

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E RECONHECIMENTO IMUNE DE PROTEÍNAS DE  
SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTOS DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* (MSP-1 e  
MSP-2) EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS À MALÁRIA NO BRASIL**

**Kézia Katiani Gorza Scopel**

**Mai/2007**

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E RECONHECIMENTO IMUNE DE PROTEÍNAS DE  
SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTOS DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* (MSP-1 e  
MSP-2) EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS À MALÁRIA NO BRASIL**

**Tese de Doutorado apresentado ao Programa de  
Pós-Graduação em Parasitologia do  
Departamento de Parasitologia da Universidade  
Federal de Minas Gerais como pré-requisito para  
obtenção do grau de Doutor em Parasitologia.**

**Orientador : Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Érika Martins Braga-ICB/UFMG**

**Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira-ICB-II/USP**

**Colaborador: Prof. Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes-FCM/UFMT**

**Kézia Katiani Gorza Scopel**

**Maio/2007**

- Trabalho realizado no Laboratório de Malária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG- Belo Horizonte-MG, e no Laboratório de Parasitologia Experimental e Aplicada do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo – USP- São Paulo- SP.
- Estudo financiando pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (CBB51/03), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (03/09719-6 e 05-51988-0) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Bolsa de Doudotado/2003 – 2007).
- Projeto aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, (ÉTIC 202/02) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ÉTIC 318/2002).

**- A Deus, meu alicerce, minha luz...meu rochedo nos momentos mais difíceis. Obrigada por estar sempre comigo e por me provar que com fé e coragem a gente chega a qualquer lugar que sonhar.**

**\*\*\***

**- Aos meus pais, Algemiro e Luzia, por tanto amor e dedicação nessa longa jornada de minha vida. Ao meu irmão Uéldson pela cumplicidade. Com vocês compartilho toda a grandeza deste momento. Eu os respeito e os amo muito!!!!**

**Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, ICB/UFMG, na pessoa do Prof. Pedro Marcos Linardi (Coordenador do Programa), os meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de realização dessa Tese de Doutorado.**

- “- Os homens do seu planeta – disse o pequeno príncipe- cultivam cinco mil rosas num mesmo jardim...e não encontram o que procuram...  
-É verdade- respondi.**
- E , no entanto, o que eles procuram poderia ser encontrado numa só rosa, ou num pouco de água...  
- -É verdade.**
- E o príncipezinho acrescentou: Mas o olhos são cegos. É preciso ver com o coração”**

*“O Pequeno Príncipe” de Antonie de Saint-Exupéry*

## ***AGRADECIMENTOS***

Dedico e agradeço a oportunidade de realização desse trabalho a três grandes pesquisadores, os quais se tornaram eternos amigos. São, inquestionavelmente, pessoas especiais que tive o privilégio de encontrar em meu caminho...

**À Prof<sup>a</sup> Érika Martins Braga pela valiosa e dedicada orientação durante o decorrer desta Tese. Obrigada, Érika, por estar comigo em todos os momentos, bons ou ruins, desta caminhada. Com você aprendi que a tranquilidade e a serenidade são ingredientes essenciais para qualquer conquista, seja ela singela ou grandiosa. Obrigada pelos conselhos, pela paciência e por tudo aquilo que com primoroso carinho e seriedade você me ensinou. Embora o que escrevo aqui não exprima em totalidade minha gratidão, deixo aqui, os meus mais sinceros e carinhosos agradecimentos a você, a quem admiro e respeito pelo exemplo de competência e entusiasmo que é.**

**Ao Prof. Marcelo Urbano Ferreira (USP), exemplo sem tamanho de ética, simplicidade, humildade, generosidade e inteligência. Obrigada por escrever parte da dessa história, por confiar em meu trabalho, pelos inumeráveis conselhos (científicos e pessoais). Obrigada também por me proporcionar à realização de um dos meus maiores desejos quanto malariologista: o de conhecer a área endêmica brasileira de malária.**

**Ao Prof. Cor Jesus Fernandes Fontes (UFMT), a quem aprendi a admirar pelo amor e dedicação incondicional à medicina, ao povo que sucumbi ao flagelo chamado Malária. Obrigada pela confiança e pelo carinho que sei que tem para comigo. Agradeço muito, Cor, por você ter confiado em meu trabalho. Isso foi fundamental para que eu pudesse chegar até aqui.**

## ***AGRADECIMENTOS***

À minha família pelos incentivos constantes e apoio nos momentos difíceis da vida.

Ao Prof. Ricardo Wagner de Almeida Victor, (Laboratório de Toxoplasmose-ICB/UFMG) por abrir as portas de seu laboratório para uso do leitor de ELISA..

Ao Prof. Alfredo Góes (Dep<sup>to</sup> de Bioquímica e Imunologia-ICB/UFMG) pelas excelentes sugestões no processo de qualificação e relatoria desse trabalho.

Ao Prof. Oscar Bruna-Romero (Dep<sup>to</sup> de Microbiologia-ICB/UFMG) pelas contribuições durante o processo de qualificação.

À Mônica da Silva-Nunes (ICB-II-USP), por compartilhar comigo sua experiência em malária. Serei eternamente grata a você por tudo que me ensinou durante o curto período que passamos juntas no Acre.

Ao Dr. David Cavanagh (University of Edinburg, Londres) e ao Dr. David Kaslow (USDA) por ter-nos cedido os antígenos recombinantes que integram os blocos 2 e 17 da PfMSP-1, respectivamente.

Aos garimpeiros de Apiacás-MT (onde quer que possam estar) por terem acreditado na Ciência tornando-se assim, alicerce desse e de outros estudos prévios.

Ao povo de Acrelândia (Acre) por tudo que me ensinaram sem precisar dizer nada.

À Sumara Aparecida, secretária do curso do Pós-Graduação em Parasitologia, pelo exemplo de competência e honestidade e ainda pelo carinho e atenção com que nos acolhe em todos os momentos de desespero.

Às amigas Cristiane G. Moraes e Tânia A Reis pelos bons momentos vividos no Laboratório de Malária, ICB/UFMG. Sinto muitas saudades de vocês!!!

Aos amigos de “luta” Nayara Bello, Rogério Guimarães, Matheus e Priscila Grynberg e Norinne Lacerda por tornarem meus dias mais agradáveis.

À amiga Lílian Lacerda Bueno..foram poucos, mas bastante agradáveis os momentos que passamos juntas no laboratório.

Aos amigos de ontem e de sempre Andrey, Viviane Vasconcelos, Cláudia Gulias Gomes, Ivoneide Maria da Silva e Cíntia Pereira. Vocês são pessoas raras e especiais. Obrigada por tornarem meus dias mais felizes e por cuidarem de mim em todos os momentos que me senti só.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia de Insetos (Dep<sup>to</sup> de Parasitologia), pelos auxílios dispensados em muitos momentos dessa tese.



Ao técnicos Márcia, Joãozinho, Mercês, Afonso, Rosálida, Edna Pires pela amizade e boa vontade em ajudar sempre.

À FAPEMIG, FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que em algum momento estiveram presentes no desenvolvimento dessa tese...

O meu muito OBRIGADA!!!!

*“Mas eu sei bem em quem creio, e estou bem certo que ELE é poderoso para guardar o meu tesouro até o dia apropriado de me entregar.”*

*São Paulo (Apóstolo)*

## **INDICE**

<b>LISTA DE FIGURAS</b> -----	12
<b>RESUMO</b> -----	13
<b>1-INTRODUÇÃO</b> -----	15
1.1- A malária: um problema global de saúde pública-----	15
1.2- A malária no Brasil: passado e presente-----	17
1.3- Ciclo de vida dos plasmódios humanos no hospedeiro vertebrado-----	21
1.4- Imunidade e malária-----	23
1.5- O perfil da imunidade adquirida contra os plasmódios humanos em áreas de transmissão intensa -----	26
1.5.1- Imunidade adquirida em regiões de baixa transmissão (hipo-mesoendêmicas): Brasil-----	30
1.6- Anticorpos contra antígenos de estágios eritrocíticos dos plasmódios-----	31
1.7- Proteínas de superfície dos merozoítos de <i>P. falciparum</i> : diversidade alélica e reconhecimento imune-----	33
1.7.1. Diversidade genética e reconhecimento imune da MSP-1-----	34
1.7.2. Diversidade genética e reconhecimento imune da MSP-2-----	37
<b>2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> -----	40
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> -----	42
3.1 – Área e população de estudo -----	42
3.1.1- População de indivíduos provenientes de Apiacás-MT-----	42
3.1.2- População de indivíduos provenientes de Acrelândia-AC-----	43
3.2-Antígenos utilizados nos ensaios imunoenzimáticos-----	45
3.2.1- Antígenos derivados da MSP-1-----	45
3.2.2- Antígenos derivados da MSP-2-----	46
3.3- ELISA para detecção de IgG e seus isotipos específicos (IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub> , IgG <sub>3</sub> e IgG <sub>4</sub> ) -----	46
3.4- Obtenção de DNA para determinação do genótipo do receptor humano de imunoglobulinas FcγRIIa e para ensaios de tipagem molecular dos genes <i>msp-1</i> e <i>msp-2</i> de <i>P. falciparum</i> -----	47
3.4.1- Obtenção de DNA genômico a partir de sangue coletado em papel filtro-----	48

3.4.2- Obtenção de DNA genômico a partir de sangue total-----	48
3.5 - Determinação do polimorfismo no receptor FcγRIIA -----	48
3.5.1- Amplificação por PCR-----	49
3.5.2- Digestão do produto da PCR com enzima de restrição-----	49
3.6 -Tipagem molecular do bloco 2 da PfMSP-1-----	50
3.7- Sequenciamento direto do bloco 2 da MSP-1-----	51
3.8 -Tipagem molecular do bloco central repetitivo da MSP-2-----	51
3.8.1- Amplificação da MSP-2 por meio de PCR dupla-----	51
3.8.2- Digestão do produto de PCR com enzima de restrição-----	52
3.9 - Análise dos Dados -----	52
<b>4- RESULTADOS-----</b>	<b>54</b>
Artigo 1-----	R1
Artigo 2-----	R2
Artigo 3 (no prelo)-----	R3
Artigo 4-----	R4
<b>5- DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS-----</b>	<b>55</b>
5.1-Diversidade genética da MSP-1 e MSP-2 de <i>P. falciparum</i> -----	56
5.2- Reconhecimento imune de MSP-1 e MSP-2 de <i>P. falciparum</i> -----	59
5.3- Anticorpos variante-específicos e malária clínica-----	64
<b>6- CONCLUSÕES-----</b>	<b>68</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----</b>	<b>70</b>

**LISTA DE FIGURAS:**

<b>FIGURA 1:</b> Distribuição geográfica e endemicidade da malária no mundo. <i>Fonte:</i> WHO (2005)-----	16
---	
<b>FIGURA 2:</b> Distribuição global do <i>P. falciparum</i> (Snow <i>et al.</i> , 2005)-----	17
----	
<b>FIGURA 3:</b> Mapas de risco para a malária nos estados da Amazônia Legal nos anos de 1999 e 2003. IPA= índice parasitário anual. <i>Fonte:</i> Ministério da Saúde, 2005-----	20
<b>FIGURA 4:</b> Mapa do estado de Mato Grosso focalizando a localização do município de Apiacás na área endêmica brasileira. Em detalhe as precárias condições de moradia e trabalho dos garimpeiros na região-----	43
-----	
<b>FIGURA 5:</b> Mapa do estado do Acre focalizando a localização do município de Acrelândia. Em detalhe as condições de moradia e trabalho (atividade agropecuária) da população na região-----	48

## **RESUMO**

Uma das características da maioria dos antígenos de estágios extracelulares dos plasmódios é a presença de regiões repetitivas contendo epitopos imunodominantes. As duas proteínas de superfície de merozoítos de *Plasmodium falciparum* candidatas à vacina, MSP-1 e MSP-2, representam exemplos desses antígenos. Em regiões de elevada endemicidade, a diversidade genética dessas proteínas tem sido descrita como fator limitante para a rápida aquisição de imunidade protetora, além de ter implicações no desenvolvimento e eficiência de vacinas. Entretanto, este tema tem sido pouco abordado em regiões de transmissão instável como as áreas endêmicas brasileiras. No presente estudo, avaliou-se a distribuição de subclasses de IgG anti-MSP-1 e anti-MSP-2 em indivíduos provenientes de duas regiões endêmicas na Amazônia brasileira, correlacionando-a à diversidade genética apresentada pelos isolados naturais de *P. falciparum*. Em indivíduos provenientes de um estudo seccional conduzido no Garimpo Satélite (Apiacás-MT), níveis similares de subclasses de IgG que reconhecem o bloco 17 conservado (PfMSP-1<sub>19</sub>) e o bloco 2 polimórfico (famílias alélicas MAD20, K1 e RO33) da MSP-1 foram observados, independente da expressão clínica da doença (sintomáticas ou assintomáticas). A associação entre o perfil de anticorpos anti-MSP-1 (blocos 2 e 17) e o tempo de exposição em área endêmica não foi observada entre os grupos de indivíduos avaliados. Sete diferentes haplótipos relacionados ao bloco 2 foram detectados entre os isolados naturais de *P. falciparum* seqüenciados, sugerindo uma limitada diversidade genética entre as populações de parasito circulantes na região. O perfil da resposta de subclasses anti-MSP2 também foi investigado. É interessante observar que uma característica marcante da resposta humoral observada para antígenos que integram a porção polimórfica da MSP-2 (bloco 3/ famílias alélicas FC27 e 3D7) foi a polarização para IgG3, também observada para antígenos do bloco 2 da MSP-1. Essa polarização parece associar-se a características inerentes aos epitopos imunogênicos, sendo pouco influenciada pelo grau de exposição à malária (tempo de exposição em área endêmica), idade e presença de infecção patente por *P. falciparum*. Outra observação interessante diz respeito à ausência de associação entre a família alélica infectante e a resposta de subclasses específicas. Uma provável explicação para este fato é a ocorrência do fenômeno imunológico denominado “*clonal imprinting*” (ou impressão clonal) no qual espera-se que freqüentes reinfecções com populações geneticamente distintas de parasitos induzam um aumento nos níveis de anticorpos preexistentes, mas não a produção de anticorpos com novas especificidades. Essa

hipótese foi testada em um estudo longitudinal conduzido entre 35 indivíduos residentes em uma comunidade rural do estado do Acre (Ramal do Granada-Acrelândia) por um período de 15 meses. A detecção dos níveis de anticorpos anti-MSP-2 antes, durante e/ou após a exposição de cada indivíduo aos parasitos locais foi avaliada durante o seguimento. No ponto inicial do estudo, 16 indivíduos não infectados mas, reportando episódios passados de malária, falharam em reconhecer três diferentes variantes antigênicas que integram a família alélica 3D7. Entretanto, durante a infecção com parasitos 3D7, seis indivíduos passaram a apresentar anticorpos família-específicos, o que contraria a idéia de ocorrência de impressão clonal. Além disso, antígenos que representam a família alélica FC27 foram predominantemente reconhecidos na linha de base do estudo (n=356), havendo expressiva reatividade cruzada de anticorpos variante-específicos que integram essa família. Ao contrário do observado para a família 3D7, os anticorpos anti-FC27 permaneceram estáveis durante o seguimento, sugerindo uma produção dependente de células T e, portanto, com indução de memória imunológica. Entretanto, esses anticorpos específicos não protegeram os indivíduos de uma nova infecção por parasitos homólogos. Nossos estudos apontam para a real necessidade de se pesquisar a resposta imune contra antígenos polimórficos candidatos à vacina antimalárica em diferentes realidades epidemiológicas.

## **INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1- A Malária: um problema global de saúde pública**

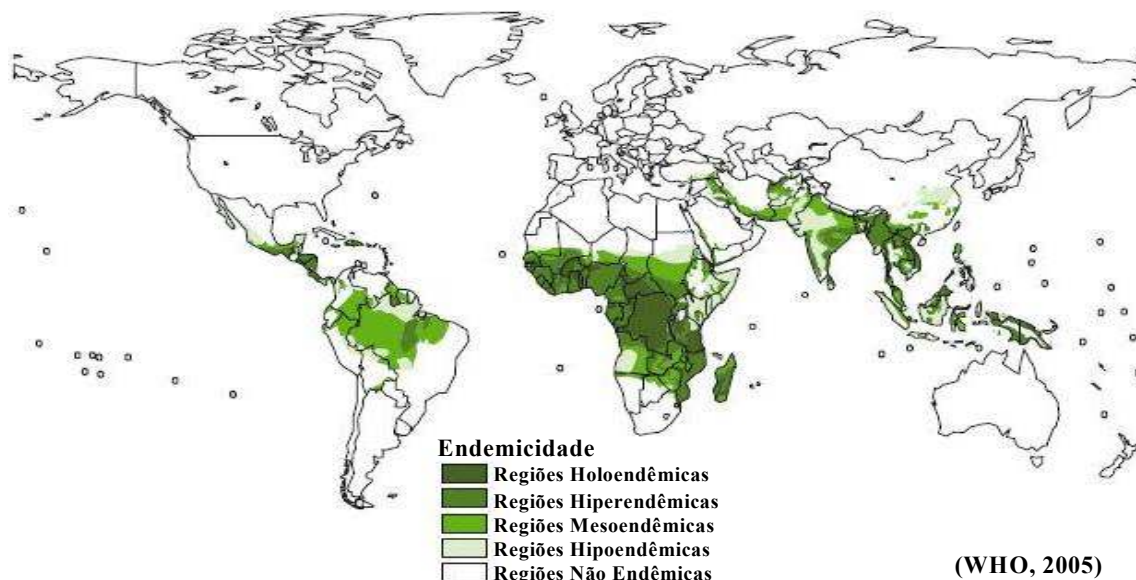
A malária humana pode ser causada por quatro espécies de plasmódios: o *Plasmodium falciparum*, o *Plasmodium vivax*, o *Plasmodium malariae* e o *Plasmodium ovale*. Conhecida popularmente como maleita, febre intermitente, paludismo, impaludismo, febre terçã ou febre quartã, a doença ocorre de forma endêmica nas regiões tropicais e subtropicais do globo, onde constitui um dos maiores problemas de saúde pública. Durante o século XX, campanhas de controle permitiram uma redução de 50% na sua distribuição global, mas aproximadamente 3 bilhões de pessoas (cerca da metade da população mundial) ainda habitam áreas de risco para a doença (Hay *et al.*, 2004). Esse número mostra-se superior a qualquer outro período da história, em particular devido ao crescimento desordenado da população humana (Hay *et al.*, 2005).

Segundo estimativas recentes, em 2001 ocorreram aproximadamente 400 milhões de casos clínicos de malária no mundo; 80% restringiram-se ao continente africano, onde cerca de 1,1 milhões de pessoas sucumbiram ao óbito (Hay *et al.*, 2004). Em sua maioria, os óbitos ocorreram entre crianças menores de 5 anos e mulheres grávidas. Os demais casos (20%) foram distribuídos entre o Sudeste Asiático, a América Latina e a Oceania (**Figura 1**). A transmissão da doença não ocorre de forma homogênea, havendo regiões com menor (regiões hipo-mesoendêmicas) e maior (hiper-holoendêmicas) risco de infecção (**Figura 1**).

Haja vista o crescente número de casos da doença registrados até meados dos anos 90, sobretudo nos países da África Subsaariana, em 1998 a OMS, em aliança com o Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas (UNDP), com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e com o Banco Mundial, lançou um programa global de combate à malária, o *Roll Back Malária* (RBM). Com o objetivo ambicioso de reduzir a morbidade e a mortalidade causada pela malária em 50% até o ano 2010, a OMS conta com o engajamento sólido dos setores de saúde, entidades governamentais e não governamentais, instituições de pesquisa, organizações privadas e comunidades afetadas. Dessa forma, busca-se o rápido acesso do indivíduo ao tratamento, principalmente crianças e mulheres grávidas, além de estratégias que dificultem o contato entre o vetor e hospedeiro vertebrado, como o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas residuais (RBM, 2002).

Embora em algumas regiões a negligência, por parte dos governos atuais, cause a deterioração das operações de prevenção e controle da doença, permitindo o reaparecimento

da doença em locais onde a mesma já havia sido considerada erradicada, (como na Coreia e no Tajiquistão), bons resultados vêm sendo alcançados desde a implantação do RBM (WHO, 2000).



**Figura 1: Distribuição geográfica e endemicidade da malária no mundo. Fonte: WHO (2005).**

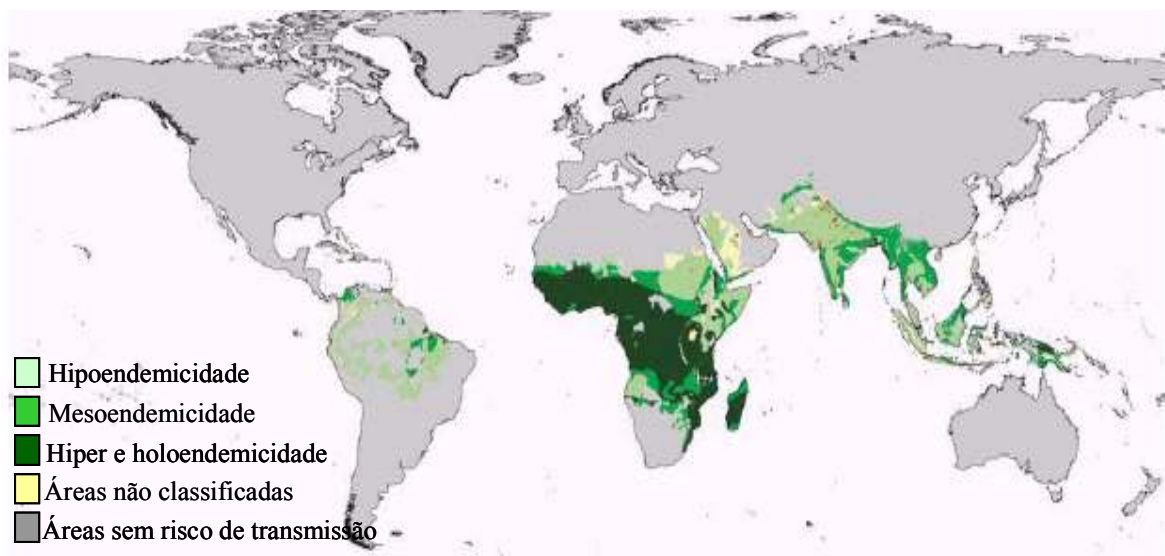
Considerada um dos maiores flagelos da humanidade devido, sobretudo, às alarmantes taxas de morbi-mortalidade, a malária constitui também um sério obstáculo para o desenvolvimento econômico das nações onde ocorre (Saches & Malaney, 2002). Assim, a elevada ocorrência de malária importada observada nos últimos anos tem posto em alerta autoridades governamentais em muitos países desenvolvidos (WHO, 2000).

