

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

**ANEMIA NA MALÁRIA VIVAX: PERFIL DE ANTICORPOS IgG E IgM
CONTRA MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE DE HEMÁCIAS DE
DIFERENTES GRUPOS SANGUÍNEOS DO SISTEMA ABO.**

JAMILA DA SILVA SULTANE ABOOBACAR

BELO HORIZONTE – MG

SETEMBRO 2016

JAMILA DA SILVA SULTANE ABOOBACAR

**ANEMIA NA MALÁRIA VIVAX: PERFIL DE ANTICORPOS IgG E IgM
CONTRA MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE DE HEMÁCIAS DE
DIFERENTES GRUPOS SANGUÍNEOS DO SISTEMA ABO.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, para a obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Érika Martins Braga

Co-orientadora: Dr.^a Luiza Carvalho Mourão

BELO HORIZONTE – MG

SETEMBRO 2016

Trabalho realizado no Laboratório de Malária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais. Este trabalho foi financiado pelo CNPq (472540/2012-2, 400858/2015-0 e 404648/2015-0), FAPEMIG (PPM-00057-13 e BPD-00122-14), e, ainda, com o auxílio financeiro do Instituto de Bolsas de Estudo (IBE) (Bolsa de Mestrado/2015-2016). Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética (CAAE: 01496013.8.0000.5149, parecer 519.481) e teve como colaboradores o Dr. Marcus Vinícius Guimarães Lacerda (Fundação de Medicina Tropical do Amazonas); o Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes (UFMT); e o Dr. Christian Baldeviano (*Immunology and Vaccine Development Unit – U.S. Naval Medical Research Unit Nro. 6, Peru*).

Este trabalho é dedicado aos meus filhos, Kelvyn Caetano e Melissa Caetano, por serem a razão da minha existência e da minha motivação de continuar lutando pelos meus sonhos.

Ao meu esposo, Edmundo Caetano,
meu grande amor, por tornar os meus dias sempre alegres.

À minha tia e madrinha, Natércia Vaz,
por ser minha inspiração como mulher e mãe.

A minha vida sem vocês seria insignificante!

“É fazendo que se aprende a fazer aquilo que se deve aprender a fazer”

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida e estar sempre ao meu lado.

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

Ao Instituto de Bolsas de Estudo (IBE), pela concessão da bolsa de mestrado.

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

À Profa. Dra. Érika Martins Braga, por ter acreditado e confiado em mim. Muito obrigada por abrir as portas do seu laboratório para mim, pelas palavras de encorajamento e sabedoria, pelo carinho, apoio, amizade, respeito, e pela oportunidade de trabalhar e aprender muito sobre malária humana. Jamais esquecerei o que você fez por mim, desde o primeiro dia que a conheci, mostrando-se sempre disponível para ajudar, não apenas no trabalho, como também nos assuntos sociais. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa que tanto adoro!

À Dra. Luiza Carvalho Mourão, minha co-orientadora e amiga, uma pessoa adorável. Obrigada pela confiança depositada em mim, pela determinação, pelo exemplo, pela disponibilidade, pela seriedade, pela dedicação, pela imensurável ajuda, pelo carinho, pelas risadas, pelos momentos de encorajamento, por compartilhar comigo os momentos difíceis e, também, os bons que passei, pela excelente convivência e, principalmente, por contribuir imensamente para o meu crescimento pessoal e profissional ao longo desses dois anos de convivência. Aprendi muito com você e levarei comigo lembranças lindas. Que Deus te dê em dobro tudo que fizeste por mim, pois sem ti já mais chegaria onde cheguei! Palavras me faltam para descrever a pessoa incrível que és, por isso, resta-me somente dizer do fundo do meu coração, muito obrigada por tudo!

Aos meus colegas e amigos do mestrado e do Departamento de Parasitologia, em especial, à Letícia, minha grande amiga, uma pessoa maravilhosa que eu adoro muito. Obrigada, pelo carinho e amizade incondicional, pela imensa ajuda que você me deu quando mais precisei,

pelas nossas conversas e risadas, pela boa convivência, e, principalmente por me alegrar em todos os momentos que passamos juntas. Você ocupou um lugar tão grande em meu coração que, jamais poderei esquecer de tudo o que fizeste e tens feito por mim. Ao Eduardo, meu grande amigo, pela imensurável ajuda, pelo companheirismo, pelos bons e, também, pelos difíceis momentos que passamos juntos nessa caminhada, e, principalmente, pela excelente convivência. Aos demais amigos do mestrado, Gabriela, Agna, Jennifer, Raquel e Wagner, pela boa convivência, por partilharem comigo os momentos difíceis e os bons que passei, pelo companheirismo, pela amizade, pela união, pelas palavras de incentivo, pela troca de conhecimentos e, também, por tornarem os meus dias mais alegres. Vocês foram muito importantes para mim nesta caminhada.

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

À Dra. Paula Magda Roma, pela amizade, pela colaboração, pela disponibilidade, pela paciência e por transmitir alguns conhecimentos de Física.

Aos amigos do Laboratório de Malária, especialmente à Camila, uma pessoa adorável, pelo carinho e amizade, por transmitir os conhecimentos da eritrofagocitose, e pelas nossas conversas e risadas; aos demais amigos do laboratório, Asmat, Daniela, Francisco, Gabriel, Graziela, Marcos, Óscar, Raquel, e Zélia, pela excelente convivência e por partilharem os momentos de alegria e aflições.

Ao Prof. Dr. Cor Jesus Fontes, da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), ao Dr. Marcus Vinícius Guimarães Lacerda, da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), e ao Dr. Christian Baldeviano, da *U.S. Naval Medical Research Unit* Nro. 6, Peru, por fornecerem as amostras de soros e os resultados do hemograma dos pacientes com malária.

Aos pacientes e a todos os doadores de sangue; sem eles jamais seria possível a realização deste trabalho.

Ao meu esposo, Edmundo Caetano, amor da minha vida, a pessoa que consegue me por a sorrir mesmo quando eu penso que não sou capaz de sorrir. Obrigada, pelo amor e companheirismo, pela paciência e compreensão que tem tido comigo, pelo encorajamento, pelas lições de vida, pelo apoio incondicional, e, principalmente, por tornar a distância que nos separa mais curta e os meus dias mais alegres. Obrigada por seres o esposo e o pai maravilhoso! Te amo demais; sem a tua força, provavelmente muitos dos meus sonhos estariam perdidos. Obrigada por tudo, amor!

Aos meus filhos, Kelvyn e Melissa, vocês fazem de mim a mulher mais feliz do mundo; sem vocês eu nada sou! Não pude participar do vosso crescimento nesses dois anos. Quero que saibam que foram os anos mais difíceis da minha vida e espero que um dia eu tenha o vosso perdão por ter feito a escolha que fiz, porque sem vocês me sinto completamente vazia. Agradeço a Deus, todos os dias da minha vida, por vos guardar e por me dar forças para superar esta fase. Amo vocês mais que a minha própria vida! Tudo que sou e tenho se resume em vocês dois. Obrigada por serem a razão da minha vida!

À minha tia e madrinha, Natércia Vaz, pelo amor e amizade, pelo amor incondicional que tem pelos meus filhos, pela força, pelo encorajamento, por ser a melhor mãe para os meus filhos nesses dois anos, pelos ensinamentos e, também, por ser a pessoa na qual me inspiro como mulher e como mãe.

Às minhas irmãs, Mariana Figueiredo, Laxmi Aboobacar, Samira Aboobacar e Maideen Suleimane, por tornarem os meus dias mais coloridos.

Aos meus familiares, em especial, à tia Laguina, avó Helena, tio Belmiro, mãe Janete, cunhada Marivete, e meus sogros, Amélia e Caetano, pelo apoio e carinho.

À minha grande amiga e irmã, Dulcília Carlos Guezimane Ernesto, pela amizade, pelos momentos bons e difíceis que passamos juntas, pela força, pela paciência, pela compreensão e, principalmente, pela boa convivência. Obrigada por seres a minha irmã do coração que tanto adoro!

Enfim, as pessoas que aqui menciono contribuíram de diferentes formas para a elaboração deste trabalho. Algumas de forma direta, adicionando conteúdos e transmitindo energias positivas; outras mesmo sem se dar conta, foram muito importantes para mim.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Situação atual da malária no mundo.....	21
1.2. Ciclo Biológico de <i>Plasmodium</i>	26
1.3. Patogênese da anemia na malária vivax	29
1.4. Auto-anticorpos na malária	32
1.5. O sistema sanguíneo ABO e a malária	35
2. JUSTIFICATIVA.....	39
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. Objetivo principal.....	41
3.2. Objetivos específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. População de estudo	42
4.2. <i>Cell</i> -ELISA.....	43
4.3. Análise estatística	45
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Reconhecimento de moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO por anticorpos IgG e IgM de pacientes com malária vivax não grave residentes na Amazônia brasileira	49
5.2. Influência da exposição à malária na resposta de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias normais dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO em pacientes com malária vivax não grave residentes na Amazônia brasileira.....	51
5.3. Influência da parasitemia na resposta de anticorpos IgG e IgM contra hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO em pacientes com malária vivax não grave residentes na Amazônia brasileira	53
5.4. Associações entre a anemia e a resposta de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO em pacientes com malária vivax não grave residentes na Amazônia brasileira	55

5.5. Reconhecimento de moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO por anticorpos IgG e IgM de indivíduos com malária vivax grave residentes em área de alta transmissão no Peru.....	59
5.6. Associações entre a anemia e a resposta de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO em pacientes com malária vivax grave residentes em áreas de alta transmissão no Peru	62
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÃO	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
9. ANEXO.....	90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição mundial da malária no ano de 2013 (Fonte: Organização Mundial da Saúde, Relatório Mundial da Malária 2014).22
- Figura 2.** Mapa de incidência da malária no Peru, 2015 (Fonte: RENACE-DGE-MINSA, 2015). 23
- Figura 3.** Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2014. As diferentes cores indicam o risco de transmissão de malária, o qual foi estimado a partir do IPA = Índice Parasitário Anual (número de casos registrados por cada 1000 habitantes em uma determinada área). Baixo risco ($IPA < 10/1000$ habitantes), médio risco ($10,0 \leq IPA \leq 49,9/1000$ habitantes) e alto risco ($IPA > 50,0/1000$ habitantes). (Fonte: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/jpg/2015/junho/24/Mapa-de-risco-2014.jpg>> Acesso em: 12 de Novembro de 2015 às 13:17 horas). 24
- Figura 4.** Ciclo de vida do *Plasmodium vivax* (Fonte: Adaptado de MUELLER et al., 2009).26
- Figura 5.** Anemia na malária por *P. vivax*. Mecanismos imunológicos sugeridos para explicar a destruição de hemácias infectadas e não infectadas. Auto-anticorpo (rosa); anticorpos contra antígeno do parasito (verde). (Fonte: Adaptado de CASTRO-GOMES et al., 2014). 30
- Figura 6.** Influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO na resposta de anticorpos IgG e IgM. (A) Frequência de pacientes não graves infectados por *P. vivax* no Brasil soropositivos para IgG e (C) IgM. As diferenças entre as proporções de soropositividade foram avaliadas por meio do teste estatístico de qui-quadrado.* Indica valor de $p < 0,05$. (B) Magnitude da resposta de IgG e (D) IgM. Cada caixa representa o intervalo que contém os 50% centrais dos dados, sendo que a linha central representa a mediana. As linhas acima e abaixo da caixa indicam, respectivamente, os valores máximos e os mínimos. As diferenças quanto à

magnitude da resposta de anticorpos contra as hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO foram analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis acompanhado pelo teste *pos hoc* de Dunn's. As letras alfabéticas **a** e **b** representadas acima de cada caixa representam os resultados do teste de comparação múltipla de Dunn's. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de anticorpos detectados contra hemácias de diferentes tipos sanguíneos. 50

Figura 7. Influência da exposição à malária na resposta de anticorpos IgG e IgM. **(A)** Frequência de soropositivos para IgG e **(C)** IgM. As diferenças entre as proporções de soropositividade observadas para os pacientes primo-infectados e os com múltiplas infecções foram avaliadas por meio do teste estatístico de qui-quadrado. ns: não significativo ($p > 0,05$). **(B)** Magnitude da resposta de IgG e **(D)** IgM. Cada caixa representa o intervalo que contém os 50% centrais dos dados, sendo que a linha central representa a mediana. As linhas acima e abaixo da caixa indicam, respectivamente, os valores máximos e os mínimos. As diferenças quanto à magnitude da resposta de anticorpos contra as hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO foram analisadas por meio do teste de Mann-Whitney. 52

Figura 8. Influência da parasitemia à malária na resposta de anticorpos IgG e IgM. **(A)** Frequência de soropositivos para IgG e **(C)** IgM. As diferenças entre as proporções de soropositividade observadas para os pacientes com parasitemia inferior a 2737 e carga parasitária maior ou igual 2737 foram avaliadas por meio do teste estatístico de qui-quadrado. ns: não significativo ($p > 0,05$). **(B)** Magnitude da resposta de IgG e **(D)** IgM. Cada caixa representa o intervalo que contém os 50% centrais dos dados, sendo que a linha central representa a mediana. As linhas acima e abaixo da caixa indicam, respectivamente, os valores máximos e os mínimos. As diferenças quanto à magnitude da resposta de anticorpos contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO foram analisadas por meio do teste de Mann-Whitney. 54

Figura 9. Correlação entre os níveis de anticorpos IgG ou IgM e os de hemoglobina (teste de Correlação de Spearman). **(A)** Correlação entre níveis de IgG contra moléculas de hemácias A e hemoglobina. **(B)** Correlação entre níveis de IgM contra moléculas de hemácia A e

hemoglobina. (C) Correlação entre níveis de IgG anti-hemácias B e hemoglobina. (D) Correlação entre níveis de IgM contra moléculas de superfície de hemácias B e hemoglobina. (E) Correlação entre níveis de IgG contra moléculas de hemácias O e hemoglobina. (F) Correlação entre níveis de IgM contra hemácias O e hemoglobina 56

Figura 10. Soropositividade para IgG e IgM contra moléculas de hemácias de diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO entre os pacientes com malária vivax não grave residentes na Amazônia brasileira apresentando ou não anemia. Hemácias do grupo A (amarelo); hemácias do grupo B (laranja); hemácias do grupo O (verde). As barras hachuradas representam os pacientes infectados por *P. vivax* apresentando anemia (hemoglobina < 11 g/dL). O limiar de positividade foi definido como índice de reatividade (IR) ≥ 1 . IR = média da duplicata do soro teste/ *cut off*. Os valores de p foram determinados utilizando-se o teste estatístico do qui-quadrado. *Indica um valor de $p < 0,05$ 57

Figura 11. Níveis de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias normais dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO em pacientes com malária vivax não grave residentes na Amazônia brasileira apresentando ou não anemia. Hemácias do grupo A (amarelo); hemácias do grupo B (laranja); hemácias do grupo O (verde). Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da duplicata do soro teste/ *cut off*. Os resultados são apresentados como mediana e intervalo interquartil. As barras hachuradas representam os pacientes infectados por *P. vivax* apresentando anemia (Hb < 11 g/dL). Os valores de p foram determinados utilizando-se o teste estatístico de Mann-Whitney. *Indica um valor de $p < 0,05$. As linhas acima e abaixo da caixa indicam, respectivamente, os valores máximos e os mínimos..... 59

Figura 12. Influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO na resposta de anticorpos IgG e IgM. (A) Frequência de pacientes graves infectados por *P. vivax* do Peru soropositivos para IgG e (C) IgM. As diferenças entre as proporções de soropositividade foram avaliadas por meio do teste estatístico de qui-quadrado.* Indica valor de $p < 0,05$. (B) Magnitude da resposta de IgG e (D) IgM. Cada caixa representa o intervalo que contém os 50% centrais dos dados, sendo que a linha central representa a mediana. As linhas acima e abaixo da caixa

indicam, respectivamente, os valores máximos e os mínimos. As diferenças quanto à magnitude da resposta de anticorpos contra as hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO foram analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis acompanhado pelo teste *pos hoc* de Dunn's. As letras alfabéticas **a** e **b** representadas acima de cada caixa representam os resultados do teste de comparação múltipla de Dunn's. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de anticorpos detectados contra hemácias de diferentes tipos sanguíneos. 61

Figura 13. Soropositividade para IgG e IgM contra moléculas de hemácias de diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO entre os pacientes graves infectados por *P. vivax* apresentando ou não anemia. Hemácias do grupo A (amarelo); hemácias do grupo B (laranja); hemácias do grupo O (verde). As barras hachuradas representam os pacientes graves infectados por *P. vivax* apresentando anemia. O limiar de positividade foi definido como índice de reatividade (IR) ≥ 1 . IR = média da duplicata do soro teste/ *cut off*. 63

Figura 14. Níveis de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO em pacientes com malária grave residentes no Peru. Hemácias do grupo A (amarelo); hemácias do grupo B (laranja); hemácias do grupo O (verde). Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da duplicata do soro teste/ *cut off*. Os resultados são apresentados como mediana e intervalo interquartil. As barras hachuradas representam os pacientes infectados por *P. vivax* apresentando anemia (Hb < 11 g/dL). Os valores de p foram determinados utilizando-se o teste estatístico de Mann-Whitney. *Indica um valor de $p < 0,05$. As linhas acima e abaixo da caixa indicam, respectivamente, os valores máximos e os mínimos.....64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados hematológicos dos indivíduos saudáveis doadores de hemácias não infectadas.44
- Tabela 2.** Características epidemiológicas, parasitológicas e hematológicas dos 75 pacientes do Brasil infectados por *P. vivax* avaliados neste estudo.47
- Tabela 3.** Sintomatologia clínica relatada pelos 75 pacientes infectados por *P. vivax* no Brasil incluídos neste estudo.48
- Tabela 4.** Características hematológicas dos 18 pacientes residentes em área de alta transmissão de malária na Amazônia peruana.49

LISTA DE ABREVIATURAS

AC - Acre

AM - Amazonas

AP - Amapá

BSA - Albumina de Soro Bovino

BFU-E - *Burst-Forming Unit-Erythroid* / Unidade formadora de “explosão” de eritróide

CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CD55 - *Decay-Accelerating Factor*/fator acelerador de decaimento

CD59 - *Membrane Inhibitor of Reactive Lysis*/inibidor de lise reativa de membrana

CFU-E - *Colony-Forming Unit-Erythroid*/ Unidade formadora de colônias de eritróide

CHMC - Concentração da hemoglobina corpuscular média

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CR1 - *Complement Receptor 1* / Receptor do complemento 1

CS - Proteína circumesporozóito

Cut off - Limiar de positividade

DO - Densidade óptica

DIRESA - *Dirección Regional de Salud*

EDTA - *Ethylenediaminetetraacetic acid*

ELISA - Ensaio imunoenzimático

EPO - Eritropoietina

DGE - *Dirección General de Epidemiología* / Direção geral de epidemiologia

FMT- Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

Hb - Hemoglobina

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HMC - Hemoglobina Corpuscular Média

HSPG - *Heparan Sulfate ProteoGlycans* / Proteoglicanos de heparana-sulfato

IBE - Instituto de Bolsas de Estudos

IR - Índice de Reatividade

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IFN- γ - Interferon gama
IgG - Imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
IL-10 - Interleucina -10
IPA - Incidência Parasitária Anual
M - Número de episódios prévios de malária
MA - Maranhão
MS - Ministério da Saúde do Brasil
MSP - Proteína de Superfície de Merozoito
MT - Mato Grosso
MINSA - *Ministerio de Salud del Perú*
OMS - Organização Mundial de Saúde
PA - Pará
PAHO - *Pan Health American Organization*/ Organização Pan-Americana de Saúde
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
OPD - *O-Phenylenediamine Dihydrochloride*
PBS - *Phosphate Buffered Saline* / Tampão fosfato salino
PS - *PhosphatidylSerine* / Fosfatidilserina
RBCs - *Red Blood Cell* / Células vermelhas sanguíneas
RENACE - Rede Nacional de Epidemiologia
RO - Rondônia
ROS - *Reactive Oxygen Species* / Espécies reativas de oxigênio
RR - Roraima
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIVEP - Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica
SVS - Secretaria de Vigilância à Saúde
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TO - Tocantins
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UFMT - Universidade Federal de Mato Grosso

RESUMO

A destruição de hemácias não infectadas tem sido associada à anemia na malária, porém, os mecanismos imunológicos envolvidos na destruição dessas células permanecem desconhecidos, principalmente nos casos de infecção por *P. vivax*. Um dos fatores que poderiam contribuir para a destruição dessas hemácias são os auto-anticorpos produzidos durante a infecção. Entretanto, nota-se, na literatura, uma escassez de estudos no que se refere à relação entre autoimunidade e anemia em infecções por *P. vivax*. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar as associações entre a resposta de anticorpos, IgG e IgM, contra moléculas de hemácias de diferentes grupos sanguíneos (A, B e O) e a anemia em pacientes infectados por *P. vivax*. Para isso, ensaios de *Cell-ELISA* foram realizados, utilizando-se eritrócitos de indivíduos saudáveis nunca expostos à malária e pertencentes a três grupos sanguíneos (A, B e O). Foram incluídos, ainda, pacientes com malária vivax não grave residentes em áreas de baixa transmissão na Amazônia brasileira (n = 75) e pacientes com malária vivax grave residentes em área de transmissão intensa no Peru (n = 18). Verificou-se que, para pacientes com malária não grave, o reconhecimento, por anticorpos IgG, contra moléculas de hemácias do grupo sanguíneo A, foi inferior ao observado para hemácias dos grupos B e O. Por outro lado, no que se refere à resposta de IgM, observou-se que as hemácias do grupo B foram menos reconhecidas que os eritrócitos dos demais grupos sanguíneos. Ainda no que se refere aos pacientes não graves, não foi encontrada nenhuma associação significativa entre a exposição ou a parasitemia e a resposta de anticorpos contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos. Além disso, associações negativas entre os níveis de hemoglobina e os de anticorpos IgG, bem como os de IgM, foram observadas. Quando comparamos a resposta de anticorpos IgG ou IgM entre pacientes anêmicos e não anêmicos, observou-se que ambas as respostas foram maiores para pacientes anêmicos. Resultados contrários foram encontrados para pacientes com malária grave residentes no Peru, já que nesse caso, os pacientes anêmicos apresentaram níveis de IgG e IgM inferiores aos observados para os não anêmicos. Todos esses achados ampliam a nossa compreensão sobre a relação entre a resposta de anticorpos direcionada contra hemácias dos diferentes grupos sanguíneos e a anemia na malária vivax.

