

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

**PERFIL DE ANTICORPOS CONTRA DIFERENTES ANTÍGENOS  
RECOMBINANTES DE MEROZOÍTOS DE *Plasmodium vivax* E SUA  
ASSOCIAÇÃO À MORBIDADE**

LUIZA CARVALHO MOURÃO

BELO HORIZONTE - MG  
FEVEREIRO 2011

LUIZA CARVALHO MOURÃO

**PERFIL DE ANTICORPOS CONTRA DIFERENTES ANTÍGENOS  
RECOMBINANTES DE MEROZOÍTOS DE *Plasmodium vivax* E SUA  
ASSOCIAÇÃO À MORBIDADE**

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 em Parasitologia.

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

BELO HORIZONTE – MG

FEVEREIRO 2011

Trabalho realizado no Laboratório de Malária, Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas (UFMG). Financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG (CBB PPM-0003-09), Conselho Nacional de Pesquisa/CNPq (471156/2010-8) (Bolsa de Mestrado 2009/2011) e Pronex Malaria, DECIT/MS (555646/2009-2).

Aos meus pais, meus primeiros mestres,  
pelo amor incondicional e pelos exemplos de vida.

Ao meu querido irmão,  
pelo carinho, zelo e momentos compartilhados.

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

“E é sempre melhor o impreciso que embala que o certo que basta,  
Porque o que basta acaba onde basta, e onde acaba não basta,  
E nada que se pareça com isto deveria ser o sentido da vida...”

Álvaro de Campos (Fernando Pessoa)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida e da sabedoria.

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

À Universidade Federal de Minas Gerais, por propiciar a realização deste trabalho.

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

À professora Érika Martins Braga, pelo exemplo de orientadora, de mãe e de amiga.

À Professora Irene Silva Soares, da Universidade Federal de São Paulo, por fornecer gentilmente as proteínas recombinantes.

Aos Professores Cor Jesus Fontes, da Universidade Federal do Mato Grosso, e Marcus Vinícius Guimarães Lacerda, da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (AM), por fornecerem os soros e os resultados do hemograma.

Ao Professor Marcus Silva Xavier, do Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva da UFMG, por despertar em mim o gosto pela estatística.

Ao Professor Ricardo Fujiwara, pela amizade, pelo exemplo profissional, pela disponibilidade e pelas discussões científicas.

À Cristiane e à Lílian, companheiras de trabalho que se tornaram grandes amigas.

Aos amigos do Laboratório de Malária, Adriana, Gabriel, Matheus, Nayara, Patrícia, Rafael, Rodrigo e Zélia, pela excelente convivência, e por compartilharem alegrias e aflições.

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

Aos colegas do mestrado, Alexandre, Angélica, Emília, Fernando, Laila, Lanuze, Letícia, Pedro e Rafaela, pela colaboração e troca de conhecimentos.

Aos amigos da Pós-Graduação, pela paciência e disponibilidade, em especial, à Milena, que se tornou uma grande amiga.

Aos amigos de Viçosa, Ana, Anderson, Danielle, Edvaldo, Elisa, Higo, Karla, Luciana, Luísa, Mafra, Nayra, Thiago e Wiliane, pelos momentos compartilhados e por estarem sempre presentes, independente da distância.

Às eternas amigas, Andréa, Fernanda, Luciana e Virgínia, companheiras fiéis que continuarão acompanhando meus passos ao longo desta caminhada.

A todos os familiares, em especial, à Tia Maria, ao Tio Ricardo e à Tia Tereza pelo carinho, paciência e apoio.

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

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO .....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Situação atual da malária.....	1
1.2. Ciclo de vida dos plasmódios .....	4
1.3. <i>Plasmodium vivax</i> .....	7
1.4. Antígenos de <i>Plasmodium</i> com potencial vacinal.....	9
1.4.1. Proteína 1 da Superfície do Merozoíto (MSP-1).....	10
1.4.2. Proteína 3 da Superfície de Merozoíto (MSP-3).....	13
2. JUSTIFICATIVA .....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo geral .....	19
3.2. Objetivos específicos .....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Área e população de estudo .....	20
4.2. Antígenos.....	22
4.2.1. Fragmento de 19 kDa da região C-terminal da Proteína 1 de Superfície de Merozoíto (PvMSP-1 <sub>19</sub> ).....	22
4.2.2. Proteína 3 $\alpha$ da Superfície de Merozoíto (PvMSP-3 $\alpha$ ).....	23
4.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	23
4.3.1. Ensaio imunoenzimático para a detecção de IgG .....	23
4.3.2. Ensaio imunoenzimático para a detecção das subclasses de IgG.....	24
4.4. Análise dos dados .....	25
5. RESULTADOS .....	27
5.1. Descrição da população de estudo.....	27
5.2. Influências da parasitemia e exposição na resposta específica de IgG total .....	29
5.2.1. Resposta de IgG total.....	29
5.2.2. Influência da exposição na resposta de IgG total .....	30



5.2.3.	Influência da parasitemia na resposta de IgG total.....	31
5.3.	Associações entre a resposta de IgG e os parâmetros de morbidade.....	32
5.3.1.	Associações entre a resposta de IgG e a anemia .....	33
5.3.2.	Associações entre a resposta de IgG e a trombocitopenia.....	34
5.4.	Padrões de resposta de subclasses .....	35
5.4.1.	Resposta de subclasses .....	35
5.4.2.	Redução dos dados de subclasses.....	37
5.5.	Padrões da resposta de subclasses e sua associação à morbidade.....	39
6.	DISCUSSÃO .....	43
7.	CONCLUSÕES .....	49
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
9.	ANEXO .....	66

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição mundial da malária em 2009 (Fonte: OMS, 2010).....	2
<b>Figura 2.</b> Mapa de risco da malária no Brasil em 2008 (SIVEP, 2009).....	3
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>Plasmodium vivax</i> , parasito causador da malária humana (Fonte: Adaptado de MUELLER et al., 2009).....	9
<b>Figura 4.</b> Área de estudo.....	21
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática da PvMSP-1 <sub>19</sub> utilizada neste estudo (Fonte: Adaptado de PUTAPORNTIP et al., 2000).....	22
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática da PvMSP-3 $\alpha$ utilizada neste estudo (Fonte: Adaptado de CUNHA, 2000 e JIMENEZ et al., 2008).....	23
<b>Figura 7.</b> (A) Prevalência (teste de McNemar) e (B) magnitude (teste de Wilcoxon) da resposta de IgG para as duas proteínas recombinantes correspondentes à PvMSP-1 <sub>19</sub> e PvMSP-3 $\alpha$ . Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da densidade ótica do soro teste/ <i>cut off</i> . A linha horizontal pontilhada indica o limiar de positividade (IR = 1). Os boxes mostram as medianas e o intervalo interquartil. As barras indicam o mínimo e o máximo.*Indica $P < 0,0001$ .....	29
<b>Figura 8.</b> Influência da exposição (expressa como número de episódios prévios de malária) na resposta de IgG. (A) Frequência de soropositivos (Teste do qui-quadrado de tendência). (B) Magnitude da resposta de IgG (Kruskal-Wallis <i>one way</i> ANOVA). Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da densidade ótica do soro teste/ <i>cut off</i> . Os pacientes foram divididos em quatro grupos conforme indicado na legenda. Em negrito, os valores de $P < 0,05$ .....	31

**Figura 9.** Influência da parasitemia (expressa como número de parasitos/  $\mu\text{L}$  de sangue) na resposta de IgG. (A) Frequência de soropositivos (Teste do qui-quadrado de tendência). (B) Magnitude da resposta de IgG (Kruskal-Wallis *one way* ANOVA). Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da densidade ótica do soro teste/*cut off*. Os pacientes foram divididos em quatro grupos conforme indicado na legenda. Em negrito, os valores de  $P < 0,05$ .....32

**Figura 10.** Associação entre a resposta de IgG e a anemia. (A) Frequência (teste exato de Fisher) e (B) magnitude (teste de Mann-Whitney – U) das respostas positivas. Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da densidade ótica do soro teste/*cut off*. \*Indica um valor de  $P = 0,0167$ . # Indica um valor de  $P = 0,0014$ . As linhas centrais nos boxes representam as medianas, e as barras flutuantes o máximo e o mínimo. Letras equivalentes indicam medianas estatisticamente iguais (Kuskal-Wallis *one way* ANOVA acompanhado pelo teste *pos hoc* de Dunns).....33

**Figura 11.** Associação entre a resposta de IgG e a trombocitopenia. (A) Frequência (teste exato de Fisher) e (B) magnitude (teste de Mann-Whitney – U) das respostas positivas. Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da densidade ótica do soro teste/*cut off*. As linhas centrais nos boxes representam as medianas, e as barras flutuantes o máximo e o mínimo. Letras equivalentes indicam medianas estatisticamente iguais (Kuskal-Wallis *one way* ANOVA acompanhado pelo teste *pos hoc* de Dunns).....34

**Figura 12.** (A) Prevalência (Qui-quadrado) e (B) magnitude (Kuskal-Wallis *one way* ANOVA acompanhado pelo teste *pos hoc* de Dunns) da resposta de subclasses contra a PvMSP-1<sub>19</sub>. IR = índice de reatividade (média da densidade ótica do soro teste/*cut off*). Letras equivalentes indicam medianas estatisticamente iguais.....35

**Figura 13.** (A) Prevalência (Qui-quadrado) e (B) magnitude (Kuskal-Wallis acompanhado pelo teste *pos hoc* de Dunns) da resposta de subclasses contra a PvMSP-3 $\alpha$ . IR = índice de reatividade (média da densidade ótica do soro teste/*cut off*). Letras equivalentes indicam medianas estatisticamente iguais.....36

**Figura 14.** Comparação entre as respostas de anticorpos para a PvMSP-1<sub>19</sub> e a PvMSP-3 $\alpha$ . (A) Frequência (teste exato de Fisher) e (B) magnitude (teste de Mann-Whitney – U) das respostas de IgG e subclasses. IR = índice de reatividade (média da densidade ótica do soro teste/*cut off*). O tracejado indica IR = 1. IR < 1 = soronegativos. \* Indica valores de  $P < 0,05$ .....37

**Figura 15.** Correlação de Pearson entre os escores dos componentes principais (CPs) e os níveis de hemoglobina. (A) CP1, (B) CP2 e (C) CP3.....39

**Figura 16.** Média  $\pm$  desvio padrão dos escores referentes aos três primeiros componentes principais (CPs) de pacientes anêmicos e não anêmicos. (A) CP1, (B) CP2 e (C) CP3.\* Indica um valor de  $P < 0,0001$ .....40

**Figura 17.** Correlação de Pearson entre os escores dos três primeiros componentes principais (CPs) e os níveis de plaquetas. (A) CP1, (B) CP2 e (C) CP3.....41

**Figura 18.** Média  $\pm$  desvio padrão dos escores referentes aos três primeiros componentes principais (CPs) de pacientes trombocitopênicos e não trombocitopênicos. (A) CP1, (B) CP2 e (C) CP3.\* Indica um valor de  $P < 0,0001$ .....42

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características epidemiológicas da população de estudo (n = 190). Os pacientes incluídos neste estudo foram atendidos no Hospital Universitário Júlio Muller, em Cuiabá (MT), e na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (AM), no período compreendido entre os meses de fevereiro de 2006 a janeiro de 2008.....27
- Tabela 2.** Manifestações clínicas e achados laboratoriais encontrados nos pacientes infectados por *P. vivax* incluídos neste estudo.....28
- Tabela 3.** *Eigenvalues* e percentual de inércia explicado por cada componente.....37
- Tabela 4.** Variáveis incluídas na ACP e sua contribuição para os três eixos derivados.....3

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACP – Análise de Componentes Principais

ADCI – *Antibody dependent cellular inhibition*/ Inibição celular dependente de anticorpo

AM - Amazonas

AMA-1 – Antígeno 1 da Membrana Apical

CP – Componente Principal

CSP – Proteína circumesporozoíto

C-Terminal – Carbóxi-terminal

*Cut off* – Limiar de positividade

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade ótica

ELISA – Ensaio imunoenzimático

GFP – *Green Fluorescent Protein*/ Proteína Verde Fluorescente

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

GST – Glutathione S Transferase

IgG – Imunoglobulina

IR – Índice de Reatividade

M – Número de episódios prévios de malária

MSP – Proteína de Superfície de Merozoíto

MT – Mato Grosso

N-Terminal – Amino terminal

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPS – Organização Panamericana da Saúde

OPD – *O-phenylenediamine*

PBS – Tampão fosfato salina

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PIB - Produto Interno Bruto

SPAM – *Secreted polymorphic antigen associated with merozoites*/ Antígeno polimórfico  
secretado associado com merozoítos

TRAP – Proteína Adesiva relacionada à Trombospondina

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

## RESUMO

Como a imunidade antimalárica ao repertório de antígenos de *Plasmodium* é complexa e compreende componentes distintos que interagem entre si, uma etapa importante para o desenvolvimento de uma vacina é a identificação da natureza precisa dos antígenos que atuam como potenciais alvos da resposta imune naturalmente adquirida. Numa tentativa de identificar esses alvos, nós investigamos as respostas de anticorpos específicas para duas proteínas de *P. vivax* candidatas à vacina, PvMSP-1<sub>19</sub> e PvMSP-3 $\alpha$ , bem como as suas relações com a anemia e a trombocitopenia em pacientes infectados por *P. vivax*. De uma forma geral, PvMSP-1<sub>19</sub> foi o antígeno mais imunogênico e a frequência de respondedores para esta proteína foi maior em pacientes com parasitemias mais elevadas. Para ambos os antígenos, as respostas de IgG foram inferiores em pacientes primoinfectados. As análises univariadas revelaram que os pacientes anêmicos apresentaram níveis de IgG superiores aos observados para os não anêmicos. O efeito da atuação conjunta das diferentes subclasses foi avaliado por meio de uma análise multivariada mais robusta, com o objetivo de se identificar o padrão de resposta que poderia estar envolvido na anemia. Pacientes anêmicos apresentaram maiores níveis de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-MSP3 $\alpha$  quando comparados aos não anêmicos. Como PvMSP-3 $\alpha$  é um antígeno polimórfico secretado, nós acreditamos que ele pode se aderir à superfície de hemácias infectadas e não infectadas, resultando na ligação de IgG ou complemento e acelerando a destruição das hemácias normais. Esses dados acrescentam informações importantes que poderão auxiliar na compreensão dos aspectos imunológicos envolvidos na patogênese da malária vivax.



## ABSTRACT

Since antimalarial immunity to the antigen repertoire of *Plasmodium* is complex and comprises distinct but interacting components, an important step before design a vaccine is identifying the precise nature of immune responses that function as targets of naturally acquired antibodies. In an effort to identify such targets, we investigated specific antibody responses against two *Plasmodium vivax* valuable vaccine candidates, PvMSP-1<sub>19</sub> and PvMSP-3 $\alpha$ , as well as their relationship with anemia and thrombocytopenia in *P. vivax* infected patients. Overall, PvMSP-1<sub>19</sub> was the most immunogenic antigen, and the frequency of responders to this protein tended to increase in patients with higher parasitaemia. For both antigens, IgG antibody responses tended to be lower in patients who had experienced their first malaria. Univariate analysis revealed that anemic patients presented higher IgG antibody responses to PvMSP-3 $\alpha$  than non-anemic ones. The joint effects of different IgG isotypes were further evaluated by robust multivariate analysis, aiming to detect the antibody profile that could be involved in anemia. Anemic patients presented higher levels of IgG1/IgG2/IgG3/IgG4 anti-MSP3 $\alpha$  than non-anemic ones. As PvMSP-3 $\alpha$  is a secreted polymorphic antigen, we hypothesized that it could adhere to uninfected or infected erythrocytes, resulting in IgG or complement binding and accelerating the destruction of normal erythrocytes. These data may add important information for understanding the immunological aspects involved in pathogenesis of vivax malaria.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Situação atual da malária

A malária é uma infecção parasitária que apresenta uma grande importância em termos de saúde pública, já que ameaça cerca de 3,3 bilhões de pessoas, o que equivale à quase metade da população mundial. Em relatório mundial sobre o paludismo, elaborado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2010, estimou-se em 106 o número de países endêmicos para a malária (Figura 1), dentre os quais a maioria se localiza em áreas tropicais e subtropicais, onde a temperatura e a pluviosidade propiciam o desenvolvimento do parasito em insetos do gênero *Anopheles*, os vetores da doença (OMS, 2010).

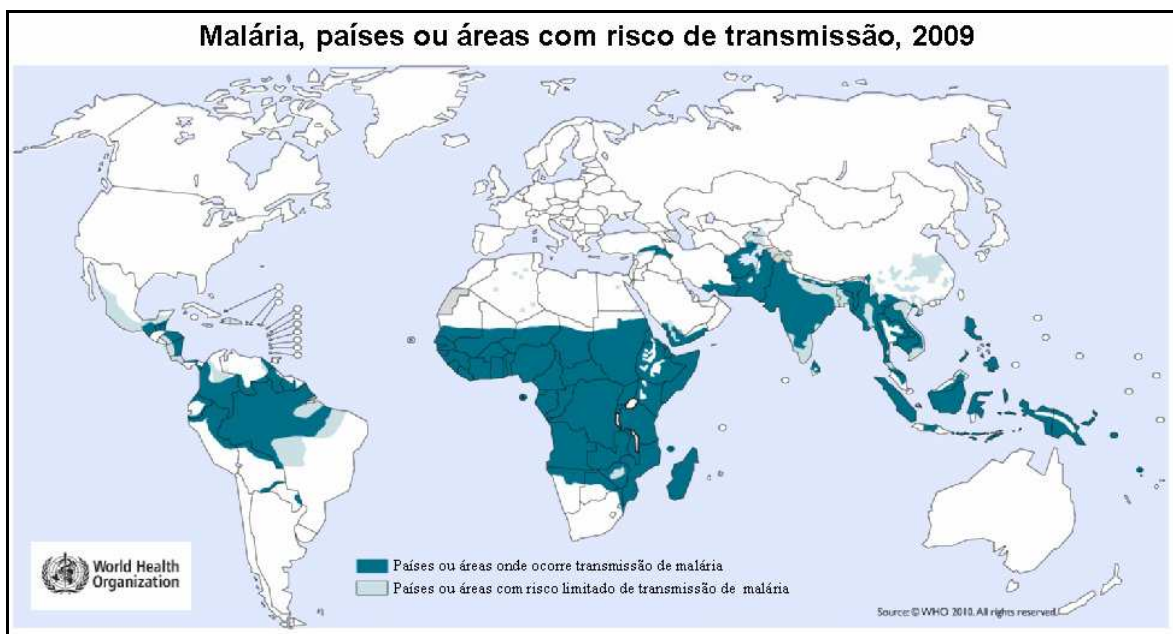
Embora a interação entre parasitos do gênero *Plasmodium* e o homem seja conhecida há longa data, as estratégias de controle desenvolvidas até o presente momento para minimizar os efeitos da infecção por esses parasitos ainda não foram capazes de eliminar a malária, que permanece como uma das doenças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

Uma vez que muitos pacientes não procuram e/ou não recebem ajuda médica, ou mesmo porque seu caso não é confirmado em laboratório, ou, ainda, porque não é incluído nas estatísticas dos governos (GREENWOOD et al., 2008), torna-se extremamente complicado determinar o fardo mundial da malária. Entretanto, vários esforços têm sido desenvolvidos nesse sentido (SNOW et al., 2005; GUERRA et al., 2010).

Segundo estimativas da organização Mundial da Saúde, cerca de 250 milhões de casos ocorrem anualmente, provocando a morte de quase um milhão de pessoas, principalmente de crianças na África subsaariana, onde uma em cada cinco crianças morre devido aos efeitos da doença, sendo registrada nesta área, uma morte a cada 30 segundos; dados estes bastante expressivos e que refletem a enorme importância da malária (OMS, 2010).

Aliando-se os dados apresentados acima a projeções macroeconômicas, é possível perceber que onde a malária predomina, as sociedades humanas prosperam menos. Logo, existe uma associação entre a malária e a pobreza, já havendo sido estimado que, em países onde a malária é endêmica, a doença é responsável pela redução do Produto Interno Bruto (PIB) em cerca de 1,3 % a cada ano, o que, no curso de décadas, resulta em um enorme impacto no desenvolvimento econômico desses países. O fardo financeiro da malária na

África, por exemplo, tem sido estimado em cerca de US\$ 12 bilhões por ano. Esses custos estão relacionados à perda de produtividade devido à doença, redução na produtividade após retorno ao trabalho, tempo perdido com o cuidado dado ao paciente e custo desse cuidado, efeitos físicos da doença a longo prazo, redução da escolaridade, impacto na demografia, no comércio, no turismo e no investimento externo indireto (SACHS & MALANEY, 2002). Por tudo isso, o controle da malária em regiões altamente malarígenas oferece a possibilidade de se iniciar um ciclo virtuoso, no qual melhorias na saúde estimulam o crescimento econômico.