Dentre as espécies de plasmódios capazes de infectar o homem, o *P. falciparum* e o *P. vivax* são as mais comuns. Contudo, enquanto o *P. vivax* é raramente fatal, o *P. falciparum* é altamente virulento, sendo capaz de causar a forma grave da doença. Esta espécie é associada a mais de 95% dos óbitos por malária registrados anualmente em todo o mundo (WHO, 2005). Segundo estimativas recentes, no ano de 2005 cerca de 3,5 bilhões de pessoas habitavam zonas de risco para essa espécie (**Figura 2**). Surpreendentemente, 75% deste total residiam em apenas dez países endêmicos (Guerra *et al.*, 2006).

Diante das estimativas alarmantes relativas a distribuição da malária no mundo, os chamados mapas de risco tornaram-se essenciais por permitirem uma melhor e mais rápida articulação das estratégias preconizadas para combate à doença. Até recentemente, os limites espaciais das áreas de risco de malária não se encontravam definidos e compreendidos, sendo delineados somente a partir do ano de 2002, com base em informações disponibilizadas pela



OMS (Hay *et al.*, 2004). Contudo, detalhes de como esses limites foram construídos não estão claros. Recentemente, estudos minuciosos reunindo características epidemiológicas, geográficas e demográficas da malária e da população humana têm permitido traçar interessantes perfis da distribuição de *P. falciparum* e *P. vivax* em todo o mundo (Snow *et al.*, 2005; Guerra *et al.*; 2006). Esses estudos permitiram estimar, em 2002, cerca de 515 (300-660) milhões de casos clínicos de malárias atribuídos ao *P. falciparum* em todo mundo. Além disso, cerca de 2,5 bilhões de pessoas encontravam-se sob risco de infecção. Essas pesquisas sugerem, ainda, que 70% do total dos casos distribuíram-se entre os países da África; 25% entre a população do leste asiático e 5% nas demais regiões endêmicas do globo (Snow *et al.*, 2005). Se esses dados estiverem corretos, a distribuição global dessa espécie, baseada nas informações cedidas pela OMS, encontra-se subestimada, sendo, pelo menos, um terço maior que o previamente proposto para as regiões fora do continente africano. Para o Brasil, a estimativa de casos é três vezes maior que aquela proposta pela OMS (Snow *et al.*, 2005).



**Figura 2: Distribuição global do *P. falciparum* (Snow *et al.*, 2005)**

### ***1.2-A malária no Brasil: passado e presente***

No Brasil, a malária alcançou seu auge no início do século XX, quando todo o território nacional encontrava-se acometido pela doença. Nessa época, a doença se firmou como um dos mais importantes agravos à saúde (Camargo, 2003).

Historicamente, grandes surtos epidêmicos da doença foram registrados na área endêmica brasileira. A primeira grande epidemia, ocorrida no final do século XIX, deu-se em

função da migração maciça de indivíduos nordestinos para a Amazônia, atraídos pelo sonho de riqueza imediata durante o “Império” da borracha. Naquela época, o Brasil comprometeu-se em construir a estrada de Ferro Madeira-Mamoré (mais tarde conhecida como “Ferrovia do Diabo”) com a finalidade de dar vazão à estrondosa produção de látex produzido na Bolívia. Durante a construção dessa ferrovia que ligaria as cidades de Santo Antônio a Guajará-Mirim, em Rondônia, explodiu a segunda grande epidemia brasileira de malária, durante a qual milhares de pessoas contraíram a infecção e chegaram ao óbito (Camargo, 2003).

Outro grande surto ocorreu nos anos 30, quando o *Anopheles gambiae*, principal vetor da malária humana no continente africano, foi introduzido no Brasil, mais precisamente no estado do Rio Grande do Norte. Em apenas dois anos após sua introdução, o número de casos de malária aumentou 12 vezes naquele estado, alcançando a dimensão de 10 mil casos em uma população de cerca de 12 mil habitantes. No final da década de 30, o mosquito havia invadido também outras regiões nordestinas. Com uma intensiva ação de controle proporcionada pelos serviços de saúde, baseada principalmente na eliminação de criadouros com aplicações de larvicidas, o *An gambiae* foi considerado erradicado do Brasil na década de 40. Esse é o único exemplo de sucesso, em caráter mundial, de erradicação de um vetor nocivo. Cabe ressaltar, contudo, que alguns fatores contribuíram para que esse sucesso fosse alcançado, como o fato de se tratar de uma espécie importada ainda não adaptada e, portanto, vulnerável às ações de controle estabelecidas (Camargo, 2003).

Após a segunda Guerra Mundial, com o surgimento de inseticidas de ação residual (DDT) e com base nos conhecimentos adquiridos sobre o comportamento dos mosquitos vetores, os quais apresentavam atividade no interior dos domicílios repousando sobre as paredes após o repasto sanguíneo, a OMS lançou, em 1957, as bases para a Campanha de Erradicação da Malária. Essa campanha teve como pilares o uso de inseticidas de ação residual, o tratamento dos indivíduos acometidos e a melhoria das condições sanitárias. Como consequência, em meados dos anos 70, observou-se um acentuado declínio no número de casos em muitos países da Europa e em outros países, como o Brasil, onde a malária tornou-se pontual, sendo sucumbida à Amazônia Legal (CENEP/FUNASA/MS, 1999; Camargo, 2003). Dentre as várias razões de ordem social e ambiental que podem explicar o caráter geográfico restrito da doença no Brasil, merecem destaque as características climático-ambientais e as formas de vida da população, as quais dificultam que medidas tradicionais de controle, como o uso de inseticidas de ação residual e de proteção individual contra o mosquito vetor, sejam eficazes nessas regiões (MacGreevy, 1989).

A partir de 1970 a prevalência de malária na Amazônia Legal voltou a aumentar, ultrapassando os 50.000 casos registrados naquele ano e atingindo mais de 630.000 em 1999 (Ministério da Saúde, MS, 2000). Dentre as várias razões que contribuíram para essa tragédia social podem ser destacados os incentivos às atividades econômicas locais, que incluem a agricultura, as atividades profissionais ligadas aos desmatamentos, a construção de estradas, a extração de madeira e a mineração ao longo das margens da floresta, influenciando o padrão de migração humana. Esse aumento na prevalência da doença também pode ser atribuído à seleção de cepas de parasitos, principalmente de *P. falciparum*, resistentes a drogas antimaláricas. Casos de resistência à cloroquina vêm sendo verificados desde a década de 60 e 70, na América Latina, e desde a década de 80 em várias regiões do sudeste asiático. Hoje, no Brasil, a resistência do *P. falciparum* a cloroquina é de 100% (Alecrim *et al.*, 1982; Marques *et al.*, 1993). Além disso, casos de *P. vivax* resistente à cloroquina e à mefloquina já foram relatados na região Amazônica (Alecrim *et al.*, 1999).

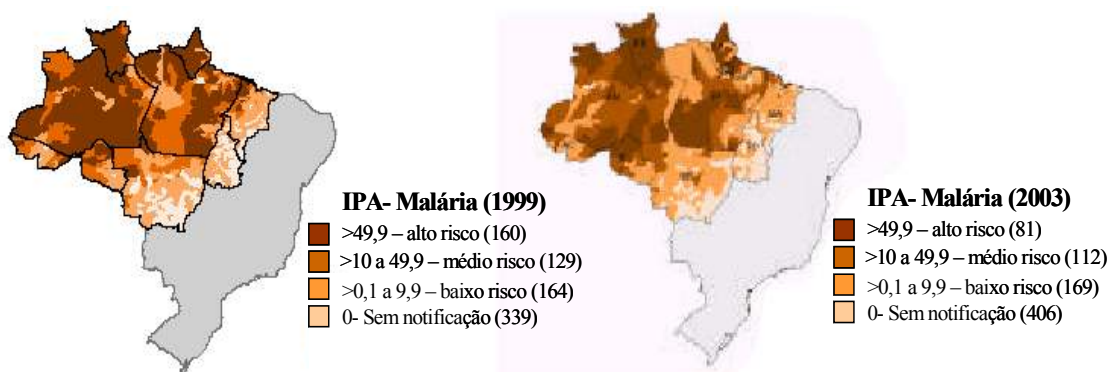
Atualmente, cerca de 80% dos casos de malária detectados anualmente no Brasil são atribuídos ao *P. vivax*. Contudo, é preocupante a ascensão dos casos de malária por *P. falciparum*, o que favorece a ocorrência da doença nas suas formas graves, podendo ocasionar óbitos. De 1999 a 2005, a proporção de malária falciparum aumentou de 18,6% para 25,7%, colocando em alerta muitos municípios (MS, 2006).

Em virtude do alarmante número de casos registrados em 1999 (637.470), o Ministério da Saúde (MS) lançou, no ano 2000, um importante plano de intensificação das ações de controle de malária (PIACM) para a Amazônia Legal. Com o objetivo de reduzir a incidência da doença, evitar o surgimento de epidemias localizadas e reduzir a gravidade das infecções, as medidas preconizadas priorizaram municípios com índice parasitário anual (IPA) maior que 49,9 (responsáveis por 80% dos casos da doença na região), além daqueles com prevalência de malária falciparum maior que 20%. Graças a essa estratégia, baseada principalmente no diagnóstico e no tratamento imediato das infecções, a redução do número de casos de malária da Amazônia Legal em 2001 chegou a 39% (389.737) em relação ao ano de 1999. Em 2002 foram registrados cerca de 300 mil casos, o que representou uma redução de cerca de 53% em relação a 1999. Estima-se, portanto, que tenham sido evitados 1,5 milhões de casos novos da doença entre os anos de 2000 a 2002 (FUNASA, 2003; MS, 2005).

Apesar da redução no número de notificações ter sido mantida até 2002, uma elevação expressiva nesse número foi observada na maior parte dos estados que compõem a Amazônia Legal (exceção para os estados do Pará e Tocantins, nos quais o número de casos decresceu),

perfazendo um total de 459 mil notificações em 2004. Embora isso reflita a fragilidade e as dificuldades de manutenção das estratégias preconizadas, o perfil epidemiológico da malária no Brasil, após a implantação do PIACM, mostrou-se animador, havendo considerável redução no número de municípios com alto e médio risco de infecção (MS, 2005). De qualquer forma, a heterogeneidade na distribuição da doença na região amazônica, com áreas de alta, média e baixa endemicidade, além do acesso restrito a algumas dessas regiões, exigem adequações imediatas das estratégias de controle.

Outro ponto que merece atenção é o surgimento de surtos epidêmicos na região extra-amazônica. A ocorrência de malária em locais normalmente livres de transmissão tem se associado ao intenso fluxo migratório de indivíduos à região amazônica. É o caso dos surtos registrados recentemente em Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Paraná, Rio de Janeiro e Mato Grosso. Como características comuns, esses estados reúnem condições favoráveis ao estabelecimento e manutenção da transmissão, como população susceptível e presença do vetor, além de boas condições ecológicas, geográficas e econômicas para o estabelecimento do foco malarígeno (MS, 2005).



**Figura. 3: Mapas de risco para a malária nos estados da Amazônia Legal nos anos de 1999 e 2003. IPA = índice parasitário anual. Fonte: Ministério da Saúde, 2005.**

Em decorrência da crescente resistência desenvolvida pelos plasmódios aos medicamentos usuais e do elevado número de casos graves e óbitos registrados anualmente, grandes esforços têm sido centrados no desenvolvimento de uma vacina efetiva em âmbito mundial. Contudo, apesar dos espetaculares avanços tecnológicos verificados durante o século passado, o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra os plasmódios não foi obtido. Esse insucesso deve-se, pelo menos em parte, ao limitado entendimento sobre a biologia do

parasito, sua interação com o homem e sua capacidade de evasão das respostas imunológicas montadas pelo hospedeiro. Isso deixa claro que controlar ou erradicar a transmissão de malária, principalmente nos países em desenvolvimento, continua sendo um grande desafio e um projeto a longo prazo.

### ***1.3- Ciclo de vida dos plasmódios humanos no hospedeiro vertebrado***

A transmissão natural da malária humana ocorre quando fêmeas de mosquitos anofelinos inoculam no hospedeiro vertebrado, durante seu repasto sanguíneo, as formas infectantes do parasito, denominadas esporozoítos. Embora os esporozoítos possam ser injetados diretamente nos capilares sanguíneos do hospedeiro, a maior parte deles é inoculada no tecido subcutâneo (Vanderberg & Frevert, 2004; Amino *et al.*, 2006; revisto por Prudêncio *et al.*, 2006). Utilizando a técnica de microscopia intravital, um estudo recente com plasmódio de roedores (*Plasmodium berghei*) demonstrou que apenas uma proporção dos esporozoítos inoculados na derme invade os capilares sanguíneos, sendo os demais drenados pelos vasos linfáticos (Amino *et al.*, 2006). Somente aqueles que penetram nos capilares chegam aos hepatócitos iniciando o ciclo exo-eritrocítico da doença (Vanderberg & Frevert, 2004; Amino *et al.*, 2006). Os parasitos drenados pelos vasos linfáticos são retidos próximo ao linfonodo proximal, onde são fagocitados e degradados pelas células dendríticas. Alguns podem, contudo, desenvolver-se parcialmente em formas exoeritrocíticas semelhante àquelas observadas nos hepatócitos antes de serem degradados (Amino *et al.*, 2006).

Ainda não está claro o mecanismo através do qual os esporozoítos passam dos capilares sinusóides do fígado para os hepatócitos. Várias possibilidades são aventadas, dentre elas: (i) os esporozoítos utilizariam células fagocitárias de Kupffer ou (ii) células endoteliais dos vasos sanguíneos (Vanderberg *et al.*, 1990). Recentemente foi demonstrado, por meio de experimentos “*in vitro*” e “*in vivo*”, que esporozoítos de *P. berghei* e *Plasmodium yoelii* reconhecem e invadem ativamente as células de Kupffer (CK) por um mecanismo de invaginação da membrana com conseqüente formação de um vacúolo parasitóforo (Pradel & Frevert, 2001). Essas células permitem que os esporozoítos ultrapassem barreiras como os sinusóides do fígado antes de infectar os hepatócitos. Já outros experimentos “*in vitro*” e “*in vivo*” demonstraram que os esporozoítos de *P. yoelii* são capazes de atravessar o citosol de várias células antes de invadir um hepatócito, com conseqüente formação do vacúolo parasitóforo e desenvolvimento em formas exoeritrocíticas

(FEE) (Mota *et al.*, 2001). Embora essas membranas possam ser rapidamente reparadas, as sucessivas passagens dos esporozoítos pelas células hospedeiras podem causar sérios danos a essas células, incluindo a morte. Mesmo assim, essas passagens parecem ser fundamentais para o ciclo de vida dos plasmódios, induzindo a secreção de uma substância chamada fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), a qual torna tais células mais susceptíveis à infecção (Mota *et al.*, 2001; Carrolo *et al.*, 2003). O reconhecimento e a invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos parece envolver a participação de pelo menos duas proteínas: a proteína circun-esporozoíto (CS) (revisto por Kappe *et al.*, 2003) e a proteína adesiva relacionada à trombospondina – TRAP – (Trottein *et al.*, 1995). A proteína CS apresenta-se de forma abundante na superfície dos esporozoítos, e está associada ao reconhecimento e à adesão dos parasitos aos proteoglicanos heparan sulfato expressos pelos hepatócitos, células estreladas e CK (revisto por Kappe *et al.*, 2004; revisto por Mota *et al.*, 2006). A TRAP, por sua vez, é encontrada nos micronemas e na membrana plasmática dos esporozoítos, onde se distribui de maneira irregular. Parece ser fundamental durante a locomoção e internalização na célula hospedeira, já que esporozoítos TRAP tornam-se incapazes de infectar hepatócitos (Sultan *et al.*, 1997).

Após invadir o hepatócito, os esporozoítos se multiplicam por reprodução assexuada (esquizogonia), originando milhares de merozoítos (30.000 a 40.000, dependendo da espécie). Até recentemente, a liberação dos merozoítos hepáticos para a circulação era referida como conseqüência da ruptura dos hepatócitos infectados, mas esse fato nunca havia sido demonstrado diretamente. Contrariando tal hipótese, demonstrou-se recentemente, “*in vivo*”, que os merozoítos são liberados para os sinusóides hepáticos **envoltos por uma estrutura vesicular** denominada merosoma (Sturm *et al.*, 2006). A velocidade de deslocamento dessas estruturas é menor quando comparada a velocidade dos eritrócitos circulantes, sugerindo que a superfície do merosoma possui moléculas que interagem com o endotélio dos sinusóides hepáticos. Eles possuem a capacidade de não serem reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro, permanecendo intactos por pelo menos uma hora. Esse estudo revelou ainda que embora as células hospedeiras apresentem características apoptóticas, os níveis de fosfatidilserina em sua superfície não se encontraram elevados, o que sugere que os parasitos controlam certos mecanismos intracelulares prevenindo sua fagocitose. Sem o reconhecimento pelas células fagocitárias, os merozoítos, após romperem a membrana do

merosoma, são liberados na circulação para invasão dos eritrócitos iniciando o ciclo sangüíneo.

O desenvolvimento nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para o *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para o *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, o mosquito inocula distintas populações de esporozoítos; algumas se desenvolvem rapidamente enquanto outras ficam em estado de latência no fígado (hipnozoítos) (Krotoski, 1985). Estes hipnozoítos são os responsáveis pelas recaídas da doença após períodos variáveis de incubação.

O desenvolvimento eritrocítico do parasito segue duas vias distintas: multiplicação assexuada por esquizogonia e diferenciação em estágios sexuados, denominados gametócitos, que irão evoluir no mosquito dando origem aos esporozoítos. Da esquizogonia sangüínea são formados os merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Assim, o ciclo sangüíneo se repete sucessivas vezes, sendo responsável pela patogenia da doença. Dependendo da espécie de *Plasmodium*, os sintomas podem se manifestar na forma não complicada, evoluindo ou não para a forma complicada. Nas infecções por *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* predomina a forma não complicada, caracterizada por febre intermitente e intensa debilidade física, entre outros sintomas. Nas infecções por *P. falciparum*, como dito anteriormente, manifestações mais graves podem ocorrer, caracterizando a forma complicada da doença, podendo levar o paciente ao óbito. Dentre essas, destacam-se os quadros de malária cerebral, anemia grave e acidose metabólica (revisto por Miller *et al.*, 2002).

## **1.4 – Imunidade e malária**

### **- A imunidade inata**

A resistência de um hospedeiro contra uma infecção depende de uma complexa interação entre mecanismos imunes inatos e adquiridos. O sistema imune inato atua na primeira linha de defesa do organismo, controlando a infecção até que a imunidade adaptativa ou adquirida seja estabelecida. Portanto, a indução dos mecanismos que caracterizam a imunidade inata independe do contato prévio do indivíduo com o patógeno, indicando que sua ativação é mediada por moléculas conservadas entre as diferentes espécies ou cepa do microorganismo (Stevenson & Riley, 2004).

Os macrófagos, as células natural killer (NK), as células dendríticas (CDs) e as células T  $\gamma\delta$  são apontadas como os mais importantes componentes da imunidade inata, mas fatores

genéticos relacionados ao hospedeiro vertebrado (tais como anemia falciforme, deficiência da glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD), talassemias e antígenos de grupo sanguíneo) contribuem parcial ou totalmente para a proteção do indivíduo contra a infecção. Por exemplo, mecanismos relacionados ao aumento do estresse oxidativo e fagocitose dos eritrócitos parasitados associam-se a mutações ou deleções no gene que codifica para a porção globina (Senock *et al.*, 1998; Ayi *et al.*, 2004), enquanto a deficiência de G6PD tem se associado à aumentada opsonização e fagocitose dos eritrócitos parasitados e redução do desenvolvimento parasitário (Cappadoro *et al.*, 1998; Sodeind *et al.*, 2003). Proteínas do sangue, incluindo os membros do sistema complemento e citocinas também se tornam essenciais para o combate à infecção.

Os macrófagos ou fagócitos mononucleares desempenham importante papel na imunidade inata contra a malária, devido, sobretudo, à sua alta capacidade em fagocitar eritrócitos parasitados na ausência de anticorpos citofílicos e opsonizadores (revisto por Serghides *et al.*, 2003). Contudo, os macrófagos podem ser mais importantes como células efectoras durante a resposta adaptativa, quando atuam produzindo mediadores inflamatórios que ativam linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Good & Doolan, 1999).

As células dendríticas (CD) são importantes células apresentadoras de antígeno (APC), e devido à sua elevada habilidade em capturar, processar e apresentar antígenos possuem papel central tanto na imunidade inata quanto na imunidade adquirida (Stevenson & Riley, 2004). O conhecimento detalhado sobre a interação das CD com os plasmódios ainda é bastante limitado e controverso, mas estudos “in vitro” e “in vivo” têm demonstrado que a maturação dessas células parece ser fortemente modulada pelos estágios eritrocíticos do parasito (Urban *et al.*, 1999; Ocanã-Morgner *et al.*, 2003). A ligação de eritrócitos infectados a CD36 e/ou CD51, expressos na superfície das CD, parece inibir a expressão de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80, CD83 e CD86, sendo observados níveis elevados de IL-10 em relação a IL-12. Como consequência, CD expostas aos eritrócitos infectados tornam-se limitadas quanto à sua capacidade de processar e apresentar peptídeos às células T e ativar células T CD4<sup>+</sup> de memória (Urban *et al.*, 2001). Em outros estudos, no entanto, a inibição da maturação e da ativação das CD por eritrócitos infectados não tem sido demonstrada (Seixas *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2004).

As células NK são ativadas em resposta aos interferons (IFN- $\alpha$  e  $\beta$ ) ou às citocinas (IL-12, IL-18) derivadas de macrófagos e CD. Quando ativadas, essas células auxiliam na



contenção inicial da infecção por meio de mecanismos citotóxicos, os quais envolvem a participação de proteínas formadoras de poros (perforinas) e indutoras de apoptose (granzimas) (Lieberman, 2003). Além disso, as células NK ativadas por TNF- $\alpha$  e IL-12 secretam grandes quantidades de INF- $\gamma$ , uma citocina pro-inflamatória essencial para o controle da infecção malárica via indução de mecanismos que incluem a ativação de macrófagos, a diferenciação de linfócitos T CD4+ e a produção de anticorpos por linfócitos B (Mohan *et al.*, 1997; de Souza *et al.*, 1997; Boehm *et al.*, 1997). Em contraste, níveis elevados de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  suprimem a ativação dessas células (Biron *et al.*, 1999; Colucci *et al.*, 2003). Interessantemente, camundongos C57BL/6 depletados de NKs apresentam uma rápida progressão na parasitemia sangüínea durante a infecção por *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS (Mohan *et al.*, 1997). Tais animais apresentam níveis reduzidos de INF- $\gamma$  e não são capazes de controlar a infecção por *P. yoelii* não-letal (de Souza *et al.*, 1997). Em humanos, as NK parecem ser as primeiras células do sangue periférico a produzir INF- $\gamma$  em resposta à infecção por *P. falciparum* (revisto por Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002).