ABSTRACT

The destruction of uninfected RBCs has been associated with anemia in malaria but the mechanisms involved in this clearance remain unknown, particularly in regard to *P. vivax*. One of the factors that could contribute to this destruction is self-antibodies produced during the infection. However, few studies have concerned the relationship between autoimmunity and anemia in *P. vivax* infections. The aim of this study was to evaluate the associations between IgG or IgM antibody responses against erythrocytes from different blood groups (A, B and O) and anemia in patients infected with *P. vivax*. For this, Cell-ELISA assays were performed using erythrocytes from healthy individuals never exposed to malaria and whose blood groups were A, B or O. Patients with uncomplicated vivax malaria residing in low-endemic areas in the Brazilian Amazon (n = 75) and patients with severe malaria living in an intense transmission area of malaria in Peru (n = 18) were also included. It has been found that for patients with non-severe malaria, the recognition by antibodies IgG against blood group A erythrocytes molecules was lower than that observed for the B and O. On the other hand, with regard to the IgM response, it was observed that the red blood cells of group B were less recognized in comparison to erythrocytes from the other blood groups. Moreover, when non-severe patients were evaluated, no significant association was found between exposure or parasitaemia and antibody response against red cell molecules of different blood groups. In addition, negative associations between hemoglobin and IgG or IgM antibodies were observed. When IgG or IgM antibody responses were compared between anemic and non-anemic patients, we observed that both responses were higher for the anemic patients. By the other hand, different results were found for patients with severe malaria living in Peru, since it was reported that in this area the anemic patients had lower levels of IgM and IgG than those observed for the non-anemic. All these findings increase our understanding of the relationship between antibody responses directed against erythrocytes of different blood groups and anemia in vivax malaria.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Situação atual da malária no mundo

Cinco espécies de plasmódios parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, sendo que esta última circula entre símios, em áreas florestais do Sudeste asiático, (COX-SINGH et al., 2008; COLLINS & BARNWELL, 2009) e a infecção provocada por ela tem caráter zoonótico (SINGH et al., 2004; COX SINGH et al., 2008; SINGH & DANESHVAR, 2010).

Das espécies mencionadas acima, *P. falciparum* é a mais virulenta, já que é responsável por elevados níveis de mortalidade, principalmente no continente africano (OMS, 2004). *P. vivax*, por sua vez, é a espécie mais amplamente distribuída no mundo, devido à sua grande diversidade fenotípica e é responsável pela maioria dos casos humanos diagnosticados fora da África (MENDIS et al., 2001; CARTER & MENDIS, 2002; GUERRA et al., 2010). Embora *P. vivax* tenha sido negligenciada, por muito tempo, pela comunidade científica, pelo fato de infecções por essa espécie serem geralmente associadas à baixa mortalidade, a morbidade em comunidades endêmicas devido a essa espécie de parasito é muito alta. Além disso, o crescimento no número de casos de malária grave por esta espécie, bem como os relatos de cepas resistentes aos principais antimaláricos utilizados para o tratamento em diferentes países revelam que *P. vivax* não pode ser negligenciada (BAIRD et al., 2004; BAIRD et al., 2007; ARÉVALO-HERRERA et al., 2010).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 3,3 bilhões de pessoas, em 97 países e territórios, encontram-se sob o risco de adquirir malária (Figura 1), sendo que, em 2013, 198 milhões de casos dessa doença ocorreram, levando à morte de 584.000 pessoas (OMS, 2014). Em 2015, foram registrados 214 milhões de novos casos de malária e 438.000 mortes em todo mundo (OMS, 2015).

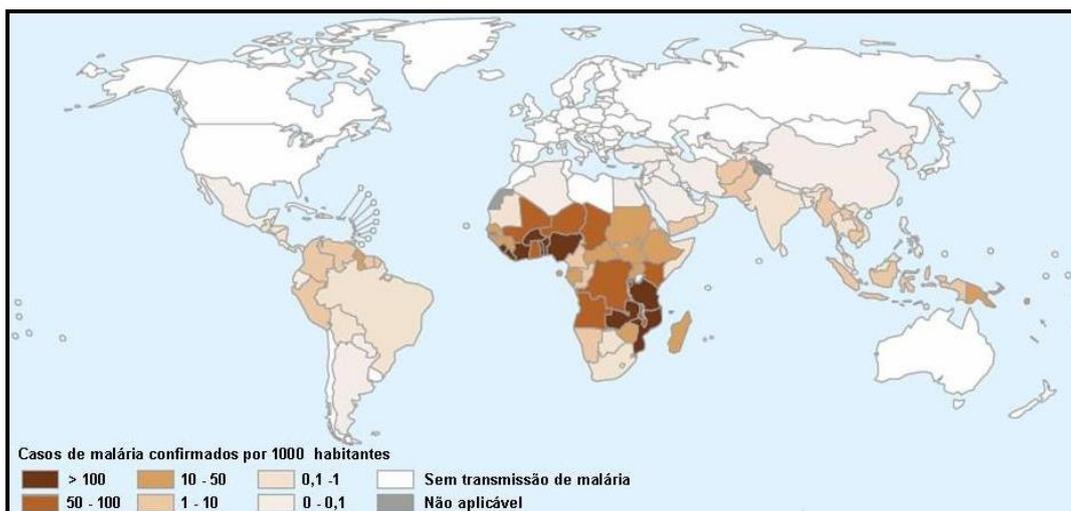


Figura 1. Distribuição mundial da malária no ano de 2013 (Fonte: Organização Mundial da Saúde, Relatório Mundial da Malária 2014).

Nas Américas, a malária ocorre em 21 países e, segundo estatísticas da Organização Pan-Americana de Saúde, foi registrado, no ano de 2012, nessa região, um total de 469.000 casos de malária que provocaram a morte de 108 pessoas (PAHO, 2013). Nesse continente, 30% da população reside em áreas de risco localizadas, principalmente, na floresta amazônica, que se estende por oito países, incluindo Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela, Suriname e Guiana (PAHO 2011; OMS 2013). E, apesar de várias décadas de intensos esforços de controle, nota-se que, na maioria desses países, a malária ainda representa um dos principais problemas de saúde pública.

No Peru, por exemplo, o risco de transmissão de malária está presente em 70,8% dos estados que compõem o país. Observa-se, contudo, que 89,5% de todos os casos de malária concentra-se no estado de Loreto, 9% nos estados de Junín, Ayacucho e Cusco, e 0,6% em Madre de Dios. A nível nacional, são 141 distritos (84,9%) com transmissão ativa de malária, sendo que 35 deles relatam uma incidência parasitária anual (IPA) superior a dez por 1000 habitantes (Figura 2). Nota-se, ainda, que 83,8% dos casos de malária são devido a *P. vivax* e 16,2% por *P. falciparum*.

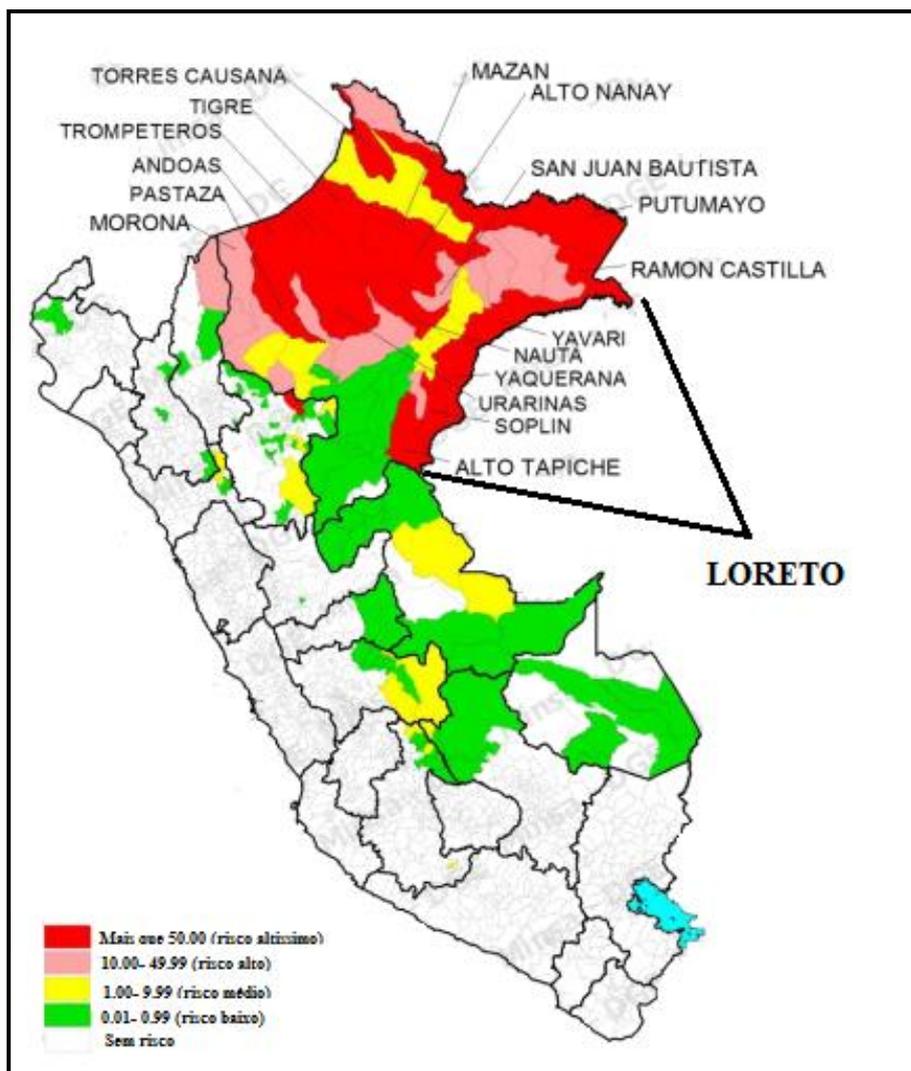


Figura 2. Mapa de incidência da malária no Peru, 2015 (Fonte: RENACE-DGE-MINSA, 2015).

No Brasil, a malária também é considerada um dos principais problemas de saúde e, nesse país, mais de 99% dos casos registrados ocorrem na região amazônica, que abrange os estados do Acre (AC), Amazonas (AM), Amapá (AP), Maranhão (MA), Mato Grosso (MT), Pará (PA), Rondônia (RO), Roraima (RR) e Tocantins (TO) (Figura 3).

A grande concentração dos casos nessa região está associada às condições ambientais e socioeconômicas que propiciam a proliferação de *Anopheles darlingi*, incriminado como o principal vetor. Nessas áreas, a transmissão da doença é geralmente focal, instável, e a notificação de casos aumenta principalmente após o período chuvoso do ano (OMS, 2009). Nota-se, ainda, que assim como ocorre para outras doenças tropicais, a malária afeta, principalmente, pessoas dos estratos sociais mais baixos e com dificuldade de acesso aos

serviços de saúde. Entretanto, surtos de malária também têm ocorrido, com certa frequência, em outros estados do Brasil fora da região amazônica. Estes surtos podem ser explicados por migrações de pessoas da região amazônica e/ou de outros países para as regiões extra-amazônicas. Segundo estatísticas dos órgãos de saúde pública, apenas 19% de todos os casos de malária na região extra-amazônica são diagnosticados e tratados no intervalo de 48 horas após o aparecimento dos sintomas, em contraste aos 60% dos casos diagnosticados e tratados na região amazônica. Isso pode explicar a elevada proporção de casos de malária grave em áreas não endêmicas. De fato, a taxa de fatalidade de malária em regiões fora da Amazônia é bem maior que a observada para a região amazônica. A falta de experiência por parte dos profissionais de saúde das áreas não endêmicas em diagnosticar e tratar a malária, bem como o pobre conhecimento público em geral, justificam essa elevada taxa de fatalidade e constituem agravantes que dificultam o tratamento e o controle da doença.

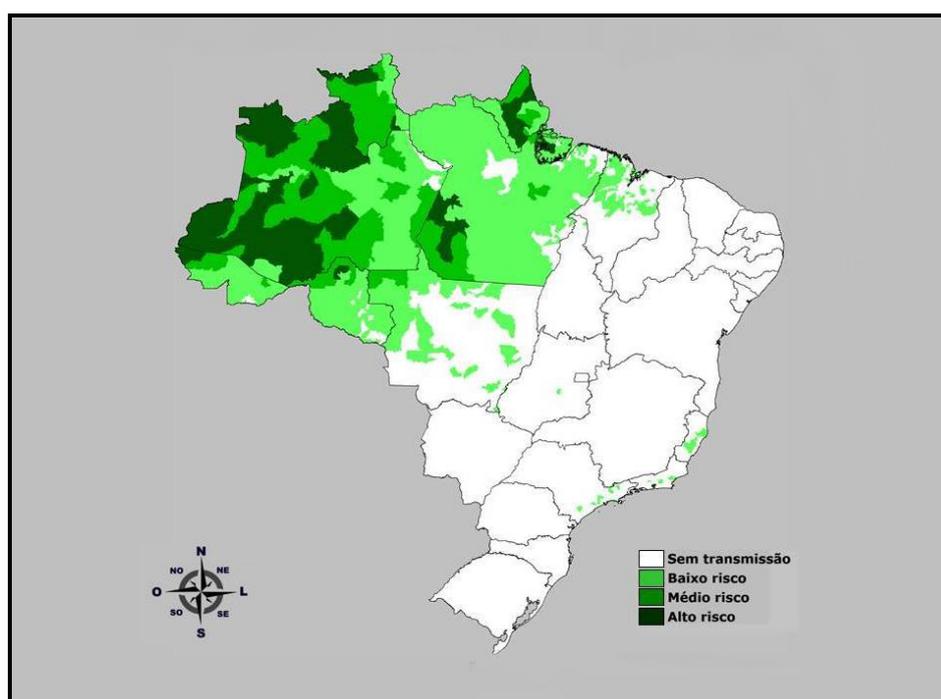


Figura 3. Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2014. As diferentes cores indicam o risco de transmissão de malária, que foi estimado a partir do IPA = Índice Parasitário Anual (número de casos registrados por cada 1000 habitantes em uma determinada área). Baixo risco ($IPA < 10/1000$ habitantes), médio risco ($10,0 \leq IPA \leq 49,9/1000$ habitantes) e alto risco ($IPA > 50,0/1000$ habitantes). (Fonte: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/jpg/2015/junho/24/Mapa-de-risco-2014.jpg>> Acesso em: 12 de Novembro de 2015 às 13:17 horas).

Em termos de distribuição da malária na Amazônia brasileira, observa-se que as áreas com elevado risco de transmissão geralmente estão intercaladas entre áreas de baixo ou moderado risco (Figura 3). A concentração dos casos nessas regiões está associada à expansão das fronteiras agrícolas e econômicas. Isso porque fatores como a ocupação desordenada das periferias das grandes cidades, a extração madeireira, a pecuária, a formação de assentamentos de reforma agrária e a mineração, além de provocarem grandes mudanças ambientais, como o desmatamento, também alteram a biologia do vetor e a transmissão da malária, pelo fato de agrupar um grande número de migrantes não-imunes perto dos criadouros do vetor.

Segundo estatísticas do Ministério da Saúde, em média, 311 casos de malária têm sido relatados, anualmente, na Amazônia brasileira, nos últimos 14 anos, mas com uma nítida redução ao longo desse período. Entre os anos de 2000 e 2014, o número de casos relatados caiu de 615.247 para 138.338, apesar do crescimento da população. Verificou-se que os estados do PA e AM, juntos, registraram quase 70% do total de casos ocorridos no Brasil em 2012; 14,4% desses casos ocorreram em áreas urbanas, 25% em áreas de exploração de minas e, o restante, em assentamentos rurais e áreas indígenas (MS/SVS 2013, SVS 2013).

Três espécies de *Plasmodium* têm sido associadas aos casos nativos de malária no Brasil: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. A transmissão por *P. falciparum* predominou entre 1985 e 1990 e, a partir daí, diminuiu, de forma constante, ao longo dos anos, ao passo que *P. vivax* apresentou uma tendência de crescimento ao longo da década de 90. Atualmente, *P. vivax* é a espécie predominante no Brasil, já que é responsável por aproximadamente 83,7% de todos os casos de malária notificados no país (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Embora a malária vivax geralmente esteja associada a um quadro clínico mais brando com baixa mortalidade, a morbidade devido a infecções por esta espécie de parasito é bastante elevada em comunidades endêmicas e, no ano passado, 93 internações devido à infecção por *P. vivax* foram registradas no país, sendo que a maioria delas ocorreu no estado do Amazonas. Em relação à *P. malariae*, sua transmissão permanece baixa e focal e esta espécie é responsável por menos de 1% de todas as infecções de malária confirmadas por exame de gota espessa no Brasil (Sivep-Malária/SVS/MS, 2013; Sivep-Malária/SVS/MS, 2015).

1.2. Ciclo Biológico de *Plasmodium*

A forma infectante do parasito *Plasmodium* é o esporozoítio, uma forma evolutiva alongada, com extremidades afiladas, que é inoculada juntamente com a saliva, na pele do hospedeiro vertebrado, pela probóscide do anofelino, durante o repasto sanguíneo (Figura 4) (MOTA & RODRIGUEZ, 2004; AMINO et al., 2006; SINNIS & ZAVALA, 2008).

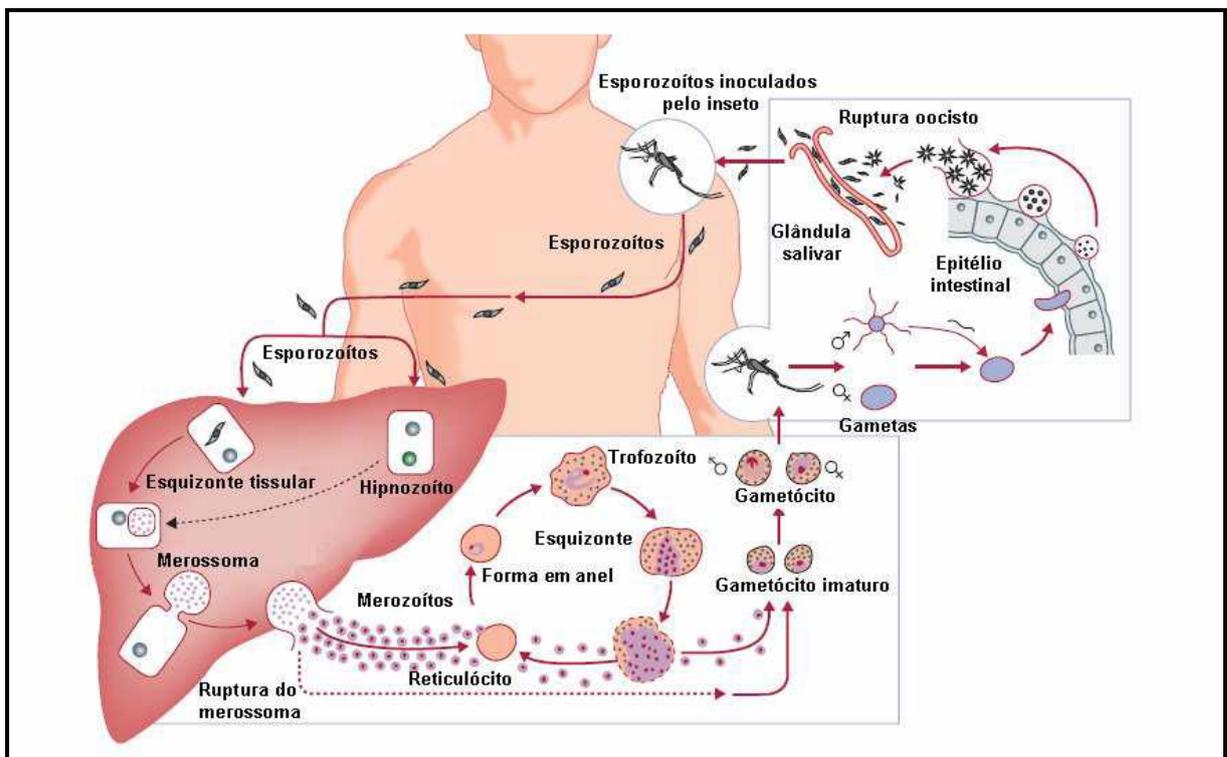


Figura 4. Ciclo de vida do *Plasmodium vivax* (Fonte: Adaptado de MUELLER et al., 2009).

Diferentes estudos têm mostrado que cerca de 50% do total de esporozoítios inoculados na pele do hospedeiro deixam o local da picada e, aproximadamente 30% deste total migra até os vasos linfáticos, de onde serão drenados para os linfonodos mais próximos, onde a maioria dos esporozoítios será degradada e destruída por células dendríticas, ao passo que os outros 70% pode migrar e alcançar a corrente sanguínea (AMINO et al., 2006; YAMAUCHI et al., 2007; EJIGIRI & SINNIS, 2009). Uma vez no sangue, os esporozoítios são transportados pelo fluxo sanguíneo até o endotélio do fígado. Eles atravessam o espaço de Disse e invadem os

hepatócitos, iniciando o estágio hepático da infecção (VANDERBER & STEWART, 1990; ISHINO et al., 2004). A interação entre o parasito e as células hepáticas pode ocorrer de diversas maneiras: 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 (MOTA et al., 2001; MOTA et al., 2002; MOTA et al., 2004). Durante a travessia celular, acreditava-se que algumas células atravessadas eram capazes de reparar o dano causado pelo parasito durante a migração através da regeneração de suas membranas celulares, ao passo que outros hepatócitos morriam em poucos minutos. Entretanto, em um estudo recente, FORMAGLIO e colaboradores (2014) monitoraram, *in vivo*, a atividade migratória dos esporozoítos inoculados na pele, bem como a integridade da membrana celular ao longo do tempo, e constataram, pela primeira vez, por meio de imagem intravital, que a maioria das células atravessadas não sobrevive à travessia, provavelmente devido ao comprometimento da permeabilidade de suas membranas celulares (FORMAGLIO et al., 2014).