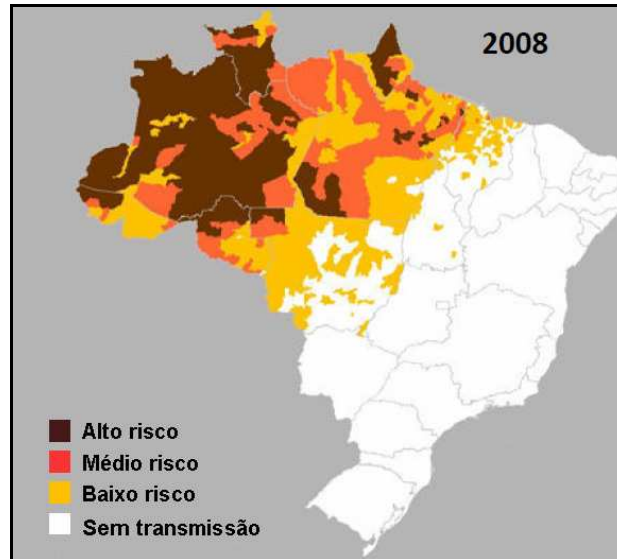


**Figura 1.** Distribuição mundial da malária em 2009 (Fonte: OMS, 2010).

Nas Américas e no Caribe, 15,97% da população (cerca de 144 milhões de pessoas), em 21 países, residem em áreas onde existe algum risco ecológico de transmissão da malária (OPS, 2007).

No Brasil, embora tenha havido uma queda no número de casos de malária nos últimos anos (em 2008 foram notificados 315.630 casos, ao passo que, em 2009, 306.908 casos, representando uma redução de 2,8%), o quadro epidemiológico desta doença ainda é preocupante. Por essa razão, a malária ainda persiste como uma das principais questões, principalmente na região que compreende os Estados da Amazônia Legal (divisão política do território nacional que engloba nove estados: Amazônia, Acre, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) (Figura 2), área na qual se concentram 99,8% dos casos (cerca de 306 mil casos por ano) (SIVEP/ Ministério da Saúde, 2010), e onde a

transmissão da doença geralmente está relacionada às condições ambientais e socioculturais (GIL et al., 2007; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).



**Figura 2.** Mapa de risco da malária no Brasil em 2008 (SIVEP, 2009).

Dados do Programa Nacional de Controle da Malária revelaram que, em 2009, apenas três estados, Amazonas, Pará e Rondônia, registraram, aproximadamente, 240 mil casos, valor esse que equivale a 78% das ocorrências (SIVEP/ Ministério da Saúde, 2010).

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

Dentre as três espécies de *Plasmodium* que são transmitidas no País, *Plasmodium vivax* é a espécie responsável por 83,7% dos casos, embora *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae* também sejam encontradas, porém, em menores proporções (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

## 1.2. Ciclo de vida dos plasmódios

A transmissão da malária ocorre por meio da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas, que contêm esporozoítos de *Plasmodium* em suas glândulas salivares. Ao exercer o repasto sanguíneo, esses insetos depositam, junto com a saliva, esporozoítos na derme do hospedeiro. O número de esporozoítos inoculados por um inseto varia muito. MEDICA & SINNIS (2005) quantificaram esse número em um estudo no qual *Anopheles stephensi* infectados com *Plasmodium yoelii* foram colocados para se alimentar em animais vivos. A análise dos dados referentes ao comportamento alimentar de 59 indivíduos mostrou que um único inseto é capaz de inocular, em média, cerca de 123 esporozoítos durante o repasto sanguíneo, embora esse número possa variar de zero a 1.297.

Há algum tempo, acreditava-se que os esporozoítos migravam rapidamente, do seu sítio de inoculação para o fígado, logo após a picada do anofelino. Entretanto, essa visão tem sido questionada por alguns pesquisadores. YAMAUCHI et al. (2007) estabeleceram a cinética dessa migração e observaram que a maioria dos esporozoítos ainda permanecia na derme por uma hora após a inoculação. Entretanto, uma redução significativa no número de esporozoítos era observada três horas após a infecção, sugerindo duas possibilidades: a migração dos esporozoítos do sítio de inoculação e/ou a destruição dos parasitos pelas células de defesa do hospedeiro. Resultado semelhante foi obtido em estudo de microscopia intravital realizado com *Plasmodium berghei* expressando a proteína verde fluorescente [GFP – *green fluorescent protein*]. Nesse trabalho, foi estimado que, em uma hora, cerca de 50% dos esporozoítos inoculados deixavam o sítio da picada e alcançavam o sangue (~ 70%), ou os vasos linfáticos (~ 30%), sendo que uma proporção importante de esporozoítos ainda era detectada na derme por um período de até sete horas após a picada. Foi também verificado que a maioria dos esporozoítos drenados pelos vasos linfáticos terminava sua jornada no linfonodo proximal, onde eram degradados dentro de células dendríticas, e uma minoria conseguia se diferenciar parcialmente em formas exo-eritrocíticas (AMINO et al., 2006).

Acredita-se que, para que a infecção por *Plasmodium* se estabeleça, é necessário que os esporozoítos alcancem o fígado e invadam as suas células-alvo, os hepatócitos, onde se proliferam e se desenvolvem. Mas, para que esse evento ocorra, os esporozoítos precisam, antes, atravessar o citosol de várias células para ativar as vias necessárias à invasão e ao futuro desenvolvimento do parasito no hepatócito específico apropriado à infecção (MOTA et

al., 2001; MOTA et al., 2002; MOTA et al., 2004). Essa hipótese, entretanto, tem gerado controvérsias, pois ensaios de invasão celular *in vitro*, envolvendo esporozoítos transgênicos deficientes para o gene *spect* – que codifica uma proteína da micronema essencial para a migração –, mostraram que, embora a deficiência de tal proteína interfira na capacidade migratória, ela não influencia na infectividade do esporozoíto, a qual se mantém semelhante à do tipo selvagem (ISHINO et al., 2004).

Os sinais moleculares que permitem aos esporozoítos decidir se eles continuam a migrar, ou se iniciam o preparo para a invasão, não são bem conhecidos. No entanto, os resultados de um estudo com malária de roedor sugeriram que o contato dos esporozoítos com células que expressam elevados níveis de proteoglicanos de heparan-sulfato ativa o início do processo de invasão, ao passo que o contato com células que expressam menores quantidades de tais moléculas resulta em migração contínua pelas células. Sendo assim, quando os esporozoítos encontram, em seu percurso, hepatócitos expressando elevados níveis desses proteoglicanos, são ativados, via proteínas quinase dependentes de cálcio, passando, então, de um fenótipo migratório para um invasivo (COPPI et al., 2007; revisto por EJIGIRI & SINNIS, 2009).

Várias proteínas de *Plasmodium* parecem desempenhar um papel crucial nessa interação entre parasito e célula hospedeira. A proteína circumesporozoíto (CSP), por exemplo, abundante na superfície do esporozoíto, parece interagir com os proteoglicanos de heparan-sulfato presentes no hepatócito, facilitando a internalização do parasito (PRUDÊNCIO et al., 2006; EJIGIRI & SINNIS, 2009). Outras proteínas, como o antígeno 1 da membrana apical (AMA-1) e a proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP), ambas localizadas nas micronemas, também merecem destaque. A AMA-1 participa na reorientação do parasito, permitindo o estabelecimento de um contato íntimo entre o pólo apical e a célula hospedeira, evento esse que culmina na formação da junção móvel (MITCHELL et al., 2004). A TRAP, por sua vez, é liberada na superfície do parasito durante a invasão e se associa a receptores do hospedeiro, de forma a facilitar a motilidade e a invasão (SOLDATI et al., 2004).

Dentro do vacúolo parasitóforo formado no hepatócito final, onde se estabelece, o esporozoíto passa por um processo de replicação e diferenciação, originando o esquizonte multinucleado que, ao se romper, libera milhares de merozoítos. Para ter acesso aos eritrócitos e garantir a sua sobrevivência, os merozoítos hepáticos precisam, obrigatoriamente, alcançar o lúmen dos sinusóides hepáticos. Como existe o risco de esses merozoítos serem rapidamente

reconhecidos e engolfados por células de Kupffer e outras células fagocíticas, eles precisam manipular, de alguma maneira, as células hospedeiras, de forma a garantir a sua proteção durante a migração do fígado para a circulação sanguínea (STURM et al., 2006).

Foi demonstrado que merozoítos de *Plasmodium berghei* não são liberados pela ruptura do hepatócito, como anteriormente se pensava, mas sim pela formação de merossomas, vesículas arredondadas que brotam da membrana do hepatócito e que parecem interagir com as células endoteliais dos sinusóides hepáticos, conferindo segurança na trajetória dos merozoítos até a circulação sanguínea (STURM et al., 2006).

Embora características apoptóticas, como a condensação do núcleo e a perda do potencial da membrana mitocondrial, sejam observadas no hepatócito parasitado, acredita-se que os plasmódios inibem a exposição de fosfatidilserina na superfície destas células, prevenindo a sua destruição por células fagocíticas (STURM et al., 2006; revisto por PRUDÊNCIO et al., 2006).

O primeiro contato entre o merozoíto e o eritrócito é um passo crucial, uma vez que o parasito precisa distinguir, dentre os eritrócitos, aqueles competentes para a invasão. É importante destacar que *Plasmodium vivax* apresenta tropismo por reticulócitos, ao passo que o *Plasmodium falciparum* é capaz de invadir hemácias de todas as idades.

O reconhecimento e a aderência primária entre o merozoíto e o eritrócito ocorrem, relativamente, a longa distância, consistindo em um evento reversível de baixa afinidade (COWMAN & CRABB, 2006). O processo se inicia quando moléculas do parasito interagem com ligantes presentes na superfície das hemácias. No caso de *Plasmodium falciparum*, por exemplo, essa interação envolve proteínas da superfície de merozoíto – EBA175 e EBA140 – que se ligam às sialoglicoproteínas da membrana do eritrócito, bem como às glicoforinas A e C. Alternativamente, o parasito pode, ainda, utilizar a via de invasão dependente de ácido siálico. A invasão do *Plasmodium vivax*, por sua vez, depende da interação com o antígeno/receptor Duffy para quimiocinas (DARC) (HANS et al., 2005; MILLER et al 2002). Esse processo de reconhecimento e entrada na célula hospedeira ocorre em um período relativamente curto, de 60 segundos, já que os antígenos presentes na superfície da forma extracelular do parasito são particularmente vulneráveis ao ataque imune (COWMAN & CRABB, 2006).

Uma cascata de atividades regulatórias dos merozoítos em maturação prepara os eritrócitos infectados e as membranas do vacúolo parasitóforo para a liberação do parasito. A

formação do merozoíto e a decomposição progressiva do citoesqueleto do eritrócito originam o esquizonte. Esses eventos, juntamente com um aumento no volume intracelular, contribuem para a transformação do esquizonte em estruturas arredondadas curtas que se assemelham a pétalas (estágio conhecido como flor) e que se rompem de modo explosivo. Dessa forma, os parasitos, separados uns dos outros, abandonam o vacúolo e, também, as outras membranas intracelulares, que são simultaneamente expelidas da célula em ruptura. Uma série de estágios morfológicos direcionados por eventos intracelulares formam uma via, pela qual o rompimento das membranas da célula hospedeira que envolvem os merozoítos resulta na vesiculação abrupta do eritrócito. Consequentemente, os merozoítos individuais de *Plasmodium* são liberados, podendo, então, iniciar o próximo *round* de infecção e, assim, sucessivamente. Nota-se que essa via, além de possibilitar uma boa disseminação desses parasitos (GLUSHAKOVAI et al., 2005), é a responsável pela patogenia da doença.

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

### 1.3. *Plasmodium vivax*

Cinco são as espécies de *Plasmodium* capazes de infectar humanos – *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium Knowlesi* (esta em caráter zoonótico no continente asiático). Embora *P. falciparum* seja considerada a espécie mais virulenta devido aos elevados níveis de mortalidade aos quais se encontra associada, principalmente na África (MENDIS et al., 2001), no que se refere à distribuição geográfica, *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo (GUERRA et al., 2010) devido à sua extraordinária diversidade fenotípica.

GUERRA e colaboradores, em um estudo realizado em 2010, combinaram dados fornecidos pelos sistemas de informação de saúde, com regras biológicas de exclusão de



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

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

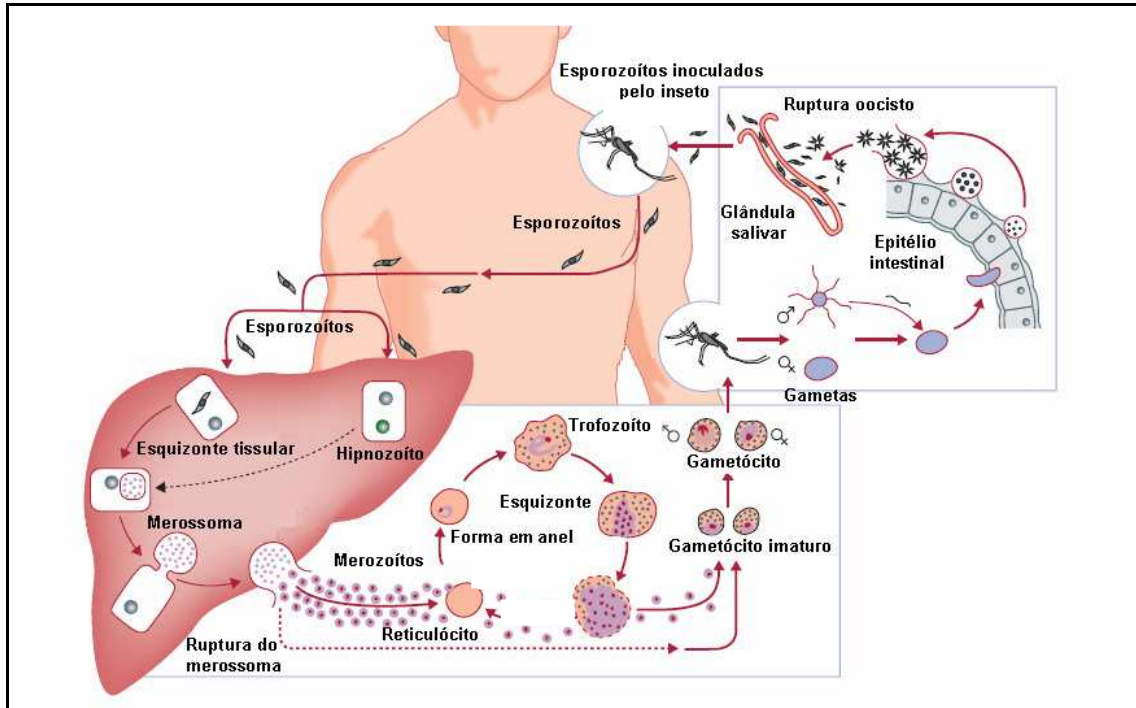
No Brasil, *P. vivax* também é a principal espécie associada a esta doença e, nos últimos anos, tem sido observado um crescimento expressivo no número de pacientes com essa infecção que necessitam de admissão hospitalar, sugerindo que essa tendência pode ser devido ao aumento na gravidade das infecções provocadas por esse parasito (SANTOS-CIMINERA et al., 2007, ALEXANDRE et al., 2009).

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

Para agravar a situação, tem sido relatada em vários países, inclusive no Brasil, a ocorrência de cepas resistentes às principais drogas utilizadas no tratamento, o que constitui um grande problema, já que o desenvolvimento de novos fármacos se torna um obstáculo diante da ausência de um sistema de cultivo *in vitro* para *P. vivax* (BAIRD et al., 2004; SANTANA FILHO et al., 2007).

Nesse sentido, torna-se de extrema importância o desenvolvimento de novos métodos e estratégias de intervenção para bloquear a sua transmissão. Nota-se, contudo, que *P. vivax* apresenta algumas particularidades em seu ciclo de vida (Figura 3) que o diferenciam de *P. falciparum* e que dificultam a interrupção de sua transmissão.

Para exemplificar, cita-se, dentre outras, a sua capacidade de persistir como hipnozoíto dormente nos hepatócitos por meses ou anos antes de iniciar uma infecção sanguínea, o que explica as recaídas tardias após a cura da infecção original. Entretanto, ainda não são conhecidos os fatores do parasito ou do hospedeiro que determinam o número e a duração dessas recaídas (MUELLER et al., 2009).



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Plasmodium vivax*, parasito causador da malária humana (Fonte: Adaptado de MUELLER et al., 2009).

Avanços importantes em relação a essa espécie têm sido observados nos últimos anos, principalmente após o sequenciamento do seu genoma. Desde então, uma série de genes que codificam antígenos imunologicamente importantes têm sido isolados, clonados e sequenciados, permitindo a geração de diferentes proteínas recombinantes. Essas proteínas, por sua vez, têm sido avaliadas em diferentes estudos que, certamente, fornecerão informações importantes para a compreensão da resposta imune e, conseqüentemente, subsídios para o desenvolvimento de uma vacina eficaz (SOARES & RODRIGUES, 2002).

#### 1.4. Antígenos de *Plasmodium* com potencial vacinal

A história natural da malária em áreas de transmissão intensa revela que indivíduos sem experiência prévia quase sempre adoecem na primeira exposição, desenvolvendo uma doença febril que pode se agravar e, inclusive, ocasionar a morte. Entretanto, após exposição contínua e ininterrupta, esses indivíduos sofrem progressivamente, menos episódios de malária, refletindo a aquisição de uma imunidade (COHEN et al., 1961; Mc GREGOR, 1974; BAIRD et al., 1991).

A transferência de imunoglobulinas purificadas dos soros de indivíduos imunes foi capaz de reduzir a parasitemia em pacientes infectados, demonstrando que os anticorpos desempenham um papel importante na imunidade adquirida (SABCHAREON et al., 1991). Isso porque eles mediam diferentes funções efetoras, incluindo a inibição da citoaderência, a inibição da invasão eritrocítica, a citotoxicidade dependente de anticorpo e, também, a inibição celular (LANGHORNE et al., 2008).

Diante da complexidade do ciclo de vida de *Plasmodium*, a abordagem de uma vacina de subunidades parece interessante por oferecer uma série de vantagens. A possibilidade de inclusão de diferentes componentes reduziria, por exemplo, a porcentagem de não respondedores e, também, o efeito do polimorfismo antigênico (GOOD et al., 2001).

Como a patogenia da malária é decorrente da infecção sanguínea, as vacinas direcionadas contra esse estágio sanguíneo do parasito mostram-se promissoras, na medida em que podem prevenir a doença clínica e reduzir, conseqüentemente, as taxas de morbidade e mortalidade associadas à malária (RICHARDS & BEESON, 2009). Nesse sentido, houve, nos últimos anos, um grande avanço na caracterização, em nível molecular, de antígenos das formas sanguíneas, bem como na compreensão dos mecanismos imunológicos que estão envolvidos na eliminação dessas formas do parasito. Entretanto, quase todos os esforços se concentraram em *P. falciparum* e pouco se sabe sobre *P. vivax*. Dentre os principais antígenos de formas sanguíneas já caracterizados e considerados como possíveis candidatos, as proteínas da superfície de merozoítos (MSPs) como a MSP-1 e a MSP-3 se destacam.

#### **1.4.1. Proteína 1 da Superfície do Merozoíto (MSP-1)**

Os antígenos presentes na superfície dos merozoítos representam candidatos à vacina promissores por constituírem alvos potenciais para a atuação dos anticorpos plasmáticos e das proteínas do sistema do complemento na resposta imune humoral. Dentre esses antígenos, destaca-se a proteína 1 da superfície de merozoíto (MSP-1), a proteína majoritária que está presente na superfície dos merozoítos de todas as espécies de *Plasmodium* já estudadas (PIZARRO et al., 2003).

A MSP-1 é sintetizada pelo esquizonte intracelular como um precursor de 190 kDa e, no final da esquizogonia, sofre clivagem proteolítica, originando polipeptídeos de diferentes tamanhos. Sabe-se que pelo menos quatro desses polipeptídeos participam da formação de um

complexo não covalente que se associa à superfície do parasito. Esse complexo consiste de polipeptídeos com os seguintes tamanhos aproximados: 83 kDa, 28-30 kDa, 38 kDa e 42 kDa, polipeptídeos esses que, por conveniência, são denominados: MSP<sub>183</sub>, MSP<sub>130</sub>, MSP<sub>118</sub> e MSP<sub>142</sub>, respectivamente (HOLDER et al., 1992).

Após a liberação dos merozoítos, um segundo processamento ocorre, porém, dessa vez, apenas o polipeptídeo C-terminal de 42 kDa é clivado, resultando em dois fragmentos, um de 33 kDa (MSP-1<sub>33</sub>) e o outro de 19kDa (MSP-1<sub>19</sub>). O fragmento maior é, então, liberado na circulação junto com o restante do complexo, ao passo que o fragmento menor permanece ancorado à membrana do merozoíto via glicosilfosfatidilinositol (GPI) (BLACKMAN et al., 1990; BLACKMAN et al., 1992).

