	(R) SDDPGKDLTSVNR
	1430,5	1430,7	(K) YHQGINAEIETR
	1492,4	1492,7	(R) ETDDLEQWISEK
	1496,0	1496,7	(K) LLTSQDVSYDEAR
	1532,9	1532,8	(R) ELYQQVVAQDLR
	1533,6	1533,7	(R) DLEDETLWVEER
	1538,8	1538,7	(R) AWESLEEAEYRR
	1576,0	1575,7	(K) GYQPC(cam)DPQVIQDR
	1621,0	1620,8	(K) NQTLQNEILGHTPR
	1712,2	1711,9	(R) LIDAGHSEAATIAEWK
	1762,9	1762,8	(K) KHEAIETDTAAYEER
	1776,0	1775,9	(R) AQGLLSAGHPEGEQIIR
	1830,0	1830,0	(K) VIQQTDPEYLLLQQR
	1972,9	1972,9	(R) ELPEDVGLDASTAESFHR
	2103,3	2103,0	(R) GQQLVEAAEIDC(cam)QDLEER
	2081,3	2081,1	(R) ELHLLGVQVQQFQDVATR
3203,7	3205,5	(R) DASVAEAWLIAQEPYLASGDFHTVDSVEK	
Proteína 4.1	1128,6	1128,6	(R) YYLC(cam)LQLR
	1308,7	1308,7	(R) GVPWNFTFNVK
	1762,9	1762,9	(K) FYPPDPAQLTEDITR
	1849,0	1849,0	(R) TLNINGQIPTGEGPPLVK
	1893,0	1892,9	(R) SMTPAQADLEFLENAKK
	1909,0	1908,9	(R) SM(oxi)TPAQADLEFLENAKK
	2163,3	2163,2	(R) IVITGDADIDHDQVLVQAIK
Proteína 4.2	1430,7	1430,8	(K) FQFTPTHVGLQR
	2241,0	2240,0	(R) LLIDEYYNEEGLQNGEGQR
Proteína banda 3	1466,7	1466,8	(K) IPPDSEATLVLVGR
	1490,8	1490,8	(R) ADFLEQPVLGFVR
	1563,8	1563,8	(R) FIFEDQIRPQDR
	1594,8	1594,8	(K) VYVELQELVMDEK
	1857,5	1857,9	(R) WVQLEENLGENGAWGR
	1877,1	1877,0	(R) LQEAAELEAVELPVPIR
	2042,2	2042,1	(K) HSHAGELEALGGVKPAVLTR
	2235,0	2235,1	(K) VYVELQELVMDEKNQELR
2325,5	2326,3	(K) GTVLLDLQETSLAGVANQLLDR	
Proteína banda 7	1716,0	1715,9	(K) EASMVITESPAALQLR
	1930,0	1930,0	(R) VQNATLAVANITNADSATR

#### **5.4. Identificação genômica de proteínas de *P. vivax* candidatas ao mimetismo molecular com proteínas de hemácias humanas**

Uma vez que os anticorpos de pacientes com malária reconheceram um número maior de *spots* em relação aos demais grupos, testamos a hipótese de que o parasito compartilhe determinantes antigênicos com as hemácias do hospedeiro, fenômeno conhecido como mimetismo molecular. Para testar essa hipótese, primeiramente, adaptamos um pipeline de mimetismo desenvolvido por LUDIN e colaboradores (2011), utilizando-se, como dados de entrada, o proteoma predito de *P. vivax*, bem como o humano. Em seguida, foi realizada uma filtragem com o banco de dados de proteínas de eritrócitos humanos. Vinte e três sequências foram apontadas como possíveis candidatos. Essas sequências obtidas *in silico* foram, então, comparadas às sequências de 24 proteínas identificadas em nossos experimentos de imunoproteômica e, verificou-se que somente as espectrinas apresentaram alta sintonia com ambos os bancos de dados (Figura 16). Esse resultado sugere um possível mimetismo e explica a detecção de elevados níveis de anticorpos anti-espectrina nos indivíduos com malária vivax.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
pectrin_Q9H254.2_ca	MAQVPG	EV	DN	HEGLP	PANNNP	ARRR	ES	PD	RGE	RE	QPAAS	TAA	RS	L
Spectrin_luiza_	HTSAT	EF	ENV	GNQP	PYSR	IN	AR	HA	DP	DD	EL	DN	DN	
Consensus	.aqsag	Ef	#N	n	qP	.P	n	n	i	a	R	H	#a	P
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
pectrin_Q9H254.2_ca	KEQRVH	LENV	GS	HDI	V	DGNHRL	TLGL	V	HTI	IL	RF	QIQ	V	I
Spectrin_luiza_	KEQRVH	LENV	GS	HDI	V	DGNHRL	TLGL	V	HTI	IL	RF	QIQ	V	I
Consensus	KEQRVH	LENV	GS	HDI	V	DGNHRL	TLGL	V	HTI	IL	RF	QIQ	V	I
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
pectrin_Q9H254.2_ca	EDVNM	E	A	P	D	E	K	S	I	I	Y	V	V	F
Spectrin_luiza_	EDVNM	E	A	P	D	E	K	S	I	I	Y	V	V	F
Consensus	EDVNM	E	A	P	D	E	K	S	I	I	Y	V	V	F
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
pectrin_Q9H254.2_ca	REGCGI	ND	IK	ANG	EL	EA	HE	RE	AL	RA	EL	TR	Q	K
Spectrin_luiza_	REGCGI	ND	IK	ANG	EL	EA	HE	RE	AL	RA	EL	TR	Q	K
Consensus	REGCGI	ND	IK	ANG	EL	EA	HE	RE	AL	RA	EL	TR	Q	K
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
pectrin_Q9H254.2_ca	TGLV	GA	RR	TR	LE	Q	N	L	A	L	A	L	A	L
Spectrin_luiza_	TGLV	GA	RR	TR	LE	Q	N	L	A	L	A	L	A	L
Consensus	TGLV	GA	RR	TR	LE	Q	N	L	A	L	A	L	A	L
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
pectrin_Q9H254.2_ca	QELEE	AE	S	M	A	R	D	K	E	R	L	L	E	A
Spectrin_luiza_	QELEE	AE	S	M	A	R	D	K	E	R	L	L	E	A
Consensus	QELEE	AE	S	M	A	R	D	K	E	R	L	L	E	A
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
pectrin_Q9H254.2_ca	DLDGL	D	M	L	R	D	A	Y	L	A	A	G	D	F
Spectrin_luiza_	DLDGL	D	M	L	R	D	A	Y	L	A	A	G	D	F
Consensus	DLDGL	D	M	L	R	D	A	Y	L	A	A	G	D	F
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
pectrin_Q9H254.2_ca	DSLDD	V	E	V	Q	H	R	F	E	S	L	D	Q	E
Spectrin_luiza_	DSLDD	V	E	V	Q	H	R	F	E	S	L	D	Q	E
Consensus	DSLDD	V	E	V	Q	H	R	F	E	S	L	D	Q	E
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
pectrin_Q9H254.2_ca	EPRQ	AL	LE	E	R	F	A	Q	A	R	L	H	G	A
Spectrin_luiza_	EPRQ	AL	LE	E	R	F	A	Q	A	R	L	H	G	A
Consensus	EPRQ	AL	LE	E	R	F	A	Q	A	R	L	H	G	A
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
pectrin_Q9H254.2_ca	GPGL	A	L	D	E	M	P	H	E	L	G	H	K	L
Spectrin_luiza_	GPGL	A	L	D	E	M	P	H	E	L	G	H	K	L
Consensus	GPGL	A	L	D	E	M	P	H	E	L	G	H	K	L
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
pectrin_Q9H254.2_ca	QQM	H	K	L	H	D	Q	L	E	L	Q	H	F	L
Spectrin_luiza_	QQM	H	K	L	H	D	Q	L	E	L	Q	H	F	L
Consensus	QQM	H	K	L	H	D	Q	L	E	L	Q	H	F	L

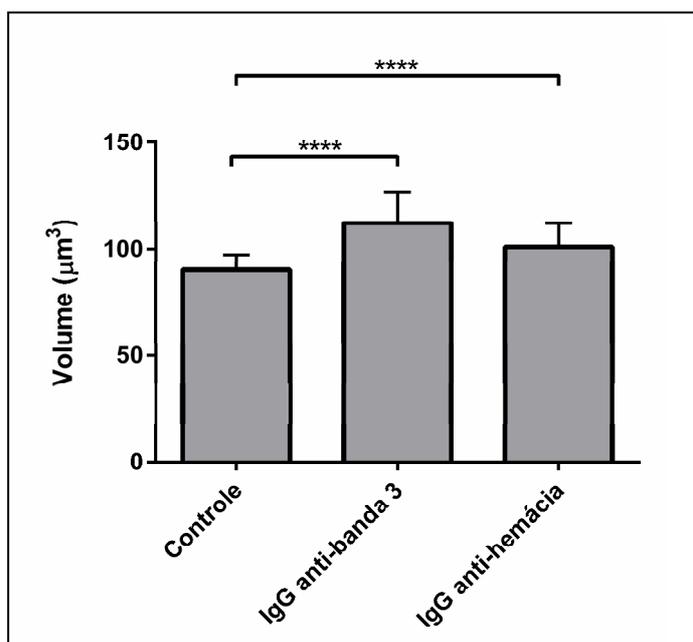
Figura 16. Alinhamento da sequência de espectrina, proteína selecionada como candidata ao mimetismo entre *P. vivax* e hemácia humana, com a sequência obtida pelo ensaio de imunoproteômica. Os aminoácidos selecionados em vermelho e azul correspondem, respectivamente, às regiões com alto e baixo grau de conservação compartilhado. Em preto, regiões neutras (presentes em uma sequência e ausentes em outra).

### **5.5. Avaliação, por meio da Microscopia de Desfocalização (MD), dos efeitos dos anticorpos anti-hemácia e anti-banda 3 na membrana da hemácia**

Uma vez que os experimentos de imunoproteômica mostraram que imunoglobulinas G direcionadas contra diferentes proteínas de hemácias estão aumentadas em pacientes infectados por *P. vivax*, associação esta ainda mais evidente em pacientes anêmicos, a etapa seguinte consistiu em se avaliar o efeito da ligação desses anticorpos na membrana de hemácias saudáveis, por meio da técnica de MD. A hipótese testada foi a de que a ligação de anticorpos às hemácias não infectadas altera a estrutura da membrana e do citoesqueleto dessas células, podendo ocasionar a sua remoção da circulação e contribuindo para a anemia.

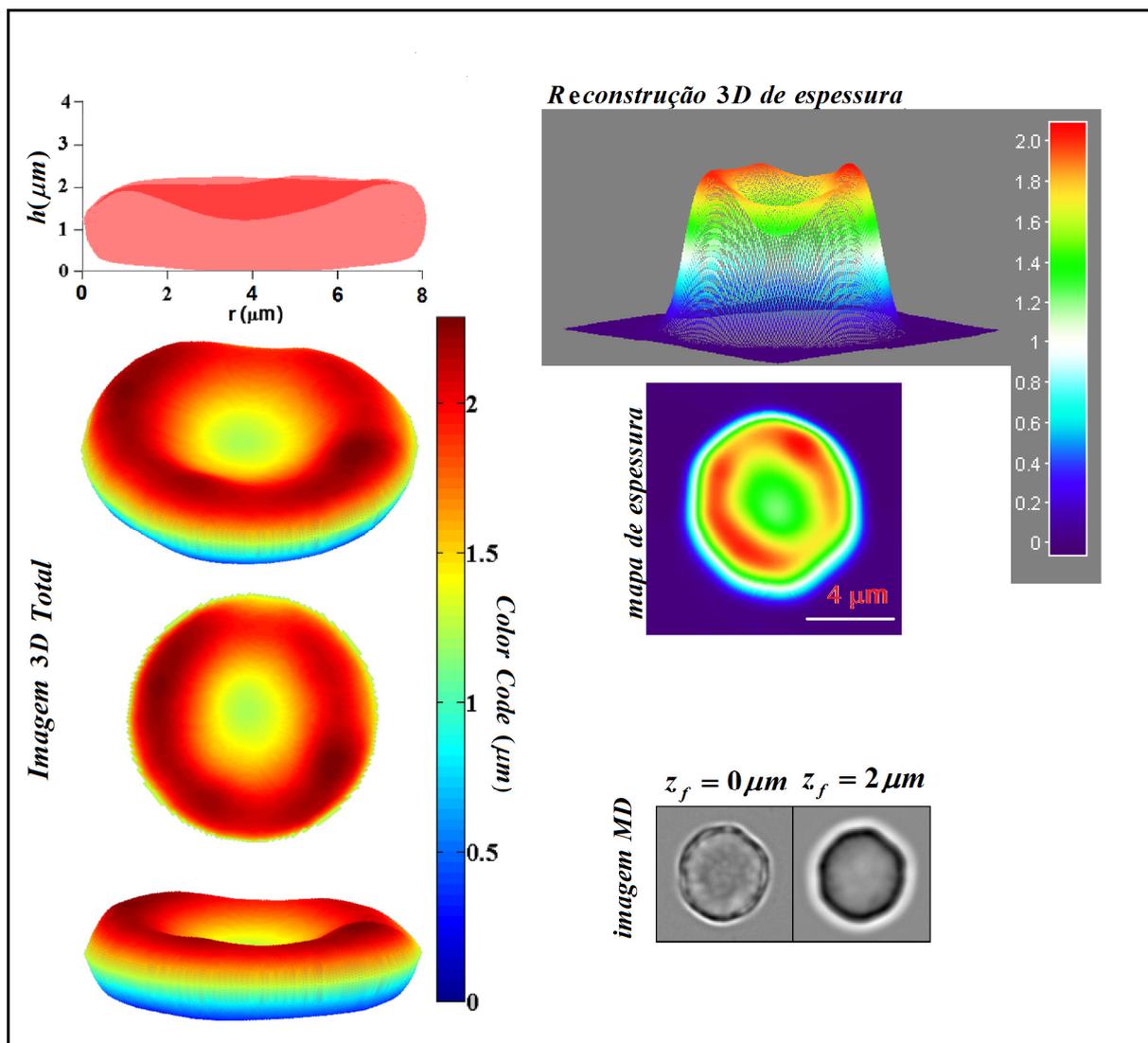
A evidência de que os anticorpos anti-banda 3 estavam aumentados nos soros de pacientes anêmicos, aliada ao fato de que essas imunoglobulinas têm sido associadas à remoção de hemácias senescentes em diferentes estudos (ARESE et al., 2005; LUTZ et al., 2012), levou-nos a utilizar um anticorpo monoclonal comercial anti-banda 3 nos ensaios de MD. Utilizamos, ainda, um anticorpo policlonal comercial anti-hemácia.