Essa interação entre o parasito e a célula hospedeira parece contar com a participação de diferentes proteínas do *Plasmodium* como a proteína circum-esporozoíto (CS), presente na superfície do esporozoíto, que interage com os proteoglicanos de heparan-sulfato na superfície do hepatócito, auxiliando na internalização do parasito (PRUDÊNCIO et al., 2006; EJIGIRI & SINNIS, 2009). Alguns estudos têm sugerido que a ativação da invasão está associada aos níveis de expressão de proteoglicanos de heparan-sulfato na superfície dos hepatócitos. Dessa forma, o contato dos esporozoítos com células que expressam níveis elevados desses proteoglicanos ativaria o início do processo de invasão, ao passo que o contato dos esporozoítos com células que expressam menores níveis de tais moléculas, resultaria em migração contínua dos esporozoítos pelas células com ausência de invasão (COPPI et al., 2007; EJIGIRI & SINNIS, 2009).

É importante mencionar que, na fase hepática da infecção por *P. vivax*, alguns esporozoítos podem se tornar dormentes, – os hipnozoítos –, formas responsáveis pelas recaídas tardias da infecção. Os demais esporozoítos continuam o ciclo e se transformam em trofozoítos depois de um período de aproximadamente dez dias. O trofozoíto se multiplica, assexuadamente, formando um esquizonte multinucleado que origina milhares de merozoítos, os quais são liberados na corrente sanguínea por meio de estruturas vesiculares arredondadas que evaginam da membrana do hepatócito, os merossomas (WHITE, 2003; STURM et al.,

2006). Essas vesículas conseguem atravessar o espaço de Disse por diapedese, camuflando o parasito e fazendo com que ele não seja reconhecido pelas células de Kupfer. Através da circulação, os merossomas são transportados para outros órgãos e, graças às forças de cisalhamento existentes no interior das veias hepáticas e de outras veias maiores, tais vesículas se subdividem em pequenas unidades que, então, são transportadas para o coração e, em seguida, para os pulmões. Nesse órgão, se acumulam nos capilares pulmonares, onde ocorre a desintegração da membrana dos merossomas e a consequente liberação dos merozoítos na microcirculação pulmonar. Do ponto de vista evolutivo, essa estratégia é vantajosa para o parasito. Isso porque, nesse local, a densidade de macrófagos é baixa e, além disso, a velocidade reduzida do fluxo sanguíneo devido à obstrução capilar pelos merossomas promove um acondicionamento denso de eritrócitos que facilita o sucesso da infecção pelo parasito (FADOK et al., 2001; LI et al., 2003; STURM et al., 2006; BAER et al., 2007).

É importante destacar que, embora os hepatócitos parasitados exibam características apoptóticas, eles não são fagocitados e nem destruídos pelas células de Kupfer e nem por outras células fagocíticas presentes nos sinusóides hepáticos. Acredita-se que isso ocorra devido ao consumo de íons cálcio presentes no meio intracelular pelos plasmódios, o que inibiria a exposição de resíduos de fosfatidilserina na superfície da membrana do merossoma (FADOK et al., 2001; LI et al., 2003; STURM et al., 2006).

Os merozoítos liberados invadem, então, suas células alvo (os reticulócitos, no caso de *P. vivax*, ou hemácias de todas as idades, no caso de *P. falciparum*), deslocando-se, ativamente, por meio de uma junção que eles estabelecem com a célula hospedeira (HANS et al., 2005; MILLER et al 2002). Após a invasão, crescimento e esquizogonia, novos merozoítos são liberados dos reticulócitos/hemácias e o ciclo de infecção se repete. Essa fase do ciclo é a responsável pela patologia da doença.

Nota-se, contudo, que nem todos os merozoítos que obtêm êxito na invasão sofrem esquizogonia e produzem mais merozoítos; alguns deles se transformam em gametócito masculino ou feminino. Durante o repasto sanguíneo, os gametócitos são ingeridos por anofelinos, iniciando-se o ciclo sexuado do parasito (esporogônico) no intestino. Ocorre, então, a liberação de gametas masculinos e femininos, a sua fusão, e a consequente formação do ovo (zigoto). Esse, por sua vez, se transforma em uma forma móvel, o oocineto, que se movimenta por meio de contrações no corpo do inseto e migra até a parede do intestino

médio, onde se encista na camada epitelial do órgão, passando a ser chamado de oocisto. Dentro do oocisto, milhares de esporozoítos se desenvolvem por meio de divisão esporogônica. Após a ruptura da parede do oocisto, os esporozoítos são liberados e disseminam-se, por meio da hemolinfa, por todo o corpo do inseto. Alguns esporozoítos conseguem atingir as células das glândulas salivares, e estão aptos a serem transmitidos para a próxima vítima humana, via picada de um anofelino, reiniciando o ciclo no hospedeiro vertebrado (WHITE, 2003; SCHOFIELD & GRAU, 2005).

1.3. Patogênese da anemia na malária vivax

A anemia é uma manifestação clínica comum em infecções plasmodiais e, assim como a malária cerebral, a anemia grave é uma das principais causas de morbidade e mortalidade na malária. Entretanto, quando comparada a outras áreas de pesquisa como imunologia, vacinas e genômica, a anemia associada à malária tem sido alvo de pouca investigação por parte da comunidade científica e, o que se observa na literatura, é que grande parte dos estudos são epidemiológicos, havendo uma escassez de informações no que se refere aos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da anemia na malária. Como no passado já havia a possibilidade de tratar a anemia associada à malária por meio de transfusão de sangue, é possível que essa seja uma das razões que explique, em parte, essa falta de interesse em se estudar essa manifestação clínica (CHANG & STEVENSON, 2004).

No entanto, essa estratégia de tratamento tem sido bastante questionada devido ao risco de transmissão de doenças e, também, devido a problemas em termos de logística, que dificultam a realização de tal procedimento (MOORE et al., 2001; FENDEL et al., 2010). Como consequência, observa-se que transfusões sanguíneas urgentes muitas vezes não são possíveis, e um percentual significativo de crianças com anemia grave associada à malária morre antes de se submeter à transfusão (BOJANG et al., 1997). Uma alternativa para melhorar essa estimativa seria desenvolver novas abordagens terapêuticas, porém isso se torna um obstáculo, já que a etiologia da anemia associada à malária ainda não é bem elucidada, principalmente no que se refere a infecções por *P. vivax*. Mas existe um consenso de que a patogênese da anemia associada à malária é complexa e multifatorial. Parte das hemácias é

perdida durante a fase sanguínea da infecção, quando o próprio parasito provoca alterações estruturais, bioquímicas e funcionais nos eritrócitos, que acabam levando à ruptura dessas células (Figura 5) (GLUSHAKOVA et al., 2005; MAIER et al., 2009; MILLHOLLAND et al., 2011).

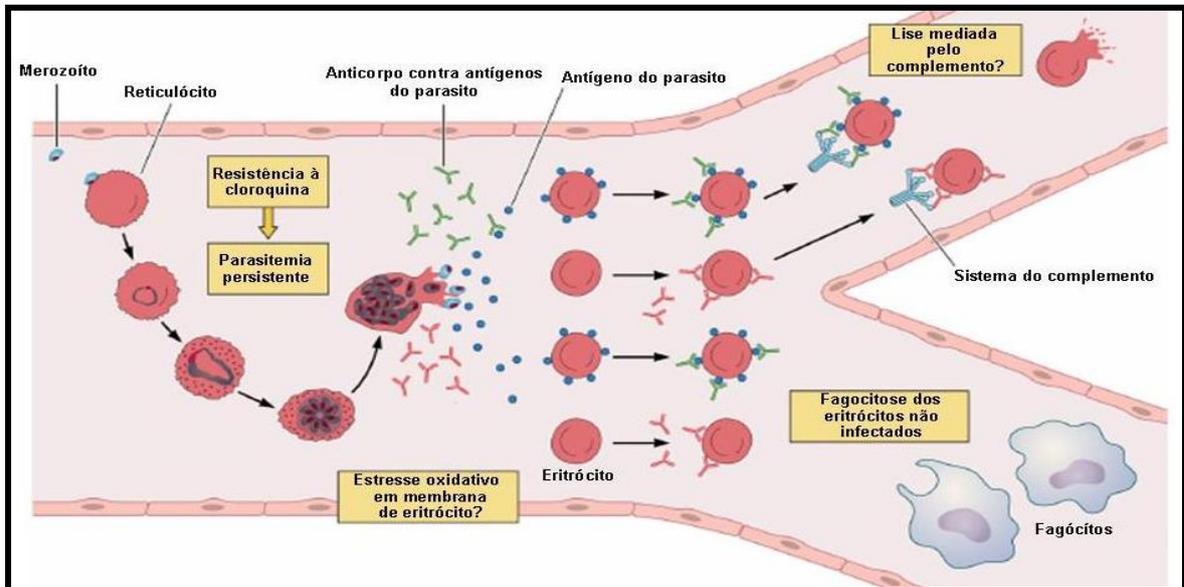


Figura 5. Anemia na malária por *P. vivax*. Mecanismos imunológicos sugeridos para explicar a destruição de hemácias infectadas e não infectadas. Auto-anticorpo (rosa); anticorpos contra antígeno do parasito (verde). (Fonte: Adaptado de CASTRO-GOMES et al., 2014).

Entretanto, *P. vivax* infecta, preferencialmente, reticulócitos, que correspondem a menos que 2% do total de eritrócitos. Logo, essas células destruídas seriam rapidamente repostas pela medula óssea por meio da eritropoiese (QUINTERO et al., 2011). Nota-se, contudo, que essa destruição pode persistir por semanas após o tratamento, mesmo quando os parasitos já foram eliminados da circulação (WOODRUFF et al., 1979; RITTER et al., 1993; CAMACHO et al., 1998; BIEMBA et al., 1998; PRICE et al., 2001). Além disso, muitas vezes, os níveis de hemoglobina mensurados após o tratamento não retornam aos valores observados no período pré-infecção (COLLINS et al., 2003), sugerindo que outros fatores podem estar envolvidos na patogênese da anemia associada a infecções por *P. vivax* (CASTRO-GOMES et al., 2014). JAKEMAN et al. (1999) e COLLINS et al. (2003) avaliaram os dados de parasitemia e anemia de pacientes submetidos à terapia com *P. falciparum* e *P. vivax*), respectivamente, para o tratamento de neurosífilis, e, a partir de

modelos matemáticos, estimaram que, para cada hemácia parasitada, cerca de nove não parasitadas eram removidas da circulação, no caso de *P. falciparum* e, aproximadamente 32, no caso de *P. vivax*, mostrando que a destruição de eritrócitos não infectados é um componente importante da anemia. Além disso, também já foi demonstrado, que o tempo de sobrevivência de eritrócitos não infectados é inferior em pacientes que se recuperam da malária *falciparum* e *vivax*, mesmo após a eliminação dos parasitos (LOOAREESUWAN et al., 1987).

Diferentes fatores podem induzir a remoção de hemácias não infectadas durante a infecção. Um deles é o dano oxidativo direto e/ou transferência de lipídios oxidados de hemácias infectadas para não infectadas (UYOGA et al., 2012), que são reconhecidas por macrófagos e removidas da circulação (Figura 5) (ARESE et al., 2005). Além disso, a baixa expressão de proteínas reguladoras do complemento (CR1, CD55 e CD59), associada a um aumento nos níveis de imunocomplexos durante a malária, também contribuem para tornar as hemácias mais suscetíveis à lise mediada pelo complemento (STOUTE et al., 2003).

Por outro lado, as citocinas produzidas durante a resposta imune contra a malária também podem estar envolvidas na destruição de hemácias não infectadas. Nesse sentido, sabe-se que a resposta inflamatória à infecção resulta em um aumento nos níveis de citocinas como, TNF- α , IFN- γ e IL-10, e já se mostrou que elevados níveis de TNF- α , por si só, ou quando combinado com outras citocinas, inibe o desenvolvimento de células dos tipos BFU-E (*Burst-Forming Unit-Erythron* – unidades formadoras de explosão eritroide) e CFU-E (*Colony-Forming Erythron* – unidades formadoras de colônia eritroide). Essa interferência na diferenciação das células eritróides exercida pelo TNF- α ocorre via regulação de fatores de transcrição específicos e, ainda, por meio da redução da produção de eritropoietina (hormônio regulador da eritropoiese) (ROODMAN et al., 1987; JELKMANN, 1998; WICKRAMASINGHE, 2000). No que se refere ao IFN- γ , nota-se que ele também inibe a eritropoiese, atuando da mesma maneira que o TNF- α na inibição de células progenitoras eritróides (DAI & KRANTZ, 1999; LIBREGTS et al., 2011). A IL-10, por sua vez, é considerada uma citocina anti-inflamatória que tem sido associada à proteção contra anemia grave, já que níveis elevados de IL-10 limitam o efeito de TNF- α em células vizinhas (OTHORO et al., 1999; THUMA et al., 2011).

Outros fatores que também podem predispor as hemácias à remoção são: redução na deformabilidade da célula, modificação da membrana eritrocítica pela ligação de IgG ou complemento, super regulação da função fagocítica do hospedeiro ou, ainda, adsorção de antígenos derivados do parasito à membrana eritrocitária. Nesse sentido, já se evidenciou que alguns exo-antígenos termolábeis liberados por culturas de *P. falciparum* podem se ligar às hemácias, formando protusões em sua membrana e modulando a deformabilidade dessas células (NAUMANN et al., 1991). Outros antígenos como o glicosilfosfatidilinositol (BRATTIG et al., 2008), proteínas associadas às roptrias de *P. falciparum* (LAYEZ et al., 2005; AWAH et al., 2009) e a hemozoína, um subproduto do metabolismo do parasito (JARAMILLO et al., 2004), também são liberados na circulação e podem se depositar na superfície das hemácias, levando à rigidificação dessas células. Desta forma, hemácias não infectadas podem ser reconhecidas por anticorpos e removidas da circulação por meio de fagocitose ou por lise mediada pelo complemento (Figura 5) (AWAH et al., 2009; AWAH et al., 2011).

É importante destacar, ainda, que, assim como outras doenças infecciosas que podem levar à anemia (VONLANDENBERG et al., 2007; TOPLAK & AVCIN, 2009; VERGANI & MIELI-VERGANI, 2013;), a malária também induz a geração de auto-anticorpos contra uma diversidade de antígenos, por exemplo, contra proteínas do citoesqueleto (BERZINS et al., 1983; TERNYNCK et al., 1991) e membrana (ZOUALI et al., 1986; ARESE et al., 2005;), enzimas (RITTER et al., 1993), motivos de carboidratos (RAVINDRAN et al., 1988; SATAPATHY et al., 1993), DNA (ADU et al., 1982; DANIEL RIBEIRO et al., 1984; ZOUALI et al., 1986), e fosfolipídios (JAKOBSEN et al., 1993; FACER & ANGIOSTRATDISOU, 1994; CONSIGNY et al., 2002). Esses autoanticorpos podem se ligar a hemácias não infectadas, mediando a fagocitose dessas células e contribuindo para a anemia (Figura 5).

1.4. Auto-anticorpos na malária

A complexa composição antigênica dos microrganismos é considerada a principal causa da hiperestimulação do sistema imune e, por essa razão, os agentes infecciosos compartilham a habilidade de ativar uma fração elevada de células linfóides totais, muitas das

quais se diferenciam para executar funções efetoras. As consequências dessa ativação do sistema imune incluem o desenvolvimento de respostas não específicas de células B e T, a imunossupressão das respostas humoral e celular para antígenos homólogos e heterólogos e, ainda, o desencadeamento de processos autoimunes que podem surgir a partir da expansão de clones auto-reativos (REINA-SAN-MARTÍN et al., 2000).

Uma das características proeminentes da resposta imune durante a malária, tanto em humanos como em modelos experimentais animais, é o aumento de imunoglobulinas no soro (McCREGOR, 1956, ABELE et al. 1965). Nota-se que grande parte dessas imunoglobulinas não é direcionada contra antígenos do parasito, mas, na verdade, tem especificidade para diferentes auto-antígenos (CURTAIN et al. 1964). Assim, uma variedade de anticorpos tem sido descrita, incluindo aqueles que reconhecem componentes próprios de tecidos e órgãos, como: eritrócitos, linfócitos, ácidos nucleicos, citoesqueleto, músculo liso, coração e tireóide (SHAPER et al., 1968; WELLS et al., 1980; ADU et al., 1982; DANIEL-RIBEIRO et al., 1983; DANIEL-RIBEIRO et al., 1991; JAKOBSEN et al., 1993; BANSAL et al., 2009; GITAU et al., 2013; HOMMEL et al., 2014). Entretanto, ainda não se sabe se esses auto-anticorpos desempenham um papel na imunidade protetora contra os estágios sanguíneos do parasito ou se tais moléculas exercem um papel patogênico.

A literatura fornece evidências nos dois sentidos. Por um lado, os auto-anticorpos podem participar na proteção imune contra a malária de diferentes maneiras: auto-anticorpos direcionados contra antígenos modificados expressos na membrana de eritrócitos durante o parasitismo, bem como auto-anticorpos reativos com cripto ou neo-antígenos expressos na membrana de eritrócitos normais ou de eritrócitos parasitados podem mediar a remoção, tanto de hemácias normais, quanto de infectadas; paralelamente a isso, auto-anticorpos anti-idiotípicos específicos para um sítio de ligação de um anticorpo anti-merozoíto podem mimetizar o ligante do parasito para o receptor do eritrócito, por meio da competição com o parasito, bloqueando a invasão do eritrócito; auto-anticorpos podem, ainda, ter reação cruzada com o material do parasito (como antígenos nucleares ou do citoesqueleto), exercendo uma atividade parasiticida direta; além disso, a própria rede natural de auto-anticorpos pode contribuir para a proteção, ao atuar como a primeira barreira de defesa anti-microbiana; e, finalmente, auto-anticorpos anti-fosfolipídeos também podem atuar, neutralizando as propriedades patogênicas de fosfolipídeos derivados do parasito (DANIEL-RIBEIRO & ZANINI, 2000).

Por outro lado, diferentes estudos têm mostrado uma associação entre os níveis de auto-anticorpos e os sintomas clínicos na malária, sugerindo o uso de tais moléculas como biomarcadores de gravidade. Nesse sentido, já se mostrou que auto-anticorpos IgG contra antígenos do cérebro estão aumentados em pacientes infectados por *P. falciparum* e se correlacionam com a gravidade da doença, tanto em pacientes africanos (Gâmbia) (GUIEYEDI et al., 2007), quanto em indianos (BANSAL et al., 2009). Auto-anticorpos contra proteínas de hemácias também já foram relatados durante as infecções plasmodiais (FACER et al., 1980; BERZINS, 1983; FERNANDES et al., 2008; FONTAINE et al., 2010) e têm sido implicados na patogênese da anemia associada à malária. ROSENBERG et al. (1973) avaliaram a magnitude da resposta de IgM em pacientes com malária falciparum após a remoção dos parasitos e constataram que os pacientes infectados apresentando anemia possuíam títulos de anticorpos anti-hemácia superiores aos detectados em pacientes infectados sem anemia. Além disso, as hemácias não-parasitadas dos indivíduos anêmicos sobreviveram por um período de tempo mais curto quando comparadas às mesmas células dos pacientes não-anêmicos. Auto-anticorpos IgM específicos para a enzima glicolítica triose-fosfato isomerase também já foram detectados nos soros de pacientes com anemia hemolítica após a cura parasitológica de infecções por *P. falciparum*, sendo que a recuperação clínica desses indivíduos, bem como a redução na hemólise, coincidiram com uma queda nos níveis de tais auto-anticorpos. Esses auto-anticorpos direcionados contra a triose-fosfato isomerase foram, então, purificados dos soros dos pacientes e tiveram a atividade avaliada por meio de ensaios *in vitro*. Os resultados mostraram que tais moléculas eram capazes de induzir a lise dos eritrócitos e a ativação do sistema do complemento, contribuindo para a anemia (RITTER et al., 1993).

Um estudo recente, realizado por FERNANDEZ-ARIAS et al. (2016), com malária murina, mostrou que anticorpos anti-fosfatidilserina produzidos durante a infecção plasmodial também são capazes de reconhecer hemácias não infectadas, contribuindo para a anemia em camundongos. Ainda neste estudo, os autores mostraram que imunoglobulinas anti-fosfatidilserina também são detectadas nos soros de pacientes com malária falciparum, sendo que níveis elevados de tais anticorpos se correlacionam com a anemia tardia pós-malária (FERNANDEZ-ARIAS et al., 2016).

Em relação à *P. vivax*, pouquíssimos estudos têm sido realizados nesse sentido. FERNANDES et al., 2008 tentaram identificar os possíveis componentes imunes envolvidos

na anemia em indivíduos com malária residentes em áreas de baixa endemicidade e transmissão instável na região amazônica brasileira. Os resultados obtidos por eles mostraram que os pacientes que apresentaram resposta positiva para IgM contra as formas sanguíneas do parasito possuíam níveis inferiores de hemoglobina quando comparados àqueles com resposta negativa (FERNANDES et al., 2008). Outros estudos realizados por nosso grupo de pesquisa têm mostrado que os pacientes infectados por *P. vivax* com anemia apresentam níveis mais elevados de anticorpos contra proteínas de hemácias do que os pacientes infectados não-anêmicos (ZITHA, 2014; MOURÃO, 2015). Entretanto, a relação entre auto-imunidade e anemia na malária vivax ainda é pouco conhecida e informações sobre a participação dos anticorpos IgG e IgM na destruição de hemácias normais dos diferentes tipos sanguíneos do sistema ABO ainda são escassas.

1.5. O sistema sanguíneo ABO e a malária

O sistema de grupo sanguíneo ABO consiste em dois antígenos (A e B) e quatro tipos sanguíneos (A, B, AB, e O). Os antígenos A e B representam os produtos dos alelos A e B, genes co-dominantes entre si e dominantes em relação ao alelo recessivo O, que codifica o antígeno H, precursor biossintético dos antígenos mencionados anteriormente (ATHREYA & LEWIS, 1967).