A utilização de inibidores ou anticorpos monoclonais foi capaz de inibir a última clivagem, impedindo, conseqüentemente, a entrada do parasito na célula hospedeira e demonstrando, dessa maneira, que o segundo processamento é essencial para a invasão (BLACKMAN et al., 1994).

Embora a função biológica da MSP-1 ainda não tenha sido definitivamente esclarecida, acredita-se que ela participa do processo de invasão dos eritrócitos, uma vez que seu domínio C-terminal de 19 kDa fornece um sítio no qual o fragmento resultante do processamento primário, MSP<sub>142</sub>, e/ou o do processamento secundário, MSP<sub>119</sub>, associam-se à proteína MSP-9, formando um complexo que se liga a regiões da banda 3 da proteína da membrana de eritrócito, um receptor importante na invasão de *P. falciparum* (GOEL et al., 2003; KARIUKI et al., 2005).

Estudos relacionados à resposta imune naturalmente adquirida contra a proteína MSP-1 de *P. vivax* (PvMSP-1) somente se desenvolveram após a elucidação da estrutura primária do gene que codifica esse antígeno (DEL PORTILLO et al., 1991). Desde então, o potencial imunogênico da MSP-1 tem sido avaliado em diferentes experimentos, incluindo roedores (LING et al., 1994; KONING-WARD et al., 2003), primatas (HUI et al., 1996; YANG et al., 1999) e humanos (MALKIN et al., 2007).

Em estudo realizado por EGAN et al. (1999), demonstrou-se que anticorpos de indivíduos naturalmente infectados, produzidos em resposta à MSP-1<sub>19</sub>, inibiam a invasão eritrocítica *in vitro*, sugerindo que o alvo da imunidade protetora encontrava-se no fragmento de 19 kDa.

A resposta de anticorpos induzida a essa porção da proteína foi comparada à induzida pela região N-terminal e os resultados confirmaram a maior imunogenicidade da MSP1-19. Os autores sugeriram que o maior grau de reconhecimento do fragmento de 19 kDa poderia estar relacionado ao fato de ele ser menos polimórfico do que a região N-terminal (SOARES et al., 1999a).

A imunização de camundongos BALB/C com a proteína MSP-1<sub>19</sub> recombinante de *P. yoelii*, formulada com Montanide ISA51, e contendo oligodeoxinucleotídeo CpG como adjuvante, por sua vez, induziu uma resposta duradoura de anticorpos nos animais imunizados e conferiu proteção completa contra a infecção sanguínea, reforçando a importância desse antígeno (JEAMWATTANALERT et al., 2007).

Além disso, vários estudos têm relatado associações entre a presença de anticorpos anti-MSP1<sub>19</sub> e proteção contra a malária clínica (BRANCH et al., 1998; BRAGA et al., 2002; DODOO et al., 2008; STANISIC et al., 2009). Soma-se a isso o fato de que a função desse fragmento é conservada entre espécies de *Plasmodium* filogeneticamente distantes, o que torna a MSP-1<sub>19</sub> o principal antígeno candidato à vacina (O'DONNELL et al., 2000).

O alinhamento das sequências de nucleotídeos de 31 alelos distintos, obtidos de isolados provenientes de diferentes áreas geográficas, revelou que a PvMSP-1 consiste em seis blocos variáveis (445 aminoácidos), flanqueados por sete blocos conservados (1306 aminoácidos) (PUTAPORNTIP et al., 2002; FERREIRA et al., 2004; BASTOS et al., 2007). Vários estudos constataram que os domínios variáveis dessa proteína são mais frequentemente reconhecidos por anticorpos naturalmente adquiridos, se comparados aos das regiões conservadas (HOLDER et al., 1996; FERREIRA et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2006; BASTOS et al., 2007), sendo que a região que compreende o bloco 2 é considerada o principal alvo da imunidade humana contra a malária (CONWAY et al., 2000).

O padrão de resposta imune adquirida a esta região foi estudado por CAVANAGH et al. (2004), que encontraram associações significativas entre a presença de IgG, principalmente IgG3, a duas de três variantes alélicas do bloco 2, e proteção subsequente contra episódios de malária clínica. Além disso, eles relataram que essa resposta era dependente da exposição e da idade.

Embora existam dados persuasivos mostrando que anticorpos anti-MSP-1 são capazes de conferir proteção contra a malária, a relativa contribuição das diferentes regiões da molécula na indução de anticorpos protetores ainda permanece desconhecida. Além disso, a

maioria desses estudos tem sido realizada com *P. falciparum* ou *P. yoelii*. e, por essa razão, pouco se sabe sobre a resposta imune desencadeada por *P. vivax*.

### 1.4.2. Proteína 3 da Superfície de Merozoíto (MSP-3)

Outro antígeno promissor como candidato em uma possível vacina de subunidades contra a malária é a proteína 3 da superfície de merozoíto [MSP-3 – *Merozoite Surface Protein 3*]. Essa molécula foi identificada por OEUVRAY e colaboradores (1994) em um estudo que utilizava ensaios de inibição celular dependente de anticorpo [ADCI – *antibody dependent cellular inhibition*] com a finalidade de selecionar moléculas capazes de induzir imunidade protetora contra a doença (OEVRAY et al., 1994a; OEUVRAY et al., 1994b).

Com um peso molecular aparente estimado em 150 kDa (GALINSKI et al., 1999), a MSP-3 foi também identificada em soros de indivíduos imunes residentes na Papua Nova Guiné, e, desde então, passou a ser denominada antígeno polimórfico secretado associado com merozoíto [SPAM – *secreted polymorphic antigen associated with merozoites*] (MC COLL et al., 1994), já que era expressa durante a esquizogonia e liberada como um produto solúvel durante a ruptura do esquizonte, parecendo se associar à superfície do estágio sanguíneo do parasito, embora não possuísse um domínio transmembrana e nem uma sequência sinal para uma âncora glicosilfosfatidil inositol (GALINSKI et al., 1999).

Características estruturais importantes desta proteína incluem a presença de uma sequência sinal N-terminal; um domínio composto por três blocos, sendo que cada um deles é constituído por quatro sequências repetidas de sete aminoácidos alanina *in tandem*; um domínio rico em ácido glutâmico e, ainda, um motivo zíper de leucina na sua porção C-terminal (McCOLL et al., 1997; PEARCE et al., 2005).

Foi verificado que existe um padrão nessas sequências repetidas de sete aminoácidos (abcdefg)<sub>n</sub>, pois os resíduos hidrofóbicos são conservados nas posições a e d, ao passo que as outras posições são ocupadas por resíduos hidrofílicos. Essas sequências repetidas apresentam comprimento e composição de aminoácidos favoráveis ao arranjo em  $\alpha$ -hélice de cada bloco. Essas  $\alpha$ -hélices, por sua vez, podem interagir entre si e formar um motivo do tipo hélice-alça-hélice (MULHERN et al., 1995; GALINSKI et al., 1999). Logo, é provável que a união entre essas sequências repetitivas e o motivo zíper de leucina representem o modo pelo qual a proteína MSP-3 se associa às moléculas da superfície do merozoíto (MILLS et al., 2002).

Embora o papel desempenhado pela MSP-3 ainda seja desconhecido, verificou-se que o truncamento do gene que codifica essa proteína foi capaz de interromper o tráfego dessa molécula para o vacúolo parasitóforo, bem como a sua interação com a superfície do merozoíto, eventos esses que culminaram na redução da eficiência de invasão dos eritrócitos, sugerindo uma possível atuação deste antígeno nesta etapa (MILLS et al., 2002).

A capacidade imunogênica da MSP-3 já foi demonstrada em diferentes estudos. Anticorpos anti-MSP-3 foram fortemente associados com proteção clínica (ROUSSILHON et al., 2007). Além disso, ensaios de inibição celular dependentes de anticorpos [ADCI – *Antibody dependent cellular inhibition*] mostraram que imunoglobulinas produzidas em resposta à MSP-3 eram capazes de promover a morte de *P. falciparum* com o auxílio de monócitos (OEVRAY et al., 1994; SINGH et al., 2004).

Diversos estudos sugeriram que as subclasses de anticorpos produzidas em resposta à infecção eram de particular importância nesse mecanismo, uma vez que já havia sido observado que anticorpos não citofílicos predominavam em indivíduos suscetíveis, ao passo que anticorpos citofílicos predominavam em indivíduos clinicamente protegidos (BOUHAROUN-TAYOUN et al., 1992; OSIER et al., 2007; ROUSSILHON et al., 2007; LEORATTI et al., 2008).

A primeira comparação formal entre a eficácia das duas principais subclasses de imunoglobulinas citofílicas – IgG1 e IgG3 –, sob condições idênticas de especificidade e afinidade, na ADCI, foi realizada por JAFARSHAD e colaboradores (2007). Os resultados desse experimento mostraram que, para uma ampla gama de concentrações de anticorpos testadas, as imunoglobulinas pertencentes à subclasse IgG3 eram cerca de 60 vezes mais ativas do que as pertencentes ao isotipo IgG1. Como a ativação dos monócitos ocorre apenas quando dois FcγR distintos são simultaneamente ocupados por, no mínimo, duas moléculas de IgG citofílicas ligadas a um antígeno contendo pelo menos dois determinantes de célula-B, existe a possibilidade de que a superioridade observada na eficácia de anticorpos IgG3 em relação a IgG1 possa estar relacionada ao comprimento da sua região de dobradiça, levando a um aumento da sua flexibilidade e habilidade, que acabam por facilitar a ligação entre o antígeno e o FCγR. Entretanto, apesar de ter sido observado que anticorpos IgG3 são mais eficientes, imunoglobulinas da subclasse IgG1 são mais estáveis e, por essa razão, têm uma meia-vida mais longa (JAFARSHAD et al., 2007).

A fim de se determinarem as regiões da MSP-3 de *P. falciparum* capazes de se ligar, de forma específica, a receptores da superfície de membrana em eritrócitos humanos,

RODRÍGUEZ et al. (2005) estudaram as interações entre peptídeos sintéticos e eritrócitos humanos normais. Os resultados desse experimento mostraram que os peptídeos da MSP-3 que se ligavam de forma específica aos eritrócitos, inibindo a invasão do merozoíto, eram: o peptídeo 31193 (<sup>21</sup>KSFINITLSLFLHLYIYI<sup>40</sup>), encontrado na região N-terminal; o 21202 (<sup>201</sup>YQKANQAVLKAKEASSYDYI<sup>220</sup>), localizado na região central; e o 31209 (<sup>341</sup>VKEAAESIMKTLAGLIKGN<sup>360</sup>), situado na região C-terminal.

A vacinação de macacos *Aotus nancymai* com o peptídeo completo expressado em levedura foi capaz de proteger esses animais do desafio com *P. falciparum* e, ainda, de gerar anticorpos reativos à MSP-1, sugerindo que a imunização com este antígeno poderia ser uma estratégia de sucesso (HISAEDA et al., 2002).

Apesar de todos esses estudos sugerirem a MSP-3 como um potencial candidato vacinal, é importante destacar que a maioria deles se concentrou em *P. falciparum*, e pouco se sabe sobre a resposta imune específica induzida pela MSP-3 de *P. vivax* (PvMSP-3).

No Brasil, a resposta humoral dirigida contra proteínas recombinantes correspondentes à extremidade C-terminal da PvMSP-3 $\alpha$  e a diferentes regiões da PvMSP-3 $\beta$  foi avaliada por CUNHA (2002) em indivíduos com infecção patente por *P. vivax*, tendo sido verificado, para todas elas, a predominância de anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3), exceto para a PvMSP-3 $\beta$ , para a qual mais de 70% dos indivíduos produziram IgG2. Esse mesmo padrão de resposta foi também verificado num estudo realizado com 282 pacientes residentes em Porto Velho (RO), no qual cinco proteínas recombinantes representando a sequência completa de aminoácidos da PvMSP-3 $\alpha$  foram avaliadas (LIMA-JÚNIOR et al., 2011).

Sabe-se que a PvMSP-3 pertence à família gênica *pvmsp-3*, que inclui membros estruturalmente relacionados como PvMSP-3 $\alpha$ , PvMSP-3 $\beta$ , e PvMSP-3 $\gamma$ , sendo que os dois primeiros são os mais estudados (MC COLL et al., 1997; GALINSKI et al., 2001).

Estudos realizados com um extenso número de isolados provenientes de áreas com endemicidades distintas (CRISTIANO et al., 2008; PRAJAPATI et al., 2010), revelaram uma enorme diversidade no gene que codifica a PvMSP-3 $\alpha$ , sugerindo seu uso como marcador molecular em estudos populacionais envolvendo *P. vivax* (BRUCE et al., 1999). Entretanto, essa diversidade está restrita ao seu domínio central, que inclui os três blocos com as repetições de alanina, ao passo que as suas extremidades carbóxi e amino-terminais são relativamente conservadas. Levando-se em consideração essas observações, foi sugerido que



a região C-terminal seja a porção incluída nas formulações vacinais envolvendo a MSP-3 (RAYNER et al., 2002).

Diante do exposto ao longo desta seção, nota-se uma escassez de estudos envolvendo a PvMSP-3. Por essa razão, torna-se extremamente necessário investigar a imunogenicidade dessa molécula em populações de diferentes áreas geográficas naturalmente expostas, bem como elucidar o padrão de resposta de anticorpos associado às manifestações clínicas, a fim de se identificarem os possíveis biomarcadores de morbidade, etapas essenciais para o desenvolvimento de vacinas.

## 2. JUSTIFICATIVA

Embora a interação entre parasitos do gênero *Plasmodium* e o homem já seja conhecida há longa data, as estratégias de controle desenvolvidas até o presente momento para minimizar os efeitos da infecção por esses parasitos ainda não foram capazes de eliminar a malária, doença que ameaça mais de 3 bilhões de pessoas (o que equivale à metade da população mundial) e é responsável por aproximadamente 225 milhões de casos clínicos e um milhão de mortes.

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

No Brasil, *P. vivax* é a principal espécie associada à infecção, contribuindo com 83,7% dos casos registrados. Nos últimos anos, tem sido relatado um aumento significativo no número de internações hospitalares devido a essa espécie, sugerindo um aumento na gravidade das infecções. Somam-se a isso relatos de diferentes regiões do mundo mostrando que manifestações graves como falência renal, síndrome respiratória e anemia grave, complicações estas anteriormente relatadas apenas em infecções por *P. falciparum*, também podem ocorrer durante a infecção por *P. vivax*. Para piorar esse cenário, cepas de *P. vivax* resistentes às principais drogas utilizadas no tratamento têm sido descritas em diferentes países do mundo, inclusive no Brasil.

Todas essas evidências contrariam o paradigma da benignidade de *P. vivax* e revelam a necessidade urgente de se desenvolver uma vacina eficaz contra esse parasito. Entretanto, quase todos os esforços nesse sentido têm se concentrado em *P. falciparum* e relativamente pouco se sabe sobre a resposta imune direcionada a antígenos de *P. vivax*.

Como indivíduos que residem em áreas endêmicas para a malária são simultaneamente e repetidamente desafiados com múltiplos antígenos, um passo importante para o desenvolvimento de vacinas é a caracterização dos padrões de resposta imune induzidos por diferentes antígenos, bem como a associação dessa resposta a parâmetros indicativos de morbidade. Estudos nesse sentido ampliarão a compreensão dos aspectos imunológicos

envolvidos na malária, além de possibilitarem o estabelecimento de uma área de campo para futuros testes clínicos de vacinas contra essa parasitose.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Caracterizar o perfil da resposta de anticorpos IgG frente a dois diferentes antígenos recombinantes de *P. vivax* candidatos a vacina, – PvMSP-1<sub>19</sub> e PvMSP-3 $\alpha$  –, bem como investigar as relações entre essas respostas e parâmetros clínicos indicativos de morbidade em pacientes infectados por *P. vivax* na Amazônia Brasileira.

#### **3.2. Objetivos específicos**

3.2.1. Caracterizar o perfil de anticorpos IgG antígeno-específico em pacientes com infecção patente por *P. vivax*;

3.2.2. Associar a resposta de IgG antígeno-específica à exposição e à parasitemia;

3.2.3. Associar a resposta de IgG antígeno-específica aos parâmetros indicativos de morbidade como anemia e trombocitopenia;

3.2.4. Caracterizar o perfil de subclasses antígeno-específico, em pacientes com infecção patente por *P. vivax*;

3.2.5. Determinar os padrões de subclasses que podem ser associados à morbidade.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

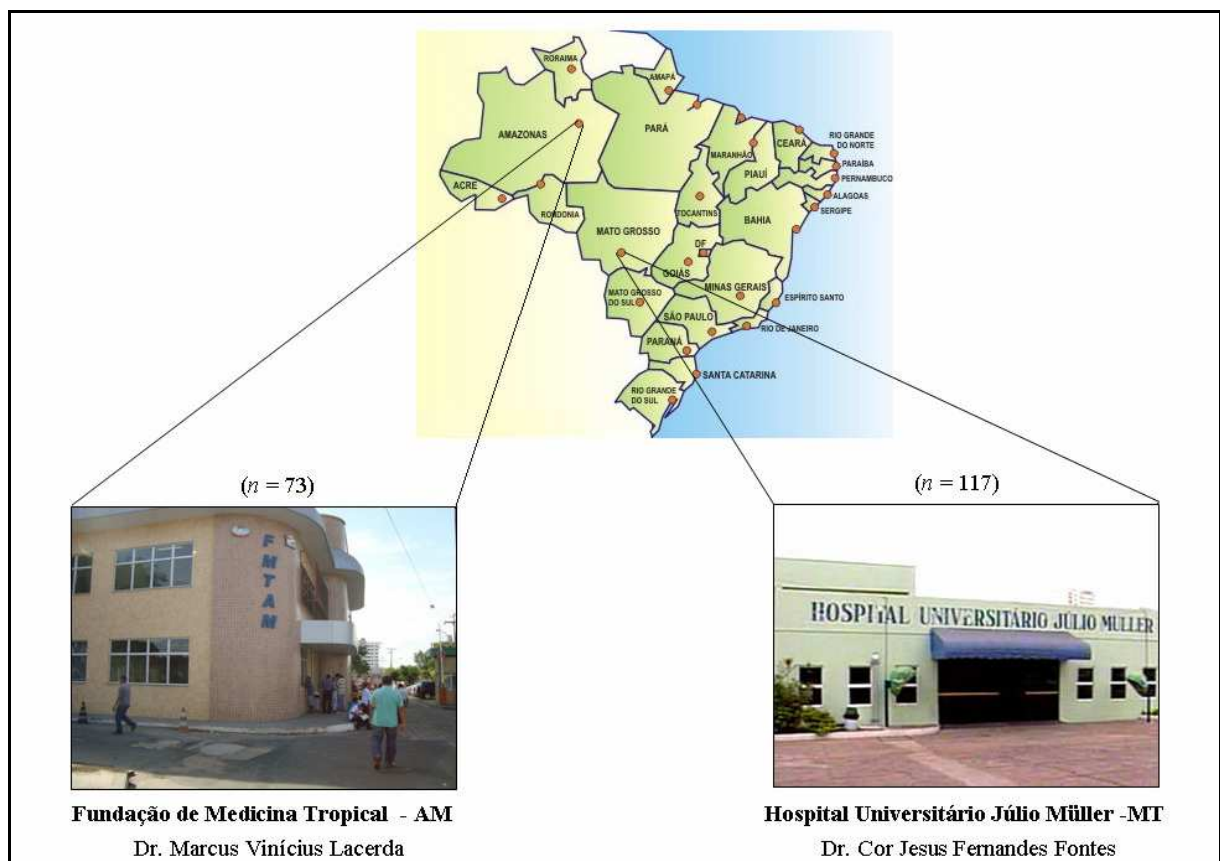
### 4.1. Área e população de estudo

Neste estudo, foram avaliados cento e noventa pacientes com infecção patente por *P. vivax*. O diagnóstico foi realizado por meio de exame microscópico de gota espessa e confirmado por PCR (Scopel et al., 2004), que excluiu infecções simples provocadas por outras espécies de *Plasmodium*, bem como infecções mistas. Esses pacientes procuraram unidades de saúde localizadas em dois estados da Amazônia Brasileira, Amazonas (AM) e Mato Grosso (MT) (Figura 4), em busca de atendimento médico, no período compreendido entre os meses de fevereiro de 2006 a janeiro de 2008. A maioria deles foi atendida no Hospital Universitário Júlio Muller (n = 117), em Cuiabá (MT), onde não ocorre transmissão ativa de malária. Como esses pacientes relataram visitas de curta duração a outras áreas da Amazônia onde a malária é endêmica, existe a possibilidade de que eles tenham se infectado nesses locais. Essa etapa do trabalho foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes (Universidade Federal do Mato Grosso).