A adição de IgG anti-banda 3 aumentou o volume médio da hemácia em relação ao controle ( $112,4 \pm 14,2 \mu\text{m}^3$  versus  $90,0 \pm 7,3 \mu\text{m}^3$ , respectivamente;  $p < 0,0001$ ), o que também foi observado para o anticorpo anti-hemácia ( $101,0 \pm 11,2 \mu\text{m}^3$  versus  $90,0 \pm 7,3 \mu\text{m}^3$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 17).



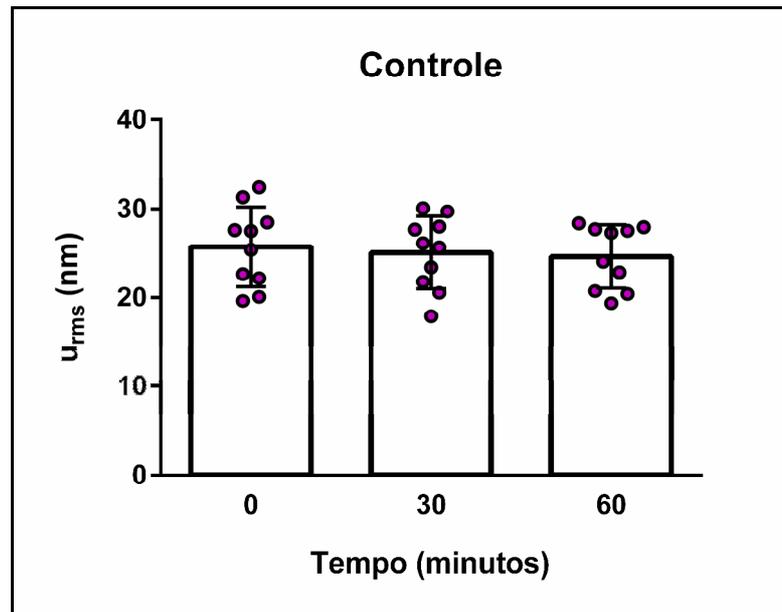
**Figura 17.** Avaliação dos efeitos dos anticorpos IgG anti-banda 3 e IgG anti-hemácia no volume das hemácias. As barras indicam a média e o desvio padrão do volume. O tamanho amostral dos grupos avaliados foi, respectivamente,  $n = 25$ ,  $n = 30$  e  $n = 30$ . Teste t para amostras independentes \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

Em relação ao índice  $k$ , que reflete a morfologia do eritrócito (disco bicôncavo, disco plano ou esferócito), a média e o desvio padrão encontrados para o controle, o IgG anti-banda 3 e o IgG anti-hemácia, foram, nesta ordem:  $0,52 \pm 0,01$ ;  $0,47 \pm 0,01$ ; e  $0,68 \pm 0,01$ . Logo, nenhum dos anticorpos alterou a forma bicôncava da hemácia (Figura 18).



**Figura 18.** Reconstrução tridimensional da espessura de uma hemácia à qual se adicionou IgG anti-hemácia. Não houve alteração na forma da célula embora tenha ocorrido alteração no volume.

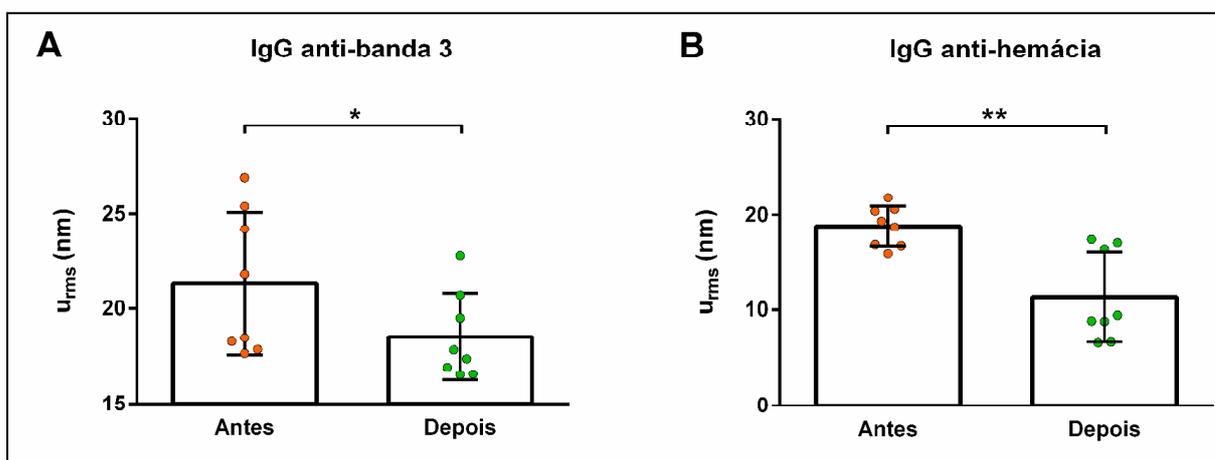
No que se refere ao parâmetro mecânico amplitude média das flutuações em altura da membrana ( $u_{rms}$ ), é importante comentar que, inicialmente, realizamos alguns testes, sem a adição de anticorpo, com o objetivo de avaliar se o tempo de duração do experimento interferia em tal parâmetro. Para isso, os valores de  $u_{rms}$  foram mensurados, para dez hemácias, em três diferentes momentos: antes de se adicionar o anticorpo; 30 minutos; e 60 minutos depois da adição. Não houve alteração significativa entre os valores médios de  $u_{rms}$  dos três diferentes intervalos de tempo (0 minuto:  $25,74 \pm 4,48$  versus 30 minutos:  $25,10 \pm 4,08$  versus  $24,64 \pm 3,57$ ; *One Way ANOVA*  $p = 0,1572$ ) (Figura 19). Partimos então, para os experimentos com os anticorpos.



**Figura 19.** Avaliação da interferência do intervalo de tempo do experimento na amplitude média das flutuações em altura ( $u_{rms}$ ) da membrana da hemácia. As barras indicam a média e o desvio padrão da  $u_{rms}$  durante os três diferentes intervalos de tempo testados: tempo zero, 30 minutos e 60 minutos. Foram avaliadas 10 hemácias por grupo. *One Way ANOVA*,  $p = 0,1572$ .

Diferenças significativas foram observadas quando comparamos as amplitudes médias das flutuações em altura das superfícies das hemácias antes e após a adição de cada anticorpo. Houve uma redução na  $u_{rms}$  após a adição do anticorpo IgG anti-banda-3 ( $u_{rms}$  antes:  $21,33 \pm 3,75$  versus  $u_{rms}$  depois:  $18,54 \pm 2,27$ ;  $p = 0,0103$ ), o que também ocorreu em relação à adição do anticorpo IgG anti-hemácia ( $u_{rms}$  antes:  $18,80 \pm 2,12$  versus  $u_{rms}$  depois:  $11,39 \pm 4,71$ ;  $p = 0,0078$ ) (Figura 20).

Esses resultados sugerem que a adição tanto de IgG anti-banda 3 quanto de IgG anti-hemácia altera as propriedades mecânicas da membrana da hemácia. Uma vez que os parâmetros mecânicos estão associados à elasticidade, é possível que a deposição desses anticorpos na membrana da hemácia comprometa a deformabilidade dessa célula, dificultando a sua passagem pelos capilares e levando à sua remoção no baço. A próxima etapa consistirá em avaliar se as IgGs purificadas dos diferentes grupos de indivíduos também promovem essas alterações na membrana eritrocitária, o que fornecerá informações importantes para a compreensão da destruição de eritrócitos não infectados na malária.



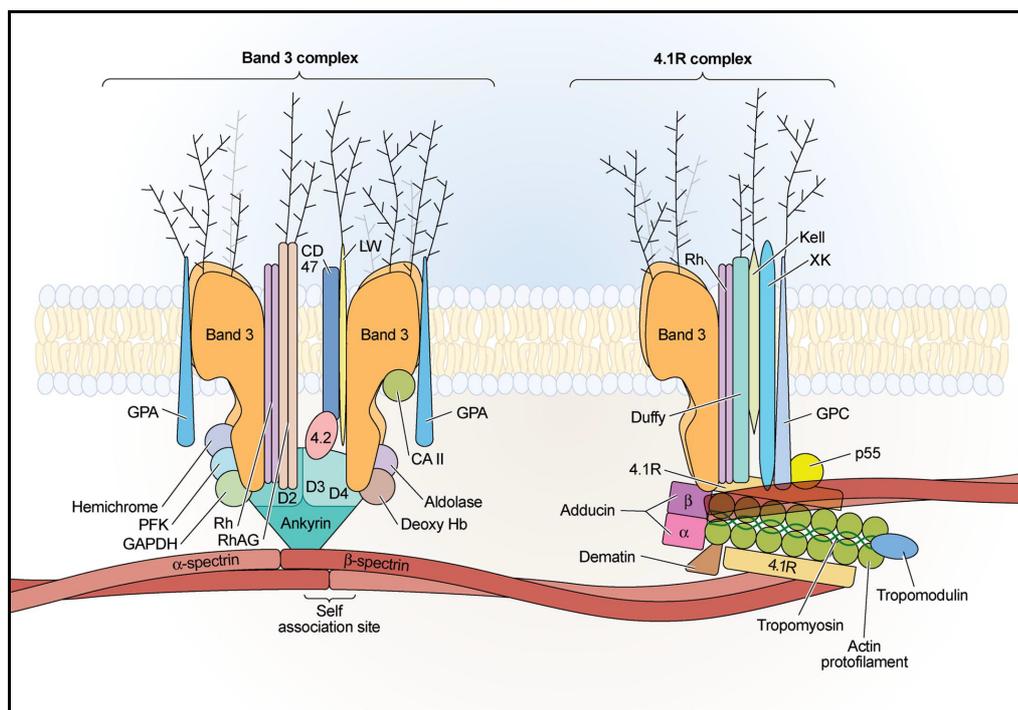
**Figura 20.** Avaliação dos efeitos dos anticorpos na amplitude média das flutuações em altura ( $u_{rms}$ ) da membrana da hemácia. As barras indicam a média e o desvio padrão da amplitude das flutuações em altura da membrana. Foram avaliadas oito hemácias por grupo. \* $p = 0,0103$ ; \*\* $p = 0,0078$ .

## 6. DISCUSSÃO

Dentre os diferentes fatores que contribuem para a anemia na malária, a destruição de eritrócitos não infectados parece ser o principal componente. Entretanto, as moléculas-chave e os mecanismos moleculares e imunológicos envolvidos nessa remoção de hemácias normais ainda são desconhecidos. Um dos elementos que poderia desempenhar um papel importante são os anticorpos gerados contra proteínas dos eritrócitos. Embora a presença desses autoanticorpos já tenha sido relatada em uma série de estudos, tanto em infecções por *P. falciparum* como em infecções por *P. vivax* (ROSENBERG et al., 1973; FACER, 1980; BERZINS et al., 1983), o papel dessas imunoglobulinas na patofisiologia da anemia ainda é obscuro devido à escassez de informações nesse sentido.

A fim de gerar informações que possam auxiliar no entendimento dos mecanismos imunológicos associados à anemia na malária vivax, primeiramente, utilizamos uma abordagem imunoproteômica para elucidar a natureza global da resposta de anticorpos direcionada para antígenos de hemácias normais. Para isso, selecionamos soros de pacientes com diferentes fenótipos clínicos, incluindo aqueles com quadros de anemia por malária vivax ou por outras etiologias, além de pacientes com malária sem anemia e indivíduos saudáveis. Diferentes proteínas imunogênicas de hemácias foram identificadas, contudo, grande parte delas corresponde a proteínas periféricas localizadas na face citoplasmática da bicamada de lipídeos da membrana, e que constituem o citoesqueleto da hemácia, como: a actina, a anquirina, a dematina, as espectrinas de cadeia alfa e beta, a flotilina, a proteína 4.1, a proteína 4.2 e a proteína banda 7 (Figura 21). Mas, cabe ressaltar, aqui, que uma proteína integral de membrana, a banda 3, também foi predominantemente reconhecida por soros de pacientes com malária, conforme será discutido posteriormente.

A baixa representatividade de proteínas de membrana é uma limitação comum nos experimentos de eletroforese bidimensional e está relacionada a diferentes fatores. O método de lise e os procedimentos de extração utilizados durante o preparo do extrato proteico de interesse, por exemplo, podem favorecer a obtenção de um determinado tipo de proteína, por promover efeitos específicos na membrana da célula (PASINI et al., 2010a, PASINI et al., 2010b). Nesse sentido, os métodos de extração que se baseiam na utilização de etanol favorecem a delipidação; aqueles que utilizam carbonato de cálcio promovem o rompimento das ligações iônicas; e, por sua vez, aqueles que utilizam o Tris-EDTA, como o adotado no presente estudo, desancoram o citoesqueleto (PASINI et al., 2010a; PASINI et al., 2010b).