O antígeno H é sintetizado pelo gene *FUT1/H*, que codifica a α 1,2-fucosiltransferase, uma enzima que adiciona uma fucose terminal à lactosamina para formar Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc-R. Esse antígeno, por sua vez, atua como substrato para a glicosiltransferase do tipo A, que adiciona um resíduo terminal de N-acetilgalactosamina (GalNAc), ou, ainda, como substrato para a glicosiltransferase do tipo B, que adiciona uma galactose (Gal). Na ausência de atividade da glicosiltransferase, apenas o antígeno H é expresso (COOLING, 2015).

Outros componentes importantes do sistema ABO são os anticorpos produzidos contra qualquer um desses antígenos do grupo sanguíneo ABO que não são encontrados nos eritrócitos de um indivíduo (YAMAMOTO et al., 2001). Assim, observa-se que indivíduos do grupo sanguíneo A apresentam antígenos A e H na membrana dos eritrócitos e anticorpos anti-B no soro; indivíduos do grupo B apresentam antígenos B e H na membrana dos

eritrócitos e anticorpos anti-A no soro; indivíduos do grupo AB apresentam os antígenos A, B e H na membrana eritrocítica, porém, não apresentam anticorpos para esses antígenos em seus soros; e indivíduos do grupo sanguíneo O apresentam antígenos H e anticorpos anti-A e anti-B no soro (SPALTERS et al., 1999; TORRY & OLSSON, 2009). É importante destacar que todos esses anticorpos são considerados naturais pelo fato de serem formados naturalmente, na ausência de qualquer estimulação antigênica. Essas imunoglobulinas se apresentavam na forma de IgM, IgG e IgA, codificadas por genes germinais, e reagem com uma ampla gama de antígenos próprios, incluindo, por exemplo, antígenos nucleares, componentes intracelulares e de membrana, e, ainda, proteínas circulantes no plasma. Anticorpos naturais geralmente são poli-reativos, exibindo reatividade cruzada idiotípica e conectividade na região variável de suas cadeias (V). Interações complementares entre as regiões V regulam a autoreatividade dos auto-anticorpos naturais no soro total, contribuindo para a manutenção da homeostase imune sob condições fisiológicas (SPALTER et al., 1999).

Tem sido sugerido que diferenças na expressão de antígenos dos grupos sanguíneos podem aumentar ou reduzir a suscetibilidade a muitas infecções. Isso porque os grupos sanguíneos podem desempenhar um papel direto na infecção, atuando como receptores e/ou co-receptores para microrganismos, parasitos e vírus (COOLING, 2015). Sendo que, alguns estudos sugerem que indivíduos do grupo A têm um risco aumentado de infecção por *S. mansoni* devido à ausência de anticorpos anti-A. Evidências mostram que a quimioatração entre parasitos adultos envolve o epitopo GalNAc em fêmeas. Desta forma, os anticorpos anti-A podem fornecer uma proteção contra o *S. mansoni*, bloqueando essas estruturas que são necessárias para o acasalamento ao acaso (HASEEB et al., 2008). Além disso, muitos antígenos dos grupos sanguíneos facilitam a invasão, transdução de sinal ou, até mesmo, a adesão, por meio da organização de microdomínios da membrana. Por todas essas razões, muitos patógenos podem interagir com os diferentes antígenos de grupo sanguíneo (COOLING, 2015).

Interações entre o patógeno e o hospedeiro têm sido propostas como uma importante força evolutiva capaz de moldar a distribuição global dos grupos sanguíneos ABO (BERGER et al., 1989). Nesse sentido, diversos estudos epidemiológicos têm sugerido que o fenótipo ABO pode modular o quadro clínico da malária, sendo os grupos sanguíneos A e B associados à maior gravidade da doença em comparação ao grupo O (FISCHER & BOONE, 1998; LELL et al., 1999). Essa associação é consistente com a maior prevalência do grupo O

em áreas endêmicas para a malária na África subsaariana, quando comparada a outras regiões do mundo onde a malária não é endêmica, sugerindo que o grupo O pode ter sido selecionado como uma adaptação protetora contra a forma grave e fatal da doença (MARTIN et al., 1979; SAITOU & YAMAMOTO, 1997; CSERTI & DZIK, 2007).

Acredita-se que indivíduos dos grupos sanguíneos A e B são mais propensos a desenvolverem malária grave, porém, os mecanismos subjacentes à proteção conferida pelo grupo O permanecem desconhecidos (FISCHER & BOONE, 1998; LELL et al., 1999; ROWE et al., 2007). Os mecanismos de proteção que têm sido propostos se assemelham àqueles implicados em outros polimorfismos de eritrócitos e incluem a redução da invasão eritrocítica e a diminuição na formação de rosetas (CHUNG et al., 2005; ROWE et al., 2007).

A associação entre os grupos sanguíneos e a formação de rosetas (aderência de eritrócitos parasitados a eritrócitos não parasitados, formando um aglomerado que se assemelha a uma roseta) tem sido alvo de investigação em diferentes estudos. Tem-se constatado que eritrócitos O formam um número inferior de rosetas, e de tamanhos menores, *in vitro*, quando comparados a eritrócitos infectados A e B (ROWE et al., 2007; MERCEREAU-PUJALON et al., 2008). Essa redução na formação de rosetas diminui a obstrução microvascular que parece contribuir para a patogênese da malária grave (SAITOU et al., 1997; PATHIRANA et al., 2005; ROWE et al., 2007).

Recentemente, experimentos *in vitro* com macrófagos humanos, bem como com monócitos de camundongo, *in vivo*, mostraram que essas células fagocitam os eritrócitos infectados do grupo O mais avidamente que os eritrócitos infectados dos grupos A e B. Essa remoção aumentada de eritrócitos infectados, bem como a diminuição na formação de rosetas do grupo O parecem contribuir para a redução da parasitemia, bem como para a diminuição da adesão de eritrócitos infectados ao endotélio e, ainda, para a diminuição da obstrução microvascular, fornecendo explicações alternativas para a proteção observada no grupo O (WOLOFSKY et al., 2012). Por isso, tem sido sugerido que o grupo sanguíneo O confere resistência à malária, o A é mais suscetível e o B possui um efeito intermediário (FISCHER & BOONE, 1998; LELL et al., 1999; PATHIRANA et al., 2005; LOSCERTALES, 2006).

Entretanto, cabe ressaltar que todos esses achados foram relatados para infecções por *P. falciparum* e poucos estudos têm sido realizados no que se refere a *P. vivax*. LEE e colaboradores (2014) realizaram uma investigação detalhada sobre o fenômeno de formação de rosetas promovido por essa espécie de parasito e verificaram que ele é mais comum em

infecções por *P. vivax* do que em infecções por *P. falciparum*, tanto em termos de incidência nas amostras de pacientes, bem como no percentual de eritrócitos infectados formando rosetas. Outro achado desse estudo foi a inexistência de correlação entre a formação de rosetas e diferentes variáveis como: o grupo sanguíneo ABO do hospedeiro, a contagem de reticulócitos e a parasitemia (LEE et al., 2014). Nota-se pois, uma escassez de informações no que se refere à *P. vivax*, espécie que apresenta algumas particularidades biológicas que a diferenciam de *P. falciparum*. Portanto, a investigação de uma possível associação entre o fenótipo ABO e a anemia em infecções por *P. vivax*, um tema ainda pouco explorado e compreendido, é de extrema importância.

2. JUSTIFICATIVA

A anemia constitui uma das manifestações clínicas mais importantes associadas à malária. Entretanto, sua etiologia ainda não é completamente conhecida. Entre os fatores que contribuem para a anemia, cita-se a digestão da hemoglobina e a destruição das hemácias, resultados imediatos do desenvolvimento e multiplicação do parasito durante o seu ciclo de vida. Entretanto, esses fatores, por si só, não explicam tal manifestação clínica, já que as parasitemias detectadas em áreas endêmicas nem sempre se correlacionam ao grau de anemia. Em infecções por *P. vivax*, espécie que apresenta como particularidade biológica a preferência em infectar reticulócitos, que constituem apenas 1-2% das células circulantes, esta ausência de correlação é ainda mais evidente. Modelos matemáticos têm estimado que, durante a malária vivax, cerca de 32 hemácias normais são destruídas para cada hemácia parasitada, sugerindo que essa destruição de hemácias normais pode ser a principal causa da anemia. Um dos fatores que poderia contribuir para essa destruição exacerbada de hemácias sadias são os auto-anticorpos produzidos durante a infecção. Acredita-se que, durante a infecção malárica, os níveis de auto-anticorpos aumentem, bem como a deposição dessas moléculas na superfície de hemácias não infectadas, o que levaria à opsonização dessas células, facilitando a sua remoção da circulação por diferentes mecanismos. Em um estudo recente realizado com malária murina, verificou-se que auto-anticorpos anti-fosfatidilserina produzidos durante a infecção plasmodial podem se ligar a hemácias não infectadas de camundongos, mediando a fagocitose dessas células e contribuindo para a anemia. Ainda neste estudo, constatou-se que esses mesmos anticorpos também eram detectados nos soros de pacientes com malária falciparum, sendo que elevados níveis de tais imunoglobulinas foram correlacionadas à anemia tardia pós-infecção. Entretanto, nota-se, na literatura, uma escassez de estudos sobre a relação entre autoimunidade e anemia em infecções por *P. vivax*, principalmente no que se refere à destruição de eritrócitos não parasitados. Atualmente, a anemia grave associada à malária é tratada com fármacos anti-maláricos e, durante a infância, comumente essas drogas são associadas à transfusão de sangue. Contudo, essa última medida tem sido bastante criticada devido aos riscos associados a ela, por exemplo, o de transmissão de outros agentes infecciosos como a bactéria *Treponema pallidum* (agente etiológico da sífilis), os vírus causadores das hepatites B e C, e o vírus HIV, dentre outros. Somam-se a isso, problemas logísticos que dificultam a realização de tal procedimento. Nota-se, pois, que por todas essas

razões, as transfusões sanguíneas urgentes nem sempre são realizadas, o que acaba levando à morte de cerca de 60% das crianças com anemia grave associada à malária. Considerando o exposto, ensaios imunoenzimáticos (*Cell-ELISA*) foram utilizados para avaliar a presença de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de superfície de hemácias de diferentes grupos sanguíneos (A, B e O), em pacientes infectados por *P. vivax* apresentando ou não anemia. Pacientes anêmicos apresentando quadros graves da infecção foram também avaliados a fim de se estabelecer associações entre a gravidade e o perfil da resposta de auto-anticorpos. Os resultados provenientes deste estudo poderão ampliar a nossa compreensão sobre o papel dos auto-anticorpos na patogênese dessa importante manifestação clínica, podendo direcionar as pesquisas científicas para os quimioterápicos e estratégias de vacinação mais apropriadas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

- Avaliar a resposta de anticorpos IgG e IgM provenientes de pacientes maláricos contra moléculas de superfície de hemácias normais de diferentes grupos sanguíneos (A, B e O) e estabelecer possíveis associações entre essa resposta e a anemia em pacientes infectados por *P. vivax*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a resposta de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias normais de diferentes grupos sanguíneos (A, B e O) em pacientes não graves infectados por *P. vivax* no Brasil.
- Avaliar a influência dos níveis de exposição à malária (número de episódios prévios de malária) e da parasitemia na determinação da resposta de IgG e IgM contra moléculas de hemácias normais de diferentes grupos sanguíneos (A, B e O) em pacientes não graves infectados por *P. vivax* no Brasil.
- Determinar a possível associação entre anemia e a resposta de IgG e IgM contra moléculas de superfície de hemácias normais de diferentes grupos sanguíneos (A, B e O) em pacientes com malária não grave e malária grave, ambos infectados por *P. vivax*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. População de estudo

Pacientes infectados por *P. vivax* entre 12 e 68 anos foram selecionados entre indivíduos com suspeita de malária que procuraram atendimento no Hospital Universitário Júlio Miller (Cuiabá, Mato Grosso, Brasil) (n = 34) ou na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (Manaus, Amazonas, Brasil) (n = 41), no período compreendido entre os meses de Fevereiro de 2006 a Janeiro de 2008. Com a finalidade de avaliar o efeito da gravidade da infecção por *P. vivax* nos níveis de anticorpos contra hemácias dos diferentes tipos sanguíneos, foram incluídos, ainda, pacientes com malária vivax com idade entre 7 e 53 anos, atendidos no Hospital de Iquitos ou no Hospital de Apoio de Iquitos, ambos localizados na cidade de Iquitos, estado de Loreto, no Peru (n = 18). É importante mencionar que essa medida foi adotada pelo fato de que os casos de malária grave são pouco frequentes no Brasil, o que dificulta a obtenção de amostras de pacientes infectados hospitalizados; situação essa que se diferencia da que ocorre em áreas endêmicas do Peru. Para exemplificar essa diferença, cita-se o estado de Loreto, onde foram registradas 164 internações no período compreendido entre 21 de Agosto a 01 de Outubro de 2014; número este bem superior a todas as 86 internações notificadas no Brasil em todo o ano de 2014 (DIRESA, Loreto, 2014). Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram examinados por um médico experiente que aplicou um questionário padrão contendo perguntas sobre dados pessoais, clínicos, parasitológicos e epidemiológicos.

O sangue foi coletado por meio de punção venosa, em tubos com EDTA, e utilizado para o hemograma e, também, para a obtenção dos plasmas, que foram separados por meio de centrifugação e estocados, a -20°C , até a realização dos experimentos. Mono-infecções por *P. vivax* foram diagnosticadas por meio do exame microscópico de gota espessa e confirmadas por *nested*-PCR (SKOPEL et al., 2004). Para a determinação da parasitemia (expressa como parasitos/ μL de sangue), foram examinados 100 campos microscópicos, com um aumento de 1000x (10x na lente ocular e 100x na lente objetiva), sob óleo de imersão.

Todos os pacientes com malária foram tratados de acordo com as recomendações do Ministério de Saúde do Brasil ou de acordo com a política nacional de tratamento do Peru.

Após a realização dos hemogramas, os pacientes foram divididos em anêmicos e não anêmicos. Para este estudo, a anemia foi definida como nível de hemoglobina igual ou inferior a 11 g/dL e apenas pacientes com anemia normocítica (volume corpuscular médio 80-96 fl) e normocrômica (concentração de hemoglobina corpuscular média 32-36 g/dl) foram incluídos. Pacientes apresentando sinais de desnutrição e aqueles infectados por HIV ou hepatite foram excluídos deste estudo. Como controle, foram incluídos plasmas de voluntários nunca expostos à malária e residentes em Belo Horizonte, Minas Gerais, área considerada não endêmica para a doença em questão (n = 11). É importante mencionar que antes da coleta de sangue, cada paciente assinou um termo de consentimento livre e esclarecido, conforme normatiza o Comitê de Ética em Pesquisa do Brasil e o do Peru (CAAE: 01496013.8.0000.5149, parecer 519.481).

4.2. Cell-ELISA

Para a realização dos ensaios de *Cell-ELISA*, utilizou-se eritrócitos de indivíduos saudáveis nunca expostos à malária e pertencentes a três grupos sanguíneos do sistema ABO, A, B e O, os quais foram confirmados por meio de tipagem sanguínea. O sangue desses indivíduos foi coletado por punção venosa, em tubos Vacutainer contendo heparina. Uma parte do volume total de sangue colhido foi utilizada para a realização do hemograma (Tabela 1) e, o restante, para a obtenção dos eritrócitos para a realização da *Cell-ELISA*.

Primeiramente, as hemácias foram separadas dos demais componentes do sangue, utilizando-se, para isso, um gradiente de Ficoll. O sangue foi diluído em PBS, na proporção de 1:1, e 4 mL dessa mistura foi adicionado, lentamente, a um tubo Falcon de 15 mL contendo 3 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, EUA). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4000g, por 40 minutos, a 19°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e as hemácias, ressuspensas em 10 mL de RPMI-1640 (Milipore) contendo L-Glutamina e 25 mM HEPES. Os tubos foram, então, centrifugados novamente, porém, a 100g por 10 minutos, a 19°C. Essa etapa foi repetida três vezes e, ao final, as hemácias foram ressuspensas em PBS e contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer.

Tabela 1. Dados hematológicos dos indivíduos saudáveis doadores de hemácias não infectadas.

Características	Doador de hemácias			Valor referencial*
	A	B	O	
Hemácias (milhões de células/mm ³)	4,38	5,39	4,60	4,00 a 5,30
Hematócrito (%)	38,7	49,2	43,4	36,0 a 46,0
Hemoglobina (g/dL)	13,6	16,2	14,6	12,0 a 16,0
Volume corpuscular médio (VCM) (fL)	88,36	91,3	94,3	82,0 a 98,0
Hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg)	31,05	30,1	31,8	27,0 a 34,0
Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (%)	35,14	33,0	33,7	32,0 a 36,0
<i>Red Cell Distribution Width</i> (RDW) (%)	11,8	12,3	12,0	11,3 a 15,3
Leucócitos/ mm ³ de sangue	7.200	7.100	8.100	3.800 a 10.000
Plaquetas/ mm ³ de sangue	239.000	254.000	227.000	150.000 a 450.000

* Valores de referência de acordo com o Laboratório Humberto Abrão.

Os ensaios imunoenzimáticos para a detecção de IgG e IgM anti-hemácia foram realizados conforme o protocolo descrito anteriormente (TYAGI & SHARMA, 2012), porém, com várias alterações. Cada orifício de uma microplaca de 96 *wells* (Thermo Fisher Scientific, USA) foi sensibilizado com, aproximadamente, um milhão de eritrócitos diluídos em tampão salina fosfato (PBS) contendo 1% (p/v) albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin* – BSA) e, mantido, por 18 horas, a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% Tween (PBST) e bloqueadas com 5% BSA, por 2 horas, a 37°C. Em seguida, 4 µL de cada soro teste foi diluído em 396 µL de PBS com 1% BSA (diluição 1:100) e, adicionados às placas, em duplicata (50 µL em cada *wells*), e incubados a 37°C por 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBST e incubadas com anticorpo monoclonal anti-IgG (SIGMA-ALDRICH) ou anti-IgM humano (SIGMA-ALDRICH) conjugado à peroxidase (diluição 1:500 em PBS com 1% BSA), diluição essa, que foi determinada após a padronização da *Cell-ELISA*, usando as seguintes concentrações de anticorpos: 1:000,

1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000 e 1:128000, onde em cada orifício da placa foi adicionado 50 µL da solução final. Após 90 minutos de incubação, a 37°C, as placas foram lavadas e, em seguida, reveladas pela adição de OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*) em tampão citrato pH 5,0, utilizando-se, como substrato, peróxido de hidrogênio. Essa reação foi mantida no escuro por 25 minutos á 37°C, e interrompida por meio da adição de ácido sulfúrico diluído 1:20 em água. A densidade óptica (DO) das microplacas foi quantificada a 490 nm, em um leitor de ELISA automático (SpectraMax 240 PC, *Molecular Devices*). A absorbância discriminante entre os resultados positivos e negativos (*cut off*) foi estabelecida pela média das absorbâncias de 11 amostras de plasmas de indivíduos sem história clínica de malária, acrescida de dois desvios padrão. Para evitar que variações diárias ocorressem nas leituras da DO dos plasmas testados, os valores de *cut off* foram acompanhados diariamente.

Os níveis de anticorpos IgG e IgM foram expressos na forma de Índice de Reatividade (IR), que foram calculados como a razão entre a média da densidade óptica da duplicata do soro teste e a densidade óptica média somada a dois desvios padrão das densidades ópticas de amostras de 11 doadores nunca expostos à malária. Índices de reatividade com valor igual ou superior a 1 foram considerados como soropositivos.

4.3. Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad Software*, Califórnia, USA). A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste estatístico de D' Agostino – Pearson. As frequências de soropositividade foram analisadas utilizando-se os testes estatísticos de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. Para comparar os níveis de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de superfície de hemácias normais dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO entre os grupos de pacientes anêmicos e não anêmicos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney ou a versão *One Way* ANOVA do teste de Kruskal-Wallis, acompanhado pelo teste *post hoc* de Dunns. O teste de correlação de Spearman foi usado para determinar a possível associação entre a anemia e a resposta de IgG e IgM contra moléculas de superfície de hemácias normais de diferentes grupos sanguíneos (A, B e O) em pacientes com malária vivax. Testes *post hoc* foram realizados para fornecer

informação específica sobre quais valores foram significativamente diferentes uns dos outros. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

Em relação à população do Brasil (Tabela 2), verificou-se que a maioria dos indivíduos pertencia ao gênero masculino (76%), e, a minoria, ao feminino (24%).

Tabela 2. Características epidemiológicas, parasitológicas e hematológicas dos 75 pacientes do Brasil infectados por *P. vivax* avaliados neste estudo.

Características	Anêmicos Hb ≤ 11 g/dL (n = 12)	Não anêmicos Hb > 11 g/dL (n = 63)	Valor de <i>p</i>
Idade (anos)	32,0 (22,5±51,8)	40,0 (27,5±50,8)	0,6072
Episódios prévios de malária	0 (0±5)	3 (1±5)	0,2314
Parasitemia (parasitos/μL de sangue)	5061 (1050±8384)	2492 (1337±4727)	0,3038
Hemoglobina (g/dL) *	10,3 (9,9±10,7)	13,3 (12,5±14,6)	< 0,0001
Hematócrito (%)*	31,5 (30,8±33,3)	40,9 (37,0±45,0)	< 0,0001
Plaquetas/ mm ³ de sangue	92.500 (52.750±133.750)	18.000 (78.000±16.000)	0,1884
Leucócitos/ mm ³ de sangue	5.950 (4.225±7.475)	5.150 (3.960 ± 6.600)	0,2751

Mediana e intervalo interquartil para pacientes infectados por *P. vivax*. **p* < 0,05. Os valores de *p* foram determinados utilizando-se o teste estatístico de Mann-Whitney.