Os outros pacientes (n = 73) foram atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (referência para atenção terciária de doenças infecciosas no estado do Amazonas), em Manaus (AM), município no qual a incidência de malária é epidêmica, principalmente nas áreas urbanas, o que se justifica pelas ações antrópicas como o desmatamento, a ocupação desordenada de novas áreas e algumas atividades econômicas como a piscicultura, que acabam favorecendo a reintrodução e a permanência da doença nessa cidade (SARAIVA et al., 2009). Um estudo retrospectivo realizado com pacientes atendidos nesse município relatou uma série de casos de pacientes com infecção por *P. vivax* com manifestações graves como falência renal, síndrome respiratória e anemia grave (ALEXANDRE et al., 2010). Essa etapa do estudo contou com a colaboração do Prof. Dr. Marcus Vinícius Guimarães Lacerda (Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado).

Todos os pacientes foram examinados e entrevistados por um médico experiente, que aplicou um questionário padrão previamente testado e elaborado, contendo perguntas sobre dados pessoais, clínicos, parasitológicos e epidemiológicos (Anexo 1). A partir de então, o sangue desses pacientes foi colhido, por punção venosa, em tubos Vacutainer contendo EDTA

ou heparina, e utilizado para a extração de DNA, para os exames laboratoriais de contagem de células sanguíneas, bem como para a obtenção dos soros, que foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios imunoenzimáticos. É importante destacar que os indivíduos incluídos neste trabalho não apresentavam dengue, hepatite e nem HIV, infecções estas que foram descartadas após a realização de outros exames laboratoriais. Para a determinação da parasitemia (expressa como parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue), foram examinados 200 campos microscópicos, com um aumento de 1000x sob imersão em óleo. Todos os pacientes que participaram deste estudo foram tratados conforme as recomendações preconizadas pelo Ministério da Saúde no Manual de Terapêutica da Malária, e todos assinaram o termo de consentimento, norma do Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e critério adotado para a inclusão no presente estudo.



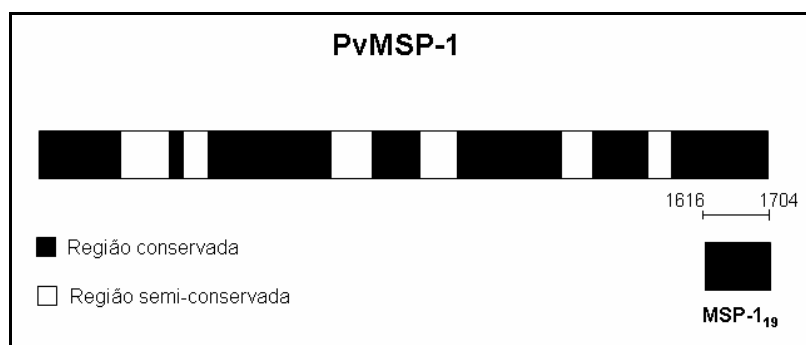
**Figura 4.** Área de estudo.

## 4.2. Antígenos

Dois antígenos recombinantes representando diferentes proteínas do estágio sanguíneo de *P. vivax* candidatas à vacina foram utilizados para a avaliação da resposta imune de IgG e subclasses nos ensaios imunoenzimáticos: o fragmento de 19 kDa correspondente à região C-terminal da Proteína 1 da Superfície do Merozoíto (PvMSP-1<sub>19</sub>) e a Proteína 3α da Superfície do Merozoíto (PvMSP-3α). Esses antígenos foram produzidos e gentilmente cedidos pela Dra. Irene Soares, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade de São Paulo (USP).

### 4.2.1. Fragmento de 19 kDa da região C-terminal da Proteína 1 de Superfície de Merozoíto (PvMSP-1<sub>19</sub>)

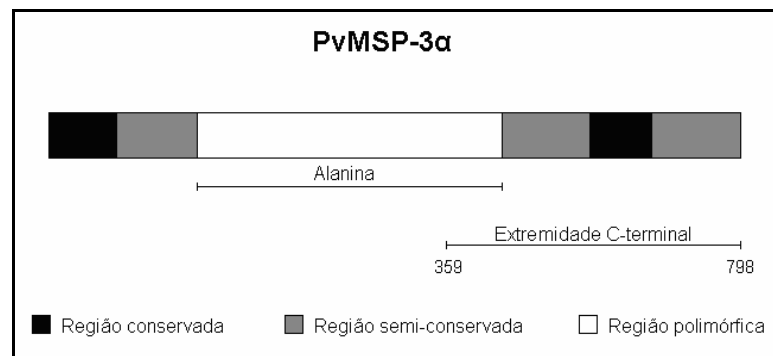
A proteína recombinante PvMSP1-<sub>19</sub> (Figura 5) corresponde ao fragmento de 19 kDa da região C-terminal (aminoácidos 1616-1704) da MSP-1 de *P. vivax* (cepa Belém) e foi expressa em *Escherichia coli* (DH5α), fundida ao gene da glutathione S transferase (GST) de *Schistosoma japonicum* (SOARES et al., 1999a; SOARES et al., 1999b; CUNHA et al., 2001). Por essa razão, utilizou-se GST como controle nos ensaios imunoenzimáticos para os testes envolvendo essa proteína.



**Figura 5.** Representação esquemática da PvMSP-1<sub>19</sub> utilizada neste estudo (Fonte: Adaptado de PUTAPORNTIP et al., 2000).

#### 4.2.2. Proteína 3 $\alpha$ da Superfície de Merozoíto (PvMSP-3 $\alpha$ )

A PvMSP-3 $\alpha$  utilizada no presente estudo foi expressa em *E. coli* estirpe BL21 (DE3), em fusão com a Glutathione S Transferase (GST) de *Schistosoma japonicum*, e corresponde à região C-terminal em quase toda a sua extensão (aminoácidos 359-798) (Figura 6). A sequência de nucleotídeos que codifica essa proteína foi obtida de plasmídeos pGEX-1 $\lambda$ T por restrição enzimática com EcoR1. Os insertos foram purificados e clonados em plasmídeo pHISa digerido com EcoR1 (CUNHA, 2000; JIMENEZ et al., 2008).



**Figura 6.** Representação esquemática da PvMSP-3 $\alpha$  utilizada neste estudo (Fonte: Adaptado de CUNHA, 2000 e JIMENEZ et al., 2008).

### 4.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

#### 4.3.1. Ensaio imunoenzimático para a detecção de IgG

Os ensaios imunoenzimáticos para a detecção de IgG total foram realizados conforme o protocolo descrito anteriormente (BRAGA et al., 2002; MORAIS et al., 2005), porém, com algumas modificações. Microplacas de ELISA de fundo chato foram sensibilizadas com 50  $\mu$ L dos antígenos recombinantes de *P. vivax* (PvMSP-1 $_9$  e PvMSP-3 $\alpha$ ) ou do antígeno controle (GST) (50ng/orifício para todos eles) diluídos em solução tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6, e mantidas por 18 horas em temperatura ambiente. Após esse período, a solução de antígeno foi desprezada, e as placas, lavadas quatro vezes com PBS 1X-Tween 0,05% (polioxietileno-sorbitano-monolaurato, SIGMA, St. Louis, USA). A etapa



seguinte consistiu na saturação das placas com leite em pó desnatado Molico 5%, diluído em PBS1X-Tween 0,05% (200 µL/orifício) por 2 horas a 37°C. Os soros testes, diluídos em PBS 1X-Tween 0,05% (diluição 1:100), foram, então, adicionados às placas (50µL/orifício), em duplicata, e incubados a 37°C por 90 minutos. Após quatro lavagens com PBS 1X-Tween 0,05%, foi adicionado às placas anticorpo monoclonal anti-IgG humano ligado à peroxidase (Sigma Chemical Company, St Louis, USA), e diluído em PBS1X-Tween 0,05% (diluição 1:1000). Este foi removido após 90 minutos de incubação a 37°C. Essa etapa foi sucedida por quatro lavagens com PBS 1X-Tween 0,05%. Em seguida, as placas foram reveladas pela adição de OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride substrate – Sigma, EUA) em tampão citrato (pH 5,0), utilizando-se, como substrato, peróxido de hidrogênio. Essa reação foi mantida no escuro e interrompida por meio da adição 50 µL/orifício de ácido sulfúrico 1:20. A densidade ótica (DO) das microplacas foi quantificada a 492 nm, em um leitor de ELISA automático (SpectraMax 240 PC, Molecular Devices).

Para ambas as proteínas, os valores de DO foram calculados subtraindo-se o valor da DO obtido para a GST do valor obtido para os antígenos recombinantes. A absorbância discriminante entre os resultados positivos e negativos (*cut off*) foi estabelecida pela média das absorbâncias de 20 amostras de soros de indivíduos sem história clínica de malária, acrescida de três desvios padrão. Para evitar que variações diárias ocorressem nas leituras da DO dos soros testados, os valores do *cut off* foram acompanhados diariamente, incluindo-se, em cada placa testada, cinco controles negativos diferentes, além de dois soropositivos que atuaram como controle interno do teste. Os resultados foram expressos na forma de Índice de Reatividade (IR). Para isso, a média da DO de cada amostra do teste foi dividida pelo valor do *cut off* da placa. Foram considerados positivos os soros que apresentaram  $IR \geq 1$ . Os limiares de positividade (*cut off*) estabelecidos para a PvMSP-1<sub>19</sub> e para a PvMSP-3 $\alpha$  foram, respectivamente, 0,135 e 0,127.

#### **4.3.2. Ensaio imunoenzimático para a detecção das subclasses de IgG**

A detecção das subclasses foi realizada conforme o procedimento descrito acima. Entretanto, nestes ensaios, a ligação do anticorpo monoclonal foi detectada com imunoglobulina anti-camundongo conjugada com a peroxidase (Sigma, EUA). Os anticorpos monoclonais específicos para IgG1 (clone HP-6012), IgG2 (clone HP-6014), IgG3 (clone HP-

6010) e IgG4 (clone HP-6025) (Sigma, St. Louis, MO) foram utilizados na diluição 1:1000 e incubados a 37°C por 60 minutos. As etapas seguintes foram semelhantes às descritas para a detecção de IgG total. Os limiares de positividade estabelecidos para as subclasses da PvMSP-1<sub>19</sub> foram: 0,298 (IgG1); 0,132 (IgG2); 0,202 (IgG3) e 0,256 (IgG4) e, para a PvMSP-3 $\alpha$ : 0,100 (IgG1); 0,126 (IgG2); 0,100 (IgG3) e 0,181 (IgG4).

#### 4.4. Análise dos dados

Inicialmente, foi construído um banco de dados no MICROSOFT EXCEL, contendo todas as informações referentes às características demográficas e clínico-epidemiológicas dos pacientes incluídos no presente trabalho.

Para a análise estatística, algumas das variáveis foram divididas em categorias. Em relação à parasitemia, os pacientes foram divididos em quatro grupos: < 1000 parasitos/ $\mu$ L de sangue (n = 37); 1000-2000 parasitos/ $\mu$ L de sangue (n = 36); 2001-5000 parasitos/ $\mu$ L de sangue (n = 42) e, finalmente, > 5000 parasitos/ $\mu$ L de sangue (n = 37). A variável número de episódios prévios de malária (M), por sua vez, foi subdividida em: 0M (n = 36), 1M (n = 30), 2-5M (n = 55) e > 5M (n = 38). No que se refere à anemia, os indivíduos foram divididos em dois grupos: 50 pacientes anêmicos (Hb < 12 g/dL), e 140 não anêmicos (Hb  $\geq$  12 g/dL). Por fim, quanto à trombocitopenia, eles foram agrupados em: 138 trombocitopênicos (plaquetas < 150.000/mm<sup>3</sup> sangue) e 52 não-trombocitopênicos (plaquetas  $\geq$  150.000/mm<sup>3</sup> sangue).

As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism version 5.01* e MINITAB (Minitab, Inc., PA). Em todos os modelos, significância estatística foi definida como  $P < 0,05$ .

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste estatístico de Kolmogorov-Sminorv. As diferenças na prevalência de anticorpos, bem como as comparações entre todas as outras frequências de interesse foram analisadas utilizando-se os testes estatísticos de Qui-quadrado, Qui-quadrado de tendência, ou, ainda, teste exato de Fisher. Para comparar os níveis de anticorpos entre os diferentes grupos de estudo, 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.

A técnica de estatística multivariada utilizada no presente trabalho foi a análise fatorial por meio de componentes principais (ACP), uma ferramenta que possibilita a redução da dimensionalidade de um conjunto de dados, facilitando a interpretação e evitando a perda de informação. Isso porque, cada componente principal (CP) é uma combinação linear de todas as variáveis originais, e é obtida em ordem decrescente da máxima variância. Dessa forma,  $n$ -variáveis originais geram  $n$ -componentes principais não correlacionados, que contêm a maior parte da informação do conjunto original (JOLLIFE, 2002; ABDI & WILLIAMS, 2010).

Como a resposta imune humoral envolve a atuação simultânea de uma série de anticorpos que agem em diferentes alvos, uma ACP foi realizada com os dados referentes às respostas de isotipos para as duas proteínas recombinantes, objetivando-se avaliar, simultaneamente, os efeitos de todos os anticorpos em uma única análise, uma vez que isso reflete melhor a situação biológica (JAOKO et al., 2007). É importante destacar que, para a inclusão dos dados nesse tipo de análise, tem sido recomendado que eles apresentem distribuição normal (JOLLIFE, 2002). Por essa razão, nós tentamos normalizar os valores de IR referentes às subclasses de anticorpos utilizando a transformação logarítmica. Entretanto, não obtivemos sucesso, o que nos fez optar pelo uso do cálculo *Blom normal squares* (WILSON et al., 2008).

A ACP permitiu a redução dos dados referentes às subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) em componentes compostos independentes, representativos dos principais padrões de resposta imune observados na população de estudo. Uma rotação do tipo varimax foi aplicada para maximizar o contraste dos *loadings* das variáveis entre os diferentes fatores. Como o tamanho da amostra avaliada neste estudo ( $n = 190$ ) foi superior a 150, utilizou-se para a interpretação apenas as variáveis com *loadings* iguais ou superiores a 0,6, a fim de se fornecer um modelo que representasse bem o padrão populacional (GUADAGNOLI & VELICER, 1988). Como os CPs extraídos apresentavam uma distribuição normal, seus *scores* foram comparados entre pacientes anêmicos e não anêmicos, bem como entre trombocitopênicos e não trombocitopênicos, por meio do teste estatístico de t Student. Esse procedimento foi adotado numa tentativa de se definir o padrão de resposta que poderia ser associado à morbidade. As relações entre os escores dos CPs e os níveis de hemoglobina ou plaquetas foram analisados utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Descrição da população de estudo

A população estudada consistiu em 190 indivíduos, sendo a maioria deles do gênero masculino (136; 71,6%), e uma minoria, do feminino (54; 28,4%). A faixa etária do grupo oscilou entre 12 e 68 anos (média 37,9 anos). Em relação à exposição, avaliada, neste estudo, por meio da variável número de episódios prévios de malária, verificou-se que esses pacientes apresentaram, em média, cerca de  $5,4 \pm 11,2$  episódios anteriores de malária, sendo que a maioria (48,6%) das infecções passadas foi provocada por *P. vivax* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características epidemiológicas da população de estudo (n = 190). Os pacientes incluídos neste estudo foram atendidos no Hospital Universitário Júlio Muller, em Cuiabá (MT), e na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (AM), no período compreendido entre os meses de fevereiro de 2006 a janeiro de 2008.

<b>Características epidemiológicas</b>	
Gênero	
Masculino (n/%)	136/ 71,6%
Feminino (n/%)	54/ 28,4%
Total	190
Idade (Média $\pm$ DP)	
(Mediana)	37,9 $\pm$ 14,3 37,5
Número de episódios prévios de malária (Média $\pm$ DP)	
(Mediana)	5,4 $\pm$ 11,2 2,0
Espécies de <i>Plasmodium</i> adquiridas durante a vida	
<i>P. vivax</i> (%)	48,6%
<i>P. falciparum</i> (%)	2,1%
Ambas (%)	36,6%

Durante o atendimento médico, os pacientes relataram diferentes manifestações clínicas. Dentre elas, as mais frequentes foram: febre (93,4%), cefaléia (83,7%), mialgia (83,1%), calafrio (80,1%) e fraqueza (72,3%), embora tonteira, náusea, epigastralgia e vômito também tenham sido relatados, porém, em menores porcentagens (Tabela 2). O exame de gota espessa revelou que a densidade parasitária média encontrada nessa população foi  $4.185 \pm 9.184$  parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue. A avaliação dos hemogramas mostrou que, quanto à dosagem de hemoglobina, os pacientes em questão apresentaram, em média,  $13,03 \pm 1,86$  g/dL. Finalmente, em relação à contagem de plaquetas, verificou-se que essa população apresentou, em média,  $120.119 \pm 56.229$  plaquetas/ $\text{mm}^3$  de sangue (Tabela 2).

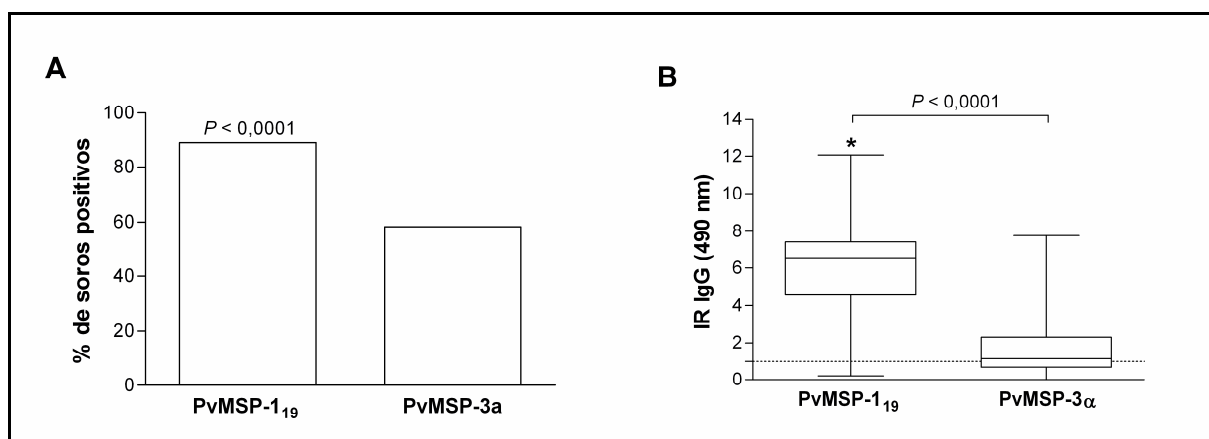
**Tabela 2.** Manifestações clínicas e achados laboratoriais encontrados nos pacientes infectados por *P. vivax* incluídos neste estudo.

<b>Características clínicas</b>	
<b>Sintomas (n = 166)</b>	<b>(n, %)</b>
Calafrio	(133; 80,1)
Cefaléia	(139; 83,7)
Epigastralgia	(78; 47,0)
Febre	(155; 93,4)
Fraqueza	(120; 72,3)
Mialgia	(138; 83,1)
Náusea	(86; 51,8)
Tonteira	(86; 51,8)
Vômito	(56; 33,7)
<b>Achado laboratorial</b>	<b>(Média <math>\pm</math> DP)</b>
Parasitemia (parasitos/ $\mu\text{L}$ sangue) (n = 152)	$4.185 \pm 9.184$
Hemoglobina (g/dL) (n = 190)	$13,0 \pm 1,9$
Plaquetas(/ $\text{mm}^3$ sangue) (n = 190)	$120.119 \pm 56.229$

## 5.2. Influências da parasitemia e exposição na resposta específica de IgG total

### 5.2.1. Resposta de IgG total

Inicialmente, nós quantificamos as respostas específicas de IgG total para a PvMSP-1<sub>19</sub> e a PvMSP-3 $\alpha$  nos soros de 190 indivíduos com infecção patente por *P. vivax* com a finalidade de avaliar a imunogenicidade dessas proteínas numa população naturalmente exposta à malária. Verificou-se que 19 (10%) deles não apresentaram resposta para nenhum dos dois antígenos, ao passo que 109 (53,4%) responderam para ambas as proteínas. A frequência de respondedores para a PvMSP-1<sub>19</sub> (88,9%) foi superior à observada para a PvMSP-3 $\alpha$  (58,4%) (Figura 7A). No que se refere à magnitude da resposta, também se confirmou superioridade para a PvMSP-1<sub>19</sub>, antígeno para o qual os níveis de IgG foram superiores (mediana PvMSP-1<sub>19</sub> = 6,55 versus mediana PvMSP-3 $\alpha$  = 1,16;  $P < 0,0001$ ) (Figura 7B).



**Figura 7.** (A) Prevalência (teste de McNemar) e (B) magnitude (teste de Wilcoxon) da resposta de IgG para as duas proteínas recombinantes correspondentes à PvMSP-1<sub>19</sub> e PvMSP-3 $\alpha$ . Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da densidade ótica do soro teste/*cut off*. A linha horizontal pontilhada indica o limiar de positividade (IR = 1). Os *boxes* mostram as medianas e o intervalo interquartil. As barras indicam o mínimo e o máximo. \*Indica  $P < 0,0001$ .