**Figura. 21.** Representação esquemática mostrando algumas das proteínas identificadas por espectrometria de massa (Fonte: Adaptado de SALOMÃO et al., 2008).

Outro fator importante que também deve ser levado em consideração no preparo da amostra é o tipo de detergente utilizado. Nota-se, em geral, que devido à elevada hidrofobicidade, as proteínas de membrana apresentam baixa solubilidade nas soluções utilizadas para a focalização isoeletrica e, quando a solubilização é possível, dificilmente essas proteínas são transferidas das fitas de IPG para o SDS-PAGE (GORG et al., 2009). Como essa solubilização geralmente é promovida pelo detergente, a escolha do composto mais apropriado para a amostra que se deseja estudar é considerada uma das etapas limitantes para a obtenção de um extrato de boa qualidade. A melhor escolha geralmente é empírica e deve levar em consideração os objetivos do estudo, o tipo de amostra e o custo (LUCHE et al., 2003). Além dos fatores mencionados anteriormente, outro fator limitante para a obtenção de proteínas de membrana é o acesso da tripsina aos sítios de clivagem nessas proteínas, devido à blindagem pelos lipídeos a elas associados (PASINI et al., 2006).

De uma forma geral, observamos que uma mesma proteína foi identificada em mais de um *spot* no mesmo gel, tanto pela análise por *MS/MS Ion Search*, quanto por interpretação manual dos espectros. Além disso, para a maioria dos *spots* identificados, houve discrepância entre os valores de massa molecular e/ou ponto isoeletrico experimental em relação aos

preditos pelos bancos de dados. Essas observações justificam-se pela existência de variantes de uma mesma proteína, resultantes de modificações pós-traducional, duplicação gênica ou *splicing alternativo*, que mantêm o perfil imunogênico (SEO & LEE, 2003; PASINI et al., 2010a; PASINI et al., 2010b). Embora o extrato tenha sido obtido na presença de um coquetel contendo diferentes inibidores de peptidases, outra possibilidade que não pode ser descartada é a clivagem ou a degradação das proteínas por peptidases, gerando diferentes fragmentos proteolíticos.

Com relação aos demais *spots* não identificados pelas estratégias adotadas neste estudo, verificou-se que a maioria apresentou espectros de massa pouco complexos ou de difícil interpretação. Várias são as possibilidades para explicar o insucesso na identificação desses *spots*: a baixa concentração do analito; a presença de contaminantes que dificultam a acessibilidade da tripsina aos sítios de clivagem, ou que interferem na espectrometria por fragmentarem-se junto com o analito, podendo, dessa forma, suprimir o sinal da amostra de interesse; a seqüência primária da proteína, pois a tripsina requer sítios em resíduos de argina e lisina para exercer a sua função e, quando esses sítios são seguidos de prolina ou possuem resíduos ácidos, a clivagem não é favorecida; e, finalmente, devido à reação que pode ocorrer, durante a eletroforese, entre os grupos sulfidril da proteína e a acrilamida não polimerizada do gel, ligação esta que resulta em uma baixa eluição dos peptídeos durante sua extração do gel (BIENVENUT, 2005). Finalmente, a ionização por MALDI acoplada à análise de massa por TOF, embora seja adequada a amostras obtidas por eletroforese, apresenta resolução e acurácia de massa relativamente baixas em relação a outros métodos atualmente disponíveis.

Diferentes estratégias metodológicas têm sido propostas e utilizadas em conjunto, para superar esses obstáculos, incluindo desde o uso de diferentes procedimentos bioquímicos para o subfracionamento da hemácia até o uso de diferentes tipos de espectrômetros de massa (LIN et al., 2000; WU et al., 2003; PASINI et al., 2006; GOODMAN et al., 2007). Graças a essas estratégias, tem sido possível identificar proteínas extracelulares de baixa abundância (PASINI et al., 2006). Essas alternativas poderão ser utilizadas, em estudos futuros, por nosso grupo, para melhorar a detecção de proteínas de baixa abundância que podem ter sido subestimadas neste estudo.

A reatividade observada para os soros dos grupos-controle (indivíduos saudáveis sem anemia e pacientes com anemia por outras etiologias) contra antígenos que normalmente não são expostos se deve à presença de autoanticorpos, que participam da manutenção da homeostase do organismo (LUTZ, 2007). De fato, anticorpos direcionados para proteínas do

citoesqueleto participam da remoção de debris provenientes de células lisadas (LUTZ & WIPF, 1992), ao passo que anticorpos anti-banda 3, estão envolvidos na remoção de hemácias senescentes (KAY et al., 1982; PANTALEO et al., 2008).

Os anticorpos dos grupos com infecção patente por *P. vivax* reconheceram um amplo repertório de antígenos eritrocitários. Visivelmente, o número de proteínas reconhecidas e a intensidade desse reconhecimento foram maiores para os soros de pacientes com malária, quando comparado aos resultados observados para os soros de pacientes com anemia por outras etiologias e de indivíduos saudáveis não infectados. Essa presença de elevados níveis de anticorpos contra proteínas de hemácias, observada na malária vivax, já é bem documentada na literatura (BERZINS et al., 1983; FERNANDES et al., 2008). Entretanto parte desses estudos não levou em consideração a presença de anemia, ou, ainda, não identificou as principais proteínas imunogênicas das hemácias; características estas, consideradas no presente estudo.

A produção exacerbada de anticorpos contra antígenos próprios também tem sido relatada em indivíduos infectados por *P. falciparum*. Nesses casos, anticorpos contra a espectrina  $\alpha$ -II, a epectrina de cadeia beta 3 e a beta-tubulina têm sido associados à malária cerebral em populações do Gabão (GUIYEDI et al., 2007), do Quênia (GITAU et al., 2013) e da Índia (BANSAL et al., 2009), fornecendo evidências em favor do uso desses anticorpos como potenciais biomarcadores de malária grave.

Essa produção elevada de autoanticorpos na malária pode ser explicada sob diferentes perspectivas. Durante a infecção, a hemólise de hemácias infectadas promove a exposição de proteínas citoplasmáticas e alguns antígenos e/ou mitógenos do parasito, liberados durante a ruptura celular, podem, por exemplo, levar a uma ativação policlonal não específica de linfócitos B (FREEMAN & PARISH, 1978) e, estimular, em particular, o repertório fisiológico dessas células que possuem uma capacidade natural de reagir contra vários antígenos próprios e/ou do ambiente (MOUTHON et al., 1996).

Outra possibilidade seria o mimetismo molecular, que se baseia no compartilhamento de similaridades antigênicas, estruturais ou funcionais entre proteínas do parasito e proteínas do hospedeiro. Seguindo-se essa linha de raciocínio, um anticorpo direcionado contra uma proteína do parasito reagiria, também, contra a célula hospedeira, disparando uma resposta autoimune que permitiria a evasão do parasito, e, ao mesmo tempo, desempenharia um papel na patologia da anemia (OLDSTONE, 1998).

Essa idéia do mimetismo já foi proposta para infecções por *P. falciparum* (ANDERS, 1986), e diferentes candidatos têm sido apontados. Dentre eles, citam-se: a proteína PfMSP-1, que possui motivos semelhantes aos do fator de crescimento epidermal humano (BLACKMAN et al., 1991); a PFTCTP [PFTCTP – *Plasmodium falciparum* translationally tumor protein], homóloga ao fator liberador da histamina [HRF – *Histamine-releasing factor*] humano (MacDONALD et al., 2001); e, mais recentemente, a proteína 1 da membrana de eritrócito de *P. falciparum* [PfEMP1 – *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1], que compartilha motivos com a vitronectina humana (LUDIN et al., 2011). Entretanto, dados nesse sentido são escassos para *P. vivax*, principalmente no que tange a sua possível associação aos quadros clínicos da infecção por essa espécie.

Diante do exposto, investigamos, neste estudo, a possibilidade de *P. vivax* compartilhar determinantes antigênicos com as hemácias do hospedeiro. Para realizar essas análises, foram utilizadas as seqüências das proteínas identificadas por, nós após a imunoproteômica. Nossos resultados mostraram que somente as espectrinas apresentaram alta sintonia com os bancos de dados de *P. vivax* e do hospedeiro, resultado esse que pode explicar a excessiva produção de anticorpos anti-espectrina observada em pacientes com malária vivax.

A indução de elevados níveis de anticorpos contra as espectrinas também já foi descrita em infecções murinas com uma cepa virulenta de *P. chabaudi*. Verificou-se, durante essas infecções, que tais anticorpos aparecem poucos dias após o pico de parasitemia e persistem por várias semanas após a remoção do parasito (TERNYNCK et al., 1991). Ainda para essa mesma espécie de *Plasmodium*, também já foi relatada a existência de uma proteína do parasito que contém uma região repetitiva, cuja estrutura se assemelha à da espectrina (WERNER et al., 1998), fornecendo mais evidências em favor da hipótese do mimetismo.

Curiosamente, pacientes do grupo com malária e anemia apresentaram uma resposta intensa de anticorpos contra a banda 3, uma proteína integral de membrana, abundante na superfície do eritrócito. Essa resposta aumentada de autoanticorpos pode ser decorrente da maciça liberação de microvesículas oriundas de hemácias durante as infecções por *P. vivax* (CAMPOS et al., 2010; NANTAKOMOL et al., 2011). Como essas partículas contêm, em sua estrutura, diferentes proteínas derivadas da membrana de eritrócito, principalmente a banda 3 (TISSOT et al., 2013), além de outras proteínas derivadas do parasito (KRIEBARDIS et al., 2007; DINKLA et al., 2012; MANTEL et al., 2013), é possível que a presença dessas

estruturas na circulação estimule o aumento na produção de IgG anti-banda 3 nos soros dos grupos de indivíduos infectados.

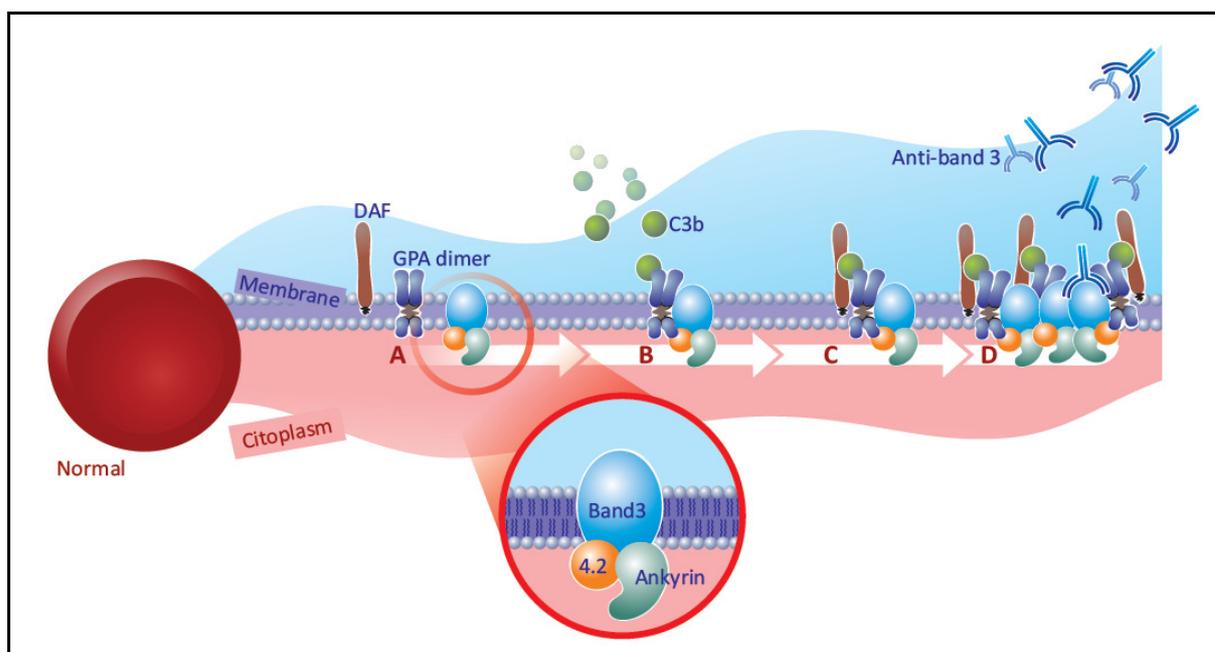
Para infecções por *P. falciparum*, duas regiões não glicosiladas localizadas na porção extracelular da banda 3 podem atuar como receptores para a ligação das proteínas MSP1<sub>42</sub> e MSP1<sub>19</sub> do parasito durante o processo de invasão das hemácias (GOEL et al., 2003). Por essa razão, a presença de anticorpos anti-banda 3 tem sido associada à proteção em áreas de transmissão intensa de malária falciparum (HOGH, et al., 1994; LUGINBUHL et al., 2007). No que se refere à malária vivax, foi recentemente demonstrado que dois antígenos de *P. vivax* ricos em triptofano, PvTRAg38 e PvTRAg [PvTRAg74 – *P. vivax tryptophan rich antigens*], são capazes de se ligar à banda 3 (TYAGI & SHARMA, 2012). Entretanto, a relação entre a resposta imune contra essa proteína e o seu papel na patofisiologia da malária vivax ainda é um assunto pouco explorado, principalmente no que se refere à anemia. Nota-se, contudo, estudos envolvendo medicina da transfusão, anemia auto-imune e homeostase de hemácias, entre outras, anticorpos contra a banda 3 têm sido associados à remoção de hemácias danificadas e senescentes (KAY et al., 2006; DINKLA et al., 2012).