Constatou-se, ainda, que dentre os 75 pacientes brasileiros com malária vivax, 63 eram não-anêmicos e 12 apresentaram anemia (Tabela 2). A mediana de idade foi 32 anos para pacientes anêmicos e 40 anos para pacientes não anêmicos (Tabela 2). Em relação à exposição, avaliada neste estudo por meio da variável número de episódios prévios de malária, não houve diferença significativa entre anêmicos e não anêmicos (Tabela 2). O exame de gota espessa revelou que também não houve diferença significativa na densidade parasitária da população estudada (Tabela 2). Quanto à contagem de plaquetas e de leucócitos, também não se observou diferença significativa entre os grupos de estudo (Tabela 2).

Durante a consulta médica, os 75 pacientes infectados por *P. vivax* no Brasil relataram alguns sintomas como: febre (90,6%), calafrio (84,0%), mialgia (81,0%), cefaléia (80,0%), fraqueza (72,0%), náusea (52,0%), tontura (50,6%), epigastralgia (49,3%) e vômito (29,3%) (Tabela 3).

Tabela 3. Sintomatologia clínica relatada pelos 75 pacientes infectados por *P. vivax* no Brasil incluídos neste estudo.

Sintomatologia clínica	População estudada (n = 75)	
	Presença de sintomas	Porcentagem (%)
Febre	68	90,6
Calafrio	63	84,0
Mialgia	61	81,3
Cefaléia	60	80,0
Fraqueza	54	72,0
Náusea	39	52,0
Tonturas	38	50,6
Epigastralgia	37	49,3
Vômito	22	29,33

No que se refere aos pacientes do Peru (Tabela 4), verificou-se que 12 indivíduos eram do gênero masculino (66,7%) e seis do feminino (33,3%). Em relação à idade, os pacientes anêmicos eram mais novos que os não-anêmicos (Tabela 4). Não houve diferença significativa entre os níveis de plaquetas de indivíduos infectados por *P. vivax* com anemia, quando comparados aos sem anemia (Tabela 4). Entretanto, constatou-se que os pacientes anêmicos apresentaram níveis de leucócitos superiores aos observados para os não-anêmicos (Tabela 4). Por fim, é importante comentar que todos os pacientes com anemia e infectados no Peru estavam internados com quadro de malária grave.

Tabela 4. Características hematológicas dos 18 pacientes residentes em área de alta transmissão de malária na Amazônia peruana.

Características	Anêmicos Hb ≤ 11 g/dL (n = 11)	Não anêmicos Hb > 11 g/dL (n = 7)	Valor de <i>p</i> *
Idade (anos) *	18 (7±23)	27 (24±33)	0,0097
Hemoglobina (g/dL) *	8,0 (7,5±9,7)	14,9 (14,0±15,9)	0,0006
Hematócrito (%) *	24 (23±30)	44 (41±45)	0,0006
Plaquetas/ mm ³ de sangue	120.000 (90.000±160.000)	140.000 (70.000±150.000)	0,6182
Leucócitos/ mm ³ de sangue *	6.000 (3.100±7.500)	1.500 (1.200±5.500)	0,0473

Mediana e intervalo interquartil para pacientes infectados por *P. vivax*.

**p* < 0,05. Os valores de *p* foram determinados utilizando-se o teste estatístico de Mann-Whitney.

5.1. Reconhecimento de moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO por anticorpos IgG e IgM de pacientes com malária vivax não grave residentes na Amazônia brasileira

Com objetivo de determinar a possível influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO na resposta de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias normais no plasma de pacientes não graves infectados por *P. vivax* (n = 75), foram realizados ensaios de *Cell-ELISA*, utilizando-se eritrócitos dos tipos sanguíneos A, B e O como antígeno.

Em relação à resposta de IgG, verificou-se que a frequência de soropositividade (Figura 6A) foi menor para hemácias do grupo sanguíneo A (16,0%) quando comparada às frequências dos grupos B e O (42,6% e 48,0%, respectivamente; *p* < 0,0001). Com relação aos níveis de IgG (Figura 6B), expressa como índice de reatividade, constatou-se que as respostas contra as hemácias A foram as de mais baixa intensidade (0,45 [0,31±0,74], mediana [intervalo interquartil]), em comparação às respostas contra hemácias B (0,93 [0,70±1,28]) e O (0,97 [0,56±1,41]) (*p* < 0,0001). Porém, é importante salientar que, embora

tenha sido observada uma diferença significativa, as medianas de reatividade dos anticorpos IgG tiveram um valor inferior ao limiar de corte e, portanto, parece não ter significado biológico.

Por outro lado, quando se avaliou a resposta de IgM, verificou-se que a frequência de respondedores (Figura 6C) foi inferior para hemácias do grupo sanguíneo B (17,3%). Já as frequências encontradas para hemácias A e O foram, respectivamente (45,3% e 53,3%) ($p < 0,0001$). Essa mesma tendência também foi observada no que se refere aos níveis de IgM (Figura 6D): 0,84 [0,48±1,44] para hemácias A; 0,54 [0,32±0,87] para hemácias B; e 1,09 [0,24±2,29] para hemácias O ($p = 0,0008$).

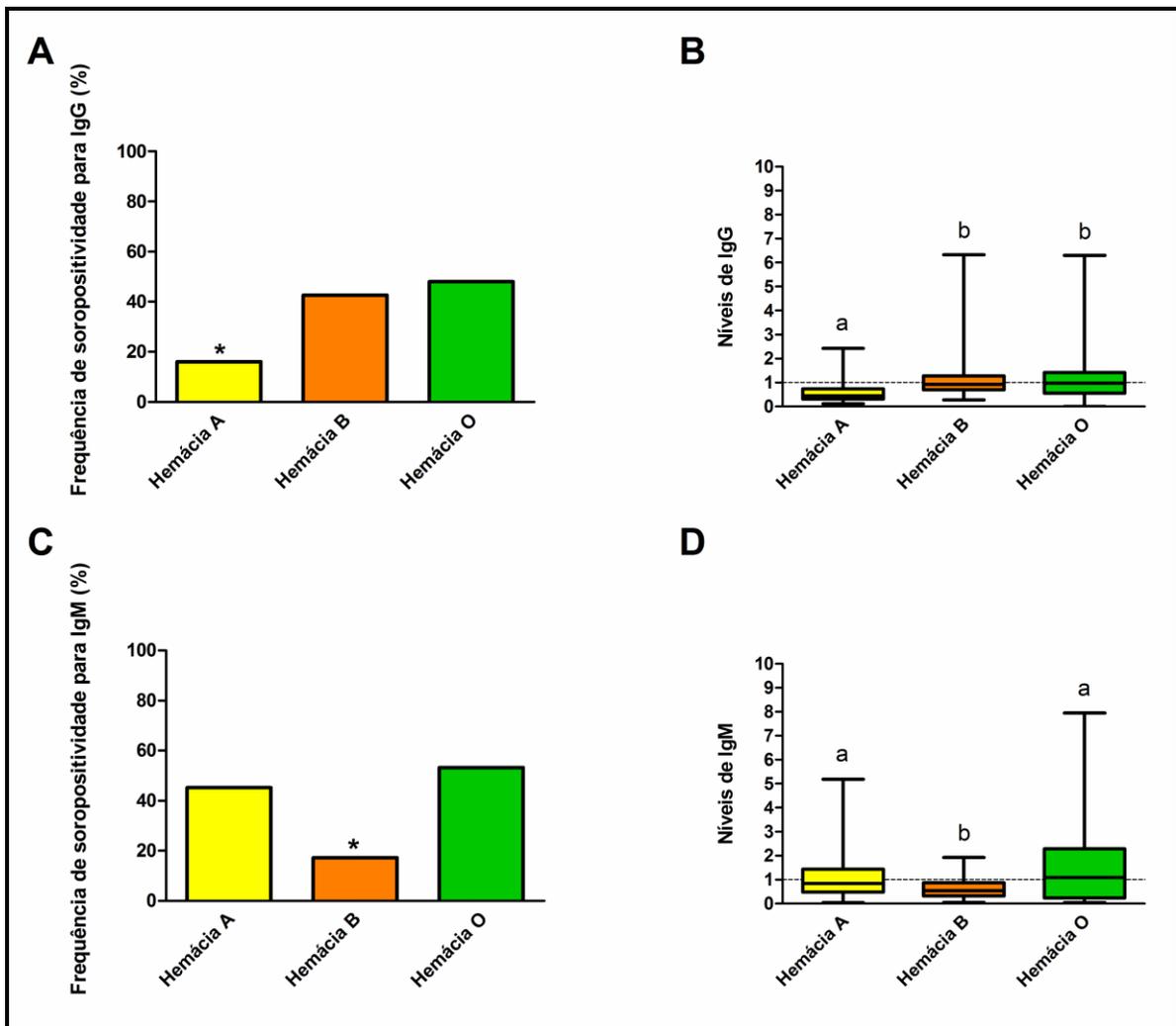


Figura 6. Influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO na resposta de anticorpos IgG e IgM. (A) Frequência de pacientes não graves infectados por *P. vivax* no Brasil soropositivos para IgG e (C)

IgM. As diferenças entre as proporções de soropositividade foram avaliadas por meio do teste estatístico de qui-quadrado.* Indica valor de $p < 0,05$. **(B)** Magnitude da resposta de IgG e **(D)** IgM. Cada caixa representa o intervalo que contém os 50% centrais dos dados, sendo que a linha central representa a mediana. As linhas acima e abaixo da caixa indicam, respectivamente, os valores máximos e os mínimos. As diferenças quanto à magnitude da resposta de anticorpos contra as hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO foram analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis acompanhado pelo teste *pos hoc* de Dunn's. As letras alfabéticas **a** e **b** representadas acima de cada caixa representam os resultados do teste de comparação múltipla de Dunn's. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de anticorpos detectados contra hemácias de diferentes tipos sanguíneos.

5.2. Influência da exposição à malária na resposta de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias normais dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO em pacientes com malária vivax não grave residentes na Amazônia brasileira

Uma vez que o tempo de exposição em áreas endêmicas é um fator importante na determinação de uma resposta imune adquirida em populações naturalmente expostas a *P. vivax*, outra associação investigada neste estudo foi a relação entre o número de episódios prévios de malária e a resposta de anticorpos IgG e IgM contra hemácias dos diferentes grupos sanguíneos em pacientes não graves infectados por *P. vivax* no Brasil (Figura 7).

Para isso, utilizou-se plasmas de 70 pacientes com malária vivax, que foram divididos em dois grupos: (i) pacientes primo-infectados ($n = 20$), que correspondem a pacientes com 0 malária e (ii) pacientes com múltiplas infecções ($n = 50$), composto por pacientes com 1 ou mais malária. Verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas frequências de indivíduos soropositivos, tanto para IgG (Figura 7A) quanto para IgM (Figura 7C), entre os grupos de pacientes primo-infectados e o de múltiplas infecções, independentemente do tipo sanguíneo da hemácia utilizada. Um resultado semelhante foi também observado quando se avaliou os níveis de anticorpos ($p > 0,05$) (Figuras 7B e 7D). Todos esses resultados sugerem que as respostas de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias de diferentes grupos

sanguíneos do sistema ABO desenvolvem-se após poucos episódios de malária, já que o fator exposição prévia parece não influenciar tanto a resposta de IgG quanto a de IgM.

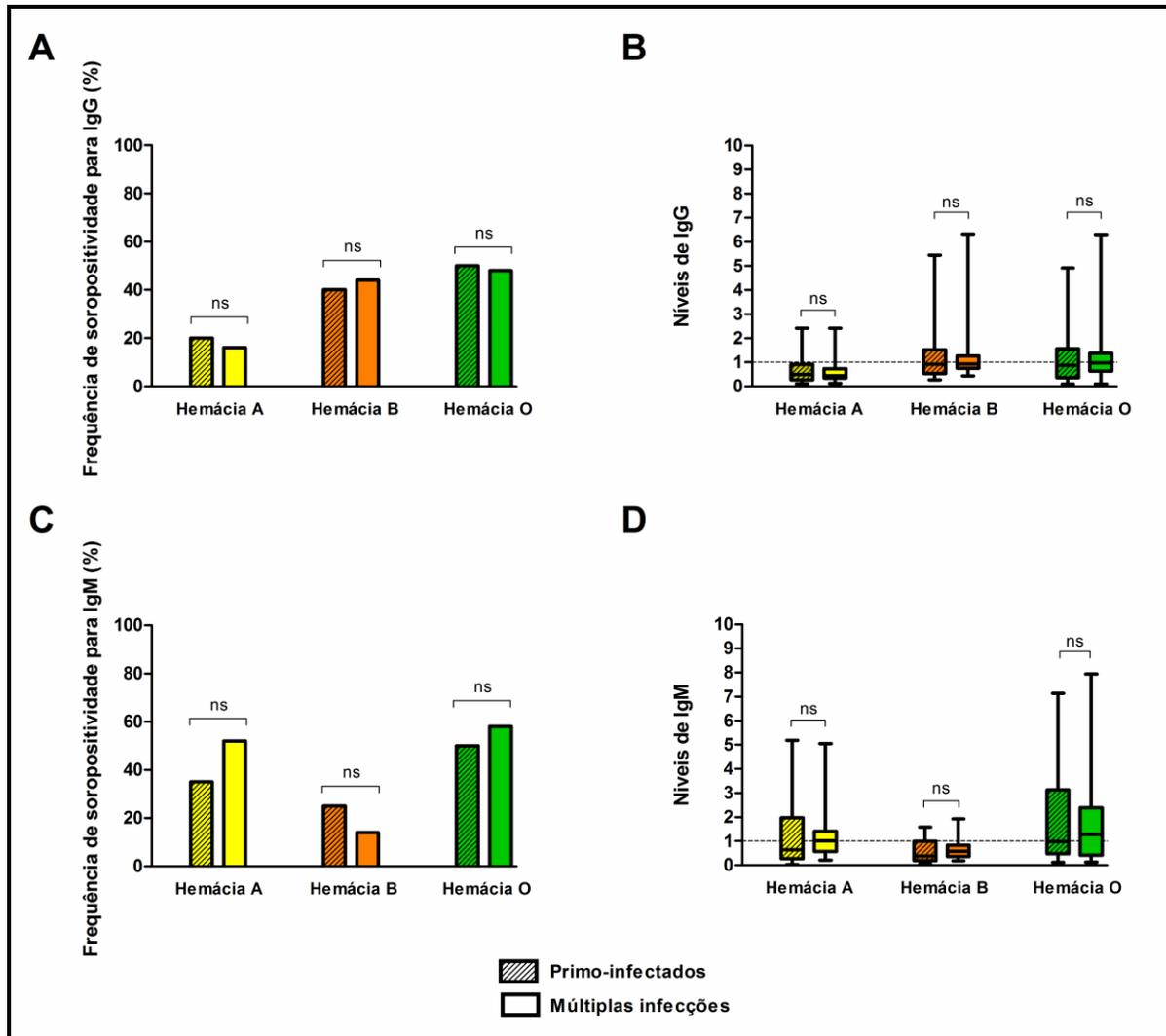


Figura 7. Influência da exposição à malária na resposta de anticorpos IgG e IgM. **(A)** Frequência de soropositivos para IgG e **(C)** IgM. As diferenças entre as proporções de soropositividade observadas para os pacientes primo-infectados e os com múltiplas infecções foram avaliadas por meio do teste estatístico de qui-quadrado. ns: não significativo ($p > 0,05$). **(B)** Magnitude da resposta de IgG e **(D)** IgM. Cada caixa representa o intervalo que contém os 50% centrais dos dados, sendo que a linha central representa a mediana. As linhas acima e abaixo da caixa indicam, respectivamente, os valores máximos e os mínimos. As diferenças quanto à magnitude da resposta de anticorpos contra as hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO foram analisadas por meio do teste de Mann-Whitney.

5.3. Influência da parasitemia na resposta de anticorpos IgG e IgM contra hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO em pacientes com malária vivax não grave residentes na Amazônia brasileira

Outra associação investigada neste estudo foi a influência da densidade parasitária na resposta de anticorpos IgG e IgM direcionados contra moléculas de hemácias normais dos grupos sanguíneos A, B e O. Para esta análise, utilizaram-se os dados de parasitemia (número de parasitos/ μ L de sangue) referentes a 67 pacientes, que foram subdivididos em dois grupos: (i) indivíduos com carga parasitária inferior a 2737 parasitos/ μ L de sangue ($n = 33$) e (ii) indivíduos cujas parasitemias foram iguais ou superiores a 2737 parasitos/ μ L de sangue ($n = 34$).

Os resultados dessa análise mostraram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas frequências de soropositividade, tanto para IgG (Figura 8A) quanto para IgM (Figura 8C), entre o grupo de pacientes com menor carga parasitária e o com maior parasitemia, independentemente do tipo sanguíneo da hemácia utilizada. Um perfil semelhante também foi observado quando se analisou os níveis de anticorpos IgG e IgM ($p > 0,05$) entre esses dois grupos de pacientes com diferentes densidades parasitárias (Figuras 8B e 8D, respectivamente).

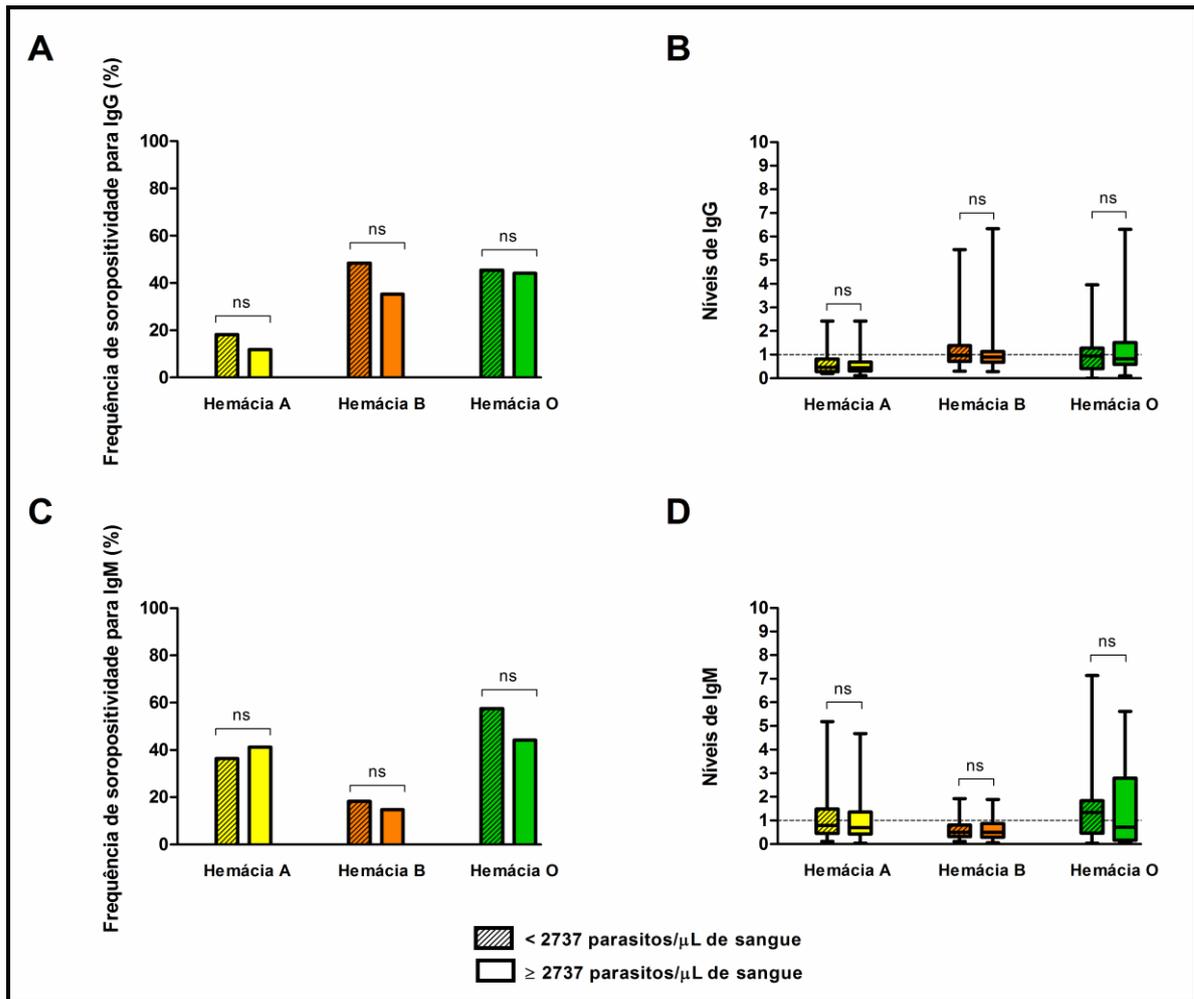


Figura 8. Influência da parasitemia à malária na resposta de anticorpos IgG e IgM. **(A)** Frequência de soropositivos para IgG e **(C)** IgM. As diferenças entre as proporções de soropositividade observadas para os pacientes com parasitemia inferior a 2737 e carga parasitária maior ou igual 2737 foram avaliadas por meio do teste estatístico de qui-quadrado. ns: não significativo ($p > 0,05$). **(B)** Magnitude da resposta de IgG e **(D)** IgM. Cada caixa representa o intervalo que contém os 50% centrais dos dados, sendo que a linha central representa a mediana. As linhas acima e abaixo da caixa indicam, respectivamente, os valores máximos e os mínimos. As diferenças quanto à magnitude da resposta de anticorpos contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO foram analisadas por meio do teste de Mann-Whitney.

5.4. Associações entre a anemia e a resposta de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO em pacientes com malária vivax não grave residentes na Amazônia brasileira

Considerando que a anemia é uma das alterações hematológicas mais comuns na malária associada à morbidade, investigou-se, ainda, a influência desse parâmetro clínico na resposta de IgG e IgM direcionados contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO.

Como a parasitemia pode influenciar diretamente os níveis de hemoglobina, primeiramente, avaliou-se a associação entre essas duas variáveis e verificou-se que não houve uma correlação significativa entre elas ($p = 0,7432$, $r = -0,04078$; teste de Correlação de Spearman) (dado não mostrado).