### 5.2.2. Influência da exposição na resposta de IgG total

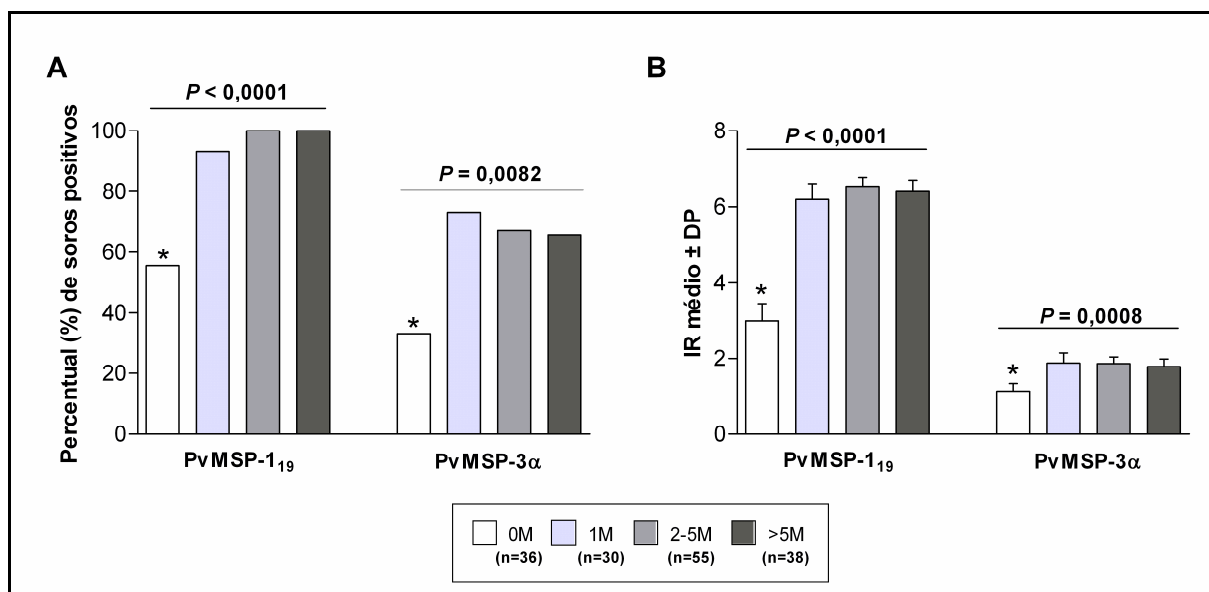
A fim de se analisar a influência da exposição na resposta de IgG total, a história pregressa de malária foi avaliada neste estudo por meio da variável número de episódios prévios de malária (M), informação esta obtida durante a aplicação do questionário.

Dos 190 pacientes incluídos neste trabalho, apenas 159 relataram o número de episódios prévios já vivenciados. De acordo com esse parâmetro, os indivíduos foram divididos em 4 grupos: grupo 0M (n = 36), composto por pacientes primo-infectados; grupo 1M (n = 30), composto por pacientes que relataram apenas um episódio de malária anterior à infecção atual; grupo 2-5M (n = 55), composto por pacientes que vivenciaram, anteriormente, 2, 3, 4 ou 5 episódios de malária; e grupo >5M (n = 38), composto por indivíduos que experimentaram mais de cinco episódios anteriores de malária.

A análise da prevalência de IgG entre os diferentes grupos revelou que, para a PvMSP-1<sub>19</sub>, a frequência de soropositivos foi inferior no grupo dos pacientes primo-infectados (0M = 55,6% vs 1M = 93,3% vs 2-5M = 100% vs > 5M = 100%; Teste do qui-quadrado de tendência:  $P < 0,0001$ ) (Figura 8A). Os indivíduos incluídos nesse grupo também apresentaram prevalência de IgG anti-PvMSP-3 $\alpha$  inferior à observada para os demais grupos (0M = 33,3% vs 1M = 73,3% vs 2-5M = 67,3% vs >5M = 65,8%;  $P < 0,0001$ ) (Figura 8A).

No que se refere à magnitude da resposta, os níveis médios de anticorpos detectados para a PvMSP-1<sub>19</sub> nos diferentes grupos foram:  $2,99 \pm 2,72$  (0M);  $6,20 \pm 2,27$  (1M);  $6,54 \pm 1,73$  (2-5M); e  $6,39 \pm 1,90$  (>5M). A comparação entre os valores medianos de IR de cada um desses grupos revelou que eles diferiram entre si (Teste do qui-quadrado de tendência:  $P < 0,0001$ ), tendo sido verificado que IgG anti- PvMSP-1<sub>19</sub> foi detectada em menores níveis em primoinfectados (Figura 8B). Quanto à PvMSP-3 $\alpha$ , os níveis médios de IgG detectados foram:  $1,12 \pm 1,23$  (0M);  $1,88 \pm 1,49$  (1M);  $1,87 \pm 1,32$  (2-5M); e  $1,78 \pm 1,28$  (>5M). Esses grupos também diferiram entre si em termos de valores medianos de IR ( $P = 0,0008$ ), e, mais uma vez, os menores níveis de IgG foram detectados em primoinfectados (Figura 8B).

Em síntese, esses resultados mostraram que, de uma forma geral, a prevalência e os níveis de anticorpos foram inferiores em indivíduos sem nenhuma experiência prévia de malária, sugerindo que a exposição realmente é um fator importante para a aquisição de uma imunidade.



**Figura 8.** Influência da exposição (expressa como número de episódios prévios de malária) na resposta de IgG. **(A)** Frequência de soropositivos (Teste do qui-quadrado de tendência). **(B)** Magnitude da resposta de IgG (Kruskal-Wallis *one way* ANOVA). Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da densidade ótica do soro teste/*cut off*. Os pacientes foram divididos em quatro grupos conforme indicado na legenda. Em negrito, os valores de  $P < 0,05$ .

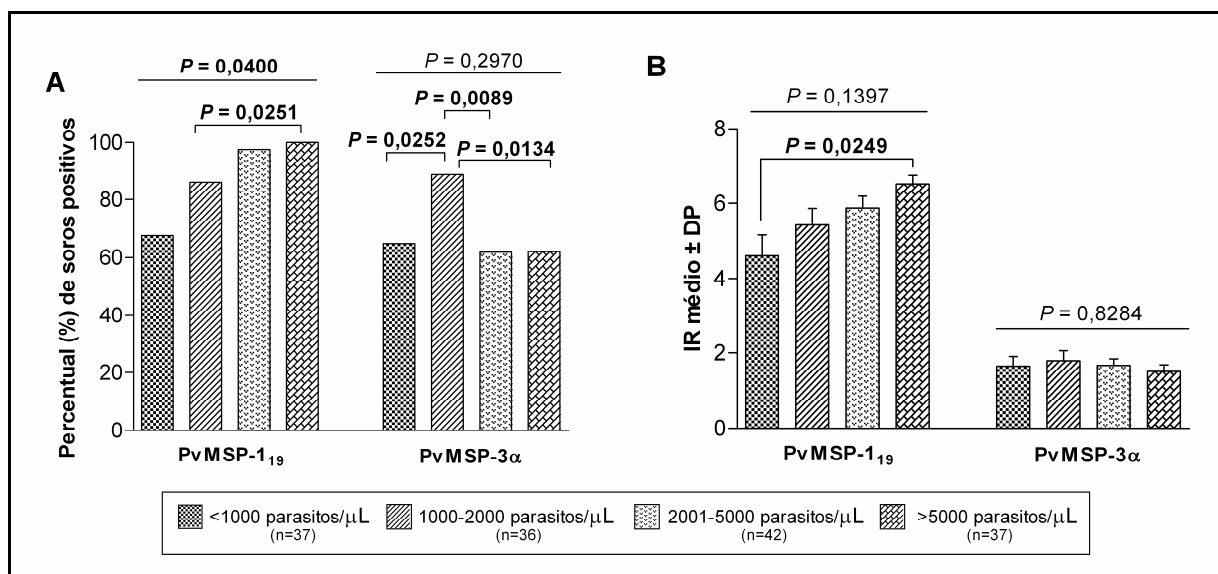
### 5.2.3. Influência da parasitemia na resposta de IgG total

Outra relação investigada no presente trabalho foi a influência da carga parasitária no reconhecimento de anticorpos anti-PvMSP-1<sub>19</sub> e anti-PvMSP-3. Para esta análise, utilizaram-se os dados de parasitemia (expresso em número de parasitos/ $\mu$ L de sangue) obtidos da gota espessa de 152 pacientes, que foram divididos em quatro grupos de acordo com os níveis de parasitos: grupo 1 (n = 37), pacientes com parasitemia inferior a 1000 parasitos/ $\mu$ L; grupo 2 (n = 36), pacientes com parasitemias entre 1000-2000 parasitos/ $\mu$ L; grupo 3 (n = 42), pacientes com parasitemias entre 2001-5000 parasitos/ $\mu$ L; e, por último, grupo 4 (n = 37), pacientes com parasitemias superiores a 5000 parasitos/ $\mu$ L.

Os resultados referentes a essa análise mostraram que a frequência de respondedores para a PvMSP-1<sub>19</sub> foi superior em pacientes que apresentavam cargas parasitárias mais elevadas (grupo 1 = 67,6%, grupo 2 = 86,1%, grupo 3 = 97,6% e grupo 4 = 100%; Teste do



qui-quadrado de tendência:  $P = 0,0400$ ) (Figura 9A). Essa tendência também foi observada em relação aos níveis de anticorpos para este mesmo antígeno, embora não tenha havido diferenças significativas nos níveis medianos de IR entre os diferentes grupos ( $P = 0,1397$ ) (Figura 9B). Em relação à PvMSP-3 $\alpha$ , não foram encontradas associações estatisticamente significativas no que se refere à frequência (Teste do qui-quadrado de tendência:  $P = 0,2970$ ) (Figura 9A) e à magnitude ( $P = 0,8284$ ) (Figura 9B) da resposta positiva de IgG.



**Figura 9.** Influência da parasitemia (expressa como número de parasitos/ $\mu$ L de sangue) na resposta de IgG. **(A)** Frequência de soropositivos (Teste do qui-quadrado de tendência). **(B)** Magnitude da resposta de IgG (Kruskal-Wallis *one way* ANOVA). Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da densidade ótica do soro teste/*cut off*. Os pacientes foram divididos em quatro grupos conforme indicado na legenda. Em negrito, os valores de  $P < 0,05$ .

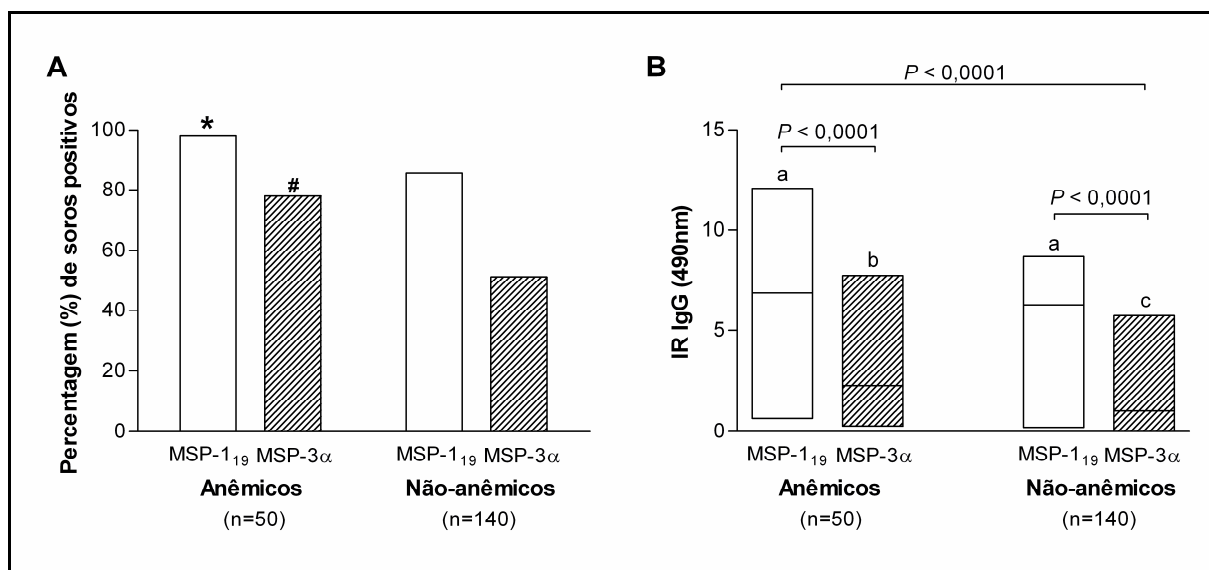
### 5.3. Associações entre a resposta de IgG e os parâmetros de morbidade

Nos últimos anos, o número de internações hospitalares devido a *P. vivax* tem aumentado significativamente no Brasil, apontando para um aumento na gravidade das infecções provocadas por essa espécie de *Plasmodium*. Considerando-se que as alterações hematológicas são as complicações mais relatadas na malária grave, neste estudo, nós utilizamos a anemia e a trombocitopenia como parâmetros indicativos de morbidade, com o intuito de investigar se a presença de anticorpos IgG naturalmente adquiridos se associa à

morbidade. A anemia foi definida como níveis de hemoglobina inferiores a 12 g/dL, e a trombocitopenia, como contagem de plaquetas inferior a 150.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> de sangue. A partir dessa definição, os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com cada um desses critérios: 50 anêmicos (Hb < 12 g/dL) versus 140 não anêmicos (Hb ≥ 12 g/dL), e 138 trombocitopênicos (<150.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> sangue) versus 52 não trombocitopênicos (≥150.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> sangue).

### 5.3.1. Associações entre a resposta de IgG e a anemia

Em relação ao parâmetro anemia, verificou-se que, para a PvMSP-1<sub>19</sub>, a frequência de soropositivos foi superior em pacientes anêmicos (98,0%), do que em não anêmicos (85,7%) ( $P = 0,0167$ ) (Figura 10A). Um comportamento semelhante foi observado para a PvMSP-3 $\alpha$  (anêmicos: 78,0% versus não anêmicos: 51,4%;  $P = 0,0014$ ) (Figura 10A).

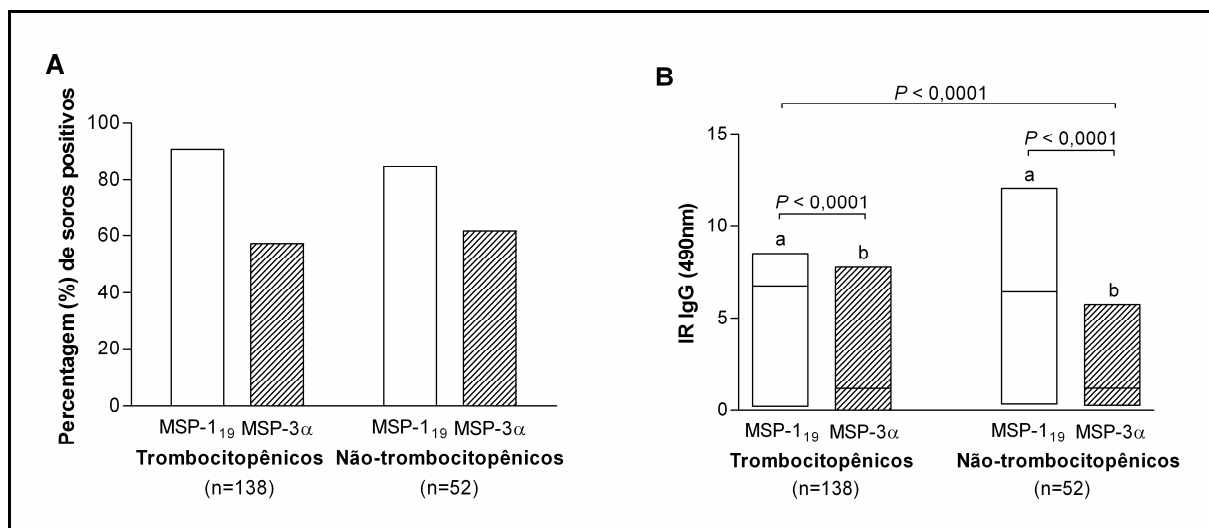


**Figura 10.** Associação entre a resposta de IgG e a anemia. **(A)** Frequência (teste exato de Fisher) e **(B)** magnitude (teste de Mann-Whitney – U) das respostas positivas. Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da densidade ótica do soro teste/cut off. \*Indica um valor de  $P = 0,0167$ . # Indica um valor de  $P = 0,0014$ . As linhas centrais nos boxes representam a mediana, e as barras flutuantes o máximo e o mínimo. Letras equivalentes indicam medianas estatisticamente iguais (Kuskal-Wallis one way ANOVA acompanhado pelo teste *pos hoc* de Dunns).

No que se refere à magnitude da resposta, não houve diferenças significativas entre os níveis medianos de IgG anti-MSP-1<sub>19</sub> entre anêmicos e não anêmicos (6,89 e 6,27, respectivamente;  $P = 0,0595$ ) (Figura 10B). Entretanto, os níveis medianos de IgG anti-PvMSP-3 $\alpha$  foram significativamente superiores em pacientes anêmicos, quando comparados aos de não anêmicos (2,27 e 1,04, respectivamente;  $P < 0.0001$ ) (Figura 10B).

### 5.3.2. Associações entre a resposta de IgG e a trombocitopenia

Quanto à trombocitopenia, não houve diferenças significativas na frequência de resposta positiva entre trombocitopênicos e não trombocitopênicos para ambos os antígenos (PvMSP-1<sub>19</sub>: 90,6% versus 84,6%, respectivamente,  $P = 0,2988$ ; PvMSP-3 $\alpha$ : 57,2% versus 61,5%, respectivamente,  $P = 0,6239$ ) (Figura 11A), nem na magnitude (mediana) (PvMSP-1<sub>19</sub>: 6,75 para trombocitopênicos versus 6,42 para não trombocitopênicos,  $P = 0,2467$ ; PvMSP-3 $\alpha$ : 1,16 para trombocitopênicos versus 1,17 para não trombocitopênicos,  $P = 0,2717$ ) (Figura 11B).



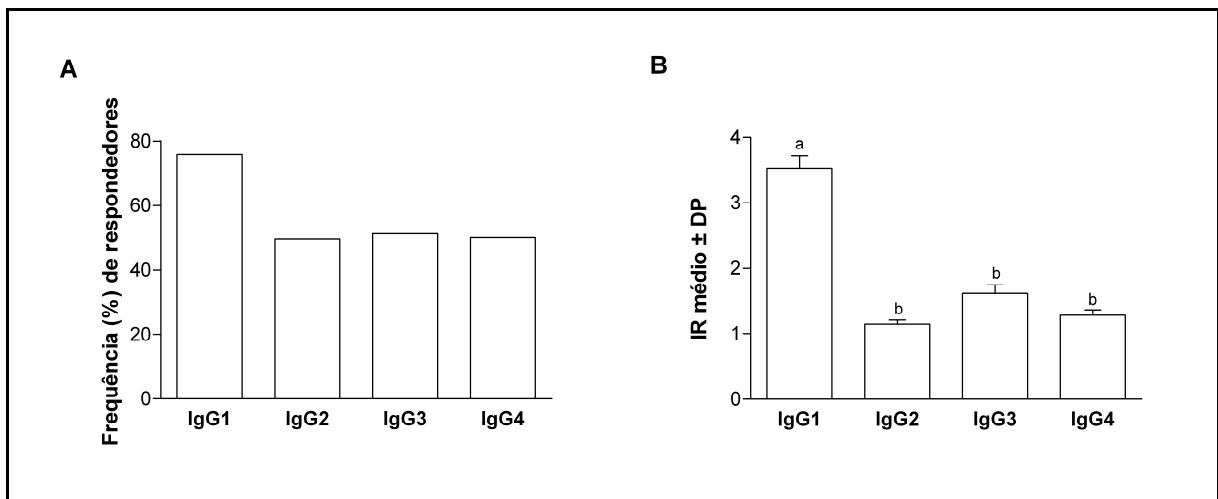
**Figura 11.** Associação entre a resposta de IgG e a trombocitopenia. **(A)** Frequência (teste exato de Fisher) e **(B)** magnitude (teste de Mann-Whitney – U) das respostas positivas. Os níveis de anticorpos foram expressos como índice de reatividade (IR). IR = média da densidade ótica do soro teste/cut off. As linhas centrais nos boxes representam a mediana, e as barras flutuantes o máximo e o mínimo. Letras equivalentes indicam medianas estatisticamente iguais (Kuskal-Wallis *one way* ANOVA acompanhado pelo teste *post hoc* de Dunns).

## 5.4. Padrões de resposta de subclasses

### 5.4.1. Resposta de subclasses

Numa tentativa de identificar a natureza precisa da resposta humoral direcionada contra os dois antígenos recombinantes que poderia ser associada à morbidade, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foram mensuradas, por meio de ELISA indireto, nos soros desses 190 pacientes.