A proteína banda 3 apresenta dois domínios funcionais: um domínio transmembrânico, que atravessa de 12 a 13 vezes a bicamada lipídica, e é responsável pela troca de íons; e um domínio citoplasmático, que fornece sítios de ligação para as proteínas do citoesqueleto, bem como para as enzimas da via glicolítica e para a hemoglobina (PASSOW et al., 1986). Reconhecido este fato, testamos a hipótese de que a ligação de anticorpos anti-banda 3, produzidos durante a malária, poderia induzir modificações bioquímicas capazes de perturbar, de alguma maneira, a membrana da hemácia, facilitando a remoção dessa célula no baço e contribuindo para a anemia. Para isso, nós utilizamos a técnica de microscopia de desfocalização, que se baseia na análise do contraste entre as imagens de uma célula fora de fase. Essa técnica fornece informações em tempo real da célula e permite avaliar as suas propriedades morfológicas e biomecânicas. Esta técnica foi proposta recentemente pelo grupo do Prof. Dr. Oscar Nassif de Mesquita, do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais, como uma potencial ferramenta para a caracterização de parâmetros morfológicos e elásticos da membrana de hemácias, os quais são diretamente influenciados pela ação de agentes químicos e físicos e, ainda, por várias doenças hematológicas (LAPA, 2014). Portanto, a aplicação dessa técnica para a análise do efeito de diferentes anticorpos sobre a membrana de eritrócitos saudáveis é apropriada e foi utilizada, pela primeira vez, neste estudo. Nossos resultados mostraram que a ligação de um anticorpo monoclonal anti-

banda 3 a hemácias normais não infectadas provocou alterações significativas no volume dessas células, situação esta também observada para a opsonização com um anticorpo policlonal anti-hemácia. Quando avaliamos as propriedades mecânicas da membrana, também obtivemos resultados interessantes e promissores. Verificou-se uma redução na média da amplitude de flutuação em altura da membrana após a adição dos anticorpos IgG anti-banda-3 e IgG anti-hemácia. Este fato indica que ambos os anticorpos reduzem a deformabilidade dos eritrócitos. Estudos futuros avaliando os efeitos das imunoglobulinas G purificadas dos pacientes com malária vivax serão essenciais para confirmar os efeitos e o papel desses anticorpos na remoção de hemácias não infectadas, já que a ligação dessas imunoglobulinas à membrana de eritrócitos pode ser uma das razões que justifica a proporção substancial de hemácias normais (15%), de pacientes infectados por *P. vivax*, destruída após a passagem por capilares estreitos simulando os sinusoides esplênicos, em estudo realizado por HANDAYANI et al. (2009). Em infecções por *P. falciparum* a redução na deformabilidade de eritrócitos não infectados é considerada um importante indicador de anemia (DONDORP et al., 1999). Várias hipóteses já foram levantadas para explicar essa diminuição na deformabilidade, incluindo, desde a peroxidação de lipídeos da membrana do eritrócito por monócitos (MOHAN et al., 1995), à ligação de um antígeno liberado por *P. falciparum* capaz de se ligar reversivelmente à membrana da hemácia (NAUMAN et al., 1991). Entretanto, este é o primeiro trabalho a fornecer evidências de que os anticorpos também participam desse processo.

Como agiriam, então, os anticorpos anti-banda 3 na remoção de hemácias não infectadas durante a malária vivax? É possível que este anticorpo atue de maneira semelhante à observada para outros ligantes extracelulares, que, de uma forma geral, promovem interações fortes ou transitórias entre proteínas integrais de membrana, impedindo a distorção local da rede do citoesqueleto da membrana em resposta à tensão de cisalhamento sofrida durante o fluxo da célula por vasos sanguíneos estreitos. A banda 3 também já foi incluída em um modelo que aponta para um mecanismo molecular que associa a ativação do complemento a alterações globais na organização da membrana de eritrócitos. Segundo esse modelo, a ativação do complemento gera C3b, que se liga, predominantemente, a dímeros de glicoforina A (GPA). Essa ligação, por sua vez, estimula a formação de um complexo C3b-GPA-banda 3 associado à espectrina do citoesqueleto via anquirina, ao qual o DAF também se associa e se torna imobilizado pela interação com C3b-GPA. A formação desse complexo resulta em alterações secundárias que afetam as propriedades viscoelásticas da membrana

(KARNCHANAPHANURACK et al., 2009). Levando-se em consideração esse modelo, é possível especular que a excessiva produção de anticorpos anti-banda 3 detectada no grupo de indivíduos com malária e anemia possa ativar, ainda mais, o complemento, levando à formação de vários complexos semelhantes ao descrito (Figura 22). Essas alterações, associadas à outros tipos de lesão, como às decorrentes da ação de espécies reativas de oxigênio, de citocinas e quimiocinas, ou, ainda, da deposição de antígenos do parasito, resultariam em uma maior suscetibilidade das hemácias não infectadas à fagocitose, como já foi mostrado para as hemácias normais de indivíduos infectados anêmicos, descrita em infecções por *P. falciparum* (WAITUMBI et al., 2000). Estudos futuros devem ser realizados para elucidar melhor essas possibilidades.



**Figura 22.** Modelo proposto para explicar alterações nas propriedades viscoelásticas da membrana das hemácias associadas à ligação de anticorpos anti-banda 3.

Os mecanismos esplênicos também contribuem para a exacerbação da anemia em modelo murino. Nesse modelo, a remoção do parasito, induzida por linfócitos T CD8<sup>+</sup>, gera intermediários que estimulam os mecanismos de remoção inata dos macrófagos no baço. A morte do parasito também provoca alterações nas propriedades das hemácias não infectadas, fazendo com que essas células sejam removidas por macrófagos ativados ou, ainda, fazendo com que a filtração de tais hemácias seja limitada através dos sinusoides esplênicos. Tem sido

sugerido que esses eventos ocorrem devido a alterações estéricas ou antigênicas nas hemácias não infectadas, que resultam no aprisionamento dessas células na polpa vermelha, potencializando a remoção neste local (SAFEUKUI et al., 2015).

Em síntese, nossos resultados sugerem que a resposta de anticorpos induzida pela infecção pode estar associada aos mecanismos patogênicos que levam à anemia na malária vivax. Entretanto, como a banda 3, um dos principais alvos da resposta de IgG em pacientes infectado anêmicos, é uma proteína cuja estrutura externa é rica em carboidratos, estudos futuros objetivando identificar o sítio de ligação de anticorpos anti-banda 3 permitirão elucidar se tais anticorpos se ligam à porção protéica ou aos carboidratos de tal proteína. Pretende-se, ainda, realizar ensaios envolvendo canais iônicos para avaliar se a ligação de anticorpo à banda 3 inibe o transporte de íons, o que poderia explicar as alterações na morfologia e mecânica das hemácias observadas neste estudo. Ensaio de eritrofagocitose também serão utilizados para avaliar o efeito da ligação de diferentes autoanticorpos na remoção de hemácias em modelos *in vitro*. Outros alvos de investigação serão as alterações no comportamento de hemácias decorrentes da adição de anticorpos específicos, que serão avaliadas em um modelo microfluídico com fluxo laminar de cisalhamento, simulando os capilares da microcirculação. Outro ponto que não foi abordado neste estudo e que merece ser investigado melhor é avaliar a capacidade dos autoanticorpos detectados no presente trabalho em estimular a lise mediada pelo complemento, o que poderia ser testado por meio de ensaios funcionais. Novas investigações deverão incluir, ainda, a avaliação dos efeitos de imunoglobulinas M (IgM) na remoção de eritrócitos não infectados, além de levar em consideração, ainda, a contagem de reticulócitos, bem como a presença de doenças que afetam a deformabilidade das hemácias, como as talassemias e a anemia falciforme, informações estas ausentes para os pacientes avaliados neste estudo. Assim, será possível gerar dados importantes que ampliarão a compreensão sobre os mecanismos envolvidos na anemia em infecções por *P. vivax* e que poderão, ainda, direcionar as pesquisas científicas para o desenvolvimento de quimioterápicos, estratégias de vacinação mais apropriadas, diagnóstico, e ferramentas de vigilância sorológica.

## 7. CONCLUSÃO

- A infecção por *P. vivax* induz a produção de anticorpos que reconhecem inúmeros componentes das membranas de eritrócitos.
- Proteínas de citoesqueleto como a anquirina, a dematina, a banda 7 e a proteína 4.2 são exclusivamente reconhecidas por soros de pacientes com malária vivax.
- As espectrinas (principalmente a cadeia beta), a actina e a banda 3 as proteínas são predominantemente reconhecidas por soros de pacientes com malária vivax.
- Anticorpos de pacientes anêmicos infectados por *P. vivax* reconhecem intensamente a banda 3.
- As espectrinas foram selecionadas como proteínas candidatas ao mimetismo entre humanos e *P. vivax*,
- A opsonização de hemácias saudáveis por IgG anti-hemácia, bem como por IgG anti-banda 3 modifica o volume e as propriedades mecânicas dessas células, diminuindo a deformabilidade, e podendo contribuir para a sua destruição.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA P, PALLAVI R, CHANDRAN S, DANDAVATE V, SAYEED SK, ROCHANI A, ACHARYA J, MIDDHA S, KOCHAR S, KOCHAR D, GHOSH SK, TATU U. Clinical proteomics of the neglected human malarial parasite *Plasmodium vivax*. *Plos One*, v.6, p.e26623, 2011.

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.

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v.215, p.403-410, 1990.

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.

ANDERS RF. Multiple cross-reactivities amongst antigens of *Plasmodium falciparum* impair the development of protective immunity against malaria. *Parasite Immunology*, v.8, p.529-539, 1986. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.4, p.e650, 2010.

ANDRADE BB, FILHO AR, NETO SMS, NETTO IR, CAMARGO LMA, BARRAL A, NETTO MB. Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malaria severity.

ANSTEY NM, GRANGER DL, HASSANALI MY, MWAIKAMBO ED, DUFFY PE, WEINBERG B. 1999. Nitric oxide, malaria, and anemia: inverse relationship between nitric oxide production and hemoglobin concentration in asymptomatic, malaria-exposed children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.61, p. 249-252, 1999.

ANSTEY NM, HANDOJO T, PAIN MCF, KENANGALEM E, TJITRA E, PRICE RN, MAGUIRE P. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary

vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *The Journal of Infectious Diseases*, v.195, p.589-596, 2007.

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

ANSTEY NM, DOUGLAS NM, POESPOPRODJO JR, PRICE RN. Chapter 3 – *Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Advances in Parasitology*, v.80, p. 151-201, 2012.

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

ARTAVANIS-TSAKONAS K, TONGREN JE, RILEY EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clinical and Experimental Immunology*, v.133, p. 145-152, 2003.

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

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

BACHMANN J, BURTE F, PRAMANA S, CONTE I, BROWN BJ, ORIMADEGUN AE, AJETUNMOBI WA, AFOLABI NK, FRANCIS AKINKUNMI, OMOKHODION S, AKINBAMI FO, SHOKUNBI WA, KAMPFT C, PAWITAN Y, UHLEN M, SODEINDE O, SCHWENK JM, WAHLGREN M, REYES DF, NILSSON P. Affinity proteomics reveals elevated muscle proteins in plasma of children with cerebral malaria. *PLoS Pathogens*, v.4, p.e1004038, 2014.

BAER K, KLOTZ C, KAPPE SHI, SCHNIEDER T, FREVERT U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathogens*, v.3:e171, 2007.

BAIRD JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, p.4075-4083, 2004.

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

BANIC DM, VIANA-MARTINS FS, SOUZA JM, PEIXOTO TD, DANIEL-RIBEIRO C. Polyclonal B-lymphocyte stimulation in human malaria and its association with ongoing parasitemia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.44, p.571-577, 1991.

BANSAL D, HERVERT F, LIM P, DESHPANDE P, BÉCAVIN 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.e8245, 2009.

BARGIERI DY, ANDENMATTEN N, LAGAL V, THIBERGE S, WHITELAW JA, TARDIEUX I, MEISSNER M, MÉNARD R. Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. *Nature Communications*, v.4, p.2552. , 2013.

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.

BIEMANN K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry*, v.16, p.99-111, 1988.

BIENVENUT WV. Acceleration and improvement of protein identification by mass spectrometry. *Springer Science & Business*, 5 de dezembro de 2005, 320 páginas.

BILGIN R, YALCIN MS, YUCEBILGIC g, KOLTAS IS, YAZAR S. Oxidative stress in vivax malaria. *Korea Journal of Parasitology*, v.50, p.375-377, 2012.

BISWAS S, SHARMA S, SAROHA A, BHAKUNI DS, MALHOTRA R, ZAHUR M, OELLERICH M, DAS HR, ASIF AR. Identification of novel autoantigen in the synovial fluid of rheumatoid arthritis in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients using an immunoproteomics approach. *PLOS One*, v.8, p.e56246, 2013.

BLACKMANMJ, LING IT, NICHOLLS SC, HOLDER AA. Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.49, p.29-33, 1991.

BOJANG KA, VAN HENS BROEK MB, PALMER WA, JAFFAR S, GREENWOOD BM. Predictors of mortality in Gambian children with severe malaria anaemia. *Annals of tropical paediatrics*, v.17, p.355-359, 1997.

BRATTIG NW, KOWALSKY K, LIU X, BURCHARD GD, KAMENA F, SEEBERGER PH. *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol toxin interacts with the membrane of non-parasitized red blood cells: a putative mechanism contributing to malaria anemia. *Microbes and Infection*, v.10, p.885-891, 2008.