As células T  $\gamma\delta$  atuam tanto na imunidade inata quanto na imunidade adquirida, durante as quais secretam grandes quantidades de INF- $\gamma$  (Langhorn *et al.*, 1994; Hviid *et al.*, 2001). A ativação dessas células durante a infecção malárica dá-se por meio de citocinas exógenas, sugerindo que as respostas imunes desencadeadas pelas mesmas ocorrem secundariamente à ativação de monócitos e NK (revisto por Stevenson & Riley, 2004). Durante a fase aguda de uma infecção primária pelos plasmódios, tanto em humanos quanto em modelos animais, tais células encontram-se em número bastante elevado na circulação, o que sugere sua importante participação no controle do crescimento do parasito (revisto por Yazdani *et al.*, 2006).

O impacto da resposta imune inata no estado clínico da infecção pelos plasmódios não é totalmente conclusivo, mas algumas inferências tornam-se pertinentes. Inicialmente, uma rápida e considerável produção de citocinas pró-inflamatórias pode permitir ao hospedeiro o controle da infecção até que a imunidade adaptativa se estabeleça. Embora seja mais relevante durante o primeiro episódio da infecção, a imunidade inata pode ser requerida durante re-infecções por parasitos geneticamente distintos. Por outro lado, uma resposta imune exacerbada pode, diretamente ou indiretamente, culminar no desenvolvimento de quadros graves de malária. Nesse cenário, a imunidade adquirida parece atuar para controlar níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias de forma a favorecer o “clearance” parasitário e

impedir o estabelecimento das formas graves da infecção. Entretanto, os eventos que contribuem para esse equilíbrio ainda não são compreendidos. Tanto em humanos quanto em modelos animais, IL-10 e TGF- $\beta$  parecem exercer papel fundamental no controle de citocinas pró-inflamatórias, como INF- $\gamma$  e IL-12, produzidas por células do sistema imune inato: NK, CD e macrófagos (revisto por Stevenson & Riley, 2004).

### **-A imunidade naturalmente adquirida à malária:**

A imunidade adquirida contra os estágios sanguíneos do *Plasmodium* envolve dois grandes mecanismos: a resposta imune humoral e a resposta imune mediada por células.

Após a fase exoeritrocítica do ciclo de vida dos plasmódios, a invasão dos eritrócitos é o passo fundamental para o prosseguimento da infecção, constituindo um dos principais alvos para a resposta imune protetora. Durante esse processo, é iniciada uma cascata de eventos que envolve uma complexa interação entre a célula hospedeira e proteínas do parasito (sobretudo proteínas de superfície). Considerando-se que os eritrócitos são incapazes de processar e apresentar antígenos, e o fato das proteínas do parasito serem expostas ao sistema imune do hospedeiro por um curto período de tempo, os anticorpos são considerados as principais moléculas responsáveis pela imunidade adquirida contra os estágios sanguíneos do *Plasmodium* (Marsh & Kinyanjui, 2006; Yazdani *et al.*, 2006). Produzidos por linfócitos B ativados, tais moléculas podem atuar promovendo distintos mecanismos, como a fagocitose de eritrócitos infectados e o bloqueio da invasão dos eritrócitos pelos merozoítos (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995; O'Donnell *et al.*, 2001). Além disso, anticorpos específicos dirigidos contra a *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP-1), expressa na superfície dos eritrócitos infectados (*knobs*), podem interferir no processo de citoaderência, protegendo o hospedeiro contra a forma grave da infecção (Giha *et al.*, 2000). Os anticorpos podem, ainda, reconhecer moléculas expressas exclusivamente na superfície de gametócitos, interferindo no desenvolvimento do parasito no mosquito vetor (Snewin *et al.*, 1995). Em virtude dessas observações, discute-se, atualmente, a possibilidade de se sintetizar anticorpos com propósito terapêutico ou vacinal (revisto por Pleass & Holder, 2005).

Apesar do essencial papel dos anticorpos na imunidade antimalárica, experimentos realizados com roedores depleados de células B sugerem que linfócitos T CD4<sup>+</sup> são capazes de limitar o crescimento parasitário independente da presença de imunoglobulinas (Van der Heyde *et al.*, 1994). Em humanos, embora não seja possível avaliar “in vivo” o papel protetor

dessas células atuando independentemente da participação dos anticorpos, estudos “in vitro” também sugerem que células T CD4<sup>+</sup> são capazes controlar a parasitemia (Brown *et al.*, 1986; Fell *et al.*, 1994). Diante disso, uma questão intrigante é a necessidade de vários anos de exposição aos parasitos em áreas endêmicas para o desenvolvimento de imunidade protetora. Uma possível explicação, com base em estudos realizados em roedores, é o fato de que, durante a infecção, células T CD4<sup>+</sup> parasito-específicas sofrem apoptose, sendo o INF- $\gamma$  a principal citocina envolvida nesse processo. Conseqüentemente, a habilidade dessas células controlarem o desenvolvimento parasitário torna-se limitado em uma infecção subsequente (Wipasa *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002). No entanto, os mecanismos que controlam esses processos precisam ser melhor caracterizados.

As citocinas envolvidas na imunidade celular são originadas, principalmente, da ativação de células T CD4<sup>+</sup> e podem atuar tanto na proteção quanto em mecanismos patológicos. Isso sugere a necessidade de um balanço nos níveis dessas substâncias durante as respostas inflamatórias, de forma a propiciar o controle da infecção e a prevenção da patologia associada à doença. Citocinas pró-inflamatórias (tais como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-18) mostram-se essenciais para o controle da infecção, enquanto citocinas anti-inflamatórias (tais como IL-10 e TGF- $\beta$ ) são requeridas para reprimir os efeitos patológicos da infecção associados a quadros graves da doença, como malária cerebral e anemia grave (revisto por Yazdani *et al.*, 2006).

É interessante observar que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, também conhecidas como reguladoras (células T<sub>reg</sub>), mostram-se capazes de modular a ativação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, o que pode favorecer o desenvolvimento parasitário. Em roedores, a depleção de células T<sub>reg</sub> os protegem da morte quando desafiados com uma cepa letal de *P. yoelii* (Hisaeda *et al.*, 2004). Em humanos, tais células são induzidas rapidamente durante a fase eritrocítica da infecção pelo *P. falciparum* e parecem estar associadas a níveis elevados de TGF- $\beta$ . Em contraste, os níveis de citocinas pró-inflamatórias e as respostas imunes específicas para os antígenos encontram-se reduzidas (Walther *et al.*, 2005). Conseqüentemente, os níveis de parasitos circulantes apresentam-se elevados, favorecendo o estabelecimento de formas graves da infecção (Walther *et al.*, 2005).

Diante do exposto, conclui-se que as respostas imunológicas, inata e adquirida, são moduladas por fatores não completamente elucidados que interagem desencadeando mecanismos que podem contribuir ou não para o controle da infecção. Assim, torna-se

evidente que o entendimento detalhado dos processos imunoreguladores da imunidade antimalárica podem facilitar a busca racional por estratégias de controle.

### ***1.5 – O perfil da imunidade adquirida contra os plasmódios humanos em áreas de transmissão intensa***

Em regiões de transmissão intensa, onde o *P. falciparum* é a espécie predominante, os recém-nascidos são relativamente resistentes à infecção durante os seis primeiros meses de vida devido provavelmente à transferência passiva de anticorpos (IgG) da mãe para o feto (Collins *et al.*, 1977; Sehgal *et al.*, 1989; Chizzolini *et al.*, 1991). Porém, após este período, as crianças tornam-se altamente susceptíveis à doença, sendo comuns as infecções fatais durante os primeiros cinco anos de vida. Este é o período em que são registrados os maiores índices de mortalidade naquelas regiões.

Com o aumento progressivo da idade, o número de ataques clínicos e a intensidade dos sintomas, bem como as taxas de parasitos circulantes, tendem a diminuir, caracterizando o período de maior morbidade da doença (Mshana *et al.*, 1993; Egan *et al.*, 1996). Atingindo a idade adulta, os sintomas clínicos da doença tornam-se geralmente ausentes (imunidade clínica ou imunidade anti-doença), e os níveis de parasitos sanguíneos extremamente baixos (imunidade anti-parasito) (McGregor *et al.*, 1964; McGregor, *et al.*, 1988), atingindo níveis subpatentes. Para ser alcançada, essa imunidade, também conhecida como premunição, requer vários anos de exposição contínua ao vetor infectado em área endêmica (Druilhe & Pérignon, 1994; Shi *et al.*, 1996) e é definida como um estado de equilíbrio entre o hospedeiro e o parasito (Druilhe & Khusmith, 1987; Pérignon and Druilhe, 1994; Druilhe & Pérignon, 1994). A premunição é freqüentemente observada em populações africanas que residem em áreas endêmicas, mesmo durante as estações de maior transmissão de malária.

A premunição não possui caráter esterilizante, tendendo a diminuir com o tempo caso os padrões de inoculações não sejam mantidos (Mercereau-Puijalon *et al.*, 1991; Druilhe & Pérignon, 1994). A baixa imunogenicidade e a grande diversidade ou polimorfismo genético dos antígenos maláricos podem ser indicados como prováveis causas da perda dessa imunidade quando o indivíduo “imune” se afasta da área endêmica (Mercereau-Puijalon *et al.*, 1991; Theander *et al.*, 1992; Marsh & Kinyanjui, 2006). Em áreas endêmicas, anticorpos protetores de alta afinidade que reconhecem epitopos invariantes de diferentes antígenos

polimórficos podem requerer tempo para alcançar níveis ideais que levam à proteção (Pleass & Holder, 2006).

Diferentemente da idéia atualmente aceita de que são necessários muitos anos de exposição ininterrupta para se adquirir imunidade contra a malária, tem sido sugerido que a proteção clínica contra a malária causada pelo *P. falciparum* pode depender de fatores intrínsecos do hospedeiro relacionados à idade. Essa hipótese fundamenta-se no fato de que crianças migrando de regiões livres de malária para regiões de elevada endemicidade em Iran Jaya adquiriram imunidade mais lentamente quando comparadas a indivíduos adultos (Baird *et al.*, 1991; Baird *et al.*, 1993). Nesse caso, a elevada taxa de parasitos circulantes associada à presença de sintomas de graus variados em indivíduos jovens e crianças poderia ser explicada, pelo menos em parte, pela ocorrência de deficiências na regulação dos mecanismos protetores efetores em consequência do estado imaturo do sistema imunológico (revisto por Baird, 1995). Se isto for verdade, a proteção contra a malária pode ser adquirida independentemente de uma longa exposição ao parasito, sendo, portanto, independente do polimorfismo antigênico.

Realmente, a associação entre infecção e ausência de sintomatologia requer especulações especiais. Em modelos experimentais, por exemplo, tem-se observado que a testosterona associa-se ao padrão clínico das infecções por *P. chabaudi* (Benten *et al.*, 1997; revisto por Wunderlich *et al.*, 2002), enquanto em humanos esse hormônio parece ter ação sobre os níveis de parasitemia de *P. falciparum* (Landgraf *et al.*, 1994). Mais recentemente, Kurtis *et al.* (2001) e Leenstra *et al.* (2003) observaram que altos níveis do hormônio sulfato dehidroepiandrosterona (DHEA-S), o qual inibe a atividade da G6PD, encontravam-se relacionados ao aumento da resistência antimalárica e/ou a reduzidas densidades de parasitos durante e após a puberdade de indivíduos do sexo masculino e feminino, respectivamente. Nestes estudos, a densidade média de parasitos circulantes de *P. falciparum* chegou a ser 92% menor nos indivíduos que apresentavam altos níveis desse hormônio em relação àqueles que apresentavam níveis reduzidos. A frequência da parasitemia também demonstrou correlação inversa com os níveis de DHEA-S, sendo essa associação significativa em indivíduos adultos. Reforçando tais encontros, um estudo posterior, conduzido “in vitro”, demonstrou a eficiente ação desse hormônio, bem como de seu análogo 16- $\alpha$  bromoepiandrosterona (EPI), na indução da fagocitose de eritrócitos infectados (Ayi *et al.*, 2002). Cabe ressaltar, ainda, que o uso de cloroquina associado ao DHEA-S tem permitido que cepas de *P. berghei* resistentes à

cloroquina tornem-se susceptíveis ao tratamento (Safeukiu *et al.*, 2004). Esses estudos reforçam a hipótese proposta por Baird e colaboradores (Baird *et al.*, 1991; Baird *et al.*, 1993) de que o longo período necessário para o desenvolvimento de imunidade natural pode ser fortemente dependente do amadurecimento fisiológico do indivíduo.

### ***1.5.1. A imunidade adquirida em regiões de baixa transmissão (hipo-mesoendêmicas): Brasil***

O grau de morbidade à malária em uma região depende de muitos fatores, tais como o grau de imunidade apresentada pelo hospedeiro; a cepa do parasito e o grau de resistência deste aos medicamentos preconizados; o nível de instabilidade de transmissão na área; o custo e a rapidez com que se tem acesso ao sistema de saúde.

Devido ao caráter migrante da população endêmica brasileira e dado aos critérios para desenvolvimento de imunidade natural, como exposição intensa e ininterrupta aos parasitos da malária, até pouco tempo não acreditava-se na possibilidade da ocorrência de casos assintomáticos da doença em regiões com baixos níveis de transmissão, como no Brasil (Prata *et al.*, 1988). Contudo, em 1995, Andrade e colaboradores descreveram, entre garimpeiros da Amazônia brasileira, os primeiros casos de infecções onde indivíduos parasitados não apresentaram qualquer sintoma clínico da doença até 48 horas após a visualização do parasito na gota espessa (Andrade *et al.*, 1995). Posteriormente, Camargo *et al.* (1999) e Alves *et al.* (2002) descreveram casos de infecções assintomáticas por *P. vivax* (14%) em uma população ribeirinha do estado de Rondônia. Neste caso, as técnicas empregadas para a detecção e diagnóstico dos parasitos foram o exame de gota espessa e/ou PCR. Em outro estudo realizado entre garimpeiros do estado de Mato Grosso também foi verificada a ocorrência de infecções assintomáticas por *Plasmodium*. Entre 527 indivíduos estudados, 58 (11%) apresentaram parasitemias patentes (por *P. falciparum* ou *P. vivax*) detectáveis na gota espessa na completa ausência de sintomas após um período de acompanhamento clínico de 72 horas (Fontes, 2001). Mais recentemente, utilizando a PCR como ferramenta para a detecção e identificação dos parasitos, 497 indivíduos pertencentes àquela população foram reavaliados, sendo observada uma prevalência de infecções assintomáticas de 27,3% (Scopel, 2003). Outro estudo recente sobre a epidemiologia da malária no Parque Nacional do Rio Jaú, no estado do Amazonas, utilizando também a gota espessa e/ou PCR para detecção dos parasitos, demonstrou uma prevalência de infecção assintomática por *Plasmodium* de 25%

entre ribeirinhos dessa localidade. Essa prevalência foi obtida após o acompanhamento clínico do paciente por 150 dias (Ladeia-Andrade, 2005; Coura *et al.*, 2006).

Esses resultados reforçam descobertas anteriores de que indivíduos expostos à transmissão de malária no Brasil estão adquirindo proteção contra as manifestações clínicas da doença, mesmo em condições de hipo-mesoendemicidade.

### **1.6 – Anticorpos contra antígenos de estágios eritrocíticos dos plasmódios**

Apesar do papel bem estabelecido da imunidade inata e mediada por células na proteção contra os plasmódios, muitos estudos, desde a realização de experimentos clássicos na década de 60 (Cohen *et al.*, 1961; McGregor, 1964) e 90 (Sabchareon *et al.*, 1991), têm buscado incessantemente a caracterização de antígenos que induzam níveis elevados de anticorpos protetores (Taylor *et al.*, 1998; Conway *et al.*, 2000; Cavanagh *et al.*, 2001; Metzger *et al.*, 2003). Tais estudos têm sugerido que a resposta imune direcionada aos estágios sangüíneos dos plasmódios é poli-específica, envolvendo uma longa variedade de antígenos e distintos perfis de imunoglobulinas.

Experimentos realizados com macacos infectados com *P. falciparum* demonstraram que a proteção conferida pela transferência de soro imune é mediada somente por anticorpos opsonizantes IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> (Groux *et al.*, 1990; Garroud *et al.*, 1994). Embora os mecanismos mediadores da proteção e a especificidade de anticorpos envolvidos não sejam totalmente compreendidos, sabe-se, com base em sistemas “in vitro”, que as IgG podem atuar por pelo menos três diferentes vias: a) inibindo a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos; b) atuando em cooperação com monócitos, inibindo o desenvolvimento intraeritrocítico do parasito (mecanismo denominado ADCI ou "*antibody-dependent cell inhibition*"), ou c) inibindo a citoaderência de eritrócitos infectados com *P. falciparum* (Druilhe & Pérignon, 1994; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995; Giha, *et al.*, 2000; O'Donnell *et al.*, 2001).

No mecanismo de ADCI, após opsonizarem os merozoítos, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> ligam-se por meio de sua porção Fc a receptores Fc $\gamma$  expressos na superfície de monócitos, induzindo-os a produzir fatores solúveis, tais como TNF- $\alpha$ . Esses fatores agem inibindo o desenvolvimento das formas intraeritrocíticas sem que haja necessidade de contato entre células efectoras e eritrócitos infectados (Bouharoun-Tayoun, *et al.*, 1990; Bouharoun-Tayoun, *et al.*, 1995). Embora não seja capaz de eliminar completamente os parasitos circulantes, este mecanismo possui fundamental relevância na manutenção dos níveis de parasitemia abaixo do limiar de

patogenicidade (Bouharoun-Tayoun, *et al.*, 1990). Recentemente, demonstrou-se, “in vitro”, que um único merozoíto para cada monócito é suficiente para desencadear uma potente atividade anti-parasito. Além disso, uma única partícula antigênica complexada a anticorpos citofílicos mostrou-se tão eficiente para a ativação ótima da ADCI quanto combinações complexas de antígenos (Jafarshad *et al.*, 2007). Antígenos solúveis também foram capazes de ativar eficientemente esse mecanismo (Jafarshad *et al.*, 2007).

Apesar do importante papel dos anticorpos adquiridos na imunidade anti-parasito, tem-se verificado que os níveis totais de anticorpos IgG anti-*P.falciparum*, direcionados contra antígenos específicos, podem alcançar níveis similares em pacientes com malária moderada e grave dentro de uma mesma área (Erunkulu *et al.*, 1992). Isso sugere que características qualitativas e funcionais dos anticorpos anti-plasmódio em populações expostas são importantes quanto à expressão clínica da infecção (Bouharoun-Tayoun & Druilhe, 1992a). Considerando-se as características qualitativas dos anticorpos, os indivíduos protegidos poderiam ser diferenciados daqueles não protegidos pela predominância de anticorpos citofílicos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> (Bouharoun-Tayoun & Druilhe, 1992b). De fato, apesar desse perfil nem sempre ser observado (Aribot *et al.*, 1996; Aucan *et al.*, 2000), tais subclasses tendem a ser predominantes em indivíduos protegidos, enquanto isotipos não citofílicos tendem a predominar naqueles não imunes (revisto por Druilhe & Perigon, 1994; Dubois & Pereira da Silva, 1995).

Apesar das evidências obtidas em pesquisas soropidemiológicas, realizadas em áreas de intensa transmissão de malária, de que os anticorpos citofílicos são os principais responsáveis pela imunidade adquirida contra a doença (Druilhe & Pérignon, 1994; Dubois & Pereira da Silva, 1995; Soe *et al.*, 2004), outros estudos têm sugerido que anticorpos não citofílicos (sobretudo IgG<sub>2</sub>) também podem atuar como protetores (Aucan *et al.*, 2000; Oeuvray *et al.*, 2000). Em recém-nascidos com até seis meses de idade, uma associação positiva entre altos níveis de IgG<sub>2</sub> e baixo risco de adquirir infecção por *P. falciparum* foi observada (Deleron *et al.*, 1997).

Embora seja eficiente quanto à capacidade de opsonização, IgG<sub>2</sub> é predominantemente descrita como incompetente na habilidade de se ligar a receptores FcγRIIa expressos na superfície de monócitos (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995; Jafarshad *et al.*, 2007). Este fato implica que somente IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> seriam importantes quanto à ativação de mecanismos como a ADCI. No entanto, uma única alteração nucleotídica, de arginina-R para histidina-H (ou



vice-versa), na posição 131 do receptor FcγRIIa, tem possibilitado que certas subclasses de IgG se liguem a algum destes receptores (Warmerdam et al., 1991). Está claro, por exemplo, que ambos os alótipos (FcγRIIa-H<sup>131</sup> e R<sup>131</sup>) ligam IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> complexados, mas somente FcγRIIa-H<sup>131</sup> interage eficientemente com IgG<sub>2</sub> permitindo a degradação de imunocomplexos contendo esta imunoglobulina (Parren et al., 1992a,b; Salmon et al., 1996). Em sistemas “in vitro”, a fagocitose de microorganismos intracelulares complexados a IgG<sub>2</sub> parece ser potencializada na presença de monócitos expressando o receptor FcγRIIa-H<sup>131</sup> (Sander et al., 1995, Tebo et al., 2002). Uma questão que permanece por ser esclarecida é se níveis elevados de IgG<sub>2</sub> associados à ocorrência do polimorfismo no aminoácido 131 do receptor FcγRIIa (de R para H) são mediadores e/ou potencializadores de proteção na malária. Dada a carência de estudos que envolvem, simultaneamente, a caracterização do perfil de anticorpos e a presença de polimorfismo no receptor Fcγ (Aucan et al., 2000), a maioria das especulações realizadas até o momento são provenientes de estudos com populações africanas, expressando diferentes formas clínicas da doença. Contudo, a relação positiva entre receptores FcγRIIa-H<sup>131</sup> e proteção não tem sido observada nesses estudos (Shi et al., 2001; Cook et al., 2003; Brower et al., 2004).

### ***1.7– Proteínas de superfície de merozoítos de P. falciparum (MSP-1 e MSP-2): diversidade genética e reconhecimento imune***

A invasão dos eritrócitos pelos merozoítos é fundamental para o estabelecimento e manutenção da infecção malárica em um indivíduo (Cowman & Crabb, 2006), tornando esse evento um potencial alvo para a ação de uma vacina.

Mecanismos essenciais ao processo de invasão das células sanguíneas, tais como o reconhecimento da célula hospedeira, parecem envolver variadas proteínas do parasito. Entre essas, encontram-se duas proteínas de superfície de merozoítos [*merozoite surface proteins* (MSPs)]: a MSP-1 e a MSP-2 (Howard & Pasloske, 1993; Holder, 1996). Ambas são glicoproteínas acopladas à superfície dos merozoítos através de âncoras glicosilfosfatidilinositol (GPI) e compreendem motivos repetitivos que variam em seqüência e número de repetições. A ocorrência de polimorfismos nesses motivos, os quais apresentam epitopos imunodominantes para células T e B, ou a simples variação no número de repetições, parece contribuir para o escape imune do parasito (Anders *et al.*, 1993). Realmente, anticorpos naturalmente adquiridos são capazes de distinguir entre motivos repetitivos

distintos de antígenos pertencentes à mesma família alélica (Ranford-Cartwright, *et al.*, 1996; Da Silveira *et al.*, 1999; Tonhosolo *et al.*, 2001), mesmo se a diferença entre eles residir somente no número de vezes em que um mesmo motivo se repete (Tonhosolo *et al.*, 2001).