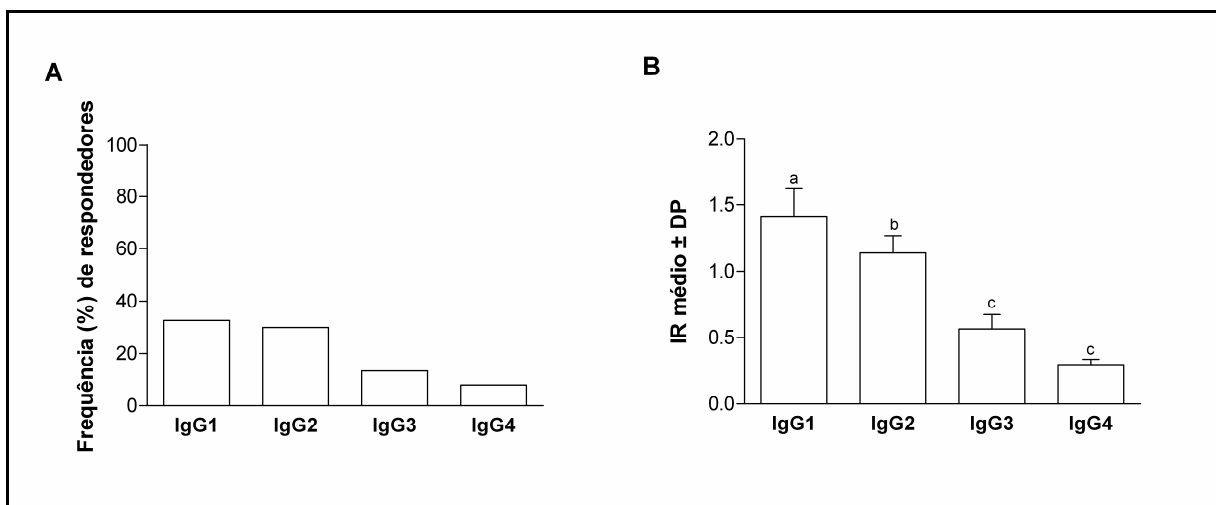
Verificou-se que, em relação à PvMSP-1<sub>19</sub>, houve o predomínio de IgG1 (75,8%), embora IgG2, IgG3 e IgG4 também tenham sido detectadas em frequências consideráveis (49,5%, 51,1% e 50,0%, respectivamente) (Figura 12A). No que se refere à magnitude da resposta, os níveis médios de anticorpos detectados para a PvMSP-1<sub>19</sub> foram:  $3,52 \pm 2,65$  (IgG1);  $1,15 \pm 0,88$  (IgG2);  $1,61 \pm 1,75$  (IgG3) e  $1,29 \pm 1,09$  (IgG4) (Figura 12B). A comparação entre os valores medianos de IR para essas subclasses revelou que elas diferiram entre si ( $P < 0,0001$ ), sendo IgG1 a detectada em maiores níveis.



**Figura 12.** (A) Prevalência (Qui-quadrado) e (B) magnitude (Kuskal-Wallis *one way* ANOVA acompanhado pelo teste *pos hoc* de Dunns) da resposta de subclasses contra a PvMSP-1<sub>19</sub>. IR = índice de reatividade (média da densidade ótica do soro teste/*cut off*). Letras equivalentes indicam medianas estatisticamente iguais.

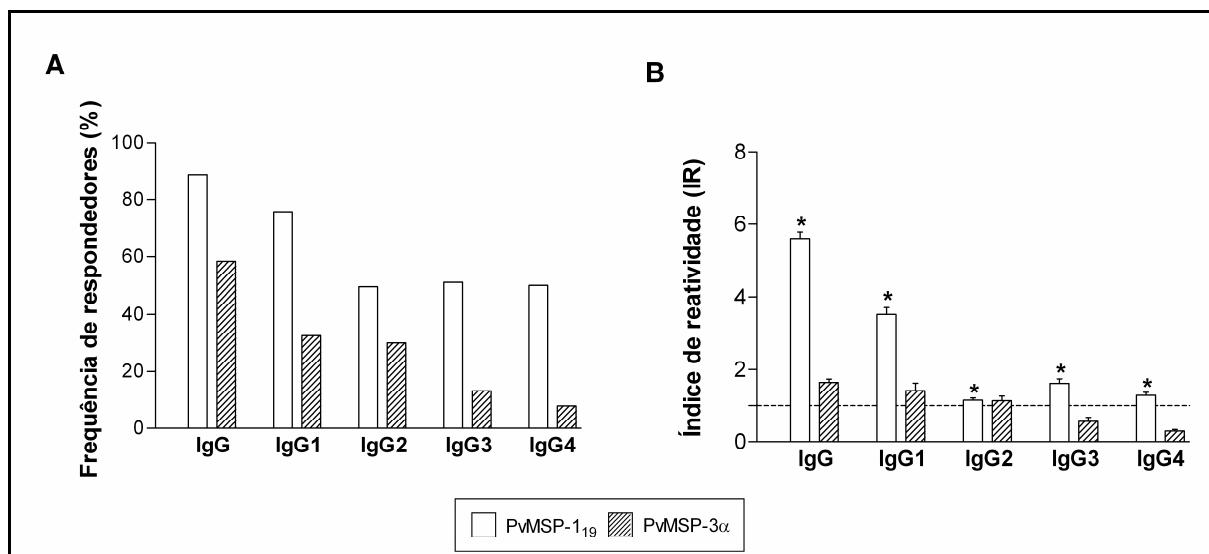
No caso da PvMSP-3 $\alpha$ , verificou-se que a frequência de resposta positiva foi maior para a IgG1 (32,6%), acompanhada pela IgG2 (30,0%), ao passo que as observadas para a IgG3 (13,2%) e IgG4 (7,9%) foram inferiores (Figura 13A).

Em termos de magnitude, os níveis médios de anticorpos referentes às subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-PvMSP-3 $\alpha$  foram, respectivamente,  $1,64 \pm 1,39$ ;  $1,42 \pm 2,87$ ;  $1,14 \pm 1,80$ ;  $0,57 \pm 1,43$  e  $0,29 \pm 0,57$  (Figura 13B). Os maiores valores medianos de IR foram detectados para o isotipo IgG1, seguido pelo IgG2 ( $P < 0,0001$ ).



**Figura 13.** (A) Prevalência (Qui-quadrado) e (B) magnitude (Kuskal-Wallis acompanhado pelo teste *pos hoc* de Dunns) da resposta de subclasses contra a PvMSP-3 $\alpha$ . IR = índice de reatividade (média da densidade ótica do soro teste/*cut off*). Letras equivalentes indicam medianas estatisticamente iguais.

De uma forma geral, as frequências (Figura 14A) e a magnitude (Figura 14B) das respostas positivas para a PvMSP-1<sub>19</sub> foram superiores às observadas para a PvMSP3- $\alpha$  ( $P < 0,0001$  para a IgG e todas as suas subclasses).



**Figura 14.** Comparação entre as respostas de anticorpos para a PvMSP-1<sub>19</sub> e a PvMSP-3 $\alpha$ . (A) Frequência (teste exato de Fisher) e (B) magnitude (teste de Mann-Whitney – U) das respostas de IgG e subclasses. IR = índice de reatividade (média da densidade ótica do soro teste/*cut off*). O tracejado indica IR = 1. IR < 1 = soronegativos. \* Indica valores de  $P < 0,05$ .

#### 5.4.2. Redução dos dados de subclasses.

Como a resposta imune humoral envolve diferentes isotipos de anticorpos atuando simultaneamente em diferentes alvos, realizamos uma Análise de Componentes Principais (ACP) com os dados referentes às subclasses para avaliar os efeitos de todos esses anticorpos em uma única análise e extrair os padrões de resposta mais importantes, para, depois, associá-los à morbidade. Os resultados da ACP mostraram que os três primeiros componentes explicaram 67,6% da variação total dos dados (Tabela 3).

**Tabela 3.** *Eigenvalues* e percentual de inércia explicado por cada componente.

Componente Principal	$\lambda_i$ ( <i>eigenvalue</i> )	Inércia individual (%)	Inércia acumulada (%)
1	2,4118	31,5	31,5
2	1,4340	18,7	50,2
3	1,3345	17,4	67,6

O primeiro componente contribuiu com 31,5% da variabilidade e deu os maiores pesos para IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-MSP-3 $\alpha$ , ao passo que o componente 2 foi melhor representado por IgG1 e IgG4 anti-MSP-1<sub>19</sub>, contribuindo com 18,7% da variação observada. O terceiro componente, por sua vez, foi capaz de explicar 17,4% da variabilidade dos dados e deu os maiores pesos para IgG2 e IgG3 anti-MSP-3 $\alpha$  (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 4.** Variáveis incluídas na ACP e sua contribuição para os três eixos derivados.

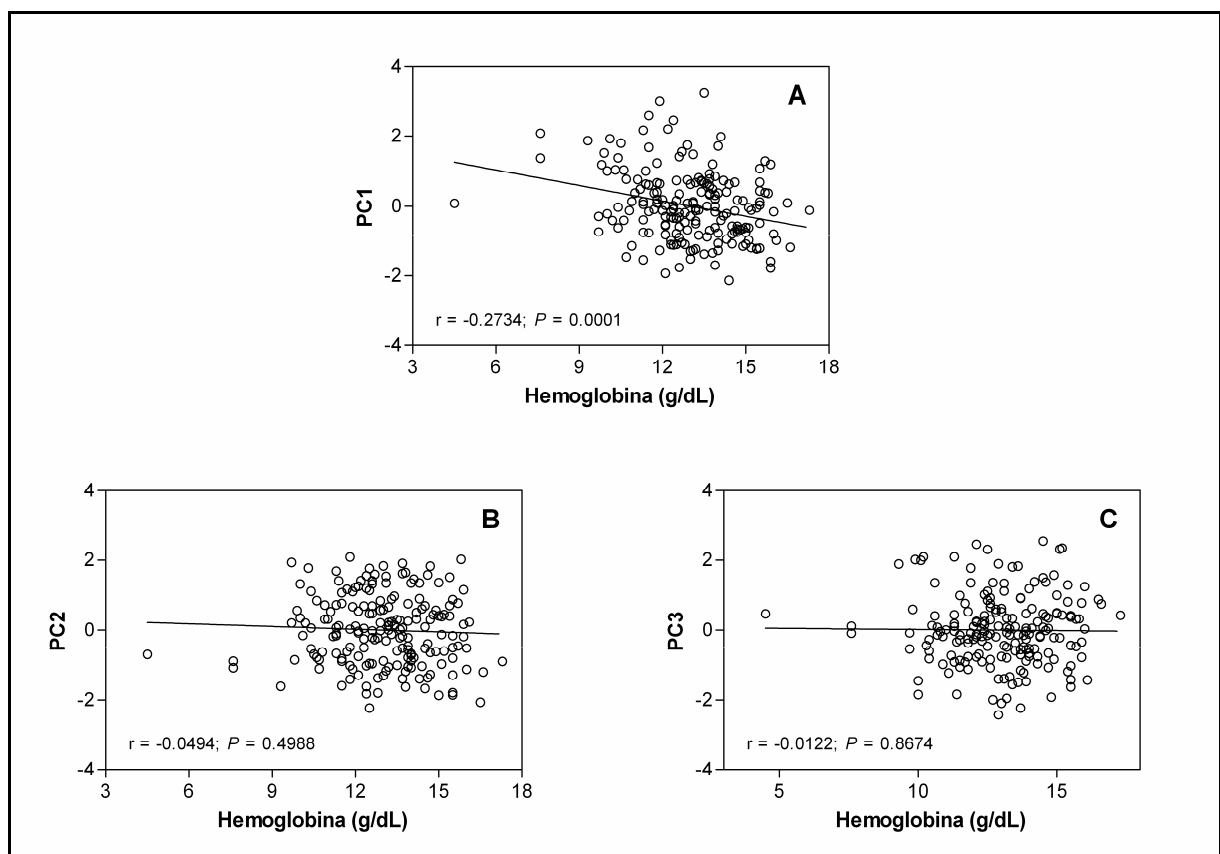
Resposta de anticorpo	Antígeno recombinante	Correlação das variáveis com os componentes ( <i>Loadings</i> ) <sup>1</sup>		
		CP1	CP2	CP3
<b>IgG1</b>	PvMSP-1 <sub>19</sub>	0,275	<b>0,743</b>	-0,111
	PvMSP-3	<b>0,709</b>	0,038	-0,060
<b>IgG2</b>	PvMSP-1 <sub>19</sub>	-0,063	0,219	<b>-0,839</b>
	PvMSP-3	<b>0,706</b>	0,244	-0,095
<b>IgG3</b>	PvMSP-1 <sub>19</sub>	-0,335	-0,023	<b>-0,754</b>
	PvMSP-3	<b>0,797</b>	0,019	-0,014
<b>IgG4</b>	PvMSP-1 <sub>19</sub>	-0,076	<b>0,879</b>	-0,079
	PvMSP-3	<b>0,760</b>	-0,003	-0,173

<sup>1</sup> Os maiores *loadings* (>0,6) estão indicados em negrito.

## 5.5. Padrões da resposta de subclasses e sua associação à morbidade

Esses três padrões de resposta de subclasses de IgG foram, então, relacionados com os parâmetros indicativos de morbidade, em uma tentativa de se determinar o perfil de resposta humoral que poderia ser associado à anemia e à trombocitopenia na malária vivax.

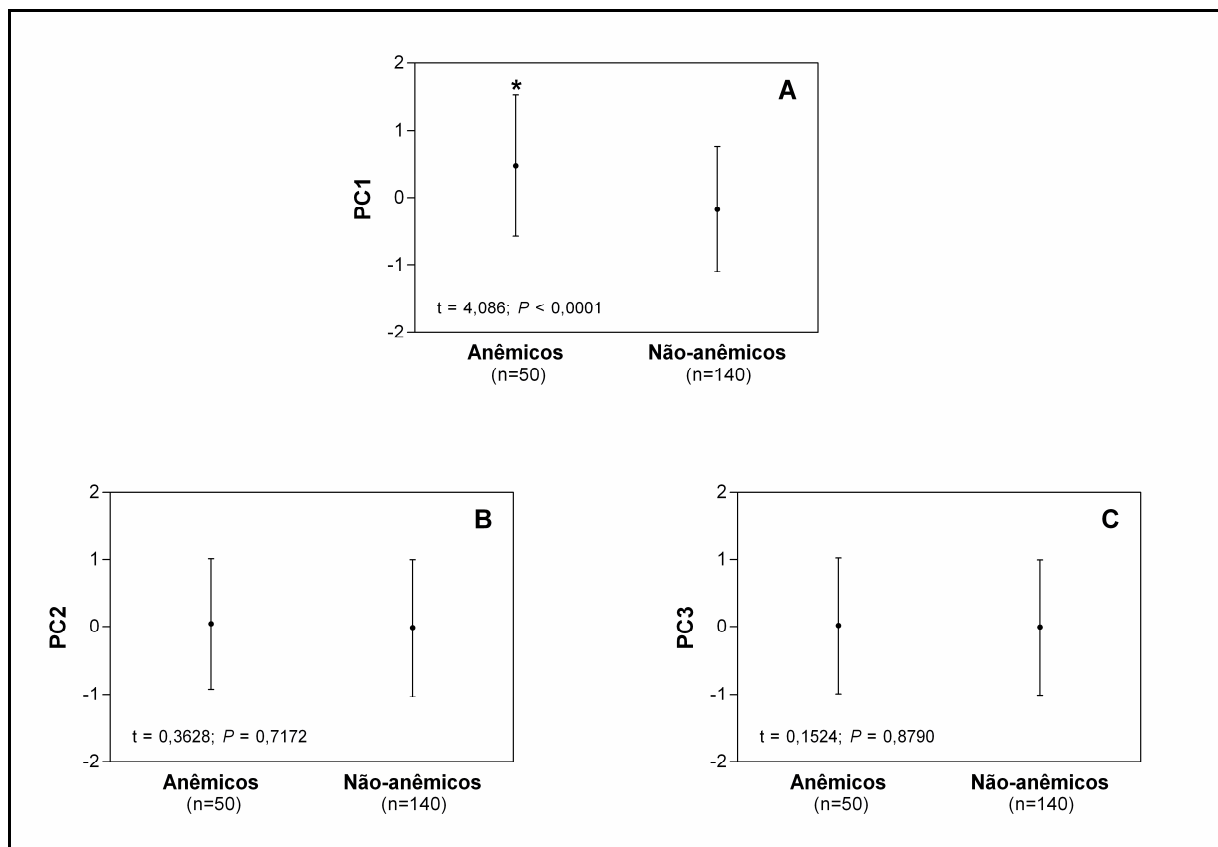
Os níveis de hemoglobina referentes aos 190 pacientes foram negativamente correlacionados com os escores do primeiro componente ( $r = -0.2734$ ;  $P = 0.0001$ ) (Figura 15A), indicando que uma redução nos níveis de hemoglobina está associada ao aumento nos níveis de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-PvMSP-3 $\alpha$ . Essa correlação também foi observada para os dois outros componentes, embora sem significado estatístico ( $r = -0.0494$ ,  $P = 0.4988$  para o PC2, e  $r = -0.0122$ ,  $P = 0.8674$ , para o PC3) (Figuras 15B e 15C).



**Figura 15.** Correlação de Pearson entre os escores dos componentes principais (CPs) e os níveis de hemoglobina. (A) CP1, (B) CP2 e (C) CP3.

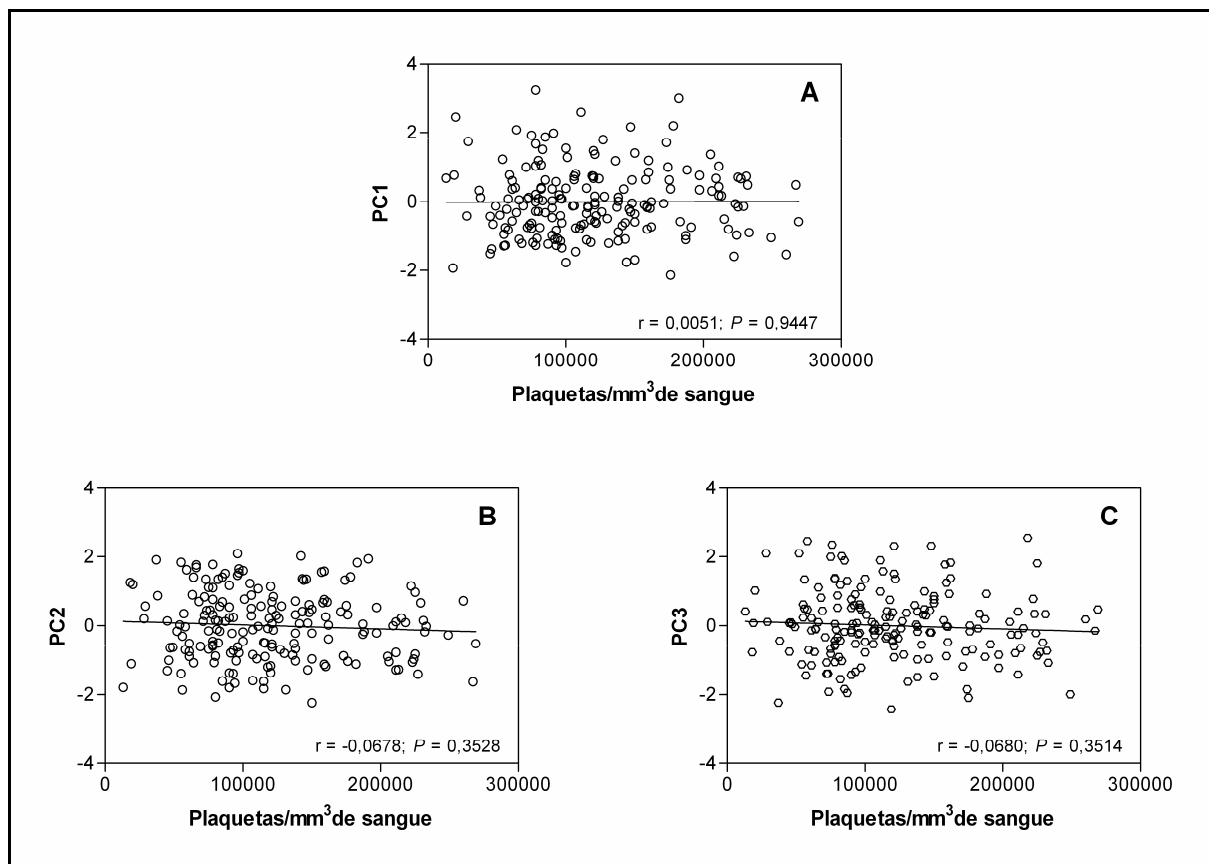


Verificou-se, ainda, que, em média, os escores do primeiro componente foram maiores em pacientes anêmicos do que em não anêmicos ( $0,48 \pm 1,05$  vs.  $-0,17 \pm 0,93$ , respectivamente;  $P < 0,0001$ ) (Figura 16A), similarmente ao que ocorreu para os escores do segundo ( $0,04 \pm 0,97$  vs.  $-0,02 \pm 1,02$ ;  $P = 0,7172$ ) (Figura 16B) e do terceiro componentes ( $0,02 \pm 1,01$  vs.  $-0,01 \pm 1,00$ ;  $P = 0,7172$ ) (Figura 16C), embora ambos sem significância estatística.