CAMACHO LH, GORDEAUK VR, WILAIRATANA P, POOTRAKUL P, BRITTENHAM GM, LOOAREESUWAN S. The course of anaemia after the treatment of acute, falciparum malaria malaria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.92, p.525-537, 1998.

CAMPOS FMF, FRANKLIN BS, TEIXEIRA-CARVALHO A, FILHO ALS, PAULA SCO, FONTES CJ, BRITO CF, CARVALHO LH. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malaria Journal*, v.9, p.e327, 2010.

CANTÚ MD, CARRILHO E, WULFF NA, PALMA MS. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova*, v.31, p.669-675, 2008.

CASTILLO P, MENÉNDEZ C, MAYOR A, CARRILHO C., ISMALL MR, LORENZONI C, MACHUNGO F, OSMAN N, QUINTÓ L, ROMAGOSA C, DOBAÑO C, ALONSO PL, ORDI J. Massive *Plasmodium falciparum* visceral sequestration: a cause of maternal death in Africa. *Clinical Microbiology and Infection*, doi: doi: 10.1111/1469-0691.12068, 2012.

CHANG K-H & STEVENSON. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *International Journal for Parasitology*, v.34, p.1501-1516, 2004.

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.e226, 2013.

CLARK IA & CHAUDRI G. Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *British Journal of Haematology*, v.70, p.99-103, 1988.

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.

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

COPPI A, TEWARI R, BISHOP JR, BENNETT BL, LAWRENCE R, ESKO JD, BILLKER O, 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.

COSTA RM, NOGUEIRA F, SOUSA KP, VITORINO R, SILVA MS. Immunoproteomic analysis of *Plasmodium falciparum* antigens using sera from patients with clinical history of imported malaria. *Malaria Journal*, v.12, p.100, 2013.

COWMAN AF, CRABB BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, v.124, p.755-766, 2006.

COX-SINGH J, DAVIS TME, LEE KS, SHASUL SSG, MATUSOP A, RATNAM S, RAHMAN HA, CONWAY DJ, SINGH B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical Infectious Disease*, v.46, p.165-171, 2008.

CUSICK MF, LIBBEY JE, FUJINAMI RS. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, v.42, p.102-111, 2012.

DASARI P, FRIES A, HEBER SD, SALAMA A, BLAU I, LINGELBACH K, BHAKDI S, UDOMSANGPETCH R, TORZEWSKI M, REISS K, BHAKDI S. Malarial anemia: digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* mediates complement deposition on bystander cells to provoke hemophagocytosis. *Medical Microbiology and Immunology*, v.203, p.383-393, 2014.

DAWSON PH. Quadrupole mass analyzers: performance, design and some recent applications. *Mass Spectrometry Reviews*, v.5, p.1-37, 1986.

DENNEHY R & McCLEAN S. Immunoproteomics: the key to discovery of new vaccine antigens against bacterial respiratory infections. *Current Proteins and Peptide Science*, v.13, p.807-815, 2012.

DINKA S, NOVOTNÝ VMJ, JOOSTEN I, BOSMAN GJCG. Storage-induced changes in erythrocyte membrane proteins promote recognition by autoantibodies. *PloS One*, v.7, p.e42250.

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.

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

EREL O, KOCYIGIT A, AVCI S, AKTEPE N, BULUT V. 1997. Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. *Clinical Biochemistry*, v.30, p.631-639, 1997.

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.

FACER CA. Direct Coombs antiglobulin reaction in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical and Experimental Immunology*, v.39, p.279-288, 1980.

FALISSE-POIRRIER N, RUELLE V, ELMOUALIJ B, ZORZI D, PIERARD O, HEINEN E, DE PAUW E, ZORZI W. Advances in immunoproteomics for serological characterization of microbial antigens. *Journal of Microbiological Methods*, v.67, p.593-596, 2006.

FARKAS I, BARANYI I, ISHIKAWA Y, OKADA N, BOHATA C, BUDAI D, FUKUDA A, IMAI M, OKADA H. CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *The Journal of Physiology*, v.539, p.537-545, 2002.

FENDEL R, BRANDTS C, RUDAT A, KREIDENWEISS A, STEUR C, APPELMANN I, RUEHE B, SCHRODER P, BERDEL WE, KREMSNER PG, MORDMULLER B. Hemolysis is associated with low reticulocyte production index and predicts blood transfusion in severe malarial anemia. *PLoS One*, v.5, p.e10038, 2010.

FERNANDES AAM, CARVALHO LJM, ZANINI GM, VENTURA MRS, SOUZA JM, COTIAS PM, SILVA-FILHO IL, DANIEL-RIBEIRO CT. Similar Cytokine Responses and

Degrees of Anemia in Patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Infections in the Brazilian Amazon Region. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.15, p.650-658, 2008.

FLORENS L, WASHBURN MP, RAIME JD, ANTHONY RM, GRAINGER M, HAYNES JD, MOCH JK, MUSTER N, SACCI JB, TABB DL, WITNEY AA, WOLTERS D, WU Y, GARDNER MJ, HOIDER AA, SINDEN RE, YATES JR, CARUCCI DJ. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, v.419, p.520-526, 2002.

FENN JB, MANN M, MENG CK, WONG SF. Electrospray ionization –principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*, v.9, p.37-70, 1990.

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.e276, 2010.

FONTAINE A, BOURDON S, BELGHAZI M, POPHILLAT M, FOURQUET P, GRANJEAUD S, TORRENTINO-MADAMET M, ROGIER C, FUSAI T, ALMERAS L. *Plasmodium falciparum* infection-induced changes in erythrocyte membrane proteins. *Parasitol Research*, v.110, p.545-556, 2012.

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.

FREEMAN RR, PARISH CR. Polyclonal B-cell activation during rodent malarial infections. *Clinical & Experimental Immunology*, v.32, p.21-45, 1978.

GALLIEN S, ROUSSILHON C, BLANC C, PÉRIGNON JL, DRUILHE P. Autoantibody against dendrite in *Plasmodium falciparum* infection: a singular auto-immune phenomenon preferentially in cerebral malaria. *Acta Tropica*, v.118, p. 67-70, 2011.

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, ELYAZAR IRF, MOYES CL, SMITH DL, BATTLE KE, GUERRA CA, PATIL AP, TATEM AJ, HOWES RE, MYERS MF, GEORGE DB, HORBY P, WERTHEIM HFL, PRICE RN, MUELLER I, BAIRD JK, HAY SI. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.6, p. e1814, 2012.

GIL LHS, TADA MS, KATSURAGAWA TH, RIBOLLA PEM, SILVA LHP. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmission with high anopheline densities are associated with human environmental changes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.102, p.271-276, 2007.

GITAU EN, KOKWARO GO, KARANJA H, NEWTON CRJ, WARD SA. Plasma and cerebrospinal proteomes from children with cerebral malaria differ from those of children with other encephalities. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 208, p.1494-1503, 2013.

GRANVOGL B, PLOSCHER M, EICHACKER LA. Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v.389, p.991-1002.

GOODMAN SR, KURDIA A, AMMANN L, KAKHNIASHVILI D, DAESCU O. The human red blood cell proteome and interactome. *Experimental Biology and Medicine*, v.232, p.1391, 2007.

GLUSHAKOVA S, YIN D, LI T, ZIMMERBERG J. Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. *Current Biology*, v.15, p.1645-1650, 2005.

GOEL VK, LI X, CHEN H, LIU S, CHISHT AH, OH SS. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, p.5164-5169, 2003.

GÖRG A, WEISS W, DUNN MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, v.4, p.3665-3685, 2004.

GORG A, DREWS O, LUCK C, WEILAND F, WEISS W. 2-DE with IPGs. *Electrophoresis*, v.30, p.s122-s132, 2009.

GREENWOOD BM, FIDOCK DA, KYLE DE, KAPPE SHI, ALONSO PL, COLLINS FH, DUFFY P. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*, v.118, p.1266-1276, 2008.

GUERRA CA, HOWES RE, PATIL AP, GETTING 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.e389, 2007.

GWAMAKA M, FRIED M, DOMINGO G, DUFFY PE. Early and extensive CD55 loss from red blood cells supports a causal role in malarial anemia. *Malaria Journal*, v.10, p.386, 2011.

GYAN B, KURTZHALS JAL, AKANMORI BD, OFORI M, GOKA BQ, HVIID L, BEHR C. Elevated levels of nitric oxid and low levels of haptoglobin are associated with severe malarial anaemia in african children. *Acta Tropica*, v. 83, p. 133-140, 2002.

HANASH, S. Disease proteomics. *Nature*, v.422, p.226-232, 2003.

HANDAYANI S, CHIU DT, TJITRA E, KUO JS, LAMPAH D, KENANGALEM E, RENIA L, SNOUMOU G, PRICE RN, ANSTEY NM, RUSSELL B. High deformability of

*Plasmodium vivax*-infected red blood cells under microfluidic conditions. *Journal of Infectious Diseases*, v. 199, p.445-450, 2009.

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.

HARRY JL, WILKINS MR, HERBERT BR, PACKER NH, GOOLEY AA, WILLIAMS KL. Proteomics: capacity versus utility. *Electrophoresis*, v.21, p.1071-1081, 2000.

HEMMER CJ, HOLST FG, KERN P, CHIWAKATA CB, DIETRICH M, REISINGER EC. Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or ovale than in *Plasmodium falciparum* malaria. *Tropical Medicine & International Health*, v.11, p.817-823, 2006.

HISSA B, PONTES B, ROMA PMS, ALVES AP, ROCHA CD, VALVERDE TM, AGUIAR PHN, ALMEIDA FP, GUIMARAES AJ, GUATIMOSIN C, SILVA AM, FERNANDES MC, ANDREWS NA, VIANA NB, MESQUITA ON, AGERO U, ANDRADE LO. Membrane Cholesterol Removal Changes Mechanical Properties of Cells and Induces Secretion of a Specific Pool of Lysosomes. *PloS ONE*, v.8, e.82988, 2013.

HISSA

HOGH B, PETERSEN E, CRANDALL I, GOTTSCHAU A, SHERMAN IW. Immune responses to band 3 neoantigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in subjects living in an area of intense malaria transmission are associated with low parasite density and high hematocrit value. *Infection and Immunity*, v.62, p.4363-4366, 1994.

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.0077-0084, 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.

JARAMILLO M, PLANTE I, OUELLET N, VANDAL K, TESSIER PA, OLIEVER M. 2004. Hemozoin-inducible proinflammatory events in vivo: potential role in malaria infection. *The Journal of Immunology*, v.172, p.3101-3110, 2004.

KALL L, KROGH A, SONNHAMMER EL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of molecular Biology*, v.338, p.1027-1036.

KARNCHANAPHANURACH P, MIRCHEV R, GHIRAN I, ASARA JM, PAPAHADJOPOULOS-STERNBERG B, NICHOLSON-WELLER A, GOLAN DE. C3b deposition on human erythrocytes induces the formation of a membrane skeleton-linked protein complex. *The Journal of Clinical Investigation*, v.119, p.788-800, 2009.

KARUNAWEEERA ND, WIJESEKERA SK, WANASEKERA D, MENDIS KN, CARTER R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. *TRENDS in Parasitology*, v.19, 188-193, 2003.

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

KARAS M, GLUCKMANN M, SHAFER J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry*, v.35, 0.1-12, 2000.

KAY MM, SORENSEN K, WONG P, BOLTON P. Antigenicity, storage, and aging: pphysiologic autoantibodies to cell membrane and serum proteins and the senescent cell antigen. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.49, p.65-85, 1982.

KAY MB. Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.15, p. 23611-23617, 1991.

KELLER CC, KREMSNER PG, HITTNER JB, MISUKONIS MA, WEIBERG JB, PERKINS DJ. Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*, v.72, p.4868-4873, 2004.

KIM Y, SHIM H, KIM K, PARK H, JANG S, PARK Y. Profiling individual human red blood cells using common-path diffraction optical tomography. *Scientific Reports*, v. 4, p.6659, 2014.

KITCHEN SF. The infection of reticulocytes by *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.s1-18, p. 347-359, 1938.

KLOSE J. protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Human Genetic*, v.26, p.231-243, 1975.

KOCHAR DK, SAXENA V, SINGH N, KOCHAR SK, KUMAR SV, DAS A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerging Infectious Diseases*, v.11, p.132-134, 2005.

KORIR JC, MAGAMBO JK, MWATHA JK, WAITUMBI JN. B-cell activity in children with malaria. *Malaria Journal*, v.11, p.e66, 2012.

KRIEBARDIS AG, ANTONELLOU MH, STAMOULIS KE, ECONOMOU-PETERSEN E, MARGARITIS LH, PAPASSIDERI IS. Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation. *Transfusion*, v.47, p.1212-1220, 2007.

LAPA PMR. Estudo da deformabilidade de Membrana de Hemácias em eventos de mudanças morfológicas via Microscopia de Desfocalização. 2014. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências – Física) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

LASONDER E, ISHIHAMA Y, ANDERSEN JS, VERMUNT AMW, PALN A, SAUERWEIN RW, ELING WMC, HALL N, WATERS AP, STUNNENBERG HG, MANN

M. Analysis of *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature*, v.419, p.537-542, 2002.

LAYEZ C, NOGUEIRA P, COMBES V, COSTA FTM, JUHAN-VAGUE I, da SIILVA LHP, GYSIN J. *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage. *Blood*, v. 106, p.3632-3638, 2005.

LEFRANÇOIS G, BOUVET E, LE BRAS J, VROKLANS M, SIMONNEAUM M, VACHON F. Anti-erythrocyte autoimmunization during chronic falciparum malaria. *Lancet*, v. 2, p.661-664, 1981.