Acredita-se que parte da variabilidade antigênica verificada dentro dos motivos repetitivos de uma proteína se origina de inserções e deleções resultantes de diversos mecanismos de recombinações intra e entre fitas de DNA (Rich *et al.*, 2000). Considerando-se que os genes que codificam a MSP-1 e a MSP-2 dos plasmódios encontram-se em cópia única no genoma haplóide, cada clone expressa somente uma das seqüências-tipo encontradas na natureza. Novas variantes desses genes são geradas, predominantemente, por meio de recombinação intragênica durante a meiose, nos casos em que os zigotos resultantes da fusão de gametócitos carregam alelos geneticamente diferentes (Kemp, 1992).

Considerando-se que a aquisição de imunidade contra os plasmódios humanos em áreas altamente endêmicas tem sido fortemente atribuída à ocorrência de elevado polimorfismo nos antígenos maláricos (Day & Marsh, 1991), a caracterização genética de isolados de parasitos que circulam em regiões de transmissão instável torna-se necessária. Embora alguns estudos com tal finalidade venham sendo conduzidos no Brasil (Sallenave-Sales *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2001; Sallenave-Sales *et al.*, 2003), até o momento nenhum deles abordou parasitos provenientes de indivíduos naturalmente imunes.

### ***1.7.1. Diversidade genética e reconhecimento imune da MSP-1***

A MSP-1 é uma molécula de alto peso molecular (185 a 210 kDa), sintetizada durante a esquizogonia e depositada na superfície dos parasitos intracelulares (Holder & Freeman, 1984; Blackman *et al.*, 1990, 1993). O gene que a codifica foi clonado e seqüenciado a partir de várias cepas de *P. falciparum*, sendo dividido em 17 blocos: sete altamente variáveis são flanqueados por dez blocos conservados ou semiconservados (Holder, 1988). Variações no gene *msp-1* são essencialmente dimórficas, isto é, há duas versões básicas para cada bloco representadas pelas seqüências do tipo alélico K1 e MAD20 (Tanabe *et al.*, 1987; Tanabe *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1993;). A única exceção conhecida ao dimorfismo alélico ocorre no bloco 2, que apresenta uma terceira versão, a RO33 (Certa *et al.*, 1987; Peterson *et al.*, 1988).

O gene *msp-1* possui cópia única e, dessa forma, cada parasito haplóide no seu estágio sangüíneo apresenta um único alelo (MAD20; K1 ou RO33 no caso do bloco 2) em cada uma de suas variações (Kaneko *et al.*, 1997). A diversidade alélica é gerada pela recombinação

próxima à extremidade 5' do gene, sendo freqüente a ocorrência de polimorfismos nas seqüências repetitivas das versões MAD20 e K1 do bloco 2 (Miller *et al.*, 1993; Tanabe *et al.*, 1987). Com base na seqüência variável de nucleotídeos e no número de cópias de motivos repetitivos, vários alelos MSP-1 podem ser agrupados em uma das três famílias que integram o bloco 2. Genes que codificam a MSP-1 de outras espécies de plasmódios também já foram clonados e seqüenciados. É o caso da MSP-1 do *P. vivax* (PvMSP-1) que codifica um polipeptídeo de 172 aminoácidos (Del Portillo *et al.*, 1991; Gibson *et al.*, 1992), do *P. chabaudi* (PcMSP-1) (Dellersnijder *et al.*, 1990; McKean *et al.*, 1993) e do *P. yoelii* (PyMSP-1) (Lewis *et al.*, 1990).

A função da MSP-1 não é totalmente conhecida (Holder *et al.*, 1994). Contudo, diversos estudos têm demonstrado que anticorpos monoclonais contra distintas porções desta proteína são capazes de bloquear a invasão de células sangüíneas “in vitro”, enquanto “in vivo” primatas não humanos imunizados com a MSP-1 nativa ou recombinante de *P. falciparum* foram parcial ou completamente protegidos contra desafios com parasitos homólogos (Perrin *et al.*, 1984; Holder *et al.*, 1988; Blackman *et al.*, 1990; Etlinger *et al.*, 1991; Darko *et al.*, 2005). Em humanos, anticorpos anti-PfMSP-1 têm sido detectados nas populações residentes em áreas de transmissão de malária (Gabra *et al.*, 1986; Kramer & Oberst, 1992; Riley *et al.*, 1993). Entretanto, a associação entre esses anticorpos e a proteção antimalárica ainda é controversa; alguns autores apontam uma nítida relação (Riley *et al.*, 1992; Tolle *et al.*, 1993; Al-Yaman *et al.*, 1996; Egan *et al.*, 1996), enquanto outros, não (Chizzolini *et al.*, 1989; Muller *et al.*, 1989; Dodo *et al.*, 1999). Uma possível explicação para essas discrepâncias é o fato de alguns anticorpos poderem atuar bloqueando mecanismos que permitem a morte dos parasitos (Guevara-Patino *et al.*, 1997; Uthaipibull *et al.*, 2001).

Embora a MSP-1 seja processada em fragmentos menores de 83, 42, 38, 28-30 e 19 kDa (este último resultante de uma segunda clivagem do fragmento de 42kDa) durante a esquizogonia (Holder *et al.*, 1987; Blackman, *et al.*, 1990; Blackman, 1993), apenas o último, pertencente à porção C-terminal da molécula, permanece ancorado à superfície do merozoíto durante a invasão de um novo eritrócito (Holder *et al.*, 1987; Blackman *et al.*, 1990). Essa fração de 19 kDa (PfMSP-1<sub>19</sub>) tem sido a mais bem caracterizada em relação à resposta imune. Ela é altamente conservada, apresentando apenas quatro resíduos de aminoácidos sujeitos a substituições (Miller *et al.*, 1993; Egan *et al.*, 1995) dentro das duas famílias alélicas que a constitui (MAD20 e Wellcome). A MSP-1<sub>19</sub> exibe dois motivos semelhantes aos fatores de crescimento epidermal (EGF) ricos em cisteínas (Cooper, 1993). Estes motivos

“EGF-like” estão, provavelmente, envolvidos em interações célula-célula, mostrando-se bons alvos para ação de anticorpos em estudos realizados em modelo experimental e também na infecção humana (Good *et al.*, 1998).

“In vitro”, anticorpos monoclonais e policlonais reconhecem o fragmento de 19 kDa do *P. falciparum* inibindo a invasão de eritrócitos e o desenvolvimento de parasitos (Chang *et al.*, 1992; Cooper *et al.*, 1992; Chappel *et al.*, 1993). Macacos *Aotus nancymai* imunizados com a essa proteína foram protegidos contra o desafio com parasitos viáveis (Kumar *et al.*, 1995; Apio *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2000; Wipasa *et al.*, 2002). Da mesma forma, roedores imunizados com MSP-1<sub>19</sub> de *P. yoelii* estiveram protegidos contra a infecção (Daly *et al.*, 1993; Tian *et al.*, 1996; Hirunpetcharat *et al.*, 1997; Hirunpetcharat *et al.*, 1998). Em humanos, pesquisas soropidemiológicas em populações africanas têm demonstrado associação positiva entre anticorpos anti-PfMSP-1<sub>19</sub> naturalmente adquiridos e proteção antimalárica, que se torna ainda mais evidente com o aumento da idade (Egan *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1996; Tongren *et al.*, 2006). Em um estudo recente realizado com indivíduos residentes em uma área endêmica brasileira, nosso grupo demonstrou que as médias de anticorpos IgG anti-PfMSP-1<sub>19</sub> foram estatisticamente maiores entre garimpeiros com infecções assintomáticas quando comparados àqueles com sintomas clínicos (Braga *et al.*, 2002).

Embora a maioria dos estudos aponte a região C-terminal da MSP-1 de *P. falciparum* como o mais importante alvo da resposta imune adquirida contra os plasmódios, há evidências de que anticorpos adquiridos naturalmente reconhecem mais frequentemente antígenos que integram blocos variáveis quando comparados a antígenos que representam blocos conservados (Fruh *et al.*, 1991; Tolle *et al.*, 1993). O perfil de anticorpos IgG dirigidos a antígenos do bloco 2 polimórfico da MSP-1, por exemplo, já esteve associado à proteção clínica ou a um reduzido risco de infecção em indivíduos africanos adultos residentes em áreas de intensa transmissão de malária (Conway *et al.*, 2000; Jouin *et al.*, 2001; Polley *et al.*, 2003). Contudo, um estudo mais recente sugere que a resposta humoral dirigida a distintas variantes alélicas do bloco 2 da MSP-1 é mais indicativa de infecção corrente do que de proteção, visto que não houve diferença no perfil de resposta de IgG no soro de indivíduos sintomáticos e assintomáticos (Ekala *et al.*, 2002). No Brasil, um estudo conduzido na Amazônia brasileira demonstrou que anticorpos IgG<sub>3</sub> anti-bloco 2 tenderam a aumentar em indivíduos com infecção aguda e frequentemente expostos aos parasitos. Além disso, observou-se que os níveis desse anticorpo, dirigidos somente contra as porções conservadas e

dimórficas da MSP-1, tenderam a decrescer após a fase aguda da doença (da Silveira *et al.*, 1999).

Esses estudos demonstram que a caracterização da resposta imune anti-MSP-1 de *P. falciparum* em populações expostas à infecção ainda fazem-se necessários, sobretudo em regiões com reduzidos níveis de transmissão.

### ***1.7.2. Diversidade genética e reconhecimento imune da MSP-2***

Outro antígeno de superfície de merozoítos de *P. falciparum* bem caracterizado é a MSP-2. Essa molécula é uma glicoproteína integral de membrana de função desconhecida e de massa molecular entre 35 e 56 kDa. Como muitos outros antígenos maláricos, essa proteína exibe um alto grau de diversidade de seqüência que se traduz em diversidade antigênica entre diferentes isolados de *P. falciparum*. Além disso, o predomínio de substituições não-sinônimas em blocos desta molécula sugere que este antígeno esteja sob pressão seletiva, provavelmente de natureza imunológica (Hughes & Hughes, 1995).

O gene que codifica a MSP-2 apresenta um único exon e compreende duas regiões (carboxi e amino-terminal) altamente conservadas (blocos 1 e 5), duas regiões não-repetitivas, porém, variáveis (blocos 2 e 4) e um bloco central repetitivo polimórfico (bloco 3). Suas seqüências agrupam-se em duas famílias alélicas conhecidas pelo nome dos isolados em que foram descritas, FC27 e 3D7, sendo esta última também designada como IC1 ou CAMP (Smythe *et al.*, 1990; Smythe *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1990; Prescott *et al.*, 1994). Isolados agrupados em famílias alélicas distintas se diferem: (a) quanto à seqüência das regiões variáveis não-repetitivas (blocos 2 e 4) que, no entanto, são bem conservadas entre os membros de uma mesma família alélica, e (b) quanto ao bloco central repetitivo polimórfico (bloco 3). Os blocos repetitivos que integram a família alélica FC27 são geralmente formados por uma a quatro cópias do motivo 32-mer, seguido por nenhuma a cinco cópias de um motivo 12-mer. Esses blocos repetitivos apresentam seqüências relativamente conservadas nessa família, ainda que freqüentemente sejam encontradas mutações pontuais. Com poucas exceções (Kanunfre *et al.*, 2003) em isolados brasileiros, essa família tem apresentado uma cópia do motivo 32-mer e duas a três cópias do motivo 12-mer (Sallenave-Sales *et al.*, 2003; Tonon *et al.*, 2004). Em contraste, os alelos pertencentes à família 3D7 apresentam maior grau de diversidade nos motivos repetitivos ricos em GSA, os quais são altamente variáveis em extensão (2-10 aminoácidos), seqüências e número de cópias (Ferreira *et al.*, 2007).

Existem, portanto, no interior de uma mesma família alélica, heterogeneidade de seqüência e variações no número de vezes em que os motivos se repetem no gene, o que contribui para uma extensiva diversidade gênica de alelos e, conseqüentemente, para o escape imunológico do parasito. Realmente, isolados africanos que deixam de apresentar o motivo repetitivo de 32-mer, característico da família FC27, são pouco reconhecidos por anticorpos provenientes de crianças africanas naturalmente expostas à malária, sugerindo que a deleção deste segmento pode ser um mecanismo de escape imune do parasito (Ranford-Cartwright *et al.*, 1996). Contudo, estudos relacionados à avaliação da diversidade alélica dessa proteína e ao *status* clínico da infecção indicam resultados conflitantes. Em algumas áreas de transmissão intensa na África e Papua Nova Guiné, os alelos FC27 estiveram associados com o intenso risco de malária sintomática (Engelbrecht *et al.*, 1995; Ofosu-Okyere *et al.*, 2001), enquanto em outras, não (Ntoumi *et al.*, 1995; Ntoumi *et al.*, 2000; Cortés *et al.*, 2004). Em populações brasileiras expostas a reduzidos níveis de transmissão, têm-se observado uma limitada diversidade no gene *msp-2* (Sallenave-Sales *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2001; Sallenave-Sales *et al.*, 2003; Tonon *et al.*, 2004), mas poucas especulações sobre tipo alelo e *status* clínico da infecção têm sido realizadas. De qualquer forma, a limitada variação no número de seqüências repetitivas desse gene parece afetar o reconhecimento de peptídeos MSP-2 por anticorpos adquiridos naturalmente (Kanufre *et al.*, 2003), o que pode representar um eficiente mecanismo para evasão imune do parasito.

Anticorpos monoclonais que reconhecem epitopos situados no bloco central repetitivo da MSP-2 mostram-se capazes de inibir a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, impedindo o crescimento do *P. falciparum in vitro* (Epping *et al.*, 1988; Ramasamy *et al.*, 1990; Fenton *et al.*, 1991). “*In vivo*”, anticorpos IgG anti-PfMSP-2, naturalmente adquiridos por indivíduos expostos à malária em áreas holoendêmicas, são descritos como sendo potencialmente protetores e predominantemente específicos para cada família alélica (Al-Yaman *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1998). Estudos epidemiológicos também mostram associações positivas entre a presença de anticorpos anti-MSP-2 (porções repetitivas) e o desenvolvimento de imunidade em áreas hiperendêmicas de Papua Nova Guiné (Al-Yaman *et al.*, 1994 e 1995) e da África (Metzger *et al.*, 2003; Polley *et al.*, 2006; Sarr *et al.*, 2006).

Uma das características marcantes da resposta imune contra a MSP-2, em populações que habitam áreas de alta endemicidade de malária na África e na Papua Nova Guiné, é o amplo predomínio de anticorpos IgG<sub>3</sub> entre as quatro subclasses de IgG (Taylor *et al.*, 1995 e 1998; Ferrante & Rzepczyk, 1997; Aucan *et al.*, 2000; Metzger *et al.*, 2003; Polley *et al.*,

2006, Sarr *et al.*, 2006; Tongren *et al.*, 2006). Nessas regiões, alterações no perfil de anticorpos anti-MSP-2 de IgG<sub>1</sub> para IgG<sub>3</sub> têm sido correlacionadas com o tempo de exposição à malária e com o aumento de idade (Taylor *et al.*, 1998). Uma possível explicação para os níveis elevados de IgG<sub>3</sub> observado para antígenos que representam essa proteína é que certos epítopos de células B parecem ser conservados entre as famílias alélicas, determinando uma ampla rede de reatividade cruzada entre as variantes que integram essas famílias (Felger *et al.*, 2003; Franks *et al.*, 2003; Fluck *et al.*, 2004). Contudo, essa polarização para IgG<sub>3</sub> parece também ser modulada, de forma independente, pela natureza do antígeno, idade e grau de exposição do indivíduo ao antígeno (Tongren *et al.*, 2006).

No Brasil, país de baixa endemicidade, estudos prévios não demonstraram tendência nítida ao predomínio de IgG<sub>3</sub> o que torna clara a necessidade de novas pesquisas que tentem esclarecer os fatores que determinam a distribuição das subclasses de IgG em população com diferentes graus de exposição.

## ***JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS***

Atuando por mecanismos distintos, os anticorpos mostram-se fundamentais para o combate à infecção malárica, justificando a importância de seu estudo dentro de uma abordagem terapêutica e/ou vacinal (Pleass & Holder, 2005). Assim, torna-se necessária a definição de partículas antigênicas do parasito capazes de induzir a produção de anticorpos potencialmente protetores quando empregadas em protótipos vacinais (Good *et al.*, 1998). Apesar de existirem vários antígenos candidatos à vacina, os alvos precisos da imunidade contra os plasmódios ainda não são conhecidos, já que nenhuma das moléculas utilizadas em protocolos de vacinação foi capaz de induzir níveis satisfatórios de proteção.

Parte do insucesso observado em triagens vacinais tem sido atribuída à ocorrência de elevado polimorfismo nos antígenos utilizados. As duas principais proteínas de superfície de merozoítos de *P. falciparum*, MSP-1 e MSP-2, ambas consideradas potenciais alvos da resposta imunológica contra os estágios sanguíneos do parasito (Good *et al.*, 1998), representam consideráveis exemplos de antígenos polimórficos. Embora possuam motivos conservados, ambas as proteínas contêm regiões repetitivas, responsáveis pela geração de maior parte do polimorfismo. As regiões polimórficas são geralmente imunodominantes e proporcionam ao parasito um excelente mecanismo de evasão imune (revisto por Ferreira *et al.*, 2004). O reconhecimento variante-específico de regiões polimórficas da MSP-1 e da MSP-2 por anticorpos naturalmente adquiridos parece corroborar tal afirmação (revisto por Ferreira *et al.*, 2004). Um dos mecanismos propostos para explicar a contribuição das repetições polimórficas para o escape imune do parasito, é a capacidade desses motivos estimularem respostas de anticorpos, independente do auxílio de células T (Schofield *et al.*, 1991). Esse fato explica, pelo menos em parte, a necessidade da exposição contínua do indivíduo a um amplo espectro de parasitos geneticamente distintos para a aquisição de imunidade (Day & Marsh, 1991). Torna-se evidente, portanto, a necessidade de se ampliar os estudos que caracterizam geneticamente as populações de parasitos circulantes em diferentes áreas geográficas, bem como o perfil e a função dos anticorpos naturalmente adquiridos.

De maneira geral, os fatores que determinam a ocorrência de imunidade em regiões de transmissão instável e sazonal, como as que ocorrem no Brasil, permanecem por serem caracterizados. Nas áreas endêmicas brasileiras, apesar de existirem evidências de estabilidade genética nas populações de *Plasmodium* circulantes (Hoffmann *et al.*, 2001; Sallenave-Sales, 2003), pouco se sabe sobre o seu papel na determinação de mecanismos



associados à proteção antimalárica. A expressiva ocorrência de casos assintomáticos da infecção malárica em variadas áreas endêmicas do país apontam para a importância de se estudar a estrutura genética das populações de plasmódios circulantes nessas regiões.

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar os padrões de diversidade genética das proteínas MSP-1 e MSP-2 em isolados naturais de *P. falciparum* provenientes de duas regiões endêmicas brasileiras com distintos perfis de endemicidade (hipo e mesoendemicidade). Além disso, avaliou-se a resposta de anticorpos IgG naturalmente adquiridos e a expressão clínica da doença. Os objetivos específicos deste estudo foram:

- a) Investigar a ocorrência de diversidade genética das proteínas MSP-1 e MSP-2 em isolados de *P. falciparum*, e estabelecer inferências sobre a estrutura genética da população local de parasitos;
- b) Avaliar a resposta de anticorpos IgG e/ou de seus isotipos específicos dirigidos contra antígenos recombinantes que integram porções conservadas e/ou polimórficas de duas proteínas do *P. falciparum*: blocos 2 (polimórfico) e 17 (conservado) da MSP-1, e bloco 3 repetitivo da MSP-2;
- c) Determinar a influência do grau de exposição à infecção sobre a modulação dos padrões de resposta de subclasses anti-MSP-1 e/ou anti-MSP-2;
- d) Correlacionar a ocorrência de anticorpos variante-específicos anti-MSP-1 e anti-MSP-2 de *P. falciparum* sobre a resposta de anticorpos e a expressão clínica da doença;
- e) Investigar a influência de variáveis (idade, tempo de exposição em área endêmica, infecção atual e polimorfismos no receptor FcγRIIa) na distribuição de anticorpos IgG e seus isotipos anti-MSP-1 e anti-MSP-2.
- f) testar, em um estudo longitudinal, a hipótese de *clonal imprinting*, ou seja, se a exposição a novas variantes antigênicas de MSP-2 induzem uma resposta de anticorpos com novas especificidades.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

### ***3.1 – Áreas e populações de estudo***

Neste estudo foram avaliados indivíduos provenientes de duas regiões endêmicas de malária localizadas em dois estados que integram a Amazônia Legal: Apicás, no estado de Mato Grosso (**Figura 4**) e Acrelândia, no estado do Acre (**Figura 5**).

#### ***3.1.1. População de indivíduos provenientes de Apicás-MT***

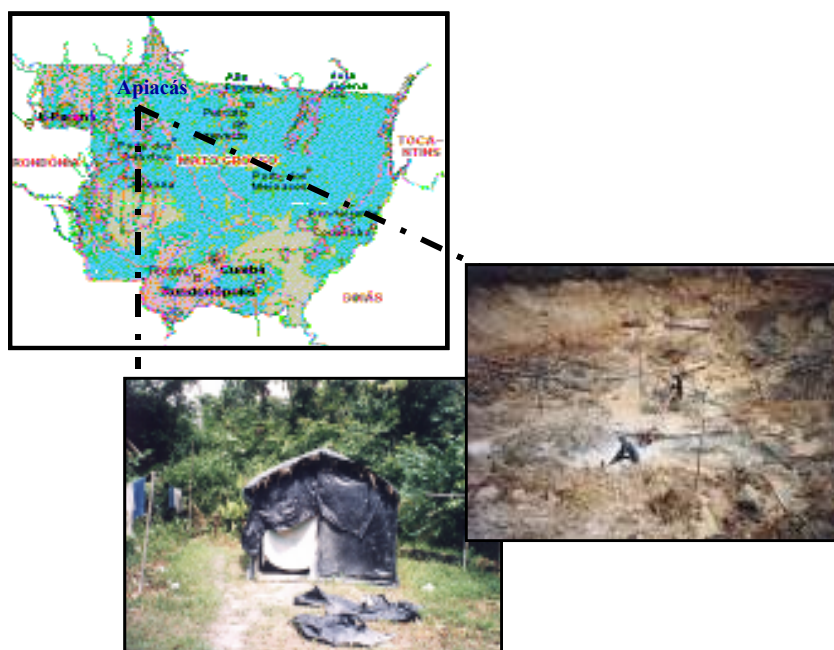
A população de indivíduos de Apicás é proveniente de um estudo epidemiológico do tipo corte transversal, conduzido em 1996 pelo Dr. Cor Jésus Fernandes Fontes (Universidade Federal do Mato Grosso) em uma população de 527 indivíduos. Apicás é uma região de garimpo localizada no extremo norte do estado de Mato Grosso, a aproximadamente 1000 km da capital, Cuiabá. Esse município faz divisa com os estados do Pará e do Amazonas, sendo parte da Bacia Amazônica (**Figura 4**).