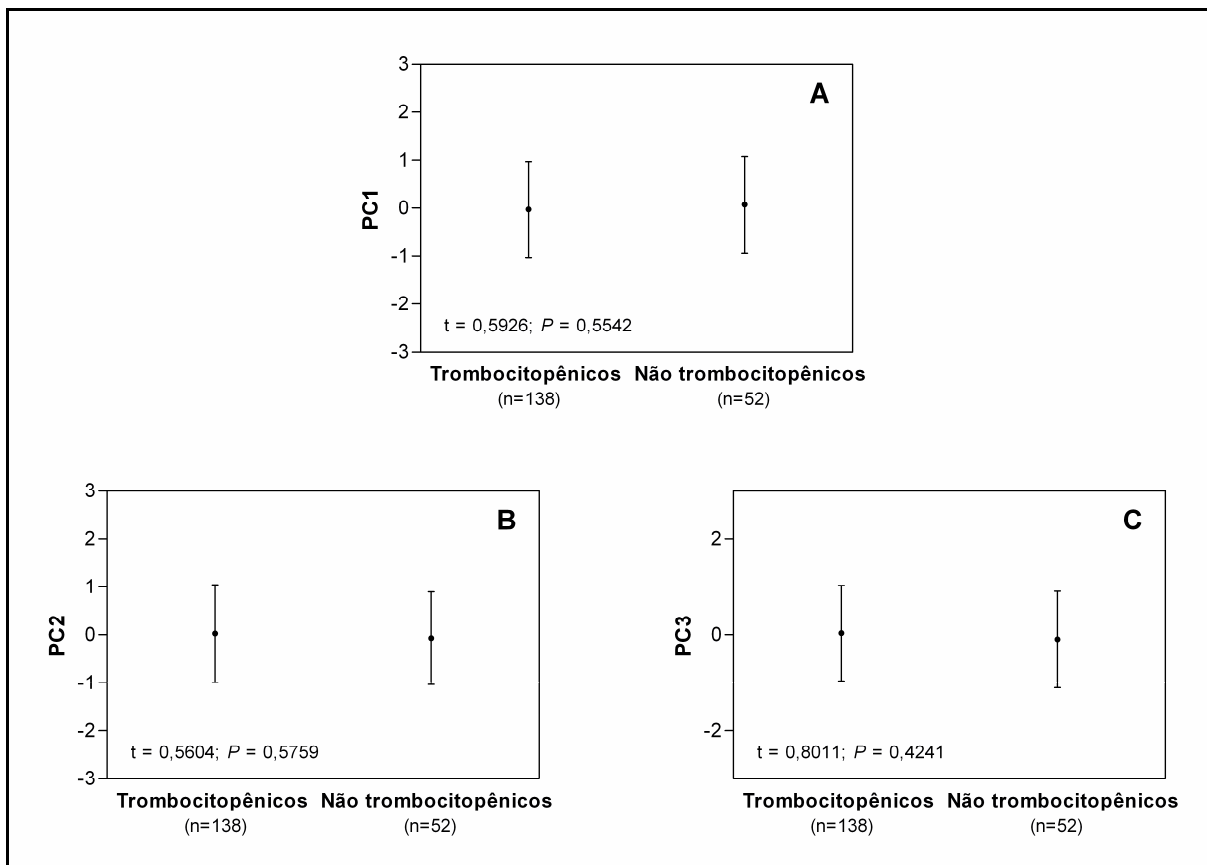
**Figura 16.** Média  $\pm$  desvio padrão dos escores referentes aos três primeiros componentes principais (CPs) de pacientes anêmicos e não anêmicos. (A) CP1, (B) CP2 e (C) CP3.\* Indica um valor de  $P < 0,0001$ .

Quanto à contagem de plaquetas, não houve correlações significativas entre os níveis de plaquetas e os escores de nenhum dos três primeiros componentes principais (PC1:  $r = 0,0050$ ,  $P = 0,9447$ ; PC2:  $r = -0,0677$ ,  $P = 0,3528$ ; PC3:  $r = -0,0679$ ,  $P = 0,3514$ ) (Figuras 17A, 17B e 17C).



**Figura 17.** Correlação de Pearson entre os escores dos três primeiros componentes principais (CPs) e os níveis de plaquetas. (A) CP1, (B) CP2 e (C) CP3.

Os escores do primeiro componente tenderam a ser menores em pacientes trombocitopênicos, entretanto, o valor de  $P$  não foi significativo ( $-0,0264 \pm 1,00$  vs.  $0,0702 \pm 1,0006$ ;  $P = 0,5244$ ) (Figura 18A). Uma tendência diferente foi observada para o segundo ( $0,0250 \pm 1,016$  vs.  $-0,0664 \pm 0,9637$ ;  $P = 0,5759$ ) (Figura 18B) e o terceiro componentes ( $0,0357 \pm 0,9987$  vs.  $-0,09477 \pm 1,0007$ ;  $P = 0,4241$ ) (Figura 18C), para os quais se verificou que os escores médios foram superiores em pacientes trombocitopênicos, porém, ambos sem significância estatística.



**Figura 18.** Média  $\pm$  desvio padrão dos escores referentes aos três primeiros componentes principais (CPs) de pacientes trombocitopênicos e não trombocitopênicos. (A) CP1, (B) CP2 e (C) CP3.\* Indica um valor de  $P < 0,0001$ .

## 6. DISCUSSÃO

Como indivíduos que residem em áreas endêmicas para a malária são simultânea e repetidamente desafiados com múltiplos antígenos, tem sido sugerido que uma vacina efetiva incorpore proteínas distintas, destacando-se as de merozoítos (RICHARDS & BEESON, 2009). Entretanto, a natureza precisa das respostas imunes que reduzem ou previnem a malária ainda é desconhecida e constitui um tema relevante de pesquisa.

Diante da necessidade de estudos nesse sentido, no presente trabalho, nós caracterizamos o perfil da resposta de anticorpos para duas proteínas recombinantes de *P. vivax* candidatas à vacina, PvMSP-1<sub>19</sub> e PvMSP-3 $\alpha$ , e investigamos, ainda, se a presença de anticorpos naturalmente adquiridos para esses dois antígenos poderia ser associada à morbidade, avaliada, aqui, por meio de duas manifestações clínicas comuns na infecção por *P. vivax*: a anemia e a trombocitopenia (WICKRAMASINGLE & ABDALLA, 2000; SONG et al., 2003; ECHEVERRI et al., 2003).

Primeiramente, nós quantificamos os níveis de IgG total nos soros de 190 pacientes com infecção patente por *P. vivax*, e os resultados mostraram que quase 89% dessa população apresentavam anticorpos para a PvMSP-1<sub>19</sub>, ao passo que apenas 58% possuíam anticorpos para a PvMSP-3 $\alpha$ , confirmando a elevada imunogenicidade da extremidade C terminal da PvMSP-1, conforme demonstrado anteriormente, inclusive por nosso grupo (MORAIS et al., 2005; BARBEDO et al., 2007). Por outro lado, cabe ressaltar que nossos dados também apontam para uma considerável imunogenicidade da PvMSP3- $\alpha$ .

A elevada imunogenicidade verificada para a PvMSP-1<sub>19</sub> pode estar relacionada ao seu baixo polimorfismo, já relatado em uma série de estudos anteriores (SOARES et al., 1999a; O'DONNELL et al., 2000; PUTAPORNTIP et al., 2002). Outra razão que poderia justificar tal imunogenicidade é o fato de a MSP-1<sub>19</sub> ser o único fragmento da MSP-1 que permanece ancorado à superfície do parasito via âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (BLACKMAN et al., 1990; BLACKMAN et al., 1994), o que, de certo modo, facilita a ligação de imunoglobulinas, uma vez que os epitopos estão mais expostos à resposta imune.

A PvMSP-3 $\alpha$ , por sua vez, é uma proteína bastante polimórfica (GALINSKI et al., 1999; GONDEAU et al., 2009). Estudos realizados com isolados provenientes de áreas com diferentes endemicidades de malária revelaram uma extensa diversidade no gene que codifica essa proteína (CRISTIANO et al., 2008; PRAJAPATI et al., 2010). Entretanto, essa

diversidade está restrita ao domínio central, que inclui três blocos com repetições de sete aminoácidos alanina, ao passo que as extremidades carbóxi e amino-terminais são relativamente conservadas (RAYNER et al., 2002).

Em posse dos resultados obtidos para a resposta de IgG específica, partimos para a investigação da prevalência e da magnitude da resposta de cada subclasse de IgG nos soros dos 190 pacientes. Verificou-se que, para a PvMSP-1<sub>19</sub>, IgG1 foi o isotipo predominante e, também, o detectado em maiores níveis. Esse dado corrobora um estudo anterior, conduzido por nosso grupo, no qual a resposta imune naturalmente adquirida foi avaliada em indivíduos da Amazônia Brasileira com diferentes níveis de exposição, sendo IgG1 a subclasse predominante (MORAIS et al., 2005). Além disso, estudos realizados com soros provenientes de outras regiões do mundo endêmicas para a malária, como a Turquia e a Papua Nova Guiné, confirmaram esse resultado, mostrando que, para a PvMSP-1<sub>19</sub>, o padrão de resposta predominante é IgG1 (ZEYREK et al., 2008; FERNANDEZ-BECERRA et al., 2010).

Em relação à PvMSP-3 $\alpha$ , houve o predomínio de IgG1 e IgG2, ressaltando que a magnitude da resposta do primeiro isotipo foi superior. É importante destacar que CUNHA (2000) avaliou a resposta humoral e celular contra proteínas recombinantes correspondentes à região C-terminal da PvMSP-3 $\alpha$  e a diferentes regiões da PvMSP-3 $\beta$  e relatou um padrão de resposta diferente do observado neste trabalho. Tal padrão foi caracterizado, de uma forma geral, por uma resposta do tipo IgG1/IgG3, exceto para a PvMSP-3 $\beta$ , para a qual mais de 70% dos indivíduos produziram IgG2. Em um outro trabalho, realizado em Porto Velho, no estado de Rondônia (RO), avaliou-se o perfil da resposta humoral frente a cinco proteínas recombinantes representando a sequência completa de aminoácidos da PvMSP-3 $\alpha$ , e, mais uma vez, verificou-se o predomínio de anticorpos citofílicos (LIMA-JÚNIOR et al., 2011).

Embora até o presente momento ainda não haja um consenso sobre o padrão de resposta de isotipos capaz de conferir proteção, tem sido sugerido que apenas as subclasses citofílicas, IgG1 e IgG3, são protetoras, ao passo que IgG2 e IgG4 podem, por outro lado, até mesmo bloquear os mecanismos protetores (BOUHAROUN-TAYOUN & DRUILHE, 1992). Entretanto, a maioria dos estudos realizados até o presente momento tem se concentrado em *P. falciparum*, e por essa razão pouco se sabe sobre o perfil protetor de anticorpos naturalmente adquiridos em infecção por *P. vivax*.

Como este estudo foi realizado com pacientes que residem na Amazônia Brasileira, área onde a malária é hipoendêmica/mesoendêmica e apresenta uma transmissão instável, com flutuações sazonais ocorrendo durante todo o ano (CAMARGO et al., 1994),

provavelmente esses indivíduos não estão protegidos da malária clínica. Esta hipótese pode ser justificada pelo fato de os indivíduos avaliados em nosso estudo terem sido diagnosticados após o relato de diferentes manifestações clínicas associadas à infecção por *Plasmodium*, aliada ao fato de esses mesmos indivíduos relatarem pouca exposição à malária. Além disso, é importante considerar a inexistência de um ensaio funcional capaz de mensurar anticorpos protetores contra *P. vivax*, não permitindo, pois, a associação entre um perfil específico de isotipos e proteção antimalárica. Nesse sentido, a realização de novos estudos envolvendo a PvMSP-3 $\alpha$ , uma proteína relativamente pouco estudada quando comparada à PvMSP-1 $_{19}$ , em populações geograficamente distintas, torna-se extremamente necessária.

Nós investigamos, ainda, se a presença de anticorpos naturalmente adquiridos contra a PvMSP-1 $_{19}$  e a PvMSP-3 $\alpha$  poderia ser associada à anemia, manifestação clínica que se desenvolve durante a infecção aguda na maioria dos pacientes infectados tanto por *P. falciparum* como por *P. vivax* (WICKRAMASINGHE & ABDALLA, 2000), e considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade com relação à malária (CHANG et al., 2004). Apesar de tamanha relevância, a patogênese da anemia ainda não é completamente conhecida, embora se aceite que ela é complexa e multifatorial (CHANG et al., 2004; GOSH et al., 2007; AWAH et al., 2009).

Um dos fatores que contribuem para a anemia é a digestão da hemoglobina e a destruição das hemácias, resultados imediatos do desenvolvimento do parasito durante o seu ciclo de vida (AN & MOHANDAS, 2010). Entretanto, esse mecanismo, sozinho, não justifica a anemia, uma vez que *P. vivax* apresenta uma particularidade biológica que é a sua preferência em infectar reticulócitos, que constituem apenas 1-2% das hemácias (MUELLER et al., 2009).

A supressão do sistema eritropoiético é outro fator que contribui para a anemia, uma vez que metabólitos do parasito (hemozoína e toxinas), citocinas pró-inflamatórias e uma resposta inadequada para a eritropoietina afetam a função e a morfologia dos precursores dos eritrócitos (WINTER & WAHLGREN, 2005; LAMIKANRA et al., 2007).

Um estudo de modelagem matemática realizado com pacientes não imunes estimou que, para cada hemácia infectada, cerca de 8,5 hemácias não infectadas são removidas da circulação (JAKEMAN et al., 1999). Uma possível explicação para essa remoção prematura das hemácias não infectadas está relacionada ao reconhecimento, por anticorpos, de antígenos do parasito presentes na superfície das hemácias, ou, ainda, à deposição de imunocomplexos

na superfície dessas células, estimulando a fagocitose (LAYEZ et al., 2005; GOSH & GHOSH, 2007; LAMIKANRA et al., 2007; KAI & ROBERTS, 2008).

Em relação à anemia, nós verificamos, nas análises univariadas, que os níveis de IgG total para a PvMSP-3 $\alpha$  foram significativamente maiores em pacientes anêmicos do que em não anêmicos. Como a exposição, os fatores demográficos e a carga parasitária podem influenciar os níveis desse parâmetro hematológico, nós comparamos os pacientes anêmicos e os não anêmicos quanto à idade, história pregressa de malária e parasitemia, em uma tentativa de se identificar as possíveis diferenças capazes de explicar esse resultado, contudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Uma vez estabelecida tal semelhança entre o grupo de pacientes anêmicos e não anêmicos, passamos a testar a hipótese de que a anemia estaria relacionada apenas à presença de anticorpos anti-PvMSP-3 $\alpha$ . Para responder a essa questão, realizamos uma análise fatorial de componentes principais com os dados individuais referentes a todas as subclasses de anticorpos. Uma vez que em condições biológicas as respostas ocorrem simultaneamente, esse tipo de análise é mais pertinente, pois não ignora a influência das interações nem o efeito combinado dos diferentes isotipos (Jaoko et al., 2007; Wilson et al., 2008). Com essa análise, três padrões de resposta foram encontrados: IgG1/IgG2/IgG3/IgG4 anti-MSP-3 $\alpha$  versus IgG1/IgG4 anti-MSP-1<sub>19</sub> versus IgG2/IgG3 anti-MSP-1<sub>19</sub>.

Em seguida, os escores obtidos na ACP foram incluídos em outra análise, em uma tentativa de se estabelecer associações entre esses três padrões de resposta e a anemia. Verificou-se que, quando comparados aos pacientes não anêmicos, os pacientes com anemia apresentavam, em média, níveis (escores) superiores de IgG1/IgG2/IgG3/IgG4 anti-MSP-3 $\alpha$ . Além disso, os escores do primeiro componente principal foram negativamente correlacionados com a dosagem de hemoglobina, mostrando que o aumento nos níveis de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-PvMSP-3 $\alpha$  estava associado a uma redução nos níveis de hemoglobina. Esses resultados sugerem que esses anticorpos estão, de alguma maneira, associados à anemia.

Como a PvMSP-3 $\alpha$  tem sido descrita como um antígeno polimórfico secretado (McCOLL et al., 1994), que se associa à superfície do merozoíto, embora não contenha um domínio transmembrana nem uma sequência consenso para uma âncora de GPI (GALINSKI et al., 1999), acreditamos que essa proteína, durante a sua circulação no sangue, possa se aderir à superfície de eritrócitos infectados e não infectados e ser reconhecida por

imunoglobulinas específicas, estimulando a fagocitose ou a lise mediada pela ativação do complemento.

O papel desses complexos de antígeno-anticorpo na sensibilização de hemácias não infectadas e a sua remoção por células do sistema reticuloendotelial foi estudado, pela primeira vez, em crianças da Gâmbia, no oeste africano (FACER et al., 1980). Mais tarde, foi confirmado experimentalmente que algumas proteínas de *Plasmodium*, como as derivadas das roptrias, eram capazes de se aderir à superfície de eritrócitos normais, induzindo a sua destruição (AWAH et al., 2009; AWAH et al., 2011; LAYEZ et al., 2005; STERKERS et al., 2007). Além disso, os resultados provenientes de um ensaio clínico (fase 2) envolvendo a fórmula *P. falciparum* AMA1-C1/Alhydrogel, realizado com 300 crianças, em Mali, revelaram um forte efeito dessa vacina na incidência de anemia, mostrando que o impacto da vacinação nesse parâmetro clínico precisa ser muito bem avaliado, principalmente em relação às proteínas do estágio sanguíneo (ELLIS et al., 2011).

Embora se saiba que *P. vivax* apresente algumas particularidades biológicas que o diferenciam de *P. falciparum*, não se pode excluir a possibilidade de que os mecanismos envolvidos nas alterações hematológicas responsáveis pela anemia sejam similares para ambas as espécies de parasitos. Diante do exposto, mais estudos se tornam necessários para ampliar o conhecimento nessa área, principalmente no que se refere a *P. vivax*.

Apesar de nenhuma associação com a resposta de anticorpos ter sido verificada para a trombocitopenia, este é um parâmetro hematológico importante, que merece atenção, pois esteve presente em 72,6% dessa população. Além disso, já foi relatado anteriormente que essa alteração hematológica foi a principal complicação observada em pacientes infectados por *P. vivax* (LACERDA, 2007). Embora ainda não se saiba por que essa redução de plaquetas ocorre em apenas algumas infecções, existem evidências de que fatores do hospedeiro e do parasito estejam envolvidos (KELTON et al., 1983). Já foi sugerido que as complicações decorrentes da redução de plaquetas estão relacionadas a mecanismos imunes, nos quais a ligação de IgG a plaquetas recobertas por proteínas do parasito estimularia a fagocitose por macrófagos ou monócitos (KELTON et al., 1983; LACERDA, 2007). O polimorfismo de genes que codificam proteínas imunogênicas do parasito pode ser outro fator importante, uma vez que já foi descrita por nosso grupo uma associação entre trombocitopenia e certas substituições particulares de aminoácidos (GRYNBERG et al., 2007).

Em síntese, nossos resultados sugerem que um possível mecanismo imune envolvido na anemia pode ser a participação de anticorpos específicos para a PvMSP-3 $\alpha$ , que podem



opsonizar ou ativar a lise mediada pelo complemento, acelerando a destruição de eritrócitos normais. Essas observações, caso confirmadas por ensaios biológicos *in vitro*, poderão acrescentar informações importantes para a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na malária vivax e, conseqüentemente, ter implicações para o desenvolvimento de futuras medidas de intervenção.

## 7. CONCLUSÕES

- A PvMSP-1<sub>19</sub> é uma proteína altamente imunogênica, uma vez que foi reconhecida por 88,9% da população de estudo.
- A PvMSP-3 $\alpha$  é uma proteína parcialmente imunogênica, uma vez que foi reconhecida por 58,4% da população de estudo.
- A exposição é um fator importante para a aquisição de uma imunidade humoral na malária provocada por *P. vivax* em região endêmica.
- O perfil de resposta predominante para a PvMSP-1<sub>19</sub> foi IgG1.
- Imunoglobulinas das subclasses IgG1 e IgG2 predominaram para a PvMSP-3 $\alpha$ .
- Indivíduos anêmicos apresentaram maiores níveis de anticorpos IgG para a PvMSP-3 $\alpha$ , quando comparados a pacientes não anêmicos.
- Três combinações de subclasses representaram os padrões de resposta predominantes nessa população: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti- PvMSP-3 $\alpha$ ; IgG1 e IgG4 anti- PvMSP-1<sub>19</sub> e, por último, IgG2 e IgG3 anti- PvMSP-1<sub>19</sub>.
- A diminuição nos níveis de hemoglobina foi associada a um aumento nos níveis de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti- PvMSP-3 $\alpha$ .
- Pacientes anêmicos apresentaram níveis maiores de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti- PvMSP-3 $\alpha$ .