LIBREGTS SF, GUTIÉRREZ L, BRUIN AM, WENSVEEN FM, PAPADOPOULOS P, IJCKEN W, OZGUR Z, PHILIPSEN S, NOLTE MA. Chronic IFN- $\gamma$  production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis. *Blood*, v.118, p. 2578-2588, 2011.

LIN C, COTTON F, BOUTIQUE C, DHERMY D, VERTONGEN F, GULBIS B. Capillary gel electrophoresis: separation of major erythrocyte membrane proteins. *Journal of Chromatography B*, v.742, p.411-419, 2000.

LIST EO, BERRYMAN DE, BOWER B, SACKMANN-SALA L, GOSNEY E, DING J, OKADA S, KOPCHICK JJ. The use of proteomics do study infectious diseases. *Infections Disorders*, v.8, p.31-45, 2008.

LOOAREESUWAN S, MERRY AH, PHILLIPS RE ET AL. Reduce erythrocyte survival following clearance of malarial parasitaemia in Thai patients. *British Journal of Haematology*, v.67, p.473-478, 1987.

LUBLIN DM. Review: Cromer and DAF: role in health and disease. *Immunohematology*, v.21, p.39-47, 2005.

LUCHE S, SANTONI V, RABILLOUD T. Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, v.3, p.249-253, 2003.

LUDIN P, NILSSON D, MASER P. Genome-wide identification of molecular mimicry candidates in parasites. *PLoS ONE*, v.6, p.e17546, 2011.

LUGINBUHL A, NIKOLIC M, BECK HP, WAHLGREN M, LUTZ U. Complement factor D, albumin, and immunoglobulin G anti-band 3 protein antibodies mimic serum in promoting rosetting of malaria-infected red blood cells. *Infection and Immunity*, v.75, p. 1771-1777, 2007.

LUTZ HU & WIPF G. Naturally occurring autoantibodies to skeletal proteins from human red blood cells. *The Journal of Immunology*, v.128, p.1695-1699, 1982.

LUTZ HU. Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview. *Journal of Autoimmunity*, v.29, p.287-294, 2007.

LUTZ HU. Naturally occurring anti-band 3 antibodies in clearance of senescent and oxidatively stressed human red blood cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v.39, p.321-327, 2012.

MACDONALD SM, BHISUTTHIBHAN J, SHAPIRO TA, ROGERSON SJ, TAYLOR TE, TEMBO M, LANGDON JM, MESHNICK SR. Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.98, p.10829-10832, 2001.

MACIEJEWSKI JP, SELLEN C, SATO T, CHO HJ, KEEFER LK, NATHAN CF, YOUNG NC. Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*, v.96, p. 1085-1092, 1995.

MAIER AG, COOKE BM, COWMAN AF, TILLEY L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nature Reviews*, v. 7, p.341-354.

MANTEL P, HOANG AN, GOLDOWITZ I, POTASHNIKOVA D, HAMZA B, VOROBEV I, GHIRAN I, TONER M, IRIMIA D, IVANOV AR, BARTENEVA N,

MARTI M. Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host & Microbe*, v.13, p.521-534, 2013.

MARIN-MENÉNDEZ A, BARDAJÍ A, MARTÍNEZ-ESPINOSA FE, BÔTTO-MENEZES, LACERDA MV, ORTIZ J, CISTERÓ P, PIQUERAS M, FELGER I, MUELLER I, ORDI J, DEL PORTILLO H, MENÉNDEZ C, WAHLGREN M, MAYOR A. Rosetting in *Plasmodium vivax*: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.7, p.e2155, 2013.

MEDOF ME, IIDA K, MOLD C, NUSSENZWEIG V. Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. *The Journal of Experimental Medicine*, v.156, p. 1739-1754, 1987.

MÉNARD R, TAVARES J, COCKBURN I, MARKUS M, ZAVALA F, AMINO R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nature Reviews Immunology*, v.11, p. 711-712, 2013.

MÉNDEZ D, HERNÁEZ ML, KAMALI AN, DIEZ A, PUYET A. Differential carbonilation of cytoskeletal proteins in blood group O erythrocytes: potential role in protection against severe malaria. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 18, p.1780-1787, 2012.

MENDIS KN, CARTER R. The role of cytokines in *Plasmodium vivax* malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.87, suplemento 3, p.51-55, 1992.

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.

MILLER LH, ACKERMAN HC, SU X, WELLEMS TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature Medicine*, v.19, p.156-167.

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

MILLHOLLAND MG, CHANDRAMOHANADAS R, PIZZARRO A, WEHR A, SHI H, DARLING C, LIM CT, GREENBAUM DC. The malaria parasite progressively dismantles the host erythrocyte cytoskeleton for efficient egress. *Molecular & Cellular Proteomics*, v.10, p.M111.010678, 2011.

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

MOHAN K, DUBEY ML, GANGULY K, MAHAJAN RC. Role of activated blood monocytes in erythrocyte membrane damage and red cell loss during malaria. *Experimental Parasitology*, v.80, p.54-63, 1995.

MOORE A, HERRERA G, NYAMONGO J, LACKRITZ E, GRANADE T, NAHLEN B, OLOO A, OPONDO G, MUGA R, JANSSEN R. Estimated risk of HIV transmission by blood transfusion in Kenya. *Lancet*, 358:657-660, 2001.

MOORE RB & SHRIVER SK. Protein 7.2b of human erythrocyte membranes binds to calpromotin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 232, p.294-297, 1997.

MORAHAN BJ, WANG L, COPPEL RL. No TRAP, no invasion. *Trends in Parasitology*, v.25, p.77-84, 2009.

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, HAFALLA 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, MORAIS CG, BUENO LL, JIMENEZ MC, SOARES IS, FONTES CJ, LACERDA MVG, XAVIER MS, BARNWELL JW, GALINSKI MR, BRAGA EM. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* blood-stage vaccine candidates (PvMSP-1<sub>19</sub> and PvMSP-3 $\alpha$ <sub>359-798</sub>) and their relationship with hematological features in malaria patients from the Brazilian Amazon. *Microbes and Infection*, v. 14, p.730-739, 2012.

MOUHTON L, LACROIX-DESMAZES S, NOBREGA A, BARREAU C, COUTINHO A, KAZATCHKINE MD. The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.44, p.243-251, 1996.

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.

MURPHY SC & BREMAN JG. Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.64, p. 57-67, 2001.

NAUMANN KM, JONES GL, SAUL A, SMITH R. A *Plasmodium falciparum* exo-antigen alters erythrocyte membrane deformability. *FEBS Letters*, v.292, p.95-97, 1991.

O'FARREL PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal Biological Chemistry*, v.250, p.4007-4021, 1975.

OLDSTONE MBA. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *The FASEB Journal*, v.12, p.1255-1265, 1998.

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

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Malaria in the Américas: time series epidemiological data from 2000 to 2007. Disponível em: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/mal-americas-2007.pdf>.>. Acesso em: 21/01/2010 às 22:12 horas.

OTHORO C, LAL AA, NAHLEN B, KOECH D, ORAGO AS, UDHAYAKUMAR V. A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *Journal of Infectious Diseases*, v.179, p. 279-282, 1999.

OWUOR BO, ODHIAMBO CO, OTIENO WO, ADHUAMBO C, MAKAWITI DW, STOUTE JA. Reduced immune complex binding capacity and increased complement susceptibility of red cells from children with severe malaria-associated anemia. *Molecular Medicine*, v.14, p.89-97, 2008.

PAIZS B, SUHAI S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, v.24, p.508-548, 2005.

PANTALEO A, GIRIBALDI G, MANNU F, ARESE P, TURRINI F. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoimmunity Reviews*, v.7, p.457-462, 2008.

PAPAYANNOPOULOS IA. The interpretation of collision –induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, v.14, p. 49-73, 1995.

PASINI EM, KIRKEGAARD, MORTENSEN P, LUTZ HU, THOMAS AW, MANN M. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood*, v.108, p.791-801, 2006.

PASINI EM, MANN M, THOMAS AW. Red blood cell proteomics. *Transfusion Clinique et Biologique*, v.17, p.151-164, 2010a.

PASINI EM, LUTZ HU, MANN M, THOMAS AW. Red blood cell (RBC) membrane proteomics – part I: proteomics and RBC physiology. *Journal of Proteomics*, v.73, p.403-420, 2010b.

PASSOW H. Molecular aspects of band 3 protein-mediated anion transport across the red blood cell membrane. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, v. 103, p.61-203, 1986.

PEDERSEN SK, SLOANE AJ, PRASAD SS, SEBASTIAN LT, LINDNER RA, HSU M, ROBINSON M, BYE PT, WEINBERGER RP, HARRY JL. An immunoproteomic approach for identification of clinical biomarkers for monitoring disease. *Molecular & Cellular Proteomics*, v.4.8, p.1052-1060, 2005.

PEKER S, AKAR N, DEMIRALP DO. Proteomic identification of erythrocyte membrane protein deficiency in hereditary spherocytosis. *Molecular Biology Reports*, v.39, p.3161-3167, 2012.

PHANUPHAK P, WATNPONG ST, HANVANICH M, PANMUONG W, MOOLLAOR P, VEJAJIVA S, SITPRIJA V, INTARAPRASERT RV, PHANTHUMKOSOL D. Autoantibodies in falciparum malaria: a sequential study in 183 Thai patients. *Clinical and Experimental Immunology*, v.53, p.627-633, 1983.

PINSWASDI C, AWBURN MM, COWDEN WB, CLARK IA. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infection and Immunity*, v.59, p.3280-3283, 1991.

PRUDÊNCIO M, RODRIGUEZ A, MOTA MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews*, v.4, p.849-856, 2006.

QUINTERO, JP, SIQUEIRA AM, TOBÓN A, BLAIR S, MORENO A, ARÉVALO-HERRERA M, LACERDA MVG, VALENCIA SH. Malaria-related anemia: a Latin American perspective. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.106, p.91-104, 2011.

RAY S, KAMATH KS, SRIVASTAVA R, RAGHU D, GOLLAPALLI K, JAIN R, GUPTA SV, RAY S, TAUR S, DHALI S, GOGTAY N, THATTE U, SRIKANTH R, PATANKAR S, SRIVASTAVA S. Serum proteome analysis of vivax malaria: An insight into the disease pathogenesis and host immune response. *Journal of Proteomics*, v.75, p.3063-3080, 2012.

RAY S, RENU D, SRIVASTAVA R, GOLLAPALLI K, TAUR S, JHAVERI T, DHALI S, CHENNAREDDY S, POTIA A, DIKSHIT JB, SRIKANTH R, GOGTAY N, THATTE U, PATANKAR S, SRIVASTAVA S. Proteomic investigation of falciparum and vivax malaria for identification of surrogate protein markers. *Plos One*. v.7, p.e41751, 2012.

ROCKETT KA, AWBURN MM, COWDEN WB, CLARK IA. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infection and Immunity*, v.59, p. 3280-3283, 1991.

ROEPSTORFF P, FOHLMANN J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, v.11, p.601, 1984.

ROMA PMS, SIMAN L, AMARAL FT, AGERO U, MESQUITA ON. Total three-dimensional imaging of phase objects using defocusing microscopy: application to red blood cells. *Applied Physics Letters*, v.104, p.251107, 2014.

ROOBSONG W, ROYTRAKUL S, SATTABONGKOT J, LI J, UDOMSANGPETCH R, CUI L. Determination of the *Plasmodium vivax* schizont stage proteome. *Journal of Proteomics*, v.74, p.1701-1710, 2011.

ROODMAN GD, BIRD A, HUTZLER D, MONTGOMERY W. Tumor necrosis factor-alpha and hematopoietic progenitors: effects of tumor necrosis factor on the growth of erythroid progenitors CFU-E and BFU-E and hematopoietic cell lines K562, HL60, and HEL cells. *Experimental Hematology*, v.15, p.928-935, 1987.

ROSENBERG EB, STRICKLAND GT, YANG SL, WHALEN GE. IgM antibodies to red cells and autoimmune anemia in patients with malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.22, p.146, 1973.

RUNGALDIER S, OBERWAGNER W, SALZER U, CSASZAR E, PROHASKA R. Stomatin interacts with GLUT1/SLC2A1, band3/SLC4A1, and aquaporin-1 in human erythrocyte membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1828, p.956-966, 2013.

SACHS J, MALANEY P. The economic and social burden of malaria. *Nature*, v.415, p.680-685, 2002.

SAFEUKUI I, GOMEZ ND, ADELANI AA, BURTE F, AFOLABI NK, AKONDY R, VELAZQUEZ P, HOLDER A, TEWARI R, BUFFET P, BROWN BJ, SHOKUNBI WA, OLALEYE D, SODEINDE O, KAZURA J, AHMED R, MOHANDAS N, FERNANDEZ-

REYES, HALDAR K. Malaria induces anemia through CD8+ T cell-dependent parasite clearance and erythrocyte removal in the spleen. *mBio*, v.6, p.e02493-14, 2015.

SALOMAO M, ZHANG X, YANG Y, LEE S, HARTWIG JH, CHASIS JÁ, MOHANDAS N, NA X. Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insight into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.105, p.8026-8031, 2008.

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.

SANTOS-CIMINERA PD, ROBERTS DR, ALECRIM MG, COSTA MRF, QUINNAN JR GV. Malaria diagnosis and hospitalization trends, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, p.1597-1599, 2007.

SARAIVA MGG, AMORIM RDS, MOURA MAS, MARTINEZ-ESPINOSA FE, BARBOSA MG. Expansão urbana e distribuição espacial da malária no município de Manaus, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42, p.515-522, 2009.

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.

SEO J & LEE K, 2004. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v.37, p.35-44, 2004.

SHARMA YD & TYAGI RK. Erythrocyte binding activity displayed by a selective group of *Plasmodium vivax* tryptophan rich antigens is inhibited by patients' antibodies. *PLoS One*, v.7, p.e50754, 2012.