Em 1996, a população de Apicás constava de 7.598 habitantes, sendo constituída, principalmente, por migrantes das regiões nordeste, sudeste e sul do país. A extração manual de ouro (garimpo), uma das bases da economia deste município, era feita em duas localidades: Garimpo Satélite e Garimpo Planeta. Nessa época, o Garimpo Satélite concentrava o maior número de casos e de lâminas positivas para malária, sendo o *Anopheles darlingi* o principal vetor associado à transmissão da doença. No ano de coleta do estudo, uma prevalência de malária de 17,3%, detectada pelo exame microscópico de gotas espessas somada a outras características clínicas dos indivíduos, permitiu classificar Apicás como uma região mesoendêmica para a transmissão da doença no país. O acompanhamento clínico dos indivíduos parasitados por um período mínimo de 72 horas permitiu, ainda, a rara observação de casos sintomáticos e assintomáticos. Casos sintomáticos foram caracterizados, principalmente, pela presença de febre intermitente, dor de cabeça, anorexia e calafrios (Fontes, 2001).

Em 2003, uma reavaliação parasitológica realizada em 497 indivíduos dessa população, usando-se a PCR para detecção e identificação dos parasitos, permitiu que fosse redefinida a epidemiologia da malária em Apicás, sendo observada uma prevalência de infecção malárica de 43,5%. Entre os casos diagnosticados, o *P. falciparum* foi a espécie predominante, estando associado a 66% das infecções. De modo preocupante, 60% dos

indivíduos infectados com essa espécie permaneceram assintomáticos após o período de acompanhamento clínico (Scopel, 2003; Scopel *et al.*, 2004a).

Neste estudo, foi avaliada, dentre outros fatores, a ocorrência da diversidade genética de duas proteínas de superfície de merozoítos (MSP-1 e MSP-2) em isolados de *P. falciparum*. Além disso, foi avaliada a resposta de anticorpos anti-MSP-1 e anti-MSP-2 em indivíduos que expressavam diferentes formas clínicas da infecção (sintomáticos e assintomáticos).



**Figura 4:** Mapa do estado de Mato Grosso focalizando a localização do município de Apiacás na área endêmica brasileira. Em detalhe as precárias condições de moradia e trabalho dos garimpeiros na região.

### ***3.1.2-População de indivíduos provenientes de Acrelândia-Ac***

Características inerentes à área e à população amostral proveniente o estado do Acre encontram-se descritas em da Silva-Nunes *et al.*, (2006) e Scopel *et al.*, (no prelo).

A população de indivíduos avaliados nesta pesquisa é proveniente de um estudo epidemiológico longitudinal conduzido pelo Dr. Marcelo U. Ferreira (Universidade de São Paulo) no Ramal do Gramada, extensão rural pertencente ao município de Acrelândia, entre março de 2004 e maio de 2005. Acrelândia localiza-se a 112 km de Rio Branco e faz divisa com os estados do Amazonas e de Rondônia. É uma região com elevada transmissão de

malária, segundo IPAs provenientes dos anos de 2002 (IPA=104.2) (Costa *et al.*, 2004) e 2004 (IPA~58.0) (Ministério da Saúde, 2005). O principal vetor da doença nessa região é o *An darlingi*.

Segundo o IBGE, em 2003 Acrelândia contava com uma população de 8,697 habitantes, sendo constituída, principalmente, por migrantes das regiões nordeste, sudeste e sul do país. Ao contrário de Apiacás, cuja economia baseava-se, principalmente no extrativismo mineral, a atividade agropecuária e o extrativismo vegetal constituem a principal economia da região de Acrelândia (**Figura 5**).

Durante o período de estudo na área (março de 2004 a maio de 2005), 466 indivíduos, com idade entre 1 dia e 90 anos, foram entrevistados com o auxílio de um questionário clínico-epidemiológico previamente elaborado e testado. Esse questionário continha informações sobre dados demográficos, socioeconômicos, migração, exposição à malária, bem como história pregressa e intensidade de sintomas relacionados à malária. Desse total, 399 indivíduos com idade  $\geq 5$  anos foram considerados aptos a participarem do estudo; 356 tiveram amostras de sangue coletadas na linha de base da coorte.



**Figura 5:** Mapa do estado do Acre focalizando a localização do município de Acrelândia. Em detalhe as condições de moradia e trabalho (atividade agropecuária) da população na região.

Para estudo, aproximadamente 5 ml de sangue foram colhidos por punção venosa, em tubos do tipo “Vacutainer” contendo anticoagulante (EDTA), para posterior realização de

gotas espessas, extração de DNA e obtenção de plasma. As gotas espessas foram confeccionadas utilizando-se cerca de 10 µl de sangue. Os esfregaços, após serem corados com Giemsa e secos ao ar, foram examinados por dois microscopistas experientes da FUNASA-Acre. Para caráter de diagnóstico e para determinação da parasitemia, pelo menos 200 campos microscópicos em objetiva imersão (100X) foram analisados.

Dos indivíduos avaliados por microscopia e/ou PCR, 168 mostraram-se positivos para *P. falciparum* ou *P. vivax*. Um terço desse total estiveram infectados por ambas as espécies de plasmódios. As manifestações clínicas comumente observadas no caso de infecções sintomáticas foram: febre, mialgia, vômitos, dor de cabeça, dor abdominal, náuseas, calafrios, sudorese e artralgia. Com base na intensidade, tais sintomas (com exceção da febre) foram classificados como fracos, moderados ou intensos. Febre foi classificada como ausente, fraca ou grave. A classificação quanto à intensidade dos sintomas seguiu os critérios previamente de estabelecidos por Karunaweera *et al.*, (1998).

O tratamento, quando realizado, seguiu as recomendações impostas pelo Ministério da Saúde, sendo: (a) cloroquina e primaquina nos casos de infecção por *P. vivax* e (b) mefloquina ou quinina-doxiciclina (e primaquina nos casos de presença de gametócitos) para *P. falciparum* (Ministério da Saúde, 1995).

Somente infecções (simples ou mistas) envolvendo o *P. falciparum* foram selecionadas para o presente estudo.

### **3.2- Antígenos utilizados nos ensaios imunoenzimáticos**

#### **3.2.1- Antígenos derivados da MSP-1**

Antígenos que representam a região C-terminal (bloco 17 conservado) e região N-terminal (bloco 2 polimórfico) da MSP-1 do *P. falciparum* foram utilizados no presente estudo para a realização dos ensaios imunoenzimáticos. Como representante do bloco conservado foi utilizado o antígeno recombinante PfMSP-1<sub>19</sub> expresso em levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Essa proteína representa a família alélica Wellcome da cepa FVO do parasito. Esta proteína nos foi gentilmente cedida pelo Dr David C. Kaslow (USDA).

Para a determinação do perfil de reposta dos isotipos de imunoglobulinas G dirigidos ao bloco 2 polimórfico da PfMSP-1 foram utilizados os antígenos recombinantes MAD20, 3D7 e RO33 pertencentes, respectivamente, às famílias alélicas MAD20, K1 e RO33. Estas proteínas foram expressas em *Escherichia coli* em fusão com o gene da glutathione S-

transferase de *Schistosoma japonicum* (GST) e por esta razão, fez-se necessário a utilização da GST como controle dos ensaios imunoenzimáticos. Estas proteínas nos foram gentilmente cedidas pelo Dr. David R. Cavanagh (University of Edinburg, Londres).

### **3.2.2- Antígenos derivados da MSP-2**

Antígenos recombinantes que representam as famílias alélicas FC27 e 3D7 da MSP-2 do *P. falciparum* foram utilizados para avaliação da resposta imune nas duas populações de estudo.

Como representantes da família alélica FC27 foram utilizados os antígenos variantes FC27 e S20, enquanto as variantes FUP/CP, 3D7, 25 e AM85 representaram a família alélica 3D7. Essas proteínas foram expressas em *Escherichia coli* em fusão com o gene da glutathione S-transferase de *Schistosoma japonicum* (GST) e por isso foi utilizado o antígeno GST como controle dos ensaios imunoenzimáticos. Esses antígenos foram produzidos e gentilmente cedidos pelo Dr. Marcelo U. Ferreira (USP).

### **3.3- ELISA para detecção de IgG e seus isotipos (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>)**

As concentrações dos diferentes antígenos recombinantes que representam a MSP-1 e a MSP-2 do *P. falciparum* foram utilizados conforme padronização prévia (Silveira *et al.*, 1999; Tonhosolo *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2002). Todas as amostras de soros foram testadas em duplicata.

Placas de ELISA de fundo chato (Nunc Maxisorp, Denmark) foram sensibilizadas a 4°C por 18 horas com 50µL/poço dos antígenos diluídos em tampão carbonato bicarbonato-pH9.6 (0,05 e 0,1µg/poço para os antígenos derivados da MSP-1/GST e MSP-2/GST, respectivamente). A seguir, as placas foram bloqueadas com leite desnatado diluído em PBS-Tween 0,05% por 60 minutos a 37°C. Após serem lavadas quatro vezes, os soros testes (diluição: 1:50 para MSP-1<sub>19</sub> e 1:100 para os demais antígenos) foram adicionados às placas, seguindo-se nova incubação por 60 minutos a 37°C. Para a detecção de IgG total, após quatro lavagens sucessivas, as placas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-IgG humana ligado a peroxidase (Sigma Chemical Company, St Louis, USA) na diluição de 1:2000. A seguir, um substrato apropriado (OPD 0,1M em tampão citrato pH 5,0) foi adicionado às placas seguindo-se nova incubação a 37°C durante 20 minutos. A reação foi interrompida através da adição de 30µl/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:20) seguindo-se, então, leitura a

490nm em leitor automático de ELISA (Biorad, USA) para determinação da densidade óptica (DO).

Para determinação dos isotipos específicos, após incubação com soros testes, anticorpos monoclonais (IgG  $\alpha$  isotipos humanos – SIGMA Chemical Company, USA, produzido em camundongos) foram adicionados às placas nas seguintes diluições: 0,14 $\mu$ L/mL para o clone SG-16 (anti-IgG<sub>1</sub>); 0,1 $\mu$ L/mL para o clone HP-6014 (anti-IgG<sub>2</sub>); 0,5 $\mu$ L/mL para o clone HP-6050 (anti-IgG<sub>3</sub>) e 0,1 $\mu$ L/mL para o clone HP-6025 (anti-IgG<sub>4</sub>). Após incubação as placas foram lavadas quatro vezes e um segundo anticorpo monoclonal anti-IgG ligado a peroxidase (Life Technologies, GIBCO, BRL) diluído 1:2000 foi adicionado às mesmas. Seguiu-se então, adição do substrato e leitura conforme descrito anteriormente.

Para os antígenos que representam o bloco 2 da MSP-1 e o bloco repetitivo da MSP-2 as absorbâncias obtidas para cada amostra teste foram subtraídas das leituras com o antígeno controle (GST). A seguir, os valores médios de absorbâncias foram ajustados para índice de reatividade (IR) dividindo-se a absorbância obtida pelo valor de “cut-off” para cada antígeno testado. Amostras com IR>1 foram consideradas positivas.

Soros controles de indivíduos não expostos à malária foram utilizados para determinação do limite de positividade para cada subclasse (“cut-off”), definido como a média das absorbâncias acrescida de três desvios padrão (X+3dp).

### ***3.4- Obtenção de DNA para determinação do genótipo do receptor humano de imunoglobulinas Fc $\gamma$ RIIa e para ensaios de tipagem molecular dos genes *m*sp-1 e *m*sp-2 de *P. falciparum****

A determinação do genótipo do receptor humano de imunoglobulinas Fc $\gamma$ RIIa e da diversidade genética dos isolados de *P. falciparum* provenientes de Apiacás foi realizada utilizando-se amostras de DNA obtidas de sangue conservado em papéis filtro conforme previamente descrito (Scopel *et al.*, 2004b). Para os estudos de tipagem molecular de isolados de parasitos provenientes de Acrelândia, amostras de DNA foram obtidas diretamente de sangue total utilizando-se kit comercial para purificação de DNA genômico (Wizard® Genomic DNA Purification-Promega Corporation, Madison, WI, USA).

### ***3.4.1- Obtenção de DNA genômico a partir de sangue coletado em papel filtro***

Brevemente, papéis filtro contendo as amostras de sangue foram picotados e colocados em tubos de microcentrífuga devidamente identificados. A cada tubo foi adicionado 250µL de tampão de lise (NaCl 50mM, Tri-HCl 50mM pH 7.4, EDTA 10mM, Triton X-100 1% (V/V) e 200µg/mL de proteinase K) sendo o mesmo mantido em banho-maria a 60°C por 18h. As amostras foram, então, submetidas a extração fenol-clorofórmio/clorofórmio-álcool isoamílico, precipitadas com etanol e suspensas em 30µL de água estéril (Sigma Chemical Company, St Louis, USA). A seguir, as amostras de DNA foram estocadas a -20°C até o momento de uso.

### ***3.4.2. Obtenção de DNA genômico a partir de sangue total***

A extração de DNA a partir de sangue total foi realizada utilizando-se o kit *GFX genomic blood DNA purification* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Rapidamente, tubos de microcentrífuga contendo 200 a 300µL de sangue foram incubados com 300µL de uma solução de lise celular e 1,5µL de solução de Rnase A (4mg/ml) a 37°C em banho-maria por 15 minutos. A seguir, 100µL de solução de precipitação de proteína foram acrescentados a cada tubo sendo os mesmos homogeneizados e centrifugados a 13.000g- 16.000g por 3 minutos.

Após o sobrenadante ter sido coletado em tubos devidamente identificados, adicionou-se 300µL de isopropanol. Os tubos foram invertidos cerca de 30 vezes e centrifugados por 1 minuto a 13.000g-16.000g. A seguir, o isopropanol foi removido por inversão em papel absorvente acrescentando-se aos mesmos 300µL de etanol 70% para a lavagem do sedimento e remoção de traços de sal. As amostras foram, então, novamente centrifugados por mais 1 minuto a 13.000g-16.000g. Cerca de 15 a 30 minutos após o etanol ter sido desprezado, o DNA foi ressuspensão em uma solução de rehidratação (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0) e mantidos a -20°C até o momento de uso.

### ***3.5 - Determinação do polimorfismo no receptor FcγRIIa***

O polimorfismo no receptor FcγRIIa foi determinado usando-se o método de digestão por enzima de restrição alelo-específica como descrito por Jiang *et al.* (1996).



Os oligonucleotídeos utilizados para esse estudo amplificam especificamente o gene que codifica o receptor FcγRIIa e não os genes altamente homólogos FcγRIIb e FcγRIIc. Foram eles: 5'- GGG AAA TCC CAG AAA TTC TCG C-3' (direto) e 5'- CAA CAG CCT GAC TAC CTA TTA CGC GGG-3' (reverso). O iniciador direto vem do exon que codifica o segundo domínio extracelular do códon 131 e termina imediatamente na extremidade 5' do sítio polimórfico. Ele contém uma única substituição nucleotídica (sublinhado) na qual introduz um sítio da enzima de restrição *BstUI* (5'-CGCG-3') dentro do produto da PCR quando o próximo nucleotídeo é G, mas não quando o próximo nucleotídeo é A. O iniciador reverso está localizado no íntron (5'-3') e contém duas substituições nucleotídicas (sublinhado) na qual introduz um sítio obrigatório de *BstUI* dentro de todo produto da PCR que usa este iniciador. Isto serve para introduzir um controle interno para o sucesso da digestão por *BstUI*.

### **3.5.1- Amplificação por PCR**

A amplificação por PCR foi realizada em uma mistura de reação de 100 µL contendo: 5µL de DNA genômico, 200 pmoles de cada iniciador, 100 µM de cada dNTP, 150 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 10 mM de tris-HCl (pH 9.0), 0,1% Triton X-100 e 1,7 U de *taq* polimerase. A mistura de reação foi incubada por 5 minutos a 96°C, seguido de 30 ciclos de 94° C por 15 segundos, 55° C por 30 segundos, 72° C por 40 segundos, e um ciclo de 72° C por 10 minutos. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 3% (p/v) na presença de brometo de etídeo. O resultado é um produto de 366pb que contém um sítio introduzido de *BstUI* na região 3' e um potencial sítio de *BstUI* na região 5' dependendo do polimorfismo do gene.

### **3.5.2- Digestão do produto da PCR com enzima de restrição**

O produto amplificado foi digerido em uma mistura de reação contendo 10 µL do produto da PCR, 10 U da enzima de restrição *BstUI* (Promega Corporation, Madison, WI, USA) e tampão de reação correspondente. As amostras foram incubadas overnight a 60° C e analisadas por eletroforese em gel de agarose 3% (p/v) corados com brometo de etídeo. O padrão dos fragmentos de DNA observados após a digestão é definido da seguinte forma: um fragmento de ~322pb para o genótipo FcγRIIa-R/R<sup>131</sup>; um fragmento de ~343pb para o FcγRIIa-H/H<sup>131</sup> e ambos os fragmentos para o genótipo FcγRIIa-H/R<sup>131</sup>.

### 3.6 – Tipagem molecular do bloco 2 da MSP-1

As seqüências dos iniciadores e o protocolo da PCR utilizado para a tipagem do bloco 2 variável são aqueles descritos por Ferreira *et al.* (1998b) e Kaneko *et al.* (1997).

O procedimento de tipagem do bloco 2 utilizando a amplificação pela PCR dupla pode ser resumido como se segue. O protocolo baseia-se em duas reações sequenciais de amplificação (PCR dupla). A primeira empregou os iniciadores comuns C1F: 5'-AAC TAG AAG CTT TAG AAG ATG CAG-3' (direto) e C3R: 5'-ACA TAT GAT TGG TTA AAT CAA AGA G-3' (reverso), enquanto a segunda amplificação foi realizada em três tubos de reações individuais contendo o iniciador reverso comum, C3R, e um dos iniciadores diretos tipo-específico, M2F: 5'- GGT TCA GGT AAT TCA AGA CGT AC -3' (para o alelo MAD20), K2F: 5'- TCT TAA ATG AAG AAG AAA TTA CTA CAA A -3' (para o alelo K1), ou R2F: 5'- TAA AGG ATG GAG CAA ATA CTC AAG T -3' (para o alelo RO33).

A maior vantagem desta estratégia é a possibilidade de tipar diferentes populações de parasitos presentes em infecções mistas (Kaneko *et al.*, 1996).

O DNA molde (5 µL de DNA extraído ou 1 µL do produto da primeira reação diluído 40X em água miliq estéril) foi amplificado em um volume final de 25 µL na presença de 100 µM de cada dNTP (Pharmacia Biotech), 10 pmoles de cada iniciador (0,4 µM), 0,8 unidades de Taq polimerase (Pharmacia) e tampão 10X suplementado pelo fabricante.

Todas as reações foram realizadas em termociclador Techne Genius (Techne, Cambridge, England). A mistura de reação foi incubada por 5 minutos a 95° C, seguido, na primeira reação, por 3 ciclos de 94° C por 30 segundos, 56° C por um minuto e 72° C por um minuto, então foram 40 ciclos (1ª reação) e 18 ciclos (2ª reação) de 94° C por um minuto, 56° C por um minuto e 72° C por um minuto, seguidos de um ciclo final de 72° C por 10 minutos. Uma amostra de 10µL do produto da segunda reação de PCR foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% (Gilbco BRL, Gaithersburg, MD) na presença de brometo de etídeo (0,5 mg/ml – Gilbco BRL). Nas tabelas abaixo encontram-se descritas as seqüências dos iniciadores empregados para a tipagem molecular do gene *mSP-1* e o tamanho dos fragmentos obtidos:

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Especificidade
C1F	AAC TAG AAG CTT TAG AAG ATG CAG	Comum
C3R	ACA TAT GAT TGG TTA AAT CAA AGA G	Comum
K2F	TCT TAA ATG AAG AAG AAA TTA CTA CAA A	Tipo K1
M2F	GGT TCA GGT AAT TCA AGA CGT AC	Tipo MAD20

R2F TAA AGG ATG GAG CAA ATA CTC AAG T Tipo RO33

Bloco	Iniciador direto	Iniciador reverso	Tipo Alélico	Tamanho (pb)
	K2F	C3R	Tipo K1	264-390
2-3	M2F	C3R	Tipo MAD20	154
	R2F	C3R	Tipo RO33	270

### 3.7- Sequenciamento direto do bloco 2 da MSP-1

O fragmento de cerca de 300pb do gene da PfMSP-1, compreendendo o final 3' do bloco 1, toda a extensão do bloco 2 e o final 5' do bloco 3 desta proteína, foi amplificado por meio de uma PCR usando os iniciadores C1F e C3R como descrito (Ferreira *et al.*, 1998b).

Produtos da PCR foram seqüenciados diretamente com o iniciador C1F usando o kit de seqüenciamento ThermoSequenase Cy5.5 Dye Terminator (Amersham Pharmacia Biotech). Os produtos da reação de seqüenciamento foram analisados no SEQ 4X4 Personal Sequencing System (Amersham Pharmacia Biotech). As seqüências obtidas foram então comparadas com aquelas encontradas no GenBank database.

### 3.8 – Tipagem molecular do bloco central repetitivo da MSP-2

O protocolo para tipagem molecular do gene *msp-2* nos isolados de *P. falciparum* provenientes de Acrelândia foi realizado conforme descrito previamente por Felger *et al.* (1999). O protocolo utilizado baseou-se na amplificação do DNA por PCR dupla e digestão com enzima de restrição.

#### 3.8.1- Amplificação da MSP-2 por meio de PCR dupla

O protocolo de PCR para amplificação do gene *msp-2* baseou-se em duas reações seqüenciais. Na primeira reação foram utilizados os iniciadores O3: 5'-GAA GGT AAT TAA AAC ATT GTC-3' (direto) e O2: 5'-GAG GGA TGT TGC TGC TCC ACA G-3' (reverso), enquanto na segunda utilizou-se os iniciadores P3: 5'-GAG TAT AAG GAG AAG TAT G-3' (direto) e P4: 5'-CTA GAA CCA TGC ATA TGT CC-3'(reverso). Ambos os pares de iniciadores têm como alvo seqüências conservadas nos blocos 1 a 5. A mistura para a PCR (volume final de 50µL) incluiu 5µL do DNA extraído ou 3µL do produto da primeira reação, 0,5µM de cada iniciador (primeira e segunda reação), 250µM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), 0,8 unidades de Taq polimerase e tampão taq 1X

(Phoneutria, BH) e 0,5mM de MgCl<sub>2</sub>. Tanto para a primeira quanto para a segunda reação a amplificação do DNA constou de um ciclo a 94<sup>o</sup>C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a 94<sup>o</sup>C por 30 segundos, 55<sup>o</sup>C por 2 minutos e 70<sup>o</sup>C por 2 minutos, e uma extensão final a 72<sup>o</sup>C por 7 minutos. Dez microlitros do produto proveniente da segunda reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5% (Gilbco BRL, Gaithersburg, MD) corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL- Gilbco BRL, Gaithersburg, MD). O fragmento de DNA proveniente dessa amplificação apresentou ~380 a 740 pb.