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI H & WILLIAMS LJ. Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews Computational Statistics*, v.2, p.433-459, 2010.

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

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

AN X & MOHANDAS N. Red cell membrane and malaria. *Transfusion Clinique et Biologique*, v.17, p.197-199, 2010.

ANSTEY NM, HANDOJO T, PAIN MCF, KENANGALEM E, TJITRA E, PRICE RN, MAGUIRE P. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *The Journal of Infectious Diseases*, v.195, p.589-596, 2007.

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

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

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

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

BARBEDO MB, RICCI R, JIMENEZ MCS, CUNHA MG, YAZDANI SS, CHITNIS CE, RODRIGUES MM, SOARES IS. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.102:335-339, 2007.

BASTOS MS, SILVA-NUNES M, MALAFRONTA RS, HOFFMAN EHE, WUNDERLICH G, MORAES SL, FERREIRA MU. Antigenic polymorphism and naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in rural amazonians. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.14, p. 1249-1259, 2007.

BLACKMAN MJ, HEIDRICH H, DONACHIE S, MCBRIDE JS, HOLDER AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *Journal of Experimental Medicine*, v.172, p.379-382, 1990.

BLACKMAN MJ, SCOTT-FINNIGAN TJ, SHAI S, HOLDER A. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. *Journal of Experimental. Medicine*, v.180, p.389-393, 1994.

BOUHAROUN-TAYOUN H & DRUILHE P. Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.87, p.229-234, 1992.

BRAGA EM, BARROS RM, REIS TA, FONTES CJF, MORAIS CG, MARTINS MS, KRETTLI AU. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the brazilian amazon region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.66, p.461-466, 2002.

BRANCH OH, UDHAYAKUMAR V, HIGHTOWER AW, OLOO AJ, HAWLEY WA, NAHLEN BL, BLOLAND PB, KASLOW DC, LAL AA. A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kilodalton domain of

*Plasmodium falciparum* in pregnant woman and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.58, p.211-219, 1998.

BRUCE MC, GALINSKI MR, BARNWELL JW, SNOUNOU G, DAY KP. Polymorphism at the merozoite surface protein-3 $\alpha$  locus of *Plasmodium vivax*: global and local diversity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.61, p.518-525, 1999.

CAMARGO LM, FERREIRA MU, KRIEGER H, CAMARGO EP, da SILVA LP. Unstable hypoendemic malaria in Rondônia (estern Amazon region, Brazil: epidemic outbreaks and work-associated incidence in na agro-industrial rural settlement. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 51, p.16-25, 1994.

CAVANAGH DR, DODOO D, HVIID L, KURTZHALS JA, THEANDER TG, AKANMORI BD, POLLEY S, CONWAY DJ, KORAM K, MCBRIDE JS. Antibodies to the N-terminal Block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are associated with protection against clinical malaria. *Infection and Immunity*, v.72, p.6492-6502, 2004.

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.

CONWAY D, CAVANAGH DR, TANABE K, ROPER C, MIKES ZS, SAKIHAMA N, BOJANG KA, ODUOLA AMJ, KREMSNER PG, ARNOT DE, GREENWOOD BM, MCBRIDE J. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nature Medicine*, v.6, p.689-692, 2000.

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

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

CRISTIANO FA, PÉREZ MA, NICHOLLS RS, GUERRA AP. Polymorphism in the *Plasmodium vivax* msp3 $\alpha$  gene in field samples from Tierralta, Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.103, p.493-496, 2008.

CUNHA MG. Resposta imune contra proteínas recombinantes correspondentes a antígenos de superfície de merozoítas de *Plasmodium vivax*: ênfase ao desenvolvimento de uma vacina contra malária. 2000. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

DEL PORTILLO HA, LONGACRE S, KHOURI E, DAVID PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,. v.88, p.4030-4034, 1991.

DODOO D, AIKINS A, KUSI KA, LAMPTEY H, REMARQUE E, MILLIGAN P, BOSOMPRAH S, CHILENGI R, OSEI YD, AKANMORI BD, THEISEN M. Cohort of the association of antibody levels to AMA-1, MSP11 $\alpha$ , MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. *Malaria Journal*, v.7, p.1-11, 2008.

ECHEVERRI M, TOBÓN A, ÁLVAREZ G, CARMONA J, BLAIR S. Clinical and laboratory findings of *Plasmodium vivax* malaria in Colômbia, 2001. *Revista do Insituto de Medicina Tropical*, 45, p.29-34, 2003.

EGAN AF, BURGHAUS P, DRUILHE P, HOLDER AA, RILEY E. Human antibodies to the 19 kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro. *Parasite Immunology*, v.21, p.133-139, 1999.

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

ELLIS RD, FAY MP, SAGARA I, DICKO A, MIURA K, GUINDO MA, GUINDO A, SISSOKO MS, DOUMBO OK, DIALLO D. Anaemia in a phase 2 study of a blood stage falciparum malaria vaccine. *Malaria Journal*, v.10, doi:10.1186/1475-2875-10-13, 2011.

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

FERNANDEZ-BECERRA C, SANZ S, BRUCET M, STANISIC DI, ALVES PF, CAMARGO EP, ALONSO PL, MUELLER I, DEL PORTILLO HA. Naturally-acquired humoral immune responses against the N- and C-termini of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay. *Malaria Journal*, v.9, p.29e, 2010.

FERREIRA MU, NUNES MS, WUNDERLICH G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.11, p.987-995, 2004.

GALINSKI MR, CORREDOR-MEDINA C, POVOA M, CROSBY J, INGRAVALLO P, BARNWELL JW. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in an alanine-rich central domain. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.101, p.131-147, 1999.

GALINSKI MR, INGRAVALLO P, CORREDOR-MEDINA C, AL-KHEDERY B, POVOA M, BARNWELL JW. *Plasmodium vivax* merozoite surface proteins-3 $\beta$  and 3- $\gamma$  share structural similarities with P. vivax merozoite surface protein-3 $\alpha$  and define a new gene family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.115, p.41-53, 2001.

GHOSH K & GHOSH K. Pathogenesis of anemia in malaria: a concise review. *Parasitology Research*, v.101, p.1463-1469, 2007.

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

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

GOEL VK, LI X, CHEN H, LIU S, CHISHTI AH, OH SS. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion in erythrocytes. *PNAS*, v.100, p.5164-5169, 2003.

GONDEAU C, CORRADIN G, HEITZ F, LE PEUCH C, BALBO A, SCHUCK P, KAJAVA AV. The C-terminal domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 self-assembles into  $\alpha$ -helical coiled coil tetramer. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.165, p.153-161, 2009.

GOOD MF. Towards a blood-stage vaccine for malaria: are we following all the leads? *Nature Reviews*, v.1, p.117-125, 2001.

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

GRYNBERG P, FONTES CJF, BRAGA EM. Association between particular polymorphic residues on apical membrane antigen 1 (AMA-1) and platelet levels in patients with vivax malaria. *Clinical Microbiology and Infection*, v.13, p.1089-1094, 2007.

GUADAGNOLI E & VELICER WF. Relation of sample size to the stability of component patterns. *Psychological Bulletin*, v.103, p.265-275, 1988.

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.

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.



HISAEDA H, SAUL A, REECE JJ, KENNEDY MC, LONG CA, MILLER LH, STOWERS A. Merozoite surface protein 3 and protection against malaria in *Aotus nancymai* monkeys. *The Journal of infectious Diseases*, v.185, p.657-664, 2002.

HOLDER AA, BLACKMAN MJ, BURGHAUS PA, CHAPPEL JA, LING IT, MCCALLUM-DEIGHTON N, SHAI S. A malaria merozoite surface protein (MSP!)-structure, processing and function. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.87, p.37-42, 1992.

HOLDER AA, RILEY EM. Human immune response to MSP-1. *Parasitology Today*, v.12, p.173-174, 1996.

HUI GS, NIKAIIDO C, HASHIRO C, KASLOW DC, COLLINS WE. Dominance of conserved B-cell epitopes of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein, MSP1, in blood-stage infections of naïve *Aotus* monkeys. *Infection and Immunity*, v.64, p.1502-1509, 1996.

ISHINO T, YANON K, CHINZEI Y, YUDA M. Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS Biology*, v.2, p.0077-0084, 2004.

JAFARSHAD A, DZIEGIEL MH, LUNDQUIST R, NIELSEN LK, SINGH S, DRUILHE PL. A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes Fc {gamma} RII and Fc {gamma} RIII. *The journal of Immunology*, v.178, p.3099-3106, 2007.

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.

JEAMWATTANALERT P, MAHAKUNKIJCHAROEN Y, KITTIGUL L, MAHANNOP P, PICHYANGKUL S, HIRUNPETCHARAT. Long-lasting protective immune response to the 19-kilodalton carboxy-terminal fragment *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 1 in mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.14, p.342-347, 2007

JIMENEZ MCS, RAMOS CHI, BARBOSA JARG, GALINSKI MR, BARNWELL JW, RODRIGUES MM, SOARES IS. Biophysical characterization of the recombinant merozoite surface protein-3 of *Plasmodium vivax*. *Biochimica et Biophysica*, v.1780, p.983-988, 2008.

JOLLIFE IT. Principal component analysis, 2nd ed. Springer, New York, NY.

KAI OK & ROBERTS DJ. The pathophysiology of malarial anaemia: where have all the red cells gone? *BMC Medicine*, v.6, p. 2-4, 2008.

KARIUKI MM, LI X, YAMODO I, CHISTI AH, OH SS. Two *Plasmodium falciparum* merozoite proteins binding to erythrocyte band 3 form a direct complex. *Biochemical and biophysical Research Communications*, v.338, p.1690-1695, 2005.

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

KELTON JG, KEYSTONE J, MOORE J, DENOMME G, TOZMAN E, GLYNN M, NEAME PB, GAULDIE J, JENSEN J. Immune-mediated thrombocytopenia of malaria. *The Journal of Clinical Investigation*, v.71, p.832-836, 1983.

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

KONING-WARD TF, O'DONELL RA, DREW DR, THOMSON R, SPEED TP, CRABB BS. A new rodent model to assess blood stage immunity to the *Plasmodium falciparum* antigen merozoite surface protein 1<sub>9</sub> reveals a protective role for invasion inhibitory antibodies. *J. Exp. Med.*, v.198, p.869-875, 2003.

LACERDA MVG (2007). Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária. 2007. 395 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Faculdade de Medicina, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

LAMIKANRA AA, BROWN D, POTOENIK A, CASALS-PASCUAL C, LANGHORNE J, ROBERTS DJ. Malarial anemia: of mice and men. *Blood*, v.110, p.18-28, 2007.

LANGHORNE J, NDUNGU FM, SPONAAS A-M, MARSH K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology*, v.9, p.725-732, 2008.

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.

LEORATTI FMS, DURLACHER RR, LACERDA MVG, ALECRIM MG, FERREIRA AW, SANCHEZ MCA, MORAES SL. Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Malaria Journal*, v.7, p.1-11, 2008.

LIMA-JÚNIOR JC, JIANG J, RODRIGUES-DA-SILVA RN, BANIC DM, TRAN TM, RIBEIRO RY, MEYER VSE, DE-SIMONE SG, SANTOS F, MORENO A, BARNWELL JW, GALINSKI MR, OLIVEIRA-FERREIRA J. B cell epitope mapping and characterization of naturally acquired antibodies to the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-3 $\alpha$  (PvMSP-3 $\alpha$ ) in malaria exposed individuals from Brazilian Amazon. *Vaccine*, doi:10.1016/j.vaccine.2010.12.099.

LING IT, OGUN AS, HOLDER AA. Immunization against malaria with a recombinant protein. *Parasite Immunology*, v.16, p.63-67, 1994.

MALKIN E, LONG CA, STOWERS AW, ZOU L, SINGH S, MACDONALD NJ, NARUM DL, MILES AP, ORCUTT AC, MURATOVA O, MORETZ SE, ZHOU H, DIOUF A, FAY M, TIERNEY E, LEESE P, MAHANTY S, MILLER LH, SAUL A, MARTIN LB. Phase 1 study of two merozoite surface protein 1 (MSP142) vaccines for *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Clinical Trials*, v.2, e12.doi:10.1371/journal.pctr.0020012, 2007.

MC COLL DJ, ANDERS RF. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.90, p.21-31, 1997.

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

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

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

MILLS KE, PEARCE JA, CRABB BS, COWMAN AF. Truncation of merozoite surface protein 3 disrupts its trafficking and that of acidic-basic repeat protein to the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Molecular Microbiology*, v.48, p.1401-1411, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da malária no Brasil. 2008. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder\\_malaria\\_2008\\_final.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf)> Acesso em: 21 jan 2010 às 13:58 horas.

MITCHELL GH, THOMAS AW, MARGOS G, DLUZEWSKI AR, BANNISTER LH. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infection and Immunity*, v.72, p.154-158, 2004.

MORAIS CG, SOARES IS, CARVALHO LH, FONTES CJF, KRETTLI AU, BRAGA EM. IgG isotype to C-terminal 19kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. *Parasitology Research*, v.95, p.420-426, 2005.

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

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

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

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.

MULHERN TD, HOWLETT GJ, REID GE, SIMPSON RJ, McCOLL DJ, ANDERS RF, NORTON RS. Solution structure of a polypeptide containing four heptad repeat units from a merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry*, v.34, p.3479-3491, 1995.

NOGUEIRA PA, ALVES FP, FERNANDEZ-BECERRA C, PEIN O, SANTOS NR, SILVA LHP, CAMARGO EP, DEL PORTILLO HA. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. *Infection and Immunity*, v.74, p.2726-2733, 2006.

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

OEUVRAY C, BOUHAROUN-TAYOUN H, GRASS-MASSE H, BOTTIUS E, KAIDOH T, AIKAWA M, FILGUEIRA M, TARTAR A, DRUILHE P. Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood*, v.84, p.1594-1602, 1994a.

OEUVRAY C, BOUHAROUN-TAYOUN H, GRASS-MASSE H, LEPERS JP, RALAMBORANTO L, TARTAR A, DRUILHE P. A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.89, p.77-80, 1994b.

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

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

OMS. Organização Mundial da Saúde. World Malaria Report 2010. Disponível em: < [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106_eng.pdf)>. Acesso em: 09 fev 2010.

OSIER FHA, POLLEY SD, MWANGI T, LOWE B, CONWAY DJ, MARSH K. Naturally acquired antibodies to polymorphic and conserved epitopes of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3. *Parasite immunology*, v.29, p.387-394, 2007.

PEARCE JA, MILLS K, TRIGLIA T, COWMAN AF, ANDERS RF. Characterization of two novel proteins from the asexual stage of *Plasmodium falciparum*, H101 and H103. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.139, p.141-151, 2005.

PIZARRO JC, CHITARRA V, VERGER D, HOLM I, PÊTRES S, DARTEVELLE S, NATO F, LONGACRE S, BENTLEY GA. Crystal structure of a Fab complex formed with PfMSP1-19, the C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*: a malaria vaccine candidate. *Journal of Molecular Biology.*, v.328, p.1091-1103, 2003.

PRAJAPATI SK, JOSHI H, VALECHA N. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 $\alpha$ : a high-resolution marker for genetic diversity studies. *Journal of Vector Borne Diseases*, v.47, p.85-90, 2010.

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.

PUTAPORNTIP C, JONGWUTIWES S, SAKIHAMA N, FERREIRA MU, KHO W, KANEKO A, KANBARA H, HATTORI T, TANABE K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *PNAS*, v.99, p.16348-16353, 2002.

RAYNER JC, CORREDOR V, FELDMAN D, INGRAVALLO P, IDERABDULLAH F, GALINSKI MR, BARNWELL JW. Extensive polymorphism in the *Plasmodium vivax* merozoite surface coat protein MSP-3 $\alpha$  is limited to specific domains. *Parasitology*, v.125, p.393-405, 2002.

RICHARDS JS & BEESON JG. The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunology and Cell Biology*, v.87, p.377-390, 2009.

RODRÍGUEZ LE, CURTIDOR H, OCAMPO M, GARCIA J, PUENTES A, VALBUENA J, VERA R, LÓPEZ R, PATARROYO ME. Identifying *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 3 (MSP3) protein peptides that bind specifically to erythrocytes and inhibit merozoite invasion. *Protein Science*, v.14, p.1778-1786, 2005.

ROUSSILHON C, OEVRAY C, MULLER-GRAF C, TALL A, ROGIER C, TRAPE J-F, THEISEN M, BALDE A, PÉRIGNON J-L, DRUILHE P. Long-term clinical protection from falciparum malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. *PloS Medicine*, v.4, p.e320, 2007.

SABCHAREON A, BURNOUF T, QUATTARA D, ATTANATH P, BOUHAROUN-TAYOUN H, CHANTAVANICH P, FOUCAULT C, CHONQSUPHAJASIDDHI T, DRUILHE P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.45, p.297-308, 1991.

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

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

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

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

SINGH S, SOE S, MEJIA J-P, ROUSSILHON C, THEISEN M, CORRADIN G, DRUILHE P. Identification of a conserved region of *Plasmodium falciparum* MSP3 targeted by biologically active antibodies to improve vaccine design. *The Journal of Infectious Diseases*, v.190, p.1010-1018, 2004.

SNOW RW, GUERRA CA, NOOR AM, MYINT HY, HAY SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, v.434, p.214-217, 2005.

SOARES IS, BARNWELL JW, FERREIRA MU, CUNHA MG, LAURINO JP, CASTILHO BA, RODRIGUES MM. A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. *Molecular Medicine*, v.5, p.459-470, 1999a.

SOARES IS & RODRIGUES MM. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*. *Parasitology*, V.124, P.237-46, 2002.

SOARES IS, OLIVEIRA SG, SOUZA JM, RODRIGUES MM. Antibody responses to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Tropica*, v.72, p.13-24, 1999b.

SOLDATI D, FOTH BJ, COWMAN AF. Molecular and functional aspects of parasite invasion. *TRENDS in Parasitology*, v.20, p.567-574, 2004.



SONG HH, O SO, KIM SH, MOON SH, KIM JB, YOON JW, KOO JR, HONG KS, LEE MG, KIM DJ, SHIN DH, KANG SH, CHOI MG, LEE KH. Clinical features of *Plasmodium vivax* malaria. *The Korean Journal of Internal Medicine*, v.18, p.220-224, 2003.

STANISIC DI, RICHARDS JS, MCCALLUM FJ, MICHON P, KING CL, SCHOEPFLIN S, GILSON PR, MURPHY VJ, ANDERS RF, MUELLER I, BEESON JG. Immunoglobulin G Subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infection and Immunity*, v.77, p.1165-1174, 2009.

STERKERS Y, SCHEIDIG C, da ROCHA M, LEPOLARD C, GYSIN J, SCHERF A. Members of the low-molecular-mass rhoptry protein complex of *Plasmodium falciparum* bind to the surface of normal erythrocytes. *The Journal of Infectious Diseases*, v.196, p. 617-621, 2007.

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.

ROUSSILHON C, OEUVRAY C, MULLER-GRAF C, TALL A, ROGIER C, TRAPE J, THEISEN M, BALDE A, PÉRIGNON J, DRUILHE P. Long-term clinical protection from falciparum malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. *PLoS Medicine*, v.4, p.1791-1803, 2007.

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

WINTER G & WAHLGREN M. Severe anemia in malaria: defense gone wrong? *Blood*, v.106, p.3337-3338, 2005.

WILSON S, JONES FM, MWATHA JK, KIMANI G, BOOTH M, KARIUKI HC, VENNERVALD BJ, OUMA JH, MUCHIRI E, DUNNE D. Hepatosplenomegaly is associated with low regulatory and Th2 responses to schistosome antigens in childhood schistosomiasis and malaria coinfection. *Infection and Immunity*, v.76, p.2212-2218, 2008.

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

YANG C, COLLINS WE, SULLIVAN JS, KASLOW DC, XIAO L, LAL A. Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in *Saimiri* monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. *Infection and Immunity*, v.67, p.342-349, 1999.

ZEYREK FY, BABAÖGLU A, DEMIREL S, ERDOĞAN DD, AK M, KORKMAZ M, COBAN C. Short report: analysis of naturally acquired antibody responses to the 19-kd C-terminal region of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* from individuals in Sanliurfa, Turkey. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.78, p.729-732, 2008.

## 9. ANEXO

Questionário padrão aplicado aos pacientes que foram atendidos nos ambulatórios do Hospital Júlio Miller, em Cuiabá (MT), e na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (AM).

PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO DE TRATAMENTO DE PACIENTES COM MALÁRIA - HJUM			
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		
Febre nos últimos 7 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Artralgia <input type="checkbox"/> Epigastralgia		
Febre nos últimos 30 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> Tontura <input type="checkbox"/> Náusea <input type="checkbox"/> Vômito <input type="checkbox"/> Fraqueza		
	<input type="checkbox"/> Hiporexia <input type="checkbox"/> Colúria		
	Temperatura axilar se tiver com febre hoje:		
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	