- SIBLEY LD. Intracellular parasite invasion strategies. *Science*, v.304, p.248-253, 2004.
- SIMPSON JA, SILAMUT K, CHOTIVANICH K, PUKRITTAYAKAMEE S, WHITE NJ. Red cell selectivity in malaria: a study of multiple-infected erythrocytes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.93, p.165–168, 1999.
- SRINIVASAN P, BEATTY WL, DIOUF A, HERRERA R, AMBROGGIOD X, MOCH K, TYLER JS, NARUM DL, PIERCE SK, BOOTHROYD JC, HAYNESE JD, MILLER LH. Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, p.13275-13280, 2011.
- SIVEP. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico* 44, número 1, 2013.
- SNOW RW, GUERRA CA, NOOR AM, MYINT HY, HAY SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, v.434, p.214-217, 2005.
- SORENSEN PG, MICKLEY H, SCHMIDT KG. Malaria-induced immune thrombocytopenia. *Vox Sanguinis*, v.47, p.68-72, 1984.
- STEEN, H & MANN M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.5, p.699-711, 2004.
- STERKERS Y, SCHEIDIG C, da ROCHA M, LEPOLARD C, GYSIN J, SCHERF A. Members of the low-molecular-mass rhoptry protein complex of *Plasmodium falciparum* bind to the surface of normal erythrocytes. *The Journal of Infectious Diseases*, v.196, p. 617-621, 2007.
- STOUTE JA, ODINDO AO, OWUOR BO, MIBEI EK, OPOLLO MO, WAITUMBI JN. Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. *Journal of Infectious Diseases*, v.187, p.522-525, 2003.

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.

SUCKAU D, ROSEMANN A, SCHUERENBERG M, HUFNAGEL P, FRANZEN J, HOLLE A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical chemistry*, v.376, p.952-965, 2003.

TANAKA K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, v.42, p.3860-3870.

TAVARES JC. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function. Malaria. 3ed.: MORGAN & CLAYPOOL LIFE SCIENCES, 2013, v. 5, p. 1-187.

TERNYNCK T, FALANGA PB, UNTERKIRSCHER C, GREGOIRE J, 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.

THUMA PE, DIJK J, BUCALA R, DEBEBE Z, NEKHAI S, KUDDO T, NOURAIIE M, WEISS G, GORDEUK VR. Distinct clinical and immunologic profiles in severe malarial anemia and cerebral malaria in Zambia. *The Journal of Infectious Diseases*, v.203, p. 211-219, 2011.

TISSOT JD, CANELLINI G, RUBIN O, ANGELLILLO-SCHERRER A, DELOBEL J, PRUDENT M, LION N. Blood microvesicles: from proteomics to physiology. *Translational Proteomics*, v.1, p.38-52, 2013.

TJALSMA H, SCHAEPS RMJ, SWINKELS DW. Immunoproteomics: from biomarker discovery to diagnostic applications. *Proteomics Clin. Appl.*, v.2, p.167-180, 2008.

TJITRA E, ANSTEY NM, SUGIARTO P, WARIKAR N, KENANGALEM E, KARYANA M, LAMPAH DA, PRICE RN. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med*, v.5, p.e128, 2008.

TOLIA NH, ENEMARK EJ, SIM KL, JOSHUA-TOR L. Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell*, v. 122, p. 183-193, 2005.

TISHKO TV, TISHKO DN, TITAR VP. Application of the digital holographic interference microscopy for study of 3D morphology of human erythrocytes. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology* (A. Méndez-Vilas, Ed.)

TURRINI F, ARESE P, YUAN J, LOW PS. Clustering of integral membrane proteins on the human erythrocyte membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, v.266, p. 23611-23617, 1991.

UYOGA S, SKOROKHOD OA, OPIYO M, ORORI EN, WILLIAMS TN, ARESE P, SCHWARZER E. Transfer of 4-hydroxynonenal from parasitized to non-parasitized erythrocytes in rosettes. Proposed role in severe malaria anemia. *British Journal of Haematology*, v.157, p.116-124, 2012.

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

VOLLER A, Immunopathology of malaria. *World Health Organization*, v.50, p.177-186, 1974.

WAITUMBI JN, OPOLLO MO, MUGA RO, MISORE AO, STOUTE JA. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia. *Blood*, v.95, p.1481-1486, 2000.

WAITUMBI JN, DONVITO B, KISSERLI A, COHEN JH, STOUTE JA. Age-related changes in red blood cell complement regulatory proteins and susceptibility to severe malaria. *Journal of Infectious Diseases*, v.190, p.1183-1191, 2004.

WERNER EBE, TAYLOR WR, HOLDER AA. A *Plasmodium chabaudi* protein contains a repetitive region with a predicted spectrin-like structure. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.94, p.185-196, 1998.

WICKRAMASINGLE SN & ABDALLA SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillière's Clinical Haematology*, v.13, p.277-299, 2000.

WILKINS MR, PASQUALI C, APPEL RD, OU K, GOLAZ O, SANCHEZ JC, YAN JX, GOOLEY AA, HUGHES G, HUMPHERY-SMITH I, WILLIAMS KL, HOCHSTRASSER DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*, v.14, p.61-65, 1996.

WHO. World Health Organization. *World Malaria Report 2012*.

WHO. World Health Organization, 2013. *World Health Statistics 2013*.

WOZENCRAFT AO, LLOYD CM, STAINES NA, GRIFFITHS VJ. Role of DNA-binding antibodies in kidney pathology associated with murine malaria infections. *Infection and Immunity*, v.58, p.2156-2164, 1990.

WU CC, MacCOSS M, HOWELL KE, YATES JR. A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nature Biotechnology*, v.21, p.532-538, 2003.

YAMAUCHI LM, COPPI A, SNOUNOU G, SINNIS P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cellular Microbiology*, v.9, p.1215-1222, 2007.

YEO TW, LAMPAH DA, TJITRA E, PIERA K, GITAWATI R, KENANGALEM E, PRICE RN, ANSTEY NM. Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release and host inflammatory response to *Plasmodium vivax*, compared with *Plasmodium falciparum*: a prospective study in Papua, Indonesia. *Journal of Infectious Diseases*, v.202, p.109-112, 2010.

ZHANG D, KIYATKIN A, BOLIN JT, LOW PS. Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *Blood*, v.96, p.2925-2933.

ZUCKERMAN A. Autoimmunization and other types of indirect damage to host cells as factors in certain protozoan diseases. *Experimental Parasitology*, v.15, p.138-183, 1964.

## 9. APÊNDICE

**Apêndice 1.** Peptídeos obtidos por meio do sequenciamento manual dos *spots* reconhecidos por anticorpos dos diferentes grupos de soros utilizados neste estudo.

>gil46397333|sp|P60709.1|ACTB\_HUMAN RecName: Full=Actin, cytoplasmic 1; AltName: Full=Beta-actin; Contains: RecName: Full=Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed

MDDDI AALVVDNGSGMCK **AGFAGDDAPRAVFPSIVGRPR**HQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGILTLKYP IEHGIVTNWDDMEK **IWHHTFY**  
**NELRVAPEEHPVLLTEAPLNPK**ANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGR **TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR**LDLAG  
 RDLTDYLMKILTER **GYSFTTTAERE**IVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLEK **SYELPDGOVITIGNER**FRCPEALFQP SFLGME SCG  
 IHETTFNSIMKCDVDIRKDLYANTVLSGGTTMYPGIADRMQKEITAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK **QEYDE**  
**SGPSIVHR**KCF

>gil22654240|sp|Q08495.3|DEMA\_HUMAN RecName: Full=Dematin; AltName: Full=Dematin actin-binding protein; AltName: Full=Erythrocyte membrane protein band 4.9

MERLQKQPLTSPGSVSPSRDSSVPGSPSSIVAKMDNQVLGYKDLAAIPKDKAILDIERPDLMIYEPHFYTSLLEHVELPRSRERSLSPK**ST**  
**SPPPSPEVWADSRSPGIISQASAPR**TTGTPRTSLPHFHPETS RPDSNIYKKPPIYKQRESVGGSPQTKHLIEDLIIESSKFPAQPPDPN  
 QPAKIETDYWPCPPSLAVVETEWRKRKASRRGAE EEEEEEDDDSGEEMKALRERQREELSKVTSNLGKMILKEEMEKS LPIRRKTRSLPDR  
 TPFHTSLHQGTSKSSSLPAYGR T T LSR LQSTEFSPSGSETGSPGLQNGEGQRGRMDRGN SLP CVLEQKIYPYEMLVVTNKGR TKLPPGVDR  
 MRLERHLSAEDFSRVFAMSPEEFGKLALWKRNELKKKASLF

gil90101808|splP11171.4|41\_HUMAN RecName: Full=Protein 4.1; Short=P4.1; AltName: Full=4.1R; AltName: Full=Band 4.1; AltName: Full=EPB4.1

MTTEKSLVTEAENSQHQQKEEGEEAINSGQQEPQQEESCQTAAEGDNWCEQKCLKASNGDTPTHEDLTKNKERTSESRGLSRLFSFLKRPK  
 SQVSEEEGKEVESDKEKGGGQKEIEFGTSLDEEIIILKAPIAAPEPELKTDP SLDLHSLSSAETQPAQEELREDPDFEIKEGEGLEEC SKI  
 EVKEESPQSKAETELKASQKPIRKHRNMHCKVSLDDTVYECVVEKHAKGQDLLKRVCEHLNLLLEEDYFGLAIWDNATSKTWLDSAKEIKQ  
 VRGVPWNFTFNVKFYPPDPAQLTEDI TRY YLCLQLRQDIVAGRLPCSFATLALLGSYTIQSELGDYDPELHGVDYVSDFKLAPNQTKELEE  
 KVMELHKSYSRSMTPAQADLEFLENAKKLSMYGVDLHKAKDLEGVDIILGVCSSGLLVYKDKLRINRFPWPVKLKISYKRSSFFIKIRPGEQ  
 EQYESTIGFKLPSYRAAKKLWKCVEHHTFFRLTSTDTIPKSKFLALGSKFRYSGRTQAQTRQASALIDRPAPHFERTASKRASRSLDGAA  
 AVDSADRSPRPTSAPAITQGQVAEGGVLDA SAKKTVVPKAQKETVKA EVKKEDEPPEQAEPEPTEAWKVEKTHIEVTVPT SNGDQTQKLAE  
 KTEDLIRMRKKKRERLDGENIYIRHSNLMLLEDLDSQEEIKKHHASISELKKNFMESVPEPRPSEWDKRLSTHSPFRTLNINGQIPTGEGP  
PLVKTQTVTISDNANAVKSEIPTKDVPVHTETKTITYEAAQTDDNSGDLDPGVLLTAQTITSETPSSTTTTQITKTVKGGISETRIEKRI  
VITGDADIDHDQVLVQAIKEAKEQHPDMSVTKVVVHQETEIADE

>gil215274164|splP16452.3|EPB42\_HUMAN RecName: Full=Erythrocyte membrane protein band 4.2; Short=Erythrocyte protein 4.2; Short=P4.2

MGQALGIKSCDFQAARNNEEHHTKALSSRRLFVRRGQPFIIILYFRAPVRAFLPALKKVALTAQTGEQPSKINRTQATFPISLGD RKWWS  
 AVVEERDAQSWTISVTTPADAVIGHYSLLLQVSGRKQLLLGQFTLLFNPWNREDAVFLKNEAQRMEYLLNQNGLIYLG TADC IQAESWDFG  
 QFEGDVIDLSRLLSKDKQVEKWSQPVHVARVLGALLHFLKEQRVLPQTQATQEGALLNKRRGSVPILRQWLTGRGRPVYDGGQAWVLAA  
 VACTVLRCLGIPARVVTTFASAQGTGGRLLIDEY YNEEGLONGEGQRGRIWIFQTSTECWMTRPALPQGYD GWQILHPSAPNGGGVLGSCD  
 LVPVRVKEGTLGLTPAVSDFAAINASCVVWKCCEDGTLELTD SNTKYVGN NISTKGVGSDRCEDITQNYKYPEGSLQEKEVLERVEKEK  
 MEREKDN GIRPPSLETASPLYLLLKAPSSPLRGDAQISVTLVNHSEQEKAVQLAIGVQAVHYNGVLA AKLWRKKLHLT L SANLEKIITIG  
 LFFSNFERNPPENTFLRLTAMATHSESNLSCFAQEDIAICRPHLAIKMPEKAEQYQPLTASVSLQNSLDAPMEDCVISILGRGL  
 IHRERSYRFRSVWPENTMCAKFQFTPTHVGLQRL TVEVDCNMFQNL TNYKSVTTVVAPELSA

>gil308153675|slp|P02549.5|SPTA1\_HUMAN RecName: Full=Spectrin alpha chain, erythrocytic 1; AltName: Full=Erythroid alpha-spectrin