### **3.8.2- Digestão do produto de PCR com enzima de restrição**

Para a definição da família alélica (FC27 ou 3D7) presente nos isolados avaliados, 10μL do produto amplificado foi digerido em uma mistura contendo 10U da enzima de restrição *HinfI* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), tampão de reação correspondente (2μL) e BSA (0,2μL). As amostras foram incubadas a 37<sup>o</sup>C em banho-maria por duas horas e analisadas em gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etídeo (0,5mg/mL- Gilbco BRL, Gaithersburg, MD). Os isolados pertencentes à família alélica FC27 apresentaram dois fragmentos: um de 137 e outro de 115bp, respectivamente. Em contraste, isolados tipo 3D7 apresentaram dois fragmentos com 70 e 108pb, respectivamente. Infecções múltiplas com parasitos portando as duas famílias alélicas foram identificadas pela presença de ambos os padrões de restrição (Felger *et al.*, 1999).

### **3.9 - Análise dos Dados**

Para análise dos dados foram utilizados os programas estatísticos Epi-Info versão 6.03d (Centro de Controle e Prevenção a Doenças, Atlanta, GA) e SPSS versão 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

O teste do  $\chi^2$  e o teste de McNemar foram utilizados para comparar prevalências enquanto, a Análise de Variância (ANOVA), Wilcoxon ou Mann-Whitney foram utilizados para comparar índices de reatividade de anticorpos obtidos para cada antígeno (PfMSP-1 e PfMSP-2) dentro e entre determinados grupos.

O modelo de regressão linear múltipla foi utilizado para avaliar o efeito independente de determinadas variáveis na polarização de IgG.

Os coeficientes de Pearson's e Spearman's foram utilizados para checar a correlação entre anticorpos IgG anti-PfMSP-2 obtidos para os antígenos testados. Escores relativos à

intensidade de sintomas foram comparados entre os diferentes grupos de indivíduos utilizando-se o teste não paramétrico Mann-Whitney U. O teste de Somer's  $d$  foi utilizado para avaliar a relação entre intensidade de sintomas e variáveis tais como, níveis de parasitemia, idade, tempo de residência em área endêmica.

Para todos os testes utilizados definiu-se um nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS**

Os resultados encontram-se descritos em artigos publicados ou aceitos para publicação em revistas indexadas, os quais estão disponíveis em arquivos tipo pdf enumerados conforme abaixo:

- 1- SCOPEL, K. K. G., FONTES, C. J. F., FERREIRA, M. U., BRAGA, E. M. *Plasmodium falciparum*: IgG subclasses antibody response to merozoite surface protein-1 among Amazonian gold miners, in relation to infection status and disease expression. *Experimental Parasitology*, 109:124-134, 2005.
- 2- SCOPEL, K. K. G., FONTES, C. J. F., FERREIRA, M. U., BRAGA, E. M. Factors associated with immunoglobulin G subclass polarization in naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite proteins: a cross-sectional survey in Brazilian Amazonia. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13:1-4, 2006.
- 3- SCOPEL, K. K. G., da SILVA-NUNES, M., MALAFRONTTE, R. L., BRAGA, E. M., FERREIRA, M. U. Variant-specific antibodies to merozoite surface protein 2 (MSP-2) and clinical expression of *Plasmodium falciparum* malaria in rural Amazonians. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **2007**; no prelo
- 4- BRAGA, E. M., SCOPEL, K. K. G., KOMATSU, N. T., da SILVA-NUNES, M., FERREIRA, M. U. Polymorphism of the Fcγ receptor IIA and malaria morbidity. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 1:5-10, 2005.

## ***DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS***

As estratégias de controle de malária atualmente utilizadas não têm se mostrado eficazes em locais que apresentam condições ambientais, econômicas e sociais favoráveis à propagação da doença, haja vista as elevadas taxas de morbidade e mortalidade atribuídas, anualmente, à malária falciparum. Além disso, a constante emergência de cepas de plasmódios resistentes aos antimaláricos convencionais, aliada à crescente descrição de linhagens de anofelinos resistentes aos inseticidas, tem justificado a incessante busca por uma vacina antimalárica eficaz. Com tal propósito, vários protótipos envolvendo diferentes moléculas imunogênicas de vários estágios evolutivos dos plasmódios já foram testados (Doolan *et al.*, 2003), em sua maioria, em regiões de elevada endemicidade de onde, também, provêm a base dos conhecimentos adquiridos sobre a história natural da doença. Entretanto, os resultados obtidos até o momento demonstram uma baixa eficácia dessas moléculas na indução de proteção, o que constitui um dos principais obstáculos ao desenvolvimento de vacinas.

As explicações para os insatisfatórios resultados vacinais se devem, em parte, à ocorrência de polimorfismos nos genes que codificam as diferentes proteínas utilizadas como imunógenos (Miller *et al.*, 1993). A imunidade induzida por proteínas de superfície de merozoítos, MSP-1 e MSP-2, por exemplo, tem sido mais eficiente contra a reinfeção por parasitos homólogos (Darko *et al.*, 2005; Genton *et al.*, 2002). Além disso, estudos soropidemiológicos têm evidenciado que anticorpos anti-MSP-1 e anti-MSP-2 são capazes de discriminar entre variantes antigênicas que integram famílias alélicas distintas (Cavanagh *et al.*, 1998; Cavanagh & McBride, 1997; Ekala *et al.*, 2002).

Reconhecendo a importância do polimorfismo antigênico na determinação da resposta imune protetora, além da escassez de dados sobre a imunidade naturalmente adquirida em áreas de transmissão reduzida e instável, no presente estudo investigou-se a diversidade genética nos genes que codificam regiões conservadas e/ou polimórficas de duas proteínas de *P. falciparum* candidatas à vacina: MSP-1 e MSP-2. Além disso, foram avaliadas as respostas de anticorpos anti-MSP-1 e anti-MSP-2 e sua contribuição na expressão clínica da infecção em indivíduos provenientes de duas regiões endêmicas na Amazônia brasileira. Apesar das duas regiões geográficas apresentarem características populacionais, demográficas e de endemicidade distintas, casos assintomáticos da infecção pelo *P. falciparum* foram observados em ambas. O estudo dessas duas populações constituiu, portanto, uma excelente

oportunidade para se avaliar os fatores e possíveis mecanismos humorais associados à aquisição de imunidade em regiões de baixa a moderada transmissão com caráter instável e sazonal.

### **5.1 – Diversidade genética da MSP-1 e MSP-2 de *P. falciparum***

A história natural da malária é bem caracterizada em áreas hiperendêmicas com predomínio de infecções por *P. falciparum*. Nesses locais, a imunidade clínica adquirida é geralmente observada entre indivíduos adultos, mas raramente entre crianças e jovens. A extensiva diversidade observada nos antígenos plasmodiais constitui uma explicação aceitável para a lenta aquisição de imunidade clínica contra a malária naquelas regiões (Day & Marsh, 1991). Além disso, deve-se considerar que em locais de transmissão elevada e estável, o intenso fluxo e a rápida flutuação temporal de parasitos geneticamente distintos são fatores que interferem na aquisição de imunidade (Daubersies *et al.*, 1994; 1996; Eisen *et al.*, 1998). Em contraste, em locais com instabilidade de transmissão, a baixa prevalência da doença parece constituir um fator limitante para o desenvolvimento de imunidade (Vinetz *et al.*, 2002). Entretanto, a ocorrência de casos de infecções assintomáticas entre indivíduos residentes em áreas endêmicas brasileiras tem sido recentemente descrita (revisto por Coura *et al.*, 2006), inclusive, por nosso grupo (Fontes, 2001; Scopel, 2004; Scopel *et al.*, 2004).

Considerando o perfil epidemiológico da malária no Brasil, e sabendo que a variabilidade genética de populações de *Plasmodium* tende a assumir papel central nos mecanismos de evasão imune, uma provável explicação para a aquisição de imunidade em regiões de transmissão instável seria a restrita diversidade e/ou estabilidade no repertório de variantes genéticas em populações locais de parasitos.

Neste trabalho, essa hipótese pôde ser testada entre indivíduos residentes em duas áreas distintas da Amazônia com infecções por *P. falciparum* apresentando ausência ou reduzida intensidade de sintomas clínicos. Este estudo se baseou, sobretudo, na tipagem molecular e/ou seqüenciamento de genes do parasito que codificam a MSP-1 (bloco 2) e a MSP-2 (bloco 3). Em Apiacás, onde casos de infecções assintomáticas foram previamente descritos (Fontes, 2001; Scopel, 2004), foi observada a distribuição similar das famílias alélicas de MSP-1 (MAD20, K1 e RO33). Entre os isolados seqüenciados, sete diferentes haplótipos foram detectados, sendo dois exclusivos do estado de Mato Grosso em comparação àqueles previamente caracterizados no estado de Rondônia (Ferreira *et al.*, 2003). Cabe



ressaltar, ainda, que nenhuma associação foi estabelecida entre família alélica, haplótipo, presença ou ausência de sintomas clínicos. Além disso, entre os isolados seqüenciados não se observou a ocorrência de haplótipos híbridos. Haplótipos híbridos resultam da fertilização cruzada e da recombinação meiótica entre gametas pertencentes a famílias alélicas distintas, e somente ocorrem no mosquito vetor (Snewin *et al.*, 1991; Irion *et al.*, 1997). Contudo, apesar da elevada frequência de genótipos mistos em algumas regiões endêmicas (Daubersies *et al.*, 1996; Babiker *et al.*, 1997; Sallenave-Sales *et al.*, 2003), formas alélicas híbridas têm sido raras na natureza correspondendo, por exemplo, a aproximadamente 7% das seqüências de MSP-2 depositadas no GenBank (Hoffmann *et al.*, 2001).

Semelhante ao observado em outra região com reduzida transmissão de malária na América Latina (Tami *et al.*, 2002), baixa diversidade genética também foi verificada para o bloco 3 da MSP-2 no estudo longitudinal conduzido em Acrelândia-Ac. Entre os isolados avaliados, nenhuma diferença significativa foi observada na distribuição das famílias alélicas FC27 e 3D7. Além disso, tais alelos parecem não interferir na presença ou intensidade dos sintomas apresentados pelos indivíduos infectados. Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram as observações de Córtes e colaboradores (2004) na Papua Nova Guiné (Córtes *et al.*, 2004) mas, contradizem estudos realizados em outras regiões, como Senegal (Scherf *et al.*, 1991), Gabão (Ekala *et al.*, 2002; Kun *et al.*, 1998), Papua Nova Guiné (Engelbrecht *et al.*, 1995) e Tanzânia (Magesa *et al.*, 2002), onde determinadas famílias alélicas estiveram associadas à doença clínica. O elevado grau de polimorfismo evidenciado nos motivos repetitivos de determinadas famílias alélicas, tais como 3D7, pode explicar esses achados, como sugerido por Ferreira & Hartl, 2006.

Vários outros fatores também podem estar relacionados à reduzida diversidade genética observada nos isolados de parasitos avaliados. A limitada flutuação e/ou introdução de cepas de parasitos geneticamente distintos, interferindo na ocorrência de recombinação meiótica no mosquito vetor, têm sido sugeridas (Sakihama *et al.*, 2007). Muitos estudos indicam que a diversidade genética e a extensão dos eventos de recombinação meiótica no gene *msp-1* sejam mais pronunciadas em áreas de transmissão intensa (Scherf *et al.*, 1991; Felger *et al.*, 1994; *apud* Tanabe *et al.*). Contudo, estudos conduzidos em áreas com reduzidos níveis de transmissão demonstraram elevada diversidade tanto do gene *msp-1* quanto do gene *msp-2* (Babiker *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1998b; Paul *et al.*, 1998; Zwetyenga *et al.*, 1998; Sakihama *et al.*, 2006). Se for considerado, então, que os eventos de recombinação meiótica ocorrem menos frequentemente em regiões com reduzida

endemicidade, pode-se pressupor que outros mecanismos sejam responsáveis pela elevada variabilidade genética em populações de plasmódios que circulam em determinadas regiões de transmissão reduzida.

A ocorrência de diversidade em populações naturais de *P. falciparum* também é favorecida pela presença de alelos distintos pertencentes a uma mesma família infectando um mesmo indivíduo (Babiker *et al.*, 1994; Sakihama *et al.*, 2001). Embora essa questão não tenha sido abordada neste estudo, em outras regiões endêmicas brasileiras, como Ariquemes e Porto Velho, o número médio de alelos/isolado foi reduzido, variando de 1,1 a 1,3 para o bloco 2 da MSP-1 e para o bloco 3 da MSP-2 (Sallenave-Sales *et al.*, 2000; Sallenave-Sales *et al.*, 2003). Em outras regiões com perfil epidemiológico semelhante, como a Guiana Francesa, o número médio de alelos/indivíduo foi cerca de 1,0, tanto para a MSP-1 quanto para MSP-2 (Ariey *et al.*, 1999). Em contraste, em regiões de elevada endemicidade, tais como Vietnã e Panguí, na Colômbia, o número médio de alelos MSP-1 e MSP-2 foi relativamente maior, variando de 1,8 a 2,4 por indivíduo (Weisman *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2002, respectivamente).

No Senegal, área mesoendêmica, o número médio de alelos MSP-1 e MSP-2 foi menor entre isolados de indivíduos assintomáticos (1,5 alelos/isolado) quando comparado aos isolados provenientes de pacientes sintomáticos (2,3 alelos/isolado) (Zwetyenga *et al.*, 1998). Em um estudo semelhante na Tanzânia, o número médio de alelos observados entre indivíduos assintomáticos e sintomáticos foi de 2,4 e 3,4, respectivamente (Bereczky *et al.*, 2007). É interessante observar que indivíduos assintomáticos que possuem somente um clone de parasitos apresentaram maior risco de tornarem-se sintomáticos quando comparados àqueles que possuem infecções alélicas mistas (2-3 clones) (Bereczky *et al.*, 2007). A redução no número de alelos em indivíduos assintomáticos também tem demonstrado correlação inversa com o fator idade (Ntoumi *et al.*, 1995). Esses dados corroboram a hipótese de que a reduzida proporção de alelos por indivíduo pode contribuir para o desenvolvimento de imunidade em regiões de baixa transmissão por limitarem a geração de novas variantes antigênicas. Contudo, outros estudos tornam-se necessários, já que uma maior frequência de alelos geneticamente distintos tem sido descrita em indivíduos assintomáticos em outras regiões (Daubersies *et al.*, 1996; Babiker *et al.*, 1997; Farnert *et al.*, 1999; Ekala *et al.*, 2002).

Um ponto que merece discussão refere-se à intensa migração de populações humanas, característica de áreas de garimpo e de mineração, que pode ser considerada um fator gerador de diversidade por permitir a introdução de novos alelos em uma dada região. Dado o restrito

repertório de variantes alélicas na região de Apiacás, a intensa flutuação populacional pode ter propiciado a maior exposição dos indivíduos às variantes locais, contribuindo, assim, para a determinação do *status* imune verificado entre os garimpeiros que fizeram parte deste estudo.

Em suma, os dados apresentados nesta pesquisa contribuem para o maior conhecimento da estrutura genética das populações de plasmódios circulantes no Brasil, confirmando a ocorrência de um repertório restrito de variantes antigênicas nas áreas endêmicas brasileiras (Da Silveira *et al.*, 1999; Sallenave-Sales *et al.*, 2003), o que pode justificar os casos de infecções assintomáticas descritos neste e em outros estudos prévios.

## **5.2 – Reconhecimento imune de MSP-1 e MSP-2 de *P. falciparum***

A distribuição de subclasses de IgG específicas contra diferentes antígenos de formas assexuadas de *Plasmodium* e suas implicações na aquisição de imunidade anti-doença em áreas de transmissão instável de malária não se encontram definidas. Sugerida a restrição gênica das populações de plasmódios no Brasil, foi definida como meta à determinação dos perfis de respostas de anticorpos contra antígenos de blocos polimórficos (bloco 2/3D7, MAD20 e RO33) e conservados (PfMSP-1<sub>19</sub>) da MSP-1 de *P. falciparum*. Além disso, pretendeu-se correlacionar esses perfis ao *status* clínico da infecção apresentada pelos indivíduos de Apiacás. Nenhuma correlação pôde ser estabelecida entre níveis de anticorpos citofílicos, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>, e os grupos de indivíduos categorizados de acordo com a presença ou ausência de infecção patente (infectados e não-infectados) e presença ou ausência de sintomas clínicos (assintomáticos e sintomáticos). Além disso, a distribuição das subclasses de IgG específicas, independente do antígeno avaliado, não se apresentou associada ao grau de exposição à malária. Esses dados contrariam um estudo anterior conduzido por nosso grupo nessa mesma área (Braga *et al.*, 2002), onde níveis elevados de anticorpos IgG<sub>1</sub> anti-PfMSP-1<sub>19</sub> estiveram associados à ausência de sintomas. Um aspecto que diferencia os dois estudos é que, no primeiro, o critério para se determinar infecção por *P. falciparum* foi a presença do parasito exclusivamente pelo método de gota espessa, enquanto no segundo caso foi utilizada a detecção do parasito por PCR (Scopel *et al.*, 2004) em adição ao exame microscópico. Assim, no primeiro estudo, somente indivíduos com moderadas ou altas parasitemias foram analisados, enquanto no segundo, indivíduos com parasitemias muito baixas foram incluídos na categoria de assintomáticos. Tal fato sugere que os mecanismos humorais podem ser modulados pelos níveis de parasitos circulantes. Deve-se destacar que em regiões africanas

como Gana e Gabão, associações positivas entre anticorpos anti-MSP-1<sub>19</sub> e proteção anti-doença também não foram relatadas entre os grupos de indivíduos avaliados, crianças em sua maioria, apresentando parasitemias consideráveis (Dodoo *et al.*, 1999; Riley *et al.*, 2000).

Nessa mesma população de garimpeiros, avaliou-se a resposta de anticorpos dirigidos contra seis variantes antigênicas que integram a região repetitiva da MSP-2 (bloco 3/25, AM89, FUP/CP, 3D7, S20 e FC27). De modo similar ao observado para o bloco 2 da MSP-1, tanto a frequência como os níveis de IgG<sub>3</sub> foram expressivos quando comparados às demais subclasses.

Embora nenhuma associação positiva entre anticorpos e proteção tenha sido observada em nossos estudos, não é possível concluir que os anticorpos anti-MSP-1 e anti-MSP-2 não participem dos mecanismos imunológicos que promovem proteção. A técnica de ELISA é amplamente útil para determinação dos níveis de anticorpos antígeno-específicos. Contudo, ela não é capaz de discriminar anticorpos protetores daqueles potencialmente bloqueadores (isto é, aqueles capazes de competir por epitopos comuns na molécula antigênica) e/ou neutros (não afetam a invasão) (Patiño *et al.*, 1997; Dekker *et al.*, 2004). Portanto, torna-se fundamental o desenvolvimento e a validação de técnicas que permitam avaliar “in vitro” o papel funcional dos anticorpos naturalmente adquiridos.

Evidências da importância do uso de testes funcionais para avaliação da atividade biológica de anticorpos detectados pela técnica imunoenzimática foram previamente descritas por Jonh *et al.* (2004). Neste estudo, níveis elevados de anticorpos IgG anti-PfMSP-1<sub>19</sub> não estiveram associados à proteção antimalárica. Contudo, esses anticorpos, em ensaios de inibição de invasão utilizando-se duas linhagens de *P. falciparum*, uma “selvagem” e outra expressando a MSP-1<sub>19</sub> de *P. chabaudi*, foram capazes de opsonizar parasitos expressando MSP-1<sub>19</sub> homóloga, bloqueando, assim, a invasão (Jonh *et al.*, 2004). Estudos semelhantes aos realizados por Jonh e colaboradores (2004) já haviam sido conduzidos previamente com o objetivo de se especular sobre a importância funcional dos anticorpos anti-MSP-1<sub>19</sub> espécie-específicos na imunidade antiparasito (O’Donnell *et al.*, 2001; Koning-Ward *et al.*, 2003). Tais estudos também demonstraram que anticorpos IgG que reconhecem essa proteína são significativamente eficientes no bloqueio da invasão de eritrócitos por parasitos expressando a MSP-1<sub>19</sub> homóloga.

Uma característica da resposta imune humoral observada neste e em outros estudos (Cavanagh *et al.*, 2001; Jouin *et al.*, 2001; Tongren *et al.*, 2006) é a tendência de alguns antígenos de estágios sanguíneos de *P. falciparum* estimularem uma produção polarizada de

anticorpos de determinada subclasse. Como observado nesta e em outras pesquisas, antígenos conservados (PfMSP-1<sub>19</sub>) têm sido freqüentemente associados à presença de IgG<sub>1</sub> ou IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> combinadas (Egan *et al.*, 1995; Nguer *et al.*, 1997; Cavanagh *et al.*, 2001; Garraud *et al.*, 2002; Tongren *et al.*, 2006). Por outro lado, antígenos polimórficos, tais como aqueles que representam o bloco 2 da MSP-1 e o bloco 3 repetitivo da MSP-2, induzem preferencialmente níveis elevados de IgG<sub>3</sub> (Taylor *et al.*, 1995; da Silveira *et al.*, 1999; Cavanagh *et al.*, 2001; Cavanagh *et al.*, 2004; Jouin *et al.*, 2001; Polley *et al.*, 2005; Tongren *et al.*, 2006).

Apesar de fatores como idade, tempo de exposição em áreas altamente endêmicas e infecção atual possam modular o balanço entre as subclasses de IgG induzindo uma forte polarização para IgG<sub>1</sub> ou IgG<sub>3</sub> (Taylor *et al.*, 1998; Diallo *et al.*, 2002; Metzger *et al.*, 2003; Polley *et al.*, 2004), essas variáveis pouco influenciaram a distribuição das imunoglobulinas anti-MSP-1 e anti-MSP-2 entre os garimpeiros de Apicás. Os dados apresentados nesta pesquisa são, contudo, condizentes com a hipótese de que propriedades intrínsecas de imunógenos possam modular o perfil de IgG durante a infecção, como já proposto (Cavanagh *et al.*, 2001) e recentemente corroborado (Tongren *et al.*, 2006). Essa hipótese é suportada por um estudo prévio conduzido “*in vitro*” através do qual se verificou que células mononucleares de indivíduos freqüentemente expostos ao *P. falciparum* produziram as quatro subclasses de IgG após estimulação por antígenos totais (Garraud *et al.*, 2002). Por outro lado, somente uma ou duas subclasses foram observadas quando as células foram estimuladas por um antígeno definido. Nesse caso, os perfis de anticorpos anti-MSP-1<sub>19</sub> e anti-MSP-2 produzidos “*in vitro*” correlacionaram-se com as subclasses detectadas no plasma (IgG<sub>1</sub>/IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>3</sub>, respectivamente) (Garraud *et al.*, 2002). Em um estudo semelhante, foi demonstrado que diferentes domínios antigênicos da MSP-1 de *P. chabaudi* foram reconhecidos por distintas subclasses de IgG. Além disso, a resposta proliferativa de células T CD4<sup>+</sup> e o perfil de citocinas próinflamatórias (IFN- $\gamma$ ) observadas “*in vitro*” em resposta a tais domínios foram marcadamente distintos (Quin & Langhorne, 2001). Embora tais observações possam ter importantes implicações no desenvolvimento de vacinas, ainda não está claro como as propriedades estruturais de determinados antígenos podem modular a resposta de anticorpos. Sabe-se que motivos repetitivos de determinados antígenos podem auxiliar na indução diferenciada de determinada subclasse de IgG. Contudo, em nossos estudos, o fato de anticorpos dirigidos contra o domínio não repetitivo do bloco 2 da MSP-1 (RO33) terem sido

predominantemente da subclasse IgG<sub>3</sub>, sugere que as repetições encontradas em determinados antígenos não são requeridas para a indução de polarização da resposta de subclasses.