Em seguida, foram avaliadas as correlações entre os níveis de hemoglobina e os níveis de anticorpos IgG e IgM direcionados contra hemácias dos grupos sanguíneos A, B ou O (Figura 9). Correlações negativas foram encontradas entre os níveis de hemoglobina e os de IgG ($p = 0,0065$, $r = -0,3118$, teste de Correlação de Spearman) (Figura 9A), bem como entre os níveis de hemoglobina e os de IgM, ambos contra hemácias do grupo A ($p = 0,0496$, $r = -0,2275$, teste de Correlação de Spearman) (Figura 9B).

Para hemácias do grupo B, não se verificou correlação significativa entre os níveis de IgG e os de hemoglobina ($p = 0,0662$, $r = -0,2133$, teste de Correlação de Spearman) (Figura 9C). Por outro lado, uma associação inversa foi encontrada para IgM ($p = 0,0065$, $r = -0,3114$, teste de correlação de Spearman) (Figura 9D).

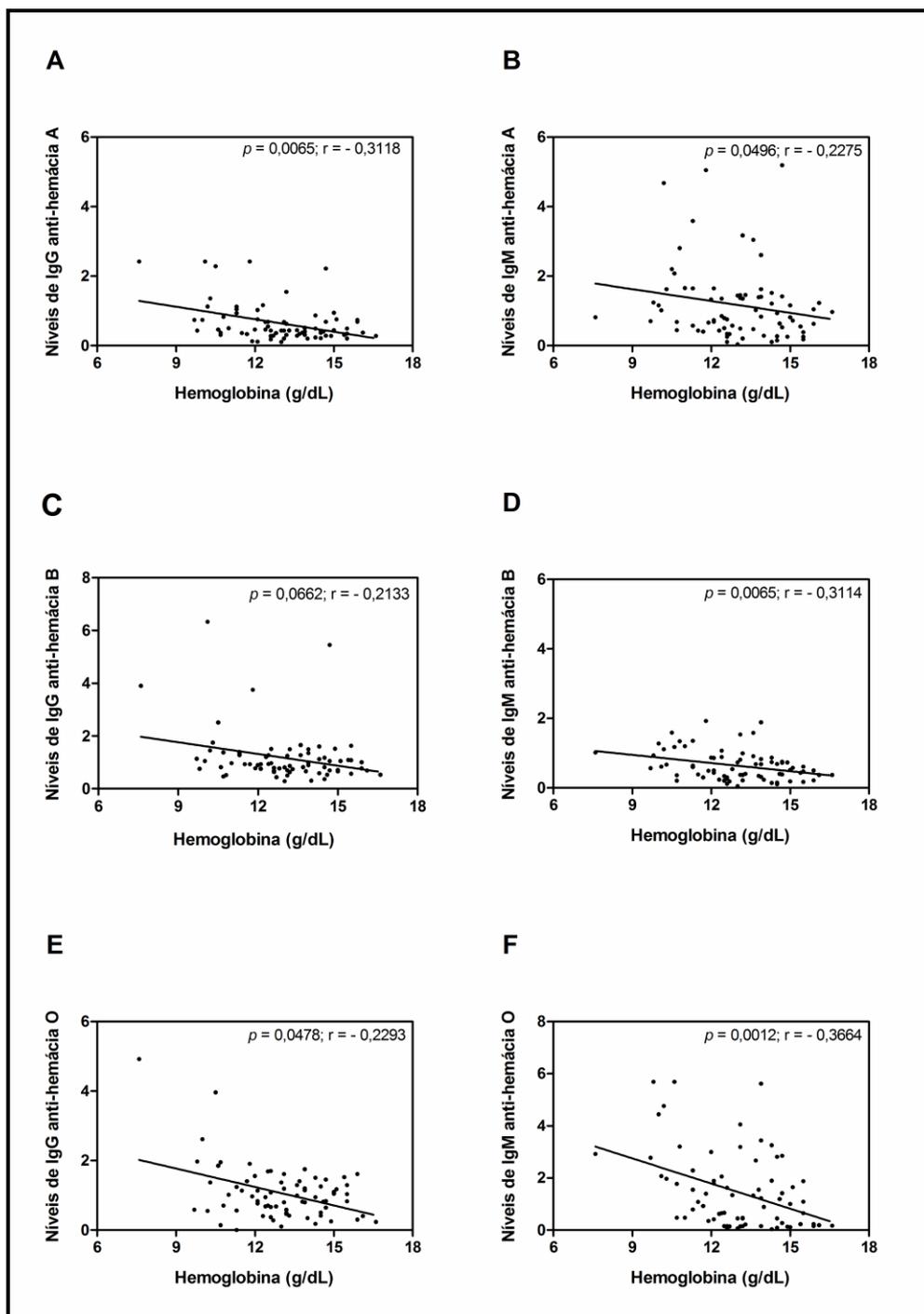


Figura 9. Correlação entre os níveis de anticorpos IgG ou IgM e os de hemoglobina (teste de Correlação de Spearman). **(A)** Correlação entre níveis de IgG contra moléculas de hemácias A e hemoglobina. **(B)** Correlação entre níveis de IgM contra moléculas de hemácia A e hemoglobina. **(C)** Correlação entre níveis de IgG anti-hemácias B e hemoglobina. **(D)** Correlação entre níveis de IgM contra hemácias B e hemoglobina. **(E)** Correlação entre níveis de IgG contra moléculas de superfície de hemácias O e hemoglobina. **(F)** Correlação entre níveis de IgM contra moléculas de hemácias O e hemoglobina.

Em relação às hemácias do grupo O, verificou-se que tanto os níveis de IgG quanto os de IgM foram inversamente correlacionados aos níveis de hemoglobina (IgG: $r = -0,2293$; $p = 0,0478$; IgM: $r = -0,3664$; $p = 0,0012$, teste de Correlação de Spearman) (Figura 9E e 9F).

Posteriormente, avaliou-se, comparativamente, as frequências e os níveis de IgG e IgM contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos (A, B e O) nos plasmas de pacientes com anemia ($n = 12$) associada à malária, bem como nos plasmas de pacientes com malária mas sem anemia ($n = 63$) (Figura 10).

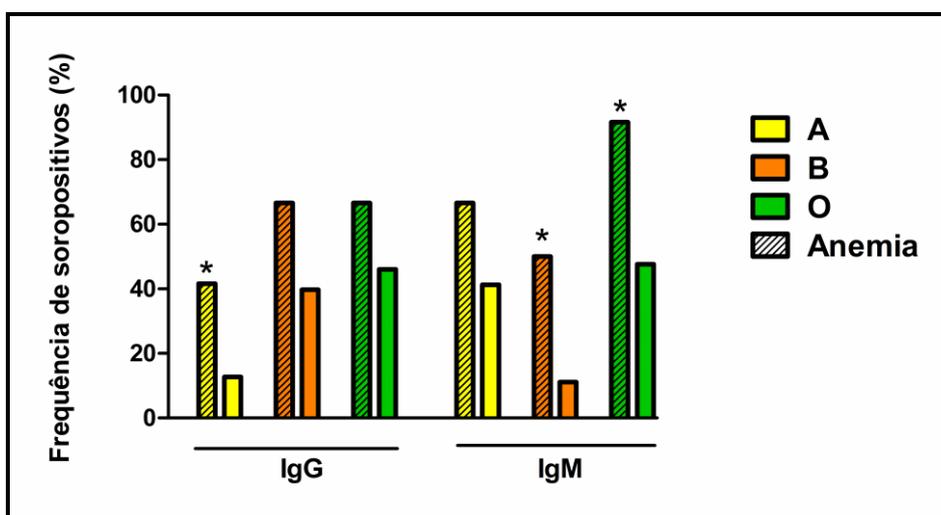


Figura 10. Soropositividade para IgG e IgM contra moléculas de hemácias de diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO entre os pacientes com malária vivax não grave residentes na Amazônia brasileira apresentando ou não anemia. Hemácias do grupo A (amarelo); hemácias do grupo B (laranja); hemácias do grupo O (verde). As barras hachuradas representam os pacientes infectados por *P. vivax* apresentando anemia (hemoglobina < 11 g/dL). O limiar de positividade foi definido como índice de reatividade (IR) ≥ 1 . IR = média da duplicata do soro teste/ *cut off*. Os valores de p foram determinados utilizando-se o teste estatístico do qui-quadrado. *Indica um valor de $p < 0,05$.

Verificou-se que, para hemácias do grupo A, a frequência de indivíduos soropositivos para IgG foi maior no grupo de pacientes anêmicos (41,6%), do que no de não anêmicos (12,6%) ($p = 0,0287$). Entretanto, não houve diferença significativa na soropositividade de IgM entre esses dois grupos (66,6% *versus* 41,2%, respectivamente, $p = 0,1249$). Para hemácias do grupo B, não se detectou diferença significativa na soroprevalência de IgG entre anêmicos (66,6%) e não anêmicos (39,6%) ($p = 0,1154$). Por outro lado, constatou-se que a

frequência de soropositivos para IgM foi maior em pacientes anêmicos (50,0%) do que em não anêmicos (11,1%) ($p = 0,0045$). Quando avaliamos a prevalência de soropositivos para IgG contra hemácias do tipo sanguíneo O, verificamos que não houve diferença estatística significativa entre anêmicos (66,6%) e não anêmicos (46,0%) ($p = 0,2223$). Um comportamento diferente foi observado em relação ao IgM (anêmicos: 91,6% *versus* não anêmicos: 47,6%, $p = 0,0049$) (Figura 10).

No que se refere aos níveis de anticorpos (Figura 11), os resultados mostraram que os níveis medianos de IgG contra hemácias do tipo sanguíneo A foram significativamente superiores em pacientes anêmicos (0,78 [0,43±2,05]; mediana [intervalo interquartil]), quando comparados à mesma resposta de pacientes não anêmicos (0,43 [0,29±0,69]) ($p = 0,0069$). Entretanto, é importante destacar que, como as medianas dos níveis de IgG contra hemácias A foram inferiores ao valor estabelecido para o *cut off*, é provável que não apresentem significado biológico. Quando avaliamos os níveis de IgM contra essas mesmas hemácias, verificou-se que não houve diferença significativa entre pacientes anêmicos e não anêmicos (1,20 [0,73-2,17] *versus* 0,79 [0,43-1,42], respectivamente, $p = 0,0593$).

Com relação aos níveis medianos de IgG detectados contra moléculas de hemácias do grupo B (Figura 11), essa mesma tendência foi observada entre pacientes com anemia e sem anemia (1,26 [0,77±2,32] *versus* 0,90 [0,69±1,27], respectivamente, $p = 0,0965$). Porém, quando se avaliou os níveis de IgM contra essas mesmas hemácias, observou-se que a mediana de anêmicos (0,96 [0,58±1,25]) era superior à de não anêmicos (0,49 [0,30±0,74], $p = 0,0158$). Contudo, como o valor da mediana de anêmicos foi inferior ao valor do *cut off*, é possível que esse resultado não tenha significado biológico.

Por fim, quando foram analisados anticorpos contra hemácias do grupo O (Figura 11), verificou-se que, quando comparados aos pacientes não-anêmicos, os anêmicos apresentaram níveis superiores tanto de IgG (anêmicos: 1,90 [0,62±3,62] *versus* não anêmicos: 0,95 [0,51±1,30], $p = 0,0149$) quanto de IgM (anêmicos: 3,06 [1,99±5,45] *versus* não anêmicos: 0,89 [0,19±1,88], $p < 0,0001$).

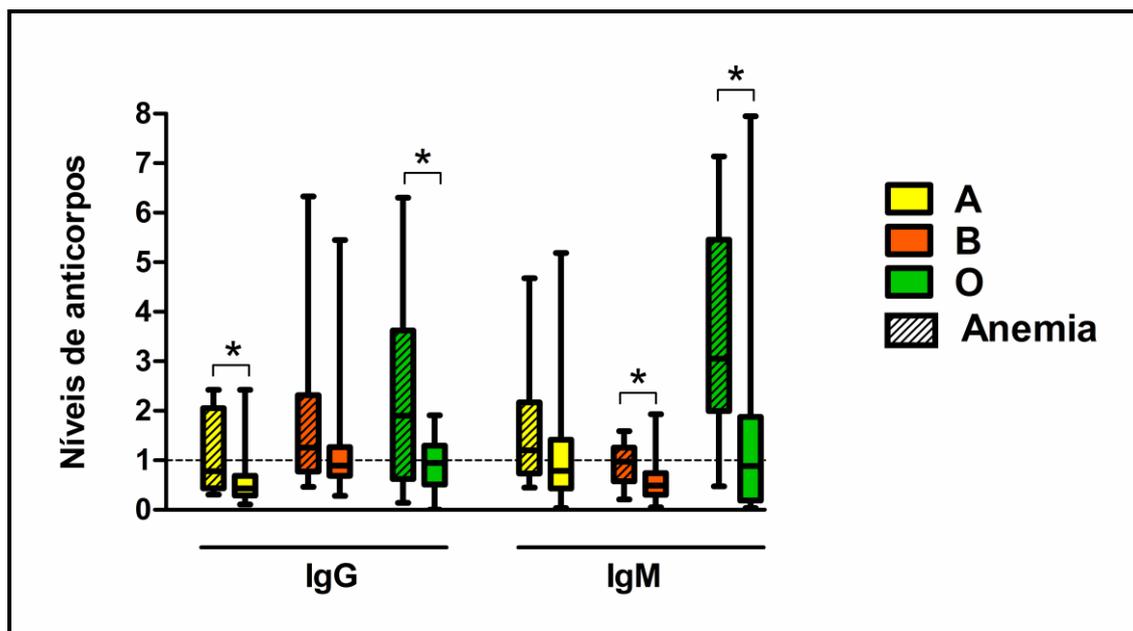


Figura 11. Níveis de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias normais dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO em pacientes com malária vivax não grave residentes na Amazônia brasileira apresentando ou não anemia. Hemácias do grupo A (amarelo); hemácias do grupo B (laranja); hemácias do grupo O (verde). Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da duplicata do soro teste/ *cut off*. Os resultados são apresentados como mediana e intervalo interquartil. As barras hachuradas representam os pacientes infectados por *P. vivax* apresentando anemia (Hb < 11 g/dL). Os valores de p foram determinados utilizando-se o teste estatístico de Mann-Whitney. *Indica um valor de $p < 0,05$. As linhas acima e abaixo da caixa indicam, respectivamente, os valores máximos e os mínimos.

5.5. Reconhecimento de moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO por anticorpos IgG e IgM de indivíduos com malária vivax grave residentes em área de alta transmissão no Peru

Com o objetivo de avaliar o efeito da gravidade de infecções por *P. vivax* na resposta de anticorpos IgG e IgM contra hemácias normais dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO, utilizamos os plasmas de pacientes internados com malária vivax grave adquirida no Peru. Para detectar tais anticorpos, ensaios de *Cell-ELISA* também foram

realizados, utilizando-se como antígeno hemácias normais dos grupos sanguíneos A, B e O. Entretanto, cabe mencionar que uma das limitações importantes para a realização dessa análise consistiu no pequeno tamanho amostral dessa população, o que dificultou a realização dos testes estatísticos.

Verificou-se que não houve diferença na frequência de soropositividade para a resposta de IgG (Figura 12A) contra hemácias A, B ou O (16,7% *versus* 11,1% *versus* 0%, respectivamente; $p = 0,2138$). Quando se avaliou a resposta de IgG (Figura 12B), observou-se que as respostas contra as hemácias B foram inferiores (0,30 [0,11±1,53]) às respostas contra hemácias A (0,57 [0,22±1,05]) e O (0,39 [0,16±0,60]) ($p = 0,0124$). Porém, é importante destacar que é possível que essa diferença não tenha significado biológico, pois os valores da mediana do índice de reatividade foram inferiores ao ponto de corte estabelecido neste estudo.

Quando se avaliou a resposta de IgM, verificou-se que a frequência de respondedores (Figura 12C) foi menor para hemácias do grupo sanguíneo B (0%) em comparação às frequências encontradas para hemácias A e O (11,1% e 61,1%, respectivamente) ($p < 0,0001$). Essa mesma tendência também foi observada, quando se analisou os níveis de IgM (Figura 12D): (hemácia A: 0,33 [0,12±1,39] *versus* hemácias B: 0,39 [0,15±0,92] *versus* hemácias O: 1,17 [0,24±2,29]) ($p < 0,0001$).

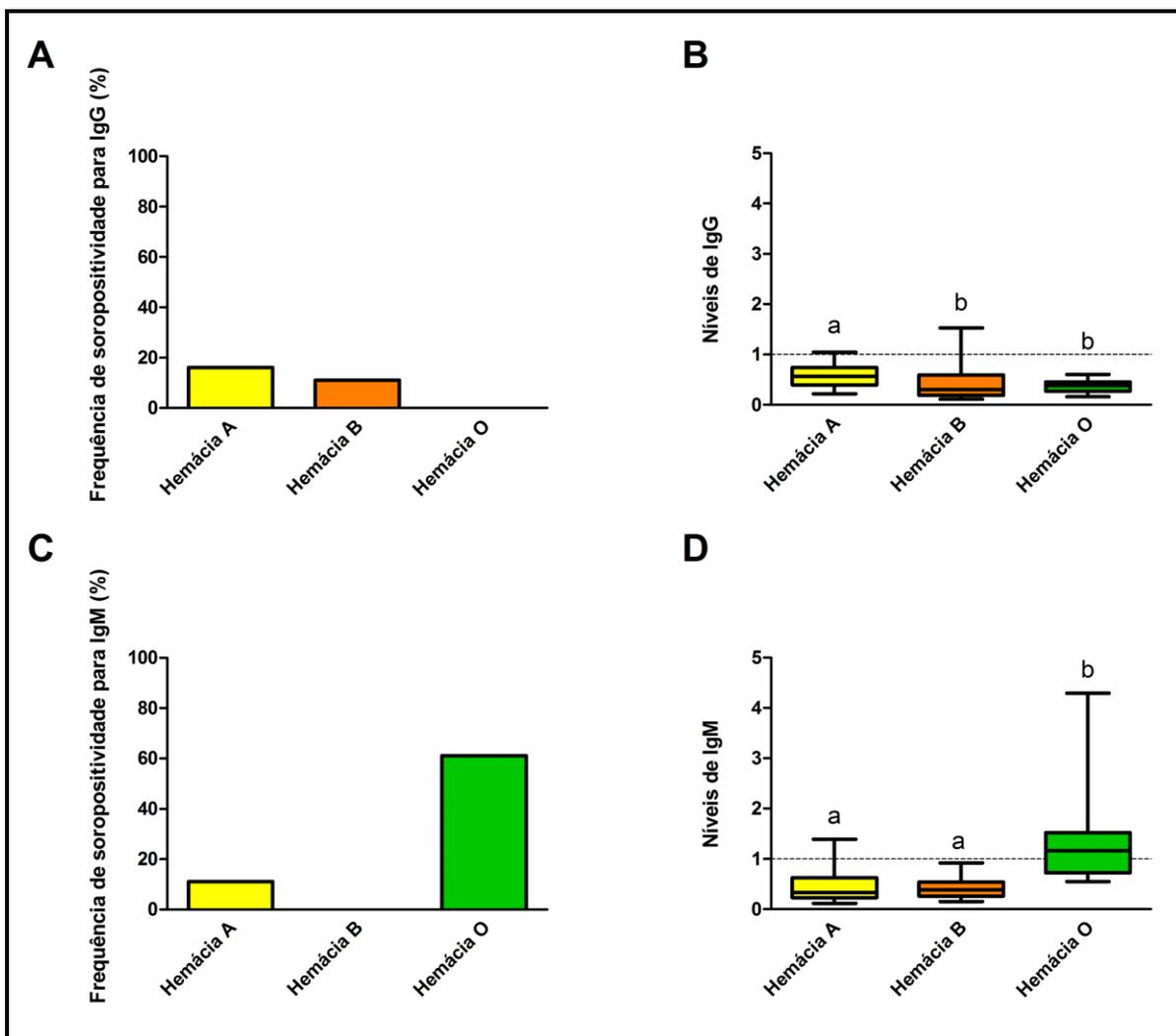


Figura 12. Influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO na resposta de anticorpos IgG e IgM. (A) Frequência de pacientes graves infectados por *P. vivax* do Peru soropositivos para IgG e (C) IgM. As diferenças entre as proporções de soropositividade foram avaliadas por meio do teste estatístico de qui-quadrado.* Indica valor de $p < 0,05$. (B) Magnitude da resposta de IgG e (D) IgM. Cada caixa representa o intervalo que contém os 50% centrais dos dados, sendo que a linha central representa a mediana. As linhas acima e abaixo da caixa indicam, respectivamente, os valores máximos e os mínimos. As diferenças quanto à magnitude da resposta de anticorpos contra as hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO foram analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis acompanhado pelo teste *pos hoc* de Dunn's. As letras alfabéticas **a** e **b** representadas acima de cada caixa representam os resultados do teste de comparação múltipla de Dunn's. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os níveis de anticorpos detectados contra hemácias de diferentes tipos sanguíneos.

5.6. Associações entre a anemia e a resposta de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO em pacientes com malária vivax grave residentes em áreas de alta transmissão no Peru

Por fim, avaliou-se a possível associação entre a anemia e a resposta de IgG e IgM contra moléculas de hemácias normais dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO em pacientes com malária grave infectados por *P. vivax* no Peru.

Nesse sentido, constatou-se, por meio das análises de correlação entre os níveis de hemoglobina e os níveis de anticorpos IgG e IgM direcionados contra moléculas de hemácias normais dos grupos sanguíneos A, B ou O, que não houve associação entre essas duas variáveis para nenhum dos grupos considerados ($p > 0,05$).

Posteriormente, realizou-se uma análise comparativa entre as frequências e os níveis de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos (A, B e O) nos plasmas de pacientes com anemia ($n = 11$) e nos de pacientes com malária vivax e sem anemia ($n = 7$) (Figura 13). Contudo, mais uma vez, notou-se que o pequeno tamanho amostral interferiu na realização dos testes estatísticos.