MEQFPKETVVESSGPKVLETAEEIQERRQEVLTTRYQSFKERVAERGQKLEDSYHLQVFKRDADDLGKWIMEKVNILTDKSYEDPTNIQGY  
 QKHQSLEAEVQTKSRLMSELEKTREERFTMGHSAHEETKAHIEELRHLWDLLELTLEKGDQLLRALKFQQYVQECADILEWIGDKEAIAT  
 SVELGEDWERTEVLHKKFEDFQVELVAKEGRVVEVNOYANECAEENHPDLPLIQSKQNEVNAAWERLRGLALQRQKALSNAANLQRFKRDV  
 TEAIQWIKKEPEVLTSEDYGKDLVASEGLFHSKGLERNLAVMSDKVKELCAKAEKLTLSHPSDAPQIQEMKEDLVSSWEHIRALATSRYE  
 KLQATYWYHRFSSDFDELSGWMNEKTAAINADELPTDVAGGEVLLDRHQQHKHEIDSYDDRFQSADETGQDLVNAVANHEASDEVREKMEILD  
 NNWTALLELWDERHRQYEQCLDFHLFYRDSEQVDSWMSRQEAFLNEDLGNLSGSAEALLQKHEDFEEAFTAQEEKIITVDKTATKLGDD  
 HYDSENIKAIRDGLLARRDALREKAATRRRLKESLLLQKLYEDSDDLKNWINKKKLLADDEDYKDIQNLKSRVQKQVFEKELAVNKTQL  
 ENIQKTGQEMIEGGHYASDNVTTRLSEVASLWEELEATKQKGTQLHEANQQLQFENNAEDLQRWLEDVEWQVTSYDYGKGLAEVQNRRLK  
 HGLLESAAVAAQDQVDILTDLAAYFEEIGHPDSKDIRARQESLVCRFEALKEPLATRKKLLDLLHLQLICRDTEDDEEAWIQETEPSATST  
 YLGKDLIASKLLNRHRVILENIASHEPRIQEITERGNKMVEEGHFAAEDVASRVKSLNQNMESLRARAARRQNDLEANVQFQQYLADLHE  
 AETWIREKEPVDNTNYGADEEAAGALLKKHEAFLDLNSFGDSMKALRNQANACQQQAAPVEGVAGEQRMALYDFQARSPREVTMKGK  
 DVLTLSSINKDWWKVEAADHQGIVPAVYVRRLAHDEFMPLPQRREEPGNITQRQEQIENQYRSLLDRAEERRRLLQRYNEFLAYEAG  
 DMLEWIQEKKAENTGVELDDVWELQKFFDEFQKDLNTNEPRLRDKVADDLLFEGLLTPEGAQIRQELNSRWGSLQRLADEQRQLLGSAAH  
 AVEVFHREADDTKEQIEKKCQALSADPGSDLFSVQALQRRHEGFERDLVPLGDKVTILGETAERLSESHPDATEDLQRQKMELNAAWEDL  
 QGRTKDRKESLNEAQKFYFLSKARDLQNWISSIGGMVSSQELAEADLTGIEILLERHQEHRADMEAEAPTFQALEDFSAELIDSGHHASPE  
 IEKKLQAVKLERDDLEKAWEKRKKILDQCLELQMFQGNCDQVESWVARENSLRSDDKSSLDSEALMKKRDDLDKAITAQEGKITDLEHF  
 AESLIADHEYAKEEIAATRLQRVLDLDRWKALKAQLIDERTKLGDIYANLQFYRDLEEELEEWISEMLPTACDESYKDATNIQRKYLKHQTFHE  
 VDGRSEQVHGVINLGNLIECSACDGNEEAMKEQLEQLKEHWDHLLERTNDKGKKLNEASRQRFNTSIRDFEFWLSEATLLAMKDQARD  
 LASAGNLLKKHQLLEREMLAREDALKDLNTLAEDLLSSGTFNVDQIVKKKDNVNRKFLNVQELAAAHHEKLEKAYALFQFFQDLDDDEESWI  
 EEKLIRVSSQDYGRDLQGVQNLKKHKLREGELVAHEPAIQNVLDMAEKLKDKAAVGOEEIQRLLAQFVEHWEKLEKELAKARGLKLEESLE  
 YLQFMQNAEEEEAWINEKNALAVRGDCGDTLAATQSLLMKHEALENDFAVHETRQVQVCAQGEDILNKVLQEESSQKEISSKIEALNEKTP  
 SLAKAIAAWKLQLEDDYAFQEFNWKADVVEAWIADKETSCLKTNGGADLGDFTLLAKQDTLDASLQSFQOERLPEITDLKDKLISAQHNQ  
 SKAIEERYAALLKRWEQLLEASAVHRQKLEKQLPLQKAEDLFVEFAHKASALNNWCEKMEENLSEPVHCVSLNEIRQLQKDHEDFLASLA  
 RAQADFCKLLELDQQIKALGVPSSPYTWTVEVLERTWKHLSDIIEEREQELQKEEARQVKNFEMCQEFQNASFLQWILETRAYFLDGS  
 LLKETGTLESQLEANRKRKQKEIQAMKRQLTKIVDLGDNLEDALILDIKYSTIGLAQQWDQLYQLGLRMQHNLEQQIQAKDIKGVSEETLKE  
 FSTIYKHFDENLTGRLTHKEFRSCLRGLNYLPMVEEDEHEPKFEKFLDAVDPGRKGYVSLDYTAFLIDKESENIKSSDEIENAFQALAE  
 GKSIIYTKEDMKQALTPQVSFCATHMQQYMDPRGRSHLSGYDYVGFNSYFGN

>gil215274269|sp|P11277.5|SPTB1\_HUMAN RecName: Full=Spectrin beta chain, erythrocytic; AltName: Full=Beta-I spectrin

MTSATEFENVGNQPPYSRINARWDAPDDELNDNDNSSARLFERSRIKALADEREVVQKKTFTKWVNSHLARVSCRITDLYKDLRDGRMLIKL  
 LEVLSGEMLPKPTKGKMR IHCLENVDKALQFLKEQRVHLENMGSHDIVDGNHRLVGLIWTIILRFQIQDIVVQTQEGRETRSADALLLW  
 CQMKTAGYPHVNVNTNFTSSWKDGLAFNALIHKHRPDLIDFDKLDKDSNARHNLEHAFNVAERQLGIIPLLDPEDVFTENPDEKSIITYVVA  
 YHYFSKMVLAVEGKRVGKVIDHAIETEKMIKYSGLASDLLTWIEQITIVLNSRKFANSLTGVQQQLQAFSTYRTVEKPPKFQEKGNLEV  
 LLFTIQSRMRANNQKVYTPHDGKLVSDINR **AWESLEEAAYRR**ELALRNELIRQEKLEQLARRFDRKAAMRETWLTSENQRLVAQDNFGYDLA  
 AVEAAKK **KHEAIETDTAAEER**VRALEDLAQELEKENYHDQKRITARKDNI LRLWSYLQELLQSRRQRLETTLALQKLFQDMLHSIDWMDE  
 IKAHLLSAEFGKHLLEVEDLLQKHKLMEADIAIQGDKVKAITAATLKFTEGK **GYQPCDPQVIQDR**ISHLEQCFEELSNMAAGRKAQLEQSK  
 RLWKKFFWEMDEAESWIKEKEQIYSSLDYGKDLTSVLILQRKHKAFEDLRLGLDAHLEQIFQEAHGMVARKQFGHPQIEARIKEVSAQWDQL  
 KDLA AFCCKNLQDAENFFQFQGDADDLKAWLQDAHRLLSGEDVGQDEGATRALGKKHKDFLEEELESRGVMEHLEQQAQGFPEEFRDSDPV  
 THRLQALR **ELYQQVVAQADLR**QQRLQEALDLYTVFGETDACE LWMGEKEKWLAE MEMPDTLEDLEV VQHRFDILDQEMKTLMTQIDGVNLA  
 ANSLVESGHPRSREVKQYQDHLNTR **WQAFQTLVSEER**REAVDSALRVHNYCVDCEETSKWITDKTKVVESTKDLGR **DLAGIAIQR**KLSGLE  
 RDVA AIQARVDALERESQQLMD SHPEQKEDIGORQKHLEELWQGLQQSLOGQEDLLGEVSQ LQAF LQDLD DFQAWLSITQKAVASEDMPES  
 LPEAEQLLQQHAGIKDEIDGHQDSYQRVKESGEK **VIQGQTDPEYLLLGQR**LEGLDTGWNALGRMWESRSHTLAQCLGFQEFQKDAKQAEAI  
 LSNQEYTLAHLEPPDSLEAAEAGIRKFEDFLGSMENNRDKVLSPVDSGNKLVAEGNLYSDKIKEKVQLIEDRHRKNNEKAQEASVLLRDNL  
 ELQNF LQNCQELTLWINDK **LLTSQDVSYDEARN**LHNKWLKHQAFVAELASHEGWLENIDAEGKQLMDEKQPFTALVSQKLEALHRLWDELQ  
 ATTKEKTQHLSAARSSDLRLQTHADLNK **WISAMEDQLR****SDDPGKDLTSVNR**MLAKLKRVEDQVNVRKEELGELFAQVPSMGEEGGDADLSI  
 EKRF **FLDLLEPLGR**RKKQLES SRAKLQISR **DLEDETLWVEER**LPLAQSADYGTNLQTVQLFMKK **NQTLQNEILGHTPR**VEDVLQR **GQQLVEA**  
**AEIDCQDLEERLGHLOSSWDR**LREAAAGRLQRLRDANE AQYYLDADAEAWIGE QELYVISDEIPKDEEGAI VMLKRHLRQQRAVEDYGR  
 NIKQLASRA **AQGLLSAGHPEGEQIIR**LQGQVDKHYAGLKDVAEERKRKLENMYHLFQLKR **ETDDLEQWISSEK**ELVASSPEMGQDFDHVTLLR  
 DKFRDFARETGAIQER **VDNVNAFIERLIDAGHSEAATIAEWK**DGLNEMWADLLELIDTRMQLLAASYDLHRYFYTGAEI LGLIDEKHREL  
**PEDVGLDASTAESFHR**VHTAFER **ELHLLGVQVQFQDVATR**LQTAYAGEKAEAIQNKEQEVSAAWQALLDACAGRRTQLVDTADKFRFFSM  
 ARDLLSWMESIIRQIETQERPRDVSSVELLMK **YHQGINAEIETR**SKNFSACLELGESLLQRQHQASEEIREKLQQVMSRRKEMNEKWEARW  
 ERLR **MLLEVCQFSRDASVAEAWLIAQEPYLASGDFGHTVDSVEK**LIKRHEAFEKSTASWAERFAALEKPTTLELKERQIAERPAAETGPQE  
 EEGETAGEAPVSHHAATERTSPVSLWSRLSSSWESLQPEPSHPY

**gil114787|spl|P02730.3|B3AT\_HUMAN RecName: Full=Band 3 anion transport protein; AltName: Full=Anion exchange protein 1; Short=AE 1; Short=Anion exchanger 1; AltName: Full=Solute carrier family 4 member 1; AltName: CD\_antigen=CD233**

MEELQDDYEDMMEENLEQEEYEDPDIPESQMEEPAHDTEATATDYHTTSHPGTHK **VYVELQELVMDEKNQELRWMEAAARWVQLEENLGEN**  
**GAWGR**PHLSHLTFWSLLELRRVFTK **GTVLLDLQETSLAGVANQLLDRFIFEDQIRPQDR**EELLRALLLK **HSHAGELEALGGVKPAVLTR**SG  
DPSQPLLPQHSSLETQLFCEQGDDGGTEGHSPSGILEK **IPPDSEATLVLVGRADFLQPVLG FVRLQEA AELEAVELPVP I R**FLFVLLGPEA  
PHIDYTQLGRAAATLMSERVFRIDAYMAQSRGELLHSLEGFLDCSLVLPPTDAPSEQALLSLVPVQRELLRRRYQSSPAKPDSSFYKGLDL  
NGGPDDPLQQTGQLFGGLVRDIRRRYPYLSDITDAFSPQVLAAVIFIYFAALSPAITFGGLLGEKTRNQMGVSELLISTAVQGILFALLG  
AQPLL VVGFSGPLLVFEEAFFSFCETNGLEYIVGRVWIGFWLILLVVLVVAFE GSF LVR F I S R Y T Q E I F S F L I S L I F I Y E T F S K L I K I F Q D  
HPLQKTYNYNVLMPKPKQGPLPNTALLSLVLMAGTFFFAMMLRKFKNSSYFPGKLRRVIGDFGVPISILIMVLVDFFIQDTYTQKLSVPDG  
FKVSNSARGWVIHPLGLRSEFP I W M M F A S A L P A L L V F I L I F L E S Q I T T L I V S K P E R K M V K G S G F H L D L L L V V G M G G V A A L F G M P W L S A T T  
VRSVTHANAL TVM G K A S T P G A A A Q I Q E V K E Q R I S G L L V A V L V G L S I L M E P I L S R I P L A V L F G I F L Y M G V T S L S G I Q L F D R I L L L F K P P K Y H  
PDVPYVKRVKTWRMHLFTGIQIICLAVLVVVKSTPASLALPFVLILTVP LRRVLLPLIFRNVELQCLDADDAKATFDEEEGRDEYDEVAMP  
V

**>gil114823|spl|P27105.3|STOM\_HUMAN RecName: Full=Erythrocyte band 7 integral membrane protein; AltName: Full=Protein 7.2b; AltName: Full=Stomatin**

MAEKRHTRDSEAQRLPDSFKDSPSKGLGPCGWILVAFSFLFTVITFPISIWMCIKI IKEYERAIIFRLGRILQGGAKGPGPLFFILPCTDSF  
IKVDMRTISFDIPPQEILTKDSVTISVDGVVYYR **VQ NATLAVANI TNAD SATR**LLAQTTLRNVLGTKNLSQILSDREEIAHNMQSTLDDAT  
DAWGIKVERVEIKDVKLPVQLQRAMAAEAEASREARAKVIAAEGEMNASRALK **EASMVITESPALQLR**YLQTLTTIAAEKNSTIVFPLPI  
DMLQGIIGAKHSHLG

## 10. ANEXO

**Anexo 1.** Questionário padrão aplicado aos pacientes que foram atendidos no ambulatório do Hospital Júlio Miller, em Cuiabá (MT).

PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO DE TRATAMENTO DE PACIENTES COM MALÁRIA - HUJM			
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"/> Epigastria <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"/> Doxiciclina <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	