Outro ponto que merece discussão diz respeito ao processamento e à apresentação de antígenos pelo sistema imunológico. A MSP-1 e a MSP-2, por exemplo, são expressas pelo mesmo estágio evolutivo do parasito e disponibilizadas simultaneamente à ação de células efetoras. No entanto, enquanto o processamento do fragmento conservado de 19-kDa da MSP-1 (PfMSP-1<sub>19</sub>) parece ocorrer predominantemente via macrófagos após a fagocitose do merozoíto ou do eritrócito parasitado, os antígenos correspondentes aos domínios N-terminal da MSP-1 e da MSP-2 são processados por células apresentadoras de antígenos (Cavanagh *et al.*, 2001). A diferença na captação e no processamento desses domínios associa-se ao fato do fragmento de 19-kDa permanecer ancorado na superfície do merozoíto após a clivagem de seu precursor, enquanto os demais fragmentos são liberados como antígenos solúveis. Embora não seja totalmente compreendida a influência da captação, do processamento e da apresentação dos antígenos plasmodiais na modulação da resposta imune antimalárica, tais especulações são de fundamental relevância sobre a ótica do desenvolvimento de vacinas.

Considerando que IgG<sub>3</sub> foi consideravelmente detectada em resposta a antígenos polimórficos, não estando, contudo, associada à presença ou ausência de sintomas, é importante definir seu papel durante as infecções maláricas. Embora IgG<sub>3</sub> esteja, não raramente, associada à proteção antimalárica em distintas regiões endêmicas (Nguer *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1998; Cavanagh *et al.*, 2001; Metzger *et al.*, 2003), sabe-se que essa imunoglobulina possui meia vida curta na circulação, geralmente entre 8 a 10 dias. Isso faz com que o predomínio dessa subclasse possa ser interpretado como um mecanismo de evasão imune, já que freqüentes re-exposições aos parasitos seriam necessárias para manter os níveis elevados dessa imunoglobulina (Ferrante & Rzepczyk, 1997). Considerando-se que neste estudo a polarização para IgG<sub>3</sub> não foi claramente influenciada pela idade, pela exposição cumulativa aos parasitos, pela infecção atual e pelos polimorfismos do receptor de imunoglobulinas (FcγRIIa), a hipótese aventada para explicar a presença dessa imunoglobulina é que os níveis de IgG<sub>3</sub> podem ser preferencialmente modulados pela natureza da molécula.

Outra observação interessante, decorrente de nossos estudos refere-se à expressiva presença de IgG<sub>2</sub> entre as subclasses de anticorpos pesquisadas, independente do antígeno e/ou do grupo de indivíduos avaliado. Este constituiu um dado intrigante, já que em áreas

altamente endêmicas observa-se que enquanto os anticorpos citofílicos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> parecem predominar nos soros de indivíduos imunes, os não citofílicos IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> parecem predominar em indivíduos não imunes (Druilhe & Pérignon, 1994; Ferreira *et al.*, 1996). Acredita-se que anticorpos não citofílicos, quando induzidos por uma infecção, competem com IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> pela ligação a epítopos antigênicos, inibindo a ativação de mecanismos como fagocitose e ADCI (Bouharoun-Tayoun & Druilhe, 1992). Contudo, altos níveis de IgG<sub>2</sub> têm sido associados ao reduzido risco de infecção por *P. falciparum* em crianças e adultos africanos. A proteção mediada por IgG<sub>2</sub> parece, contudo, depender da presença de receptores FcγRIIa expressando o aminoácido histidina<sup>131</sup> (H<sup>131</sup>) (Deleron *et al.*, 1997; Aucan *et al.*, 2000). Neste estudo, apesar de IgG<sub>2</sub> ter sido uma subclasse frequentemente detectada em resposta a todos os antígenos estudados, e de cerca de 70% dos indivíduos de Apiacás possuírem seu ligante (o receptor FcγRIIa-H<sup>131</sup>) (Braga *et al.*, 2005), nenhuma associação foi observada entre essa subclasse e a proteção anti-doença. Além disso, os polimorfismos no receptor FcγRIIa não afetaram a distribuição de anticorpos anti-MSP-1 e anti-MSP-2 nos indivíduos avaliados. Os dados apresentados nesta pesquisa são divergentes daqueles publicados por Ntoumi *et al.* (2005), em que crianças africanas possuindo o genótipo FcγRIIa-R<sup>131</sup> apresentaram, de modo significativo, menores níveis de anticorpos IgG<sub>2</sub> anti-MSP-2 quando comparados às crianças com o genótipo FcγRIIa-H<sup>131</sup>. Neste estudo, níveis reduzidos de IgG<sub>2</sub> anti-MSP-2 estiveram fortemente associados à ocorrência do traço falciforme, mas nenhuma relação foi estabelecida entre a distribuição dos genótipos FcγRIIa e a ocorrência de HbAS (Ntoumi *et al.*, 2005).

Diante das várias especulações sobre a interação de IgG<sub>2</sub> com receptores Fcγ mediando a ativação de mecanismos imunes como ADCI, algumas questões merecem ser discutidas. Primeiro, apesar da boa evidência sobre a participação de IgG<sub>2</sub> no reduzido risco de infecção por *P. falciparum*, descrita por Aucan *et al.* (2000), entre adultos africanos, um estudo atual realizado “in vitro” demonstra claramente a incapacidade de essa subclasse ativar ADCI (Jafarshad *et al.*, 2007). Neste estudo, somente IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> mostraram-se potentes indutores desse mecanismo com destacada eficiência para IgG<sub>3</sub> (~60% mais ativo que IgG<sub>1</sub>). Uma das prováveis explicações para maior eficiência de IgG<sub>3</sub> em relação à IgG<sub>1</sub> relaciona-se à maior extensão da região dobrável de IgG<sub>3</sub>, permitindo sua maior interação com o antígeno e receptores Fcγ (Redpath *et al.*, 1998). Essas observações podem, portanto, abortar a hipótese de que altos níveis de IgG<sub>3</sub> possam constituir um mecanismo de evasão imune do parasito,

conforme discutido anteriormente. Outro dado relevante obtido por Jafarshad e colaboradores (2007) diz respeito ao fato da ativação do mecanismo de ADCI revelar-se dependente da ativação sinérgica de ambos os receptores FcγRIIa e FcγRIIIa. Essa conclusão apóia-se no fato da atividade anti-parasito proporcionada pela ativação de monócitos ter sido completamente inibida quando qualquer um desses receptores foi bloqueado com anticorpos monoclonais específicos. As conseqüências clínicas dos polimorfismos observados nesses receptores e a influência dos mesmos na susceptibilidade à infecção pelos plasmódios, no entanto, necessitam ser investigadas.

### **5.3 – Anticorpos variante-específicos e malária clínica**

Um importante aspecto a ser considerado durante o desenvolvimento e a avaliação de vacinas antimaláricas é sua capacidade de induzir respostas de anticorpos que atuem sobre cepas heterólogas de parasitos. Sabe-se que vacinas que contêm somente uma forma alélica de antígenos polimórficos podem induzir respostas imunes alelo-dirigidas e, portanto, podem selecionar parasitos que expressam alelos heterólogos. A vacinação de crianças, por exemplo, com o antígeno 3D7 (MSP-2), favoreceu a infecção por parasitos, expressando a família alélica FC27 em uma área endêmica da Papua Nova Guiné (Genton *et al.*, 2002). No Brasil, com exceção de nossos estudos, a influência de determinada família alélica na definição do caráter clínico da infecção malárica, bem como sobre a intensidade dos sintomas referentes à doença, não têm sido investigada. Além disso, também não há especulações sobre o papel de anticorpos alelo-específicos na modulação da expressão clínica da infecção.

Entre os garimpeiros de Apiacás, a expressão clínica da infecção não foi modulada por anticorpos que reconhecem especificamente a família alélica expressa pelo parasito causador da infecção. Além disso, foi observada a falta de associação entre a especificidade de anticorpos circulantes e as variantes detectadas em isolados de parasitos. Esses dados corroboram estudos prévios conduzidos em outras áreas de transmissão de malária no Brasil (Da Silveira *et al.*, 1999).

Anticorpos específicos para as variantes alélicas K1 e MAD20 (Bloco 2) têm sido significativamente associados ao baixo risco prospectivo de crianças africanas contraírem malária (Conway *et al.*, 2000). Além disso, indivíduos que apresentam, simultaneamente, anticorpos anti-K1 e anti-MAD20, estiveram mais protegidos que aqueles apresentando anticorpos para uma única família (Conway *et al.*, 2000). A forte associação entre anticorpos



anti-bloco 2 da MSP-1 e o baixo risco de malária clínica sugere que os motivos repetitivos dessas moléculas contêm epitopos específicos e imunodominantes que modulam as respostas de células B, induzindo a produção de anticorpos protetores (Polly *et al.*, 2003). Contudo, a presença de anticorpos reconhecendo um epitopo específico não exclui a possibilidade de uma infecção subsequente por parasitos expressando epitopos homólogos (Fruh *et al.*, 1991; Jouin *et al.*, 2001).

Nesta pesquisa, não foram encontradas evidências de que a presença de anticorpos específicos para determinada família alélica possa determinar a ausência ou a ocorrência de infecções com sintomas (febre, dor de cabeça, calafrios, sudorese, mialgia, artralgia, dor abdominal, náuseas e vômitos) menos pronunciados. A taxa de parasitos determinada no momento do diagnóstico mostrou-se melhor preditor da expressão clínica da infecção quando comparada ao nível de exposição cumulativa à malária e aos níveis de anticorpos anti-MSP-2. Esses dados são consistentes com a interpretação de que a imunidade adquirida reduz a densidade de parasitos, mas sugere que outras moléculas imunogênicas do parasito e/ou fatores intrínsecos ao hospedeiro podem ser responsáveis pela proteção apresentada por alguns indivíduos. Considerando o fato de que as populações avaliadas nesta pesquisa são compostas majoritariamente por adultos, discute-se a possibilidade de que fatores hormonais possam estar envolvidos na aquisição de proteção clínica, como previamente proposto (Kurtis *et al.*, 2001; Leenstra *et al.*, 2003). Essa é, portanto, uma questão que merece ser melhor averiguada.

Em crianças africanas, os episódios clínicos de malária têm sido associados à ocorrência de *gaps* no repertório de variantes antigênicas reconhecidas por anticorpos (revisito por Bull and Marsh, 2002). No Sudão, por exemplo, indivíduos que apresentam anticorpos contra um extenso painel de variantes da PfEMP-1 foram protegidos contra a malária clínica quando desafiados com parasitos expressando antígenos homólogos (Giha *et al.*, 2000). A ocorrência de *gaps* no repertório de variantes antigênicas tem sido extensivamente testada em relação aos antígenos variantes de superfície de eritrócitos infectados, mas pouco é conhecido em relação a antígenos de superfície de merozoítos. Apesar de nossos estudos sugerirem a ocorrência de *gaps* no reconhecimento imunológico das famílias alélicas de blocos polimórficos da MSP-1, esses não determinaram o caráter sintomático ou assintomático da infecção.

Dentre os fatores propostos para explicar as observações referentes à falta de associação entre família alélica e respostas de anticorpos, destacam-se: (i) a presença de

parasitos geneticamente distintos, mas que não foram identificados durante a tipagem (Farnert *et al.*, 1997); (ii) a falta de associação entre a composição genética estrutural das proteínas recombinantes utilizadas e aquelas apresentadas pelos parasitos durante a infecção; (iii) a presença de anticorpos com diferentes especificidades induzida por infecções prévias e (iv) a ocorrência do mecanismo de impressão clonal ou *original antigenic sin* (Taylor *et al.*, 1996).

A ocorrência do fenômeno chamado impressão clonal (*clonal imprinting*) foi proposta para explicar o não reconhecimento de variantes de MSP-2 em diferentes estudos conduzidos em populações africanas (Taylor *et al.*, 1996; Franks *et al.*, 2003). Assim, espera-se que freqüentes reinfecções com populações de parasitos geneticamente distintas induzam um *booster* no perfil de anticorpos preexistentes, mas não a produção de anticorpos com novas especificidades. Mais detalhadamente, durante uma primeira infecção, ocorreriam expansão e maturação de células T e B que se tornariam células de memória, expressando receptores de superfície para antígenos e moléculas co-estimulatórias. As interações entre células B e T permitiriam a produção de anticorpos com especificidades definidas. Em uma resposta secundária a outras variantes antigênicas, ocorreria a competição de células B de memória (apresentando alta densidade de receptores antigênicos de superfície) e células B não primadas. Neste caso, as células B de memória apresentariam os antígenos diretamente para células T de memória, originando uma resposta de anticorpos dirigida contra epitopos relativos à primeira infecção (Riley, 1996).

Para testar a hipótese de impressão clonal, foi utilizada a coorte conduzida entre indivíduos de uma comunidade rural no estado do Acre com base na resposta de anticorpos contra cinco variantes antigênicas que integram as duas famílias alélicas da MSP-2 (bloco 3 repetitivo). Os resultados obtidos apontam, mesmo que de forma não concreta, evidências sobre a ocorrência deste fenômeno. As evidências se baseiam no fato de que a maioria dos indivíduos infectados com parasitos expressando o alelo 3D7 falhou em reconhecer antígenos que integram essa família, mas mantiveram as respostas de anticorpos previamente observadas contra antígenos heterólogos. Entretanto, alguns indivíduos infectados com parasitos expressando o alelo 3D7 soroconverteram durante a infecção, mantendo os níveis de anticorpos anti-FC27 previamente detectados. Esse fato contraria a idéia esperada de uma resposta exclusiva contra epitopos prefixados. Além disso, anticorpos gerados em resposta às variantes 3D7 foram rapidamente consumidos da circulação, sugerindo que tais respostas foram geradas independente da ativação de células T (Mond *et al.*, 1995). Entretanto, não se pode definir se os baixos padrões de reconhecimento imunológico observados para as

variantes 3D7 representam a extensiva diversidade alélica ou a baixa imunogenicidade dos antígenos que integram essa família.

Cabe ressaltar que respostas de anticorpos anti-MSP-1 em um estudo de coorte no Sudão não demonstram evidências reais sobre a ocorrência do fenômeno de impressão clonal (Cavanagh *et al.*, 1998). Neste estudo, os indivíduos avaliados não apresentaram uma resposta de anticorpos compatível com a hipótese de fixação de epítopos para qualquer antígeno do bloco 2 polimórfico. Visto que a maioria das respostas de anticorpos observadas para o bloco 2 coincidiu com a família alélica detectada no isolado de parasito, os autores sugerem que tais especificidades podem indicar somente infecção recente e não respostas fixadas a variantes para as quais o indivíduo foi previamente exposto (Cavanagh *et al.*, 1998). Portanto, estudos ainda são necessários sobre confirmar a ocorrência do evento de impressão clonal entre indivíduos expostos à malária.

Dada a ausência de associações entre o *status* clínico das infecções maláricas e os parâmetros genéticos e imunológicos abordados nesta pesquisa, torna-se evidente que sobre a ótica do desenvolvimento de vacinas, as observações provenientes de estudos conduzidos em regiões com elevada endemicidade não devem ser extrapoladas para áreas com perfis endêmicos variados. Nossos resultados representam contribuições significativas quanto ao conhecimento das relações parasito-hospedeiro, estabelecidas em regiões de reduzida endemicidade.

## CONCLUSÕES

Nossos estudos nos permitem concluir que:

- o repertório de haplótipos que representam o bloco 2 polimórfico da MSP-1 de *P. falciparum* apresentou-se restrito em Apiacás;
- o perfil de anticorpos naturalmente adquiridos e a expressão clínica da doença não foram influenciados pelas variantes alélicas presentes nos isolados infectantes;
- diferentes blocos de uma mesma molécula induzem diferentes perfis de subclasses de IgG em indivíduos naturalmente expostos à infecção por *P. falciparum*: níveis similares de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> são observados para bloco 17 conservado da MSP-1, enquanto anticorpos IgG<sub>3</sub> predominam contra o bloco 2 polimórfico desta mesma proteína;
- a exposição cumulativa à malária não se correlacionou à distribuição de subclasses de IgG anti-MSP-1, independente do status clínico da infecção;
- os níveis de IgG<sub>2</sub> anti-MSP-1, bem como a frequência de receptores FcγRIIA-H<sup>131</sup>, não se associaram à proteção antimalárica em regiões de transmissão instável;
- variáveis como tempo de exposição em área endêmica, infecção atual, idade e polimorfismos nos receptores FcγRIIA pouco afetaram a polarização para IgG<sub>3</sub> verificada para antígenos que integram os blocos polimórficos da MSP-1 e MSP-2 de *P. falciparum*;
- as respostas de anticorpos anti-MSP-2 observadas em indivíduos com expressões clínicas variadas na Amazônia Brasileira são predominantemente família alélica-específica;

- antígenos pertencentes à família alélica FC27 da MSP-2, mas não 3D7, induzem uma longa memória imunológica mesmo na ausência de re-exposições à variantes homólogas;
- anticorpos gerados contra as variantes FC27 e 3D7 não impedem infecções subseqüentes por parasitos expressando alelos homólogos;
- anticorpos anti-MSP-1 e anti-MSP-2 variante-específicos não influenciaram a determinação do caráter clínico da infecção,
- em áreas de transmissão instável no Brasil, os níveis de parasitos circulantes são bons preditores de prevalência e intensidade de sintomas clínicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALECRIM, M. S., ALECRIM, W. D., ALBUQUERQUE, B. C., DOURADO, H. V., WANSSA, M. D. Resistance of *Plasmodium falciparum* in the Brazilian Amazon to the combination of sulfadoxine and pyrimethamine. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 24:44-47, 1982.
- ALECRIM, M. S., ALECRIM, W. D., MACEDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine in Brazilian Amazon Region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32:67-68, 1999.
- ALVES, F. P., DURLACHER, R. R., MENEZES, M. J., KRIEGER, H., DA SILVA, L. H. P., CAMARGO, E. P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:641-648, 2002.
- AL-YAMAN, F., GENTON, B., ANDERS, R. F., FALK, M., TRIGLIA, T., LEWIS, D., HUI, J., BECK, H.-P., ALPERS, M. P. Relationship between humoral response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 and malaria morbidity in a highly endemic area of Papua New Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51:593-602, 1994.
- AL-YAMAN, F., GENTON, B., ANDERS, R. F., TARAICA, J., CHANG, S. P., HUI, G. S., ALPERS, M. P. Assessment of the role of the humoral response to *Plasmodium falciparum* MSP-2 compared to RESA and Spf66 in protecting Papua New Guinean children from clinical malaria. *Parasite Immunol.* 17:493-501, 1995.
- AL-YAMAN, F., GENTON, B., KRAMER, K. J., CHANG, S. P., HUI, G. S., BAISSOR, M., ALPERS, M. P. Assessment of the role of naturally acquired antibody levels to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in protecting Papua New Guinean children from malaria morbidity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54:443-448, 1996.
- AMINO, R THIBERG, S., MARTIN, B., CELLI, S., SHORTE, S., FRISCHKNECHT, F., MENARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature Med.* 12:220-224, 2006.
- ANDERS, R. F., MC COLL, D. J., COPPEL, R. L. Molecular variation in *Plasmodium falciparum*: polymorphic antigens of asexual erythrocytic stages. *Acta Trop.* 53:239-253, 1993.
- ANDRADE, A. L., MARTELLI, C. M., OLIVEIRA, R. M., ARIAS, J. R., ZICKER, F., PANG, L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. *Clin. Inf. Dis.* 20:475, 1995.
- APIO, B., NALUNKUMA, A., OKELLO, D., RILLEY, E., EGWANG, T. G. Human IgG subclass antibodies to the 19 kilodalton carboxy terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP1(19)) and predominance of the MAD20 allelic type of MSP1 in Uganda. *East Afr Med. J.* 77:189-193, 2000.
- ARIBOT, G., ROGIER, C., SARTHOU, J. L., TRAPE, J. F., BALSDE, A. T., DRUILHE, P., ROUSSILHON, C. Pattern of immunoglobulin isotype response to *P. falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, West Africa). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54:449-457, 1996.

- ARIEY, F., CHALVET, W., HOMMEL, D., MERCEREAU-PUIJALON, O., DUCHEMIN, J-B., SARTHOU, J-L., REYNES, J-M., FANDEUR, T. *Plasmodium falciparum* parasites in French Guiana: limited genetic diversity and high selfing rate. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 61:978-984, 1999.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K., RILEY, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **J. Immunol.** 169:2956-2963, 2002.
- AUCAN, C., TRAORE, Y., TALL, F., NACRO, B., TRAORE-LEROUX, T., FUMOUX, F., RIHET, P. High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. **Infect. Immun.** 68:1252-1258, 2000.
- AYI, K., GIRIBALD, G., SKOROKHOD, A., SCHAWARZER, E., PRENDERGAST, P. T., ARESE, P. 16 $\alpha$ -Bromoepiandrosterone, an antimalarial analogue of the hormone dehydroepiandrosterone, enhances phagocytosis of ring stage parasites erythrocytes: a novel mechanism for antimalarial activity. **Antimic. Ag. Chem.** 46:3180-3184, 2002.
- AYI, K., TURRIRI, F., PIGA, A., ARESE, P. Enhanced phagocytosis of ring-parasited mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum-malaria in sickle-trait and beta-thalassemia-trait. **Blood.** 104:3364-3371, 2004.
- BABIKER, H. A., CREASEY, A. M., FENTON, B., BAYOUMI, R. A. L., ARNOT, D. E., WALLIKER, D. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in a village in eastern Sudan. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 85:512-511, 1991.
- BABIKER, H. A., LINES, J., HILL, W. G., WALLIKER, D. Population structure of *Plasmodium falciparum* in villages with different malaria endemicity in East Africa. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 56:141-147, 1997.
- BABIKER, H. A., RANFORD-CARTWRIGHT, L. C., CURRIE, D., CHARLWOOD, J. D., BILLINGSLEY, P., TEUSCHER, T., WALLIKER, D. Random mating in a natural population of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Parasitol.** 109:413-421, 1994.
- BAIRD, J. K. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. **Parasitol. Today** 11:105-111,1995.
- BAIRD, J. K., JONES, T. R., DANUDIRGO, E. W., ANNIS, B. A., BANGS, M. J., BASRI, H., PURNOMO, MASBAR, S. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 45:65-76, 1991.
- BAIRD, J. K., PURNOMO, BASRI, H., BONGS, M. J., ANDERSEN, E. M., JONES, T. R. MASBAR, S., HARJOSUWARNO, S., SUBIANTO, B., ARBANI, P. R. Age-specific prevalence of *Plasmodium falciparum* among six population with limited histories of exposure to endemic malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 49:707-719,1993.
- BENTEN, W. P., ULRICH, P., KUHN-VELTEN, W. N., VOHR, H. W., WUNDERLICH, F. Testosterone-induced susceptibility to *Plasmodium chabaudi* malaria: persistence after withdrawal of testosterone. **J. Endocrinol.** 153:275-281, 1997.