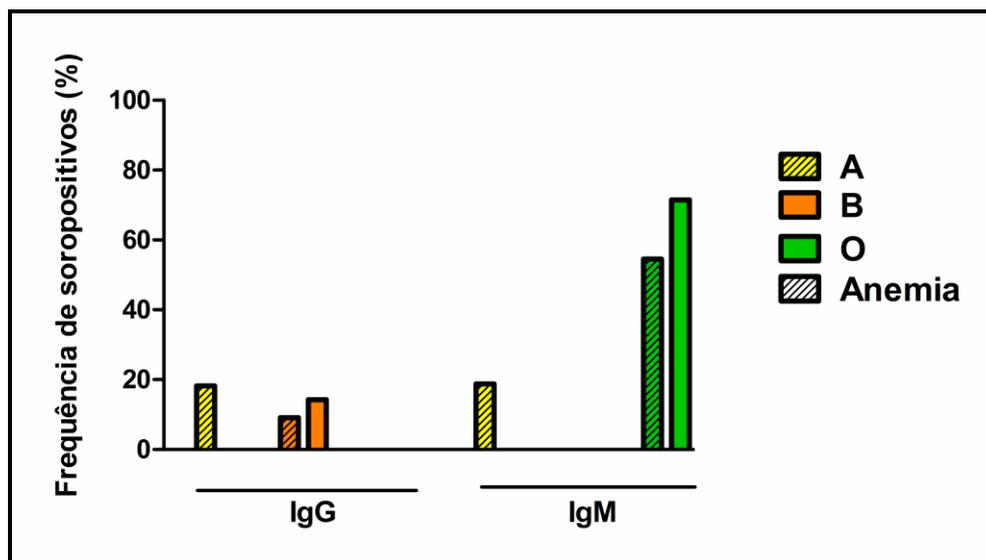


Figura 13. Soropositividade para IgG e IgM contra moléculas de hemácias de diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO entre os pacientes graves infectados por *P. vivax* apresentando ou não anemia. Hemácias do grupo A (amarelo); hemácias do grupo B (laranja); hemácias do grupo O (verde). As barras hachuradas representam os pacientes graves infectados por *P. vivax* apresentando anemia. O limiar de positividade foi definido como índice de reatividade (IR) ≥ 1 . IR = média da duplicata do soro teste/ *cut off*.

Verificou-se que, para hemácias do grupo sanguíneo A, não houve diferença significativa na frequência de soropositividade para IgG e IgM entre pacientes anêmicos e não anêmicos (IgG: 18,1% *versus* 0%, respectivamente; $p = 0,4967$; IgM: 18,8% *versus* 0%; $p = 0,4967$, respectivamente).

Para hemácias do grupo B, a mesma tendência também foi observada na frequência de soropositivos, tanto para IgG (anêmicos: 9% *versus* não anêmicos: 14,8%; $p = 1,000$), quanto para IgM (anêmicos: 0% *versus* não anêmicos: 0%; não foi possível extrair o valor de p).

E, finalmente, para hemácias do grupo O, verificou-se que também não houve diferença significativa na frequência de soropositividade, tanto para IgG entre pacientes anêmicos (0%) e não anêmicos (0%) (não foi possível extrair o valor de p devido ao pequeno número de indivíduos em cada grupo), quanto para IgM (anêmicos: 54,5% *versus* não anêmicos: 71,4%; $p = 0,6371$) (Figura 13).

Em termos da magnitude da resposta (Figura 14), verificou-se que, para hemácias do grupo sanguíneo A, não houve diferença significativa nos níveis de anticorpos IgG e nem nos de IgM entre pacientes anêmicos e não anêmicos com malária grave (IgG – anêmicos

mediana: 0,56; intervalo interquartil: [0,33±0,78] *versus* não anêmicos mediana: 0,63; intervalo interquartil: [0,46±0,73], $p = 0,3414$). IgM (anêmicos: 0,32 [0,23±0,52] *versus* não anêmicos: 0,43 [0,21±0,68], $p = 1,0000$).

No que se refere aos níveis de anticorpos contra hemácias B, observou-se que os pacientes anêmicos (0,27 [0,15±0,34]) apresentaram níveis de IgG contra moléculas de hemácias significativamente inferiores aos detectados para os não anêmicos (0,51 [0,29±0,76]) ($p = 0,0463$). Porém, esses valores foram inferiores ao *cut off*, e, portanto, é provável que não tenha sentido biológico. Já em relação aos níveis de IgM contra moléculas de hemácias B, não houve diferença significativa entre anêmicos (0,37 [0,24±0,46]) e não anêmicos (0,51 [0,26±0,89]) ($p = 0,3357$).

Por fim, quando foram avaliados os níveis de anticorpos contra hemácias do grupo O nos plasmas dos pacientes peruanos com malária grave, constatou-se que não houve diferença significativa, tanto nos níveis de IgG, quanto nos de IgM, entre anêmicos e não anêmicos respectivamente (IgG: 0,30 [0,21±0,47] *versus* 0,42 [0,40±0,45], $p = 0,0937$; IgM: 1,08 [0,71±1,37] *versus* 1,38 [0,73±2,14], $p = 0,2771$) (Figura 14).

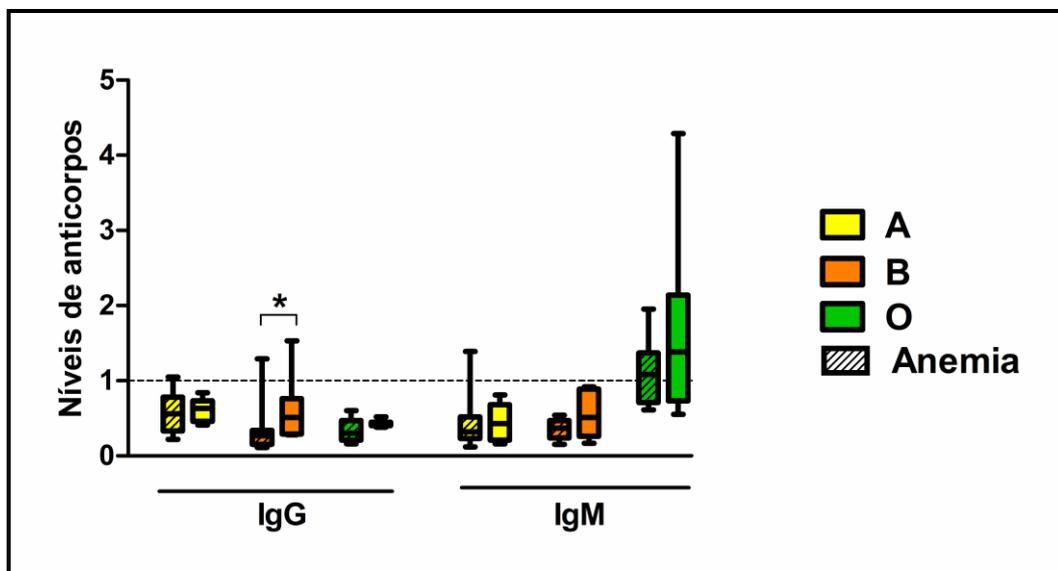


Figura 14. Níveis de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO em pacientes com malária grave residentes no Peru. Hemácias do grupo A (amarelo); hemácias do grupo B (laranja); hemácias do grupo O (verde). Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da duplicata do soro teste/ *cut off*. Os resultados são apresentados como mediana e intervalo interquartil. As barras hachuradas representam os pacientes infectados por *P. vivax* apresentando anemia (Hb < 11 g/dL). Os valores de p foram

determinados utilizando-se o teste estatístico de Mann- Whitney. *Indica um valor de $p < 0,05$. As linhas acima e abaixo da caixa indicam, respectivamente, os valores máximos e os mínimos.

6. DISCUSSÃO

A destruição de hemácias não infectadas tem sido apontada como um dos principais componentes que levam ao desenvolvimento da anemia na malária. Porém, os mecanismos imunológicos envolvidos na destruição dessas células ainda não são plenamente conhecidos, principalmente no que se refere a *P. vivax*. Um dos fatores que parece contribuir para essa destruição exacerbada de hemácias normais é a produção de auto-anticorpos, já que imunoglobulinas contra moléculas de superfície de hemácias têm sido relatadas durante infecções plasmodiais (FACER et al., 1980; BERZINS, 1983; FERNANDES et al., 2008; FONTAINE et al., 2010; ZITHA, 2014; MOURÃO, 2015; FERNANDEZ-ARIAS et al., 2016) e, em alguns casos, como em infecções por *P. falciparum* (ROSENBERG et al., 1973; RITTER et al., 1993), têm sido associadas à anemia. Entretanto, a relação entre a autoimunidade e o desenvolvimento da anemia na malária vivax ainda é pouco compreendida e poucos são os estudos que investigam a participação de auto-anticorpos das classes IgG e IgM na destruição de eritrócitos saudáveis, bem como sua associação aos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO. Nesse sentido, o intuito do presente estudo foi completar essa lacuna da literatura, investigando a possível associação entre essas imunoglobulinas e a anemia associada a infecções por *P. vivax*.

Como diferenças na expressão de antígenos dos grupos sanguíneos podem aumentar ou diminuir a susceptibilidade a muitas infecções (COOLING, 2015), primeiramente, nós investigamos a possível influência do sistema sanguíneo ABO na resposta de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de superfície de hemácias normais no plasma de pacientes não graves infectados por *P. vivax* na Amazônia brasileira. Para os pacientes infectados no Brasil, o reconhecimento, por anticorpos IgG, de moléculas de superfície de hemácias do grupo sanguíneo A, foi inferior ao observado para hemácias dos grupos B e O. Sabe-se que os níveis de IgGs ligadas aos eritrócitos está diretamente correlacionado ao nível de fagocitose (SHEIBAN & GERSHON (1990). Portanto, os resultados apresentados neste estudo corroboram aqueles observados por MEDEIROS (2016), que relatou uma diminuição nas taxas de eritrofagocitose de hemácias normais do grupo sanguíneo A após a opsonização dessas células com imunoglobulinas G purificadas dos soros de pacientes brasileiros com malária vivax. Estes resultados sugerem que, hemácias do grupo A são mais susceptíveis a

infecções por *P. vivax*, quando comparadas as demais hemácias, tendo em conta o baixo reconhecimento dessas hemácias por imunoglobulinas G.

Por outro lado, quando avaliamos a resposta de IgM, observamos um resultado distinto, já que as hemácias do grupo B foram menos reconhecidas por essa classe de anticorpos quando comparadas aos eritrócitos dos demais grupos sanguíneos. Com base nesses achados, é possível sugerir que mecanismos imunológicos distintos podem ser ativados dependendo do grupo sanguíneo do paciente. Nesse sentido, já foi demonstrado que a IgM se liga ao componente C1q do sistema do complemento com muito mais afinidade que a IgG e, portanto, atua como um potente ativador da via do complemento. Isso se justifica pelo fato de uma única molécula de IgM ser suficiente para disparar a lise mediada pelo complemento de um eritrócito, ao passo que cerca de 1000 moléculas de IgG são necessárias para exercer a mesma atividade. A IgM pode, também, opsonizar para a fagocitose diretamente, apresentando superioridade em relação à IgG como opsonina para a remoção fagocítica de partículas muito pequenas e de micropartículas apoptóticas (tamanho 1-2 μm) (PLEASS et al., 2016). Em um outro estudo, a atividade patogênica de uma variante de IgM anti-eritrócito foi investigada, em camundongos, e verificou-se que ela era capaz de induzir uma forma grave de anemia, que foi atribuída à hemaglutinação mediada por polivalência no baço e, ocasionalmente, no fígado, diferentemente do relatado para auto-anticorpos IgG anti-hemácia, para os quais o principal mecanismo envolvido era a eritrofagocitose (por células de Kupffer) mediada por Fc γ R- ou por complemento (BAUDINO et al., 2007). Contudo, é importante mencionar que, tanto para IgG quanto IgM, hemácias do grupo O foram mais fortemente reconhecidas quando comparadas as demais hemácias, sugerindo portanto, um possível papel protetor do grupo sanguíneo O contra malária vivax em relação aos grupos A e B. Porém, os mecanismos envolvidos no reconhecimento dessas células por essas imunoglobulinas ainda são desconhecidos.

Estudos envolvendo *P. falciparum* têm apresentado evidências de que o fenótipo ABO pode modular a gravidade e a evolução clínica da doença. Nesse sentido já se demonstrou, por exemplo, que para a formação de rosetas (ligação de hemácias infectadas a eritrócitos não infectados), – um fenômeno relacionado à virulência de *P. falciparum* –, o grupo sanguíneo do paciente é importante, pois a formação dessas estruturas é mais proeminente no grupo A que no O (CARLSON & WAHLGREN, 1992; BARRAGAN et al., 2000; ROWE et al., 2007; GOEL et al., 2015). Além disso, crianças do grupo A têm maior probabilidade de sucumbir à

malária grave quando comparadas a crianças do grupo O (FISCHER & BOONE, 1998; MIGOT-NABIAS et al., 2000; BEIGUELMAN et al., 2003; PATHIRANA et al., 2005).

A remoção inata imune de eritrócitos infectados por *P. falciparum* também já foi investigada como um possível modo de proteção contra a malária grave, já que esse mecanismo pode atuar como uma das primeiras linhas de defesa contra a malária em indivíduos não imunes. Ensaio realizados *in vitro*, com macrófagos humanos e, *in vivo*, com monócitos de camundongos, mostraram que eritrócitos infectados do grupo O são fagocitados mais avidamente que eritrócitos A e B, e este processo estaria associado ao aumento na deposição de hemicromos e de agregados da proteína banda 3 em eritrócitos O infectados (WOLOFSKY et al., 2012).

Uma vez que diferentes estudos têm mostrado que a aquisição de uma imunidade protetora está relacionada a uma longa e permanente exposição a picadas infectantes do inseto vetor (LUNEL & DRUILHE, 1989; DRUILHE & PÉRIGNON, 1994; DUBOIS & PEREIRA-SILVA, 1995; SHI et al., 1996), nós avaliamos, ainda, o efeito da exposição na resposta de anticorpos contra hemácias dos diferentes grupos sanguíneos. No entanto, nenhuma associação significativa foi encontrada. Esse achado sugere que a produção de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias parece não depender da exposição, mas sim do grupo sanguíneo do paciente.

Em relação à parasitemia, nossos resultados mostraram que essa variável também não exerce influência na resposta de anticorpos, corroborando o observado por FACER e colaboradores (1979). Esses pesquisadores observaram que quando crianças africanas (Gâmbia) com malária falciparum eram submetidas ao Teste de Coombs Direto para a identificação da presença de anticorpos IgGs fixados à superfície de hemácias, não era encontrada nenhuma associação entre os níveis de anticorpos IgG e a parasitemia, sugerindo que essa variável não é um fator determinante da resposta de IgG em infecções por *P. falciparum* (FACER et al., 1979). Por outro lado, BOUDIN e colaboradores (1993), com a finalidade de evidenciar o possível papel dos anticorpos IgM contra antígenos de *P. falciparum* na proteção imunológica em crianças e adolescentes residentes em áreas hiperendêmicas de Burquina Faso, verificaram que existia uma correlação negativa entre os níveis de IgM e a densidade parasitária, sugerindo um possível efeito protetor para IgM na malária (BOUDIN et al., 1993). Esses autores também relataram a inexistência de uma correlação

positiva entre os níveis de IgG e a parasitemia, uma vez que, à medida que a concentração dessas imunoglobulinas aumentava, a densidade parasitária também se elevava nos indivíduos infectados por *P. falciparum*. Esse achado corrobora os nossos resultados e sugere que, em infecções por *P. vivax*, a resposta de auto-anticorpos IgG não é dependente da carga parasitária.

A possível associação entre a anemia e a resposta de anticorpos contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO foi outro alvo de investigação deste estudo. Associações negativas foram encontradas entre os níveis de hemoglobina e os de anticorpos IgG, bem como os de IgM. Além disso, verificou-se que, de uma forma geral, as respostas de IgG e de IgM foram maiores em pacientes anêmicos. Esses dados estão de acordo com os resultados de um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, que também investigou o perfil de IgG e de suas subclasses, porém, contra um extrato proteico preparado a partir de eritrócitos normais (ZITHA, 2014). Mais tarde, também foi mostrado, por nosso grupo, que os anticorpos IgG purificados de pacientes anêmicos eram capazes de alterar as propriedades biomecânicas de hemácias normais, bem como de aumentar as taxas de fagocitose dessas células, contribuindo para a anemia (MOURÃO et al., 2016). A fim de identificar os fatores que contribuem para essa destruição acelerada de hemácias normais, WAITUMBI et al. (2000) avaliaram as alterações que ocorrem na superfície de eritrócitos de crianças com anemia grave associada à malária e constataram que elas apresentam um aumento na deposição de IgG, bem como deficiências nos níveis de proteínas reguladoras do complemento, como CR1 e CD55, quando comparadas ao controle. Entretanto, não existem na literatura informações sobre a expressão dessas proteínas em hemácias de diferentes grupos sanguíneos.

No que se refere à resposta de IgM, ROSENBERG et al (1973) avaliaram os títulos desses anticorpos contra eritrócitos, nos soros de pacientes infectados por *P. falciparum*, por meio de imunofluorescência indireta, e relataram que os pacientes anêmicos apresentavam maiores títulos de IgM, além de uma redução no tempo de vida de hemácias normais após a cura parasitológica, sugerindo a participação dessas imunoglobulinas na patogênese da anemia. Também já foi demonstrado que alguns anticorpos específicos, por exemplo, as imunoglobulinas anti-fosfatidilserina se ligam a hemácias não infectadas de camundongos, promovendo a fagocitose dessas células e contribuindo para a anemia. Esses anticorpos também têm sido detectados em pacientes com malária falciparum com anemia tardia

(FERNANDEZ-ARIAS et al., 2016). Já, no que se refere à malária vivax, um dos poucos estudos realizados nesse sentido avaliou a presença de anticorpos direcionados contra componentes de membrana de eritrócitos, a fim de identificar potenciais associações dessa resposta com os diferentes graus de anemia. Os autores desse estudo relataram que os pacientes que apresentaram resposta positiva para IgM contra as formas sanguíneas do parasito possuíam níveis inferiores de hemoglobina quando comparados aos de resposta negativa. Além disso, não houve correlação entre a presença de anticorpos anti-eritrócitos e a presença ou a intensidade da anemia. É importante ressaltar que esses autores investigaram pacientes residentes no estado do Pará, uma área diferente da avaliada no presente trabalho (FERNANDES et al., 2008).

Por fim, quando avaliamos a relação entre o padrão da resposta de IgG e IgM contra moléculas de hemácias normais e a anemia em pacientes com malária grave residentes no Peru, obtivemos resultados contrários aos observados para os pacientes brasileiros com malária não-grave, já que os pacientes peruanos anêmicos apresentaram níveis de anticorpos anti-hemácia inferiores aos detectados para pacientes não-anêmicos. Esse resultado deve ser interpretado com cautela visto que o número de pacientes utilizados é muito pequeno, não permitindo, pois, análises comparativas confiáveis. Assim, embora esse achado seja inconclusivo e necessite de maior investigação, fatores ambientais, variações genéticas associadas ao hospedeiro, e virulência do parasito, não podem ser desconsideradas, bem como a participação de outros mecanismos, dentre os quais cita-se: (i) a eritropoiese/diseritropoiese ineficaz, detectada por meio de anormalidades morfológicas nas células precursoras eritróides obtidas por meio de esfregaço da medula óssea de pacientes infectados por *P. vivax* (WICKRAMASINGHE et al., 1989); (ii) o estresse oxidativo induzido por metabólitos gerados durante a infecção, que pode esgotar os mecanismos de defesa das hemácias, reduzindo a habilidade dessas células em se proteger contra as espécies reativas de oxigênio, além de torná-las mais vulneráveis a danos (EREL et al., 1997; BILGIN et al., 2012); (iii) o fracasso das hemácias em recuperar passagem através do filtro esplênico, o que leva à sua destruição sem a necessidade de fagocitose (HANDAYANI et al., 2009); além de outros fatores.

Diante do exposto, nota-se que este estudo levanta considerações importantes sobre a distribuição de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de superfície de eritrócitos saudáveis em infecções por *P. vivax*. Esses dados irão auxiliar na compreensão dos mecanismos

envolvidos na remoção de eritrócitos normais, contribuindo para o entendimento da patofisiologia da anemia associada à malária vivax. Espera-se que esses resultados, associados a outras investigações relacionadas com autoanticorpos e grupos sanguíneos que deverão ocorrer no futuro, contribuam para o desenvolvimento de novas terapias para prevenir essa importante manifestação clínica da malária.

7. CONCLUSÃO

- Infecções por *P. vivax* induzem a produção intensa de auto-anticorpos das classes IgG e IgM que reconhecem moléculas de superfície de eritrócitos saudáveis.
- A exposição prévia à malária e a parasitemia parecem não influenciar os níveis de IgG e IgM contra moléculas de superfície de hemácias saudáveis não infectadas por *P. vivax*.
- A resposta de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de superfície de hemácias normais é dependente dos grupos sanguíneos ABO em infecções por *P. vivax*, sendo hemácias do grupo O fortemente reconhecidas por estes auto-anticorpos.
- Hemácias saudáveis do grupo sanguíneo A são fracamente reconhecidas por auto-anticorpos IgG enquanto hemácias saudáveis do grupo sanguíneo B são pouco reconhecidas por auto-anticorpos IgM, sugerindo que mecanismos imunológicos distintos dependentes de anticorpos possam ser ativados de acordo com o grupo sanguíneo do paciente.
- Níveis de auto-anticorpos IgG e IgM contra moléculas de superfície de hemácias normais dos diferentes grupos sanguíneos A e O são negativamente correlacionados aos níveis de hemoglobina e essa mesma associação também ocorre entre os níveis de IgM contra hemácias do grupo sanguíneo B e os níveis de hemoglobina, sugerindo a participação desses auto-anticorpos em mecanismos imunes de destruição de hemácias saudáveis em infecções por *P. vivax*.
- Pacientes anêmicos, com malária não grave infectados por *P. vivax*, apresentam maiores níveis de anticorpos IgG e IgM contra moléculas de hemácias dos diferentes grupos sanguíneos do sistema ABO quando comparados aos não anêmicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELE DC, TOBIE JE, HILL GJ, CONTACOS PG, EVANS CB. Alterations in serum proteins and 19s antibody production during the course of induced malarial infections in man. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.14, p.191-197, 1965.
- ADU D, WILLIAMS DG, QUAKYI IA, VOLLER A, ANIM-ADDO Y, BRUCE-TAGOE AA, JOHNSON GD, HOLBOROW EJ. Anti-ssDNA and antinuclear antibodies in human malaria. *Clinical & Experimental Immunology*, v.49, p.310–316, 1982.
- AMINO R, THIBERGE S, MARTIN B, CELLI S, SHORTE S, FRSCHKNECHT F, MÉNARD R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*, v.12, p.220-224, 2006.
- ARESE, P, TURRINI F, SCHWARZER, E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v.16, p.133–146, 2005.
- ARÉVALO-HERRERA M, CHITNIS C, HERRERA S. Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. *Human Vaccines*, v.6, p.124-132, 2010.
- ATHREYA BH, CORIELL LL. Relation of blood groups to infection a survey and review of data suggesting possible relationship between malaria and blood groups. *The American Journal Epidemiology*, v.86, p.292-304, 1967.
- AWAH NW, TROYE-BLOMBERG M, BERZINS K, GYSIN J. Mechanisms of malarial anaemia: potential involvement of the *Plasmodium falciparum* low molecular weight rophtry-associated proteins. *Acta Tropica*, v.112, p.295-302, 2009.
- AWAH N, BALOGUN H, ACHIDI E, MARIUBA LA, NOGUEIRA PA, ORLANDI P, TROYE-BLOMBERG M, GYSIN J, BERZINS K. Antibodies to the *Plasmodium falciparum* rophtry protein RAP-2/RSP-2 in relation to anemia in Cameroonian children. *Parasite Immunology*, v. 33, p. 104–115, 2011.
- BAER K, KLOTZ C, KAPPE SHI, SCHNIEDER T, FREVERT U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PloS Pathogens*, v.3, p.e171, 2007.

- BAIRD JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, p.4075-4083, 2004.
- BAIRD JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, p.4075-4083, 2004. BAIRD JK. Neglect of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitology*, v.23, p.533-539, 2007.
- 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.
- BARRAGAN A, KREMSNER PG, WAHLGREN M, CARLSON. Blood group A antigen is a co-receptor in *Plasmodium falciparum* rosetting. *Infection Immunity*, v.68, p: 2971–2975, 2000.
- BAUDINO L, FOSSATI-JIMACK L, CHEVALLEY C, MARTINEZ-SORIA E, SHULMAN MJ, IZUI S. IgM and IgA anti-erythrocyte autoantibodies induce anemia in a mouse model through multivalency-dependent hemagglutination but not through complement activation. *Blood*, v.109 (12), p. 5355-5362, 2007.
- BEIGUELMAN B, ALVES FP, MOURA MM, ENGRACIA V, NUNES AC, HECKMANN MI, FERREIRA RGM, SILVA LHP, CAMARGO EP, KRIEGER H. The association of genetic markers and malaria infection in the Brazilian Western Amazonian region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, p.455-460, 2003.
- BERGER SA, YOUNG NA, EDBERG SC. Relationship between infectious diseases and human blood type. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v.8, p.681–689, 1989.
- BERZINS K., WAHLGREN M., PERLMANN P. Studies on the specificity of anti-erythrocyte antibodies in the serum of patients with malaria. *Clinical & 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.

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.

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 Pediatrics*, v.17, p.355-359, 1997.

BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO DEL PERÚ, 2016

BOUDIN C, CHUMPITAZI B, DZIEGIEL M, PEYRON F, PICOT S, HOGH B, AMBROISE-THOMAS P. Possible Role of Specific Immunoglobulin M Antibodies to *Plasmodium falciparum* Antigens in Immunoprotection of Humans Living in a Hyperendemic Area, Burkina Faso. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar, v.31, p.636-641, 1993.

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. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.92, p.525-537, 1998.

CARLSON J, WAHLGREN M. *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions. *Journal of Experimental Medicine*, v.176, p.1311-1317, 1992.

CARTER R, MENDIS KN. Evolutionary and historic aspects of the burden of malaria. *Clinical Microbiological*, v.15, p.564-594, 2002.

CASTRO-GOMES T, MOURÃO LC, MELO GC, MONTEIRO WM, LACERDA MVG, BRAGA EM. Potential Immune Mechanisms Associated with Anemia in *Plasmodium vivax* Malaria: a Puzzling Question. *Infection and Immunity*, v.82, p.3990 – 4000, 2014.

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.

- CHUNG WY, GARDINER DL, HYLAND C, GATTON M, KEMP DJ, TRENHOLME KR. Enhanced invasion of blood group A1 erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.144, p.128–130, 2005.
- COHEN S, BUTCHER GA. Serum antibody in acquired malarial immunity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.65, p.125–13, 1971.
- COOLING L. Blood groups in infection and host susceptibility. *Clinical Microbiology Reviews*, V. 28, p.801-870, 2015.
- 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.
- CONSIGNY PH, CAUQUELIN B, AGNAMEY P, COMBY E, BRASSEUR P, BALLETT JJ, ROUSSILHON C. High prevalence of co-factor independent anticardioplin antibodies in malaria exposed individuals. *Clinical & Experimental Immunology*, v.127, p.158–164, 2002.
- COPPI A, TEWARI R, BISHOP JR, BENNETT BL, LAWRENCE R, ESKO JD, BILLKERO, SINNIS P. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host & Microbe*, v.2, p.316-327, 2007.
- COX-SINGH J, DAVIS TME, LEE KS, SHASUL SSG, MATUSOP A, RATNAMS, 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.
- CSERTI CM, DZIK WH. The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood*, v.110, p.2250–2258. 2007.
- 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.
- DAÍ C, KRANTZ SB. Interferon induces upregulation and activation of caspases 1, 3, and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells. *Blood*, v.93, p.3309–3316, 1999.

DANIEL RIBEIRO CT, DE ROQUEFEUIL S, DRUILHE P, MONJOUR L, HOMBERG JC, GENTILINI M. Abnormal anti-single stranded (ss) DNA activity in sera from *Plasmodium falciparum* infected individuals. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.78, p.742–746, 1984.

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

DRUILHE P, PERIGNON JL. Mechanisms of defense against *Plasmodium falciparum* asexual blood stages in humans. *Immunity Letters*, v.41, p.115-120, 1994.

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 anti-oxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. *Clinical Biochemistry*, v.30, p.631-639, 1997.

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

FACER CA, & AGIOSTRATIDOU G. High levels of anti-phospholipid antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* and in *P. vivax* malaria. *Clinical & Experimental Immunology*, v.95, p.304–309, 1994.

FADOK VA, DE CATHELINEREAU A, DALEKE DL, HENSON PM, BRATTON DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, v.276, p.1071-1077, 2001.

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 AMRS, 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. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.15, p. 650-658, 2008.

FERNANDEZ-ARIAS C, RIVERA-CORREA J, GALLEGO-DELGADO J, BUFFET P, NDOUR PA, RODRIGUEZ A. Anti-Self Phosphatidylserine Antibodies Recognize Uninfected Erythrocytes Promoting Malarial Anemia. *Cell Host & Microbe*, v.19, p.194–203, 2016.

FISCHER PR, BOONE P. Short report: severe malaria associated with blood group. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.58, p.122–123, 1998.

FONTAINE A, POPHILLAT M, BOURDON S, VILLARD C, BELGHAZI M, FOURQUET P, DURAND C, LEFRANC D, ROGIER C, FUSAI T, ALMERAS L. Specific antibody responses against membrane proteins of erythrocytes infected by *Plasmodium falciparum* of individuals briefly exposed to malaria. *Malaria Journal*, v.9, p.276, 2010.

FORMAGLIO P, TAVARES J, MÉNARD R, AMINO R. Loss of host cell plasma membrane integrity following cell traversal by *Plasmodium* sporozoites in the skin. *Parasitology International*, v.63, p.237-244, 2014.

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

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.

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

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

GUIYEDI V, CHANSEAUD Y, FESEL C, SNOUNOU G, ROUSSELLE J, LIM P, KOKO J, NAMANE A, CAZENAVE P, KOMBILA M, PIED S. Self-reactivities to the non-erythroid alpha spectrin correlate with cerebral malaria in Gabonese children. *PLoS ONE*, v.4, p.e389, 2007.

HALL N, KARRAS M, RAINE JD, CARLTON JM, KOOIJ TW, BERRIMAN M, FLORENS L, JANSSEN CS, PAIN A, CHRISTOPHIDES GK, JAMES, RUTHERFORD K, HARRIS B, HARRIS D, CHURCHER C, QUAIL MA, ORMOND D, DOGGETT J, TRUEMAN HE, MENDOZA, BIDWELL SL, RAJANDREAM MA, CARUCCI DJ, YATES JR, RD, KAFATOS FC, JANSE CJ, BARRELL B, TURNER CM, WATERS AP, & SINDEN RE. A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science*, v.307, p.82-86, 2005.

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.

HASEEB MA, THORS C, LINDER E, EVELAND LK. *Schistosoma mansoni*: chemoreception through N-acetyl-D-galactosamine-containing receptors in females offers insight into increased severity of schistosomiasis in individuals with blood group A. *Experimental Parasitology*, v. 119, p.67-73, 2008.

HELEGBE GK, GOKA BQ, KURTZHALS JAL, ADDAE MM, OLLAGA E, TETTEH JKA, DODOO D, OFORI MF, OBENG-ADJEI G, HIRAYAMA K, AWANDARE GA,

AKANMORI BD. Complement activation in Ghanaian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Malaria Journal*, v.6. p. 1-9, 2007.

<http://portalsaude.saude.gov.br/images/jpg/2015/junho/24/Mapa-de-risco-2014.jpg>. Acessado no dia 12 de Novembro de 2015, às 13 horas e 17 minutos.

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

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

JAKOBSEN PH, MORRIS-JONES SD, HVIID, THEANDER TG, HOIER-MADSEN M, BAYOUMI RA, GREENWOOD BM. Anti-phospholipid antibodies in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *Immunology*, v.79, p.653–657, 1993.

JARAMILLO GN, SAUL A, HOGARTH WL, COLLINS WE. Anemia 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.

KORIR JC, MAGAMBO JK, MWATHA JK, WAITUMBI JN. B-cell activity in children with malaria. *Malaria Journal*, v.11, p.66, 2012.

KWIATKOWSKI DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *The American Journal of Human Genetics*, v.77, p.171–192, 2005.

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

LEE WC, MALLERET B, LAU YL, MAUDUIT M, FONG MY, CHO JS, SUWANARUSK R, ZHANG R, ALBRECHT L, COSTA FT, PREISER P, MCGREADY R, RENIA L,

- NOSTEN F, RUSSELL B. Glycophorin C (CD236R) mediates vivax malaria parasite rosetting to normocytes. *Blood*, v.123, p.100-109, 2014.
- LELL B, MAY J, SCHMIDT-OTT RJ, LEHMAN LG, LUCKNER D. The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. *Clinical Infectious Diseases*, v.28, p.794–799, 1999.
- LIBREGTS SF, GUTIÉRREZ L, BRUIN AM, WENSVEEN FM, PAPADOPOULOS P, IJCKEN W, OZGUR Z, PHILIPSEN S, NOLTE MA. Chronic IFN- γ 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.
- LI MO, SARKISIAN MR, MEHAL WZ, RAKIC P, FLAVELL RA. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science*, v.302, p.1560-1563, 2003.
- LOOAREESUWAN S, MERRY AH, PHILLIPS RE. Reduce erythrocyte survival following clearance of malarial parasitaemia in Thai patients. *British Journal of Haematology*, v.67, p.473-478, 1987.
- LOSCERTALES MP & BRABIN BJ. ABO phenotypes and malaria related outcomes in mothers and babies in The Gambia: a role for histo-blood groups in placental malaria? *Malaria Journal*, v.5, p.1-6, 2006.
- LUDIN P, NILSSON D, MASER P. Genome-wide identification of molecular mimicry candidates in parasites. *PLoS One*, v.6, p.17546, 2011.
- LUNEL F, DRUILHE P. Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages in vitro. *Infection and Immunity*, v.57, p.2043-2049, 1989.
- MAIER AG, COOKE BM, COWMAN AF, TILLEY L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nature Reviews*, v.7, p.341-354, 2009.
- MARTIN SK, MILLER LH, HICKS CU, DAVID-WEST A, UGBODE C, DEANE M. Frequency of blood group antigens in Nigerian children with falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.73, p.216–218, 1979.

- MCGREGOR IA, TURNER MW, WILLIAMS K, HALL P. Soluble antigens in the blood of African patients with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*, v.7548, p.881-884, 1956.
- MENDIS K, SINA BJ, MARCHESINI P, CARTER R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.64, p.97-106, 2001.
- MERCEREAU-PUIJALON O, GUILLOTTE M, VIGAN-WOMAS I. Rosetting in *Plasmodium falciparum*: a cytoadherence phenotype with multiple actors. *Transfusion Clinique et Biologique*, v.15, p.62-71, 2008.
- MIGOT-NABIAS F, MOMBO LE, LUTY AJF, DUBOIS B, NABIAS R, BISSEYE C, MILLET P, LU CY, DELORON P. Human genetic factors related to susceptibility to mild malaria in Gabon. *Genes & Immunity*, v.1, p.435-441, 2000.
- 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.111.010678, 2011.
- 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*, v.358, p.657-660, 2001.
- 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, HAFALLA JCR, RODRIGUEZ A. Migration through cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nature Medicine*, v.8, p.1318-1322, 2002.
- 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, 2015. Anticorpos direcionados a proteínas de membrana de hemácias e sua associação à anemia em infecções por *Plasmodium vivax*. (Doutorado em Parasitologia) Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

MOURÃO LC, ROMA PMS, ABOOBACAR JSS, MEDEIROS CMP, ALMEIDA ZB, FONTES CJF, AGERO U, MESQUITA ON, BEMQUERER MP & BRAGA EM. Anti-erythrocyte antibodies may contribute to anaemia in *Plasmodium vivax* malaria by decreasing red blood cell deformability and increasing erythrophagocytosis. *Malaria Journal*, p.1-9, 2016.

MSP. Ministerio de Salud del Peru. Tendencia y situación de las enfermedades sujetas a vigilância epidemiológica: malária. *Boletim Epidemiológico*, v.22, p.1088-1097, 2013.

MSVS. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde 2013 Brasil. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. *Boletim Epidemiológico*, v.44, p.1-16, 2013.

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.

NURLEILA S, SYAFRUDDIN D, ELYAZAR IR, BAIRD JK. Serious and fatal illness associated with falciparum and vivax malaria among patients admitted to hospital at West Sumba in eastern Indonesia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.87, p.41-49, 2012.

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

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 holo-endemic malaria region in western Kenya. *Journal of Infectious Diseases*, v.179, p. 279-282, 1999.

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

PATHIRANA SL, ALLES HK, BANDARA S, PHONE-KYAW M, PERERA MK. ABO-blood-group types and protection against severe, *Plasmodium falciparum* malaria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.99, p.119–124, 2005.

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.

PLEASS RJ, MOORE SC, STEVENSON L, HVIID L. Immunoglobulin M: restrainer of inflammation and mediator of immune evasion by *Plasmodium falciparum* malaria. *Trends in Parasitology*, v.1431, p.1-12, 2016.

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.

RAVINDRAN B, SATAPATHY AK, DAS MK. Naturally-occurring anti-alpha-galactosyl antibodies in human *Plasmodium falciparum* infections - a possible role for auto-antibodies in malaria. *Immunology Letters*, v.19, p.137–141, 1988.

REDE NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA, DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGIA, MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ, 2015.

REDE NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA, DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGIA, MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ, 2016.

- RITTER K, KUHLENCORD A, THOMSSSEN R, BOMMER W. Prolonged haemolytic anaemia in malaria and auto-antibodies against triose-phosphate isomerase. *The Lancet*, v.342, p.1333–1334, 1993.
- ROSENBERG EB, STRICKLAND GT, YANG SL, WHALEN GE. IgM antibodies to red cells and autoimmune anemia in patients with malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.22, p.146-152, 1973.
- ROWE JA, SHAFI J, KAI OK, MARSH K, RAZA A. Nonimmune IgM but not IgG binds to the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and correlates with resetting and severe malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.66, p 692-699, 2002.
- ROWE JA, HANDEL IG, THERA MA, DEANS AM, LYKE KE, KONE A, DIALLO DA, RAZA A, KAI O, MARSH K, PLOWES CV, DOUMBO OK, MOULDS JM. Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.104, p.17471–17476, 2007.
- RUWENDE C, KHOO SC, SNOW RW. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature*, v.376, p.246–249, 1995.
- SAITOU N, YAMAMOTO F. Evolution of primate ABO blood group genes and their homologous genes. *Molecular Biology and Evolution*, v.14, p.399–411, 1997.
- SATAPATHY AK, DAS MK, RAVINDRAN B. Murine malaria: anti-erythrocytic antibodies recognize N-acetyl neuraminic acid residues. *Immunology*, v.80, p.546–552, 1993.
- SHEIBAN E, GERSHON H. The specific blocking of an IgG dependent erythrophagocytosis assay by protein G and ELISA determination of in situ bound IgG on erythrocytes of normal donors. *Journal of Immunological Methods*. V.135, p.139-146, 1990.
- SHI YP, SAYED U, OARI SH, ROBERTS JM, UDHAYAKUMAR V, OLOO AJ, HAWLEY WA, KASLOW DC, NAHLEN BL, LAL AA. Natural Immune Response to the C-terminal 19-kilodalton Domain of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1. *Infection Immunity*, v.64, p.2716-2723, 1996.

SINGH B, & DANESHVAR P. *Plasmodium knowlesi* malaria in Malaysia. *Medical Journal of Malaysia*, v.3, p.224-240, 2010.

SINGH B, SUNG LK, MATUSOP A, RADHAKRISHNAN A, SHAMSUL SSG, & COX-SINGH J. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, v.363, p.1017-1024, 2004.

SINNIS P, & ZAVALA F. The skin stage of malaria infection: biology and relevance to the malaria vaccine effort. *Future Microbiology*, v.3, p.275-278, 2008.

SCHOFIELD L, & GRAU GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, v.5, p.722-735, 2005.

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.

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.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde 2013 Brasil. Dados epidemiológicos de malária por estado. Brasil 2010 a 2011, 2013.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde 2013 Brasil. Dados epidemiológicos de malária por estado. Brasil, 2015.

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

TYAGI RK, SHARMA YD. Erythrocyte binding activity displayed by a selective group of *Plasmodium vivax* tryptophan rich antigens is inhibited by patients' antibodies. *PLoS One*, v. 7, p.1-14, 2012.

- 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.
- 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 Medicine*, v.5, p.e128, 2008.
- TOPLAK N, & AVCIN T. Influenza and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1173, p.619–626, 2009.
- TURRINI F, ARESE P, YUAN J, LOW P.S. 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. 2012. 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.
- VERGANI D, & MIELI-VERGANI G. Autoimmune manifestations in viral hepatitis. *Seminars in Immunopathology*, v.35, 73–85, 2013.
- VOLLER A. Immunopathology of malaria. *World Health Organization*, v.50, p.177-186, 1974.
- VON LANDENBERG P, LEHMANN HW, MODROW S. Human parvovirus B19 infection and antiphospholipid antibodies. *Autoimmunity Reviews*, v.6, 278–285, 2007.
- 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.
- WHITE NJ. Manson's Tropical Diseases. *Elsevier Science*, v.21, p.1205-1295, 2003.

- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Roll Back Malaria, 2004.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report, 2009.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report, 2014.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control and Elimination of *Plasmodium vivax* Malaria, 2015.
- WICKRAMASINGLE SN & ABDALLA SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillière's Clinical Haematology*, v.13, p.277-299, 2000.
- WOLOFSKY KT, AYI K, BRANCH DR, HULT AK, OLSSON ML, LILES WC, CSERTI-GAZDEWICH C.M, KAIN K.C. ABO Blood Groups Influence Macrophage-mediated Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected Erythrocytes. *PLoS Pathogens*, v.8, p.1002942, 2012.
- WOODRUFF AW, ANSDELL VE, PETTITT LE. Cause of anaemia in malaria. *Lancet*, v.1, 1055-1057, 1979.
- YAMAMOTO F, CLAUSEN H, WHITE T, MARKEN J, HAKOMORI S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*, v.345, p.229–233, 1990.
- YAMAMOTO M, LIN XH, KOMINATO Y, HATA Y, NODA R. Murine equivalent of the human histo-blood group ABO gene is a cis-AB gene and encodes a glycosyltransferase with both A and B transferase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, v.276, p.3701–13708, 2001.
- YAMAUCHI LM, COPPI A, SNOUNOU G, SINNIS P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cellular Microbiology*, v.9, p.1215-1222, 2007.
- ZHITA, 2014. Caracterização do perfil isotópico de imunoglobulinas G e sua associação à anemia na infecção por *Plasmodium vivax*. (Mestrado em Parasitologia), Universidade Federal de Minas Gerais.
- ZOUALI M, DRUILHE P, EYQUEM A. IgG-subclass expression of anti-DNA and anti-ribonucleoprotein autoantibodies in human malaria. *Clinical & Experimental Immunology*, v.66, p.273–278, 1986.

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. ANEXO

Questionário padrão aplicado aos pacientes incluídos neste estudo.

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 (em meses)?		
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) (em dias):			
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"/> Doxicilina <input type="checkbox"/> Quinina <input type="checkbox"/> Artesunato Esquemas (dose e tempo):			
Conclusão do caso: 1 <input type="checkbox"/> Primoinfecção 2 <input type="checkbox"/> Recrudescência 3 <input type="checkbox"/> Reacaída 4 <input type="checkbox"/> Reinfecção			

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO APÓS 7 DIAS (D7)

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

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO APÓS 14 DIAS (D14)

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

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO APÓS 21 DIAS (D21)

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

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO APÓS 28 DIAS (D28)

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