- BERECZKY, S., LILJANDER, A., ROTH, I., FARAHA, L., GRANATH, F., MONTGOMERY, S. M., FARNERT, A. Multiclonal asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections predict a reduced risk of malaria disease in a Tanzanian population. *Microb. Infect.* 9:103-110, 2007.
- BIRON, C. A., NGUYEN, K. B., PIEN, G. C., COUSENS, I. P., SALAZAR-MATHER, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17:189-220, 1999.
- BLACKMAN, M. J., CHAPPEL, J. A., SHAI, S., HOLDER, A. A. A conserved parasite serine protease processes the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62:103-114, 1993.
- BLACKMAN, M. J., HEIDRICH, H. G., DONACHIE, S., MACBRIDE, J. S., HOLDER, A. A. 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. *J. Exp. Med.* 172:379-382, 1990.
- BLACKMAN, M. J., SCOTT-FINNIGAN, T. J., SHAI, S., HOLDER, A. A. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. *J. Exp. Med.* 180:389-393, 1994.
- BOEHM, U., KLAMP, T., GROOT, M., HOWARD, J. C. Cellular response to interferon gamma. *Ann. Rev. Immunol.* 15:749-795, 1997
- BOUHAROUN-TAYOUN, H., ATTANATH, P., SABCHAREON, A., CHONGSUPHJASIDDHI, T., DRUILHE, P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J. Exp. Med.* 172:1633-1641, 1990.
- BOUHAROUN-TAYOUN, H., DRUILHE, P. Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87:229-234, 1992a.
- BOUHAROUN-TAYOUN, H., DRUILHE, P. *Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect Immun.* 60:1473-81, 1992b.
- BOUHAROUN-TAYOUN, H., OEUVRAY, C., LUNEL, F., DRUILHE, P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of asexual blood stages. *J. Exp. Med.* 182:409-418, 1995.
- BRAGA, E. M., BARROS, R. M., REIS, T. A., FONTES, C. J. F., MORAIS, C. G., MARTINS, M. S., KRETTLI, A. U. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19kDa) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:461-466, 2002.
- BROWER, K. C., LAL, A. A., MIREL, L. B. Polymorphism of Fc receptor IIa for immunoglobulin G is associated with placental malaria in HIV-1-positive women in Western Kenya. *J. Infect. Dis.* 190:1192-1198, 2004.
- BROWN, J., GREENWOOD, B. M., TERRY, R. J. Cellular mechanisms involved in recovery from acute malaria Gambian children. *Parasite Immunol.* 8:551-564, 1986.



- BULL, P. C., MARSH, K. The role of antibodies to *Plasmodium falciparum*-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. **Trends Immunol.** 10:55-58, 2002.
- CAMARGO, E. P. Malaria, Maleita, e Paludismo. **Ciência Cult.** 55:26-32, 2003.
- CAMARGO, E. P., ALVES, F., DA SILVA, L. H. P. Symptomless *Plasmodium vivax* infections in native Amazonians. **Lancet.** 353:1415-1416, 1999.
- CAPPADORO, M., GIRIBALDI, G., O'BRIEN, E., TURRIRI, F., MANNU, F., ULLIERS, D., SIMULA, G., LUZZATTO, L., ARESE, P. Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficiente erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. **Blood.** 92:662-668, 1998.
- Carrolo, M. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. **Nature Med.** 9:1363-1369, 2003.
- CAVANAGH, D. R., DODOO, D., HVIID, L., KURTZHALS, J. A., THEANDER, T. G., AKANMORI, B. D., POLLEY, S., CONWAY, D. J., MCBRIDE, J. S. Antibodies to the N-terminal block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface 1 are associated with protection against clinical malaria. **Infect. Immun.** 72:6492-6502, 2004.
- CAVANAGH, D. R., DOBAÑO, C., ELHASSAN, I. M., MARSH, K., ELHASSAN, A., HVIID, L., KAHALIL, E. A. T. G., THEANDER, T. G., ARNOT, D., MCBRIDE, J. S. Differential patterns of human immunoglobulin G subclass responses to distinct regions of a single protein, the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum*. **Infect. Immun.** 69:1027-1211, 2001.
- CAVANAGH, D. R., ELHASSAN, I. M., ROPER, C., ROBINSON, V. J., GIHA, H., HOLDER, A. A., HVIID, L., THEANDER, T. G., ARNOT, D., E., MCBRIDE, J. S. A longitudinal study of type-specific antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in an area of unstable malaria in Sudan. **J. Immunol.** 161:347-359, 1998.
- CAVANAGH, D., MCBRIDE, J. S. Antigenicity of recombinant proteins derived from *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. **Mol. Biochem. Parasitol.** 85:197-211, 1997.
- CENEPI/FUNASA/MS. Evolução Das Endemias Parasitárias. Malária. Informe epidemiológico do SUS, 8:26-29, jul-set.
- CERTA, U., ROTMANN, D., MATILE, H., REBER-LISKE, R. A naturally occurring gene encoding the major merozoite surface antigen precursor of p190 of *Plasmodium falciparum* lacks tripeptide repeats. **EMBO J.** 6:4137-4142, 1987.
- CHANG, S. P., GIBSON, H. L., LEENG, C. T., BARR, J. P., HUI, G. S. N. A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth. **J. Immunol.** 149:548-555, 1992.
- CHAPPEL, J. A., HOLDER, A. A., Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion in vitro recognize the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. **Mol. Biochem. Parasitol.** 60:303-311, 1993.
- CHIZZOLINI, C., DELAPORTE, E., KAUFAMANN, M. H., JAKUE, J. P., VERDIN, A. S., PESSI, A., DEL GIUDICE, G. Age related prevalence of antibody response against three different,

- defined *Plasmodium falciparum* in children from Haut-Ogoue province in Gabon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:147-151, 1989.
- CHIZZOLINI, C., TROTTEIN, F., BERNARD, F. X., KAUFAMANN, M. G. Isotypic analysis, antigen specificity, and inhibitory function of maternally transmitted *Plasmodium falciparum* - specific antibodies in gabonese newborns. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45:57-64, 1991.
- COHEN, S., MCGREGOR, I. A., CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature.* 192:733-737, 1961.
- COLLINS, W. E., CEDILLOS, R. A., WARREN, M. The seroepidemiology of malaria in middle Africa: IV. Passage of malaria antibodies from mothers to infants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26:1105, 1977.
- COLUCCI, F., CALIGIURI, M., DI, S. J. What does it take to make a natural killer? *Nat. Rev. Immunol.* 3:413-425, 2003.
- CONWAY, D. J., CAVANAGH, D. R., TANABE, K., ROPER, C., MIKES, Z. S., SAKIHAMA, N., BOJANG, K. A., ODUOLA, A. M. J., KREMSNER, P. G., ARNOT, D. E., GREENWOOD, B. M., McBRIDE, J. S. A principal target of immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analysis. *Nat. Med.* 6:689-692. 2000.
- COOK, G. S., AUCAN, C., WALLEY, A. J. Association of Fc $\gamma$  receptor IIa (CD32) polymorphism with severe malaria in West Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69:565-568, 2003.
- COOPER, J. A. Merozoite surface antigen-1 of *Plasmodium*. *Parasitol. Today.* 9:50-84, 1993.
- COOPER, J. A., COOPER, L. T., SAUL, A. J. Mapping of the region predominantly recognized by antibodies to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSA-1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51:301-312, 1992.
- CORTÉS, A., MELLOMBO, M., BENET, A., OLRV, K., RARE, L., REEDER, J. C. *Plasmodium falciparum*: distribution of msp-2 genotypes among symptomatic and asymptomatic individuals from the Wosera region of Papua New Guinea. *Exp. Parasitol.* 106:22-29, 2004.
- COURA, J. R., SUÁREZ - MUTIS, M., LADEIA – ANDRADE, S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection – A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101:229-237, 2006.
- COWNAM, A. F., CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell.* 124:755-766, 2006.
- DA SILVA-NUNES, M., MALAFRONTA, R. S., LUZ, B. A., SOUZA, E. A., MARTINS, L. C., RODRIGUES, S. G., CHIANG, J. O., VASCONCELOS, P. F. C., MUNIZ, P. T., FERREIRA, M. U. The Acre Project: the epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. *Cad. Saúde Publ.* 22:1325-1334, 2006.
- DALY, T. M., LONG, C. A. A recombinant 19-kDa carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii yoelii* 17XL merozoite surface protein-1 induces a protective immune response in mice. *Infect Immun.* 59:1183-1187, 1993.

- DARKO, C. A., ANGOV, E., COLLINS, W. E., BERGMANN – LEITNER, E. S., GIROUARD, A. S., HITT, S. L., McBRIDE, J. S., DIGGS, C. L., HOLDER, A. A., LONG, C. A., BARNWELL, J. W., LYON, J. A. The clinical – Grade 42 – Kilodalton fragment of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* strain FVO Expressed in *Escherichia coli* Protects *Aotus nancymai* against challenge with homologous erythrocytic – stage parasites. *Infect. Immun.* 73:287–297, 2005.
- DAUBERSIES, P; SALLENAVE-SALES, S; MAGNE, S; TRAPE, JF; CONTAMIN, H; FANDEUR, T; ROGIER, C; MERCEREAU-PUIJALON, O & DRUILHE, P. Rapid turnover of *Plasmodium falciparum* populations in asymptomatic individuals living in a high transmission area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54:18-26, 1996.
- DAUBERSIES P, SALLENAVE-SALES S, TRAPE JF, RAHARIMALALA L, ROGIER C, CONTAMIN H, FANDEUR T, DANIEL-RIBEIRO CT, MERCEREAU-PUIJALON O, DRUILHE P. PCR characterization of isolates from various endemic areas: diversity and turn over of *Plasmodium falciparum* populations are correlated with transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 89:9-12, 1994.
- DAY, K. P., MARSH, K. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Immunol. Today.* 12:68-71,1991.
- DE SOUZA, J. B., WILLAMSON, K. H., OTAN, H., PLAYFAIR, J. H. L. Early  $\gamma$ - interferon responses in lethal an non-lethal murine blood stage malaria. *Infect. Immun.* 65:1593-1598, 1997.
- DEKKER, C., UTHAIPIBULL, C., CALDER, L. J. Inhibitory and neutral antibodies to *Plasmodium falciparum* MSP1-19 form ring structures with their antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 137:143-149, 2004.
- DEL PORTILLO, H. A., LONGACRE, S., KHOURI, E., DAVID, P. Primary structure of the merozoite surface antigen-1 of *Plasmodium* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:4030-4034, 1991.
- DELLERSNIJDER, W., HENDRIX, D., BENDAHMAN, N., HANEGREEFS, J., BRIJS, L., HAMERSCASTERMAN, C., HAMERS, R. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the major merozoite surface antigen of *Plasmodium chabaudi chabaudi* IP-PCI. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62:199-209, 1990.
- DELORON, P., DUBOIS, B., Le HESRAN, J. Y., RICHE, D., FIEVET, N., CORNET, M., RINGWALD, P., COT, M. Isotypic analysis of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Cameroon, and relationship with risk of *P. falciparum* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 110:212-218, 1997.
- DIALLO, T.O. Differential evolution of IgG1/IgG3 antibody responses to *Plasmodium falciparum* MSP1-19 over time immune adult Senegalese. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:137-139, 2002.
- DODOO, D., THEANDER, T. G., KURTZHALS, J. A., KORAM, K., RILEY, E., AKANMORI, B. D., NKRUHMAH, F. K., HVIID, L. Levels of antibody to conserved parts of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in Ghanaian children are not associated with protection from clinical malaria. *Infect. Immun.* 67:2131-2137, 1999.
- DOOLAN, D. L., AGUIAR, J. C., WEIS, W. R., SETTE, A., FELGNER, P. L., REGIS, D. F., QUINONES-CASAS, P., YATES, J. R., BLAIR, P. L., RICHIE, T. L., HOFFMAN, S. L.,

- CARUCI, D. J. Utilization of genomic sequence information to develop malaria vaccines. *J. Exp. Biol.* 206:3789-3802, 2003.
- DRAKELEY, C. J., BOUSEMA, J. T., AKIM, N. I. J., TEELEN, K., ROEFFEN, W., LENSEN, A. H., BOLMER, M., ELING, W., SAUERWEIN, R. W. Transmission-reducing immunity is inversely related to age in *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. *Parasite Immunol.* 28:185-190, 2006.
- DRUILHE, P., KHUSMITH, S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoites phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria immune status. *Infect. Immun.* 55:888, 1987.
- DRUILHE, P., PERIGNON, J. L. Mechanisms of defense against *Plasmodium falciparum* asexual blood stages in humans. *Immunol. Lett.* 41:115-120, 1994.
- DUBOIS, P., DA SILVA, L. H. P. Towards a vaccine against asexual blood stage infection by *Plasmodium falciparum*. *Res. Immunol.* 146:263-275, 1995.
- EGAN, A. E., CHAPPEL J. A., BURGHAUS, P. A., MORRIS, J. S., McBRIDE, J. S., HOLDER, A. A., KASLOW, D. C., RILEY, E. M. Serum antibodies from malaria-exposed people recognize conserved epitopes formed by the two epidermal growth factor motif of MSP-1 (19), the carboxy-terminal fragment of the major merozoite surface protein of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 63:456-466, 1995.
- EGAN, A. E., MORRIS, J., BARNISH, G., ALLEN, S., GREENWOOD, B. M., KASLOW, D. C. HOLDER, A., RILEY, E. M. – Clinical immunity *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19 kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen PfMSP-1. *J. Infect. Dis.* 173:765-769, 1996.
- EISEN, D., BILLMAN-JACOB, H., MARSHALL, V. F., FRYAUFF, D., COPPEL, R. L. Temporal variation of the merozoite surface protein-2 gene of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 66:239-246, 1998.
- EKALA, M-T, JOUIN, H., LEKOULOU, F., ISSIFOU, S., MERCEREAU-PUIJALON, O., NTOUMI, F. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP1) genotyping and humoral responses to allele-specific variants. *Acta Trop.* 81:33-46, 2002.
- ENGELBRECHT, F., FELGER, I., GENTON, B., ALPERS, B., BECK, H. P. *Plasmodium falciparum*: malaria morbidity is associated with specific merozoite surface antigen 2 genotypes. *Exp. Parasitol.* 81:90-96, 1995.
- EPPING, R. J., GOLDSTONE, S. D., INGRAM, L. T., UPCROFT, J. A., RAMASAMY, R., COOPER, J. A., BUSHELL, G. R., GEYSEN, H. M. An epitope recognized by inhibitory monoclonal antibodies that react with a 51 kilodalton merozoite surface antigen in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 28:1-10, 1988.
- ERUNKULU, O. A., HILL, A. V. S., KWIATKOWSKI, D. P., TODD, J. E., IQBAL, J., BERZINS, K., RILEY, E. M., GREENWOLD, B. M. Severe malaria in Gambian children is not due to lack of previous exposure to malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 89:296-300, 1992.

- ETLINGER, H. M., CASPER, P., MATILE, H., SCHÖNFELD, D., TAKACS, B. Ability of recombinant or native proteins to protect monkeys against heterologous challenge with *Plasmodium falciparum*. **Infect. Immun.** 59:3498-3503, 1991.
- FARNERT, A., SNOUNOU, G., ROTH, I., BJORKMAN, A. Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulations in asymptomatic children in a holoendemic area. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 56:538-547, 1997.
- FARNERT, A., ROTH, I., SNOUNOU, G., BJORKMAN, A. Complexity of *Plasmodium falciparum* infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children. **J. Infect. Dis.** 179:989-995, 1999.
- FELGER, I., IRION, A., STEIGER, S., BECK, H-P. Epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. 2. Genotypes of merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. **Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.** 93:S1/3-S1/9, 1999.
- FELGER, I., MARSHAL, V. M., REEDER, J. C., HUNT, J. A., MGONE, C. S., BECK, H. Sequence diversity and molecular evolution of the merozoite surface antigen 2 of *Plasmodium falciparum*. **J. Mol. Evol.** 45:154-160, 1997.
- FELGER, I., STEIGER, S., HATZ, C., SMITH, T., BECK, H. P. Antigenic cross-reactivity between different alleles of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2. **Parasite Immunol.** 25:531-543, 2003.
- FELGER, I., TAVUL, L., KABINTIK, S., MARSHALL, V., GENTON, B., ALPERS, M., BECK, H-P. *Plasmodium falciparum*: extensive polymorphism in merozoite surface antigen 2 alleles in area with endemic malaria in Papua New Guinea. **Exp. Parasitol.** 79:106-116, 1994.
- FELL, A. H., CURRIER, J., GOOD, M. F. Inhibition of *Plasmodium falciparum* growth in vitro by CD4+ and CD8+ T cells from non-exposed donors. **Parasite Immun.** 16:579-586, 1994.
- FENTON, B., CLARK, J. T., KHAN, C. M. A., ROBINSON, J. V., WALLIKER, D., RIDLEY, R., SCAIFE, J. G., McBRIDE, J. S. Structural and antigenic polymorphism of the 35-to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MAS-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Mol. Cell. Biology.** 11:963-971, 1991.
- FERRANTE, A., RZEPczyk, C. M. Atypical IgG subclass antibody responses to *Plasmodium falciparum* asexual blood stage antigens. **Parasitol. Today.** 13:145-148, 1997.
- FERREIRA, M. U., HARTL, D. L. *Plasmodium falciparum*: Worldwide sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (MSP-2). **Exp. Parasitol.** 115:32-40, 2006.
- FERREIRA, M. U., DA SILVA-NUNES, M., WUNDERLICH, G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 11:987-995, 2004.
- FERREIRA, M. U., KIMURA, E.A., SOUZA, J. M. K., KATZIN, A. M. The IgG subclass distribution of naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum* in relation to malaria exposure and severity. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 92:245-256, 1998a.

- FERREIRA, M. U., KIMURA, M., TANABE, K., NDAWI, B. T., S., KAWAMOTO, F. Allelic diversity in the merozoite surface protein-1 and epidemiology of multiple-clone *Plasmodium falciparum* infections in northern Tanzania. **J. Parasitol.** 84:1286-1289, 1998b.
- FERREIRA, M. U., RIBEIRO, W. L., TONON, <sup>a</sup> P., KAWAMOTO, F., RICH, S. M. Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*. **Gene.** 304:65-75, 2003.
- FLUCK, C., SMITH, T., BECK, H-P., IRION, A., BETUELA, I., ALPERS, M. P., ANDERS, R., SAUL, A., GENTON, B., FELGER, I. Strain-specific humoral response to a polymorphic malaria vaccine. **Infect. Immun.** 72:6300-6305, 2004.
- FONTES, C. J. Malária assintomática em áreas de garimpo no Brasil: estudos de fatores de risco. 2001. [Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte].
- FRANKS, S., BATON, L., TETTEH, K., TONGREN, E., DEWIN, D., AKANMORI, B. D., KORAM, K. A., RANFORD-CARTWRIGHT, L., RILEY, E. M. Genetic diversity and antigenic polymorphism in *Plasmodium falciparum*: extensive serological cross-reactivity between allelic variants of merozoite surface protein 2. **Infect. Immun.** 71:3845-3495, 2003.
- FRUH, K., DUOMBO, O., MULLER, H. M., KOITA, O., McBRIDE, J., CRISANTI, A., TOURÉ, Y., BUJARD, H. Human antibody response to the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* is strain specific and short-lived. **Infect. Immun.** 59:1319-1324, 1991.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Informe epidemiológico. 2003
- GABRA, M. S., GROSSIORD, D., PERRIN, L. H., SHAW, A., Cheung A., McGREGOR, I. A. Defined *Plasmodium falciparum* antigens in malaria serology. **Bull. World Health Organ.** 64:889-896, 1986.
- GARRAUD, O., PERRAUT, R., DIOUF, A., NAMBEI, W. S., TALL, A., SPIEGEL, A., LONGRACRE, S., KASLOW, D. C., JOUIN, H., MATTEI, D., ENGLER, G. M., NUTMAN, T. B., RILEY, E. M., MERCEREAU-PIUJALON, O. Regulation of antigen-specific immunoglobulin G subclasses in response to conserved and polymorphic *Plasmodium falciparum* antigens in an in vitro model. **Infect. Immun.** 70:2820-2827, 2002.
- GARRAUD, O., PERRAUT, R., GYSIN, J., BEHR, C., DUBOIS, P., BONNEMAINS, B., JOUIN, H., MICHEL, J. A., PERREIRA DA SILVA, L. H. Manipulating blood T cells and B cells from squirrel monkeys: some technical considerations. **J. Immunol. Methods.** 173:165-173, 1994.
- GENTON, B., BETUCLA, L., FELGER, I., AL-YAMAN, F., ANDERS, R. F., SAUL, A., RARE, L., BAISOR, M., OLRYS, K., BROWN, G. V., PYE, D., IRVING, D. O., SMITH, T. A., BECK, H-P., ALPERS, M. P., A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. **J. Infect. Dis.** 185:820-827, 2002.
- GIBSON, H. L., TUCKER, J. E., KASLOW, D. C., KRETTLI, A.U., COLLINS, W. E., KIEFER, M. C., BATHURST, I. C., BARR, P. J. Structure and expression of the gene for Pv200, major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 50:325-334, 1992.

- GIHA, H. A., STAALSOE, T., DODOO, D. Antibodies to variable *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes surface antigens are associated with protection from novel malaria infections. ***Immunol. Lett.*** 71:117-126, 2000.
- GOMEZ, D., CHAPARRO, J., RUBIANO, C., ROJAS, M. O, WASSERMAN, M. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* field samples from an isolated Colombian village. ***Am. J. Trop. Med. Hyg.*** 67:611-616, 2002.
- GOOD, M. F., DOOLAN, D. L. Immune effectors mechanisms in malaria. ***Curr. Opin. Immunol.*** 11:412-419, 1999.
- GOOD, M. F., KASLOW, D. C., MILLER, L. H., Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. ***Ann. Rev. Immunol.*** 16:57-87, 1998.
- GROUX, H., GYSIN, J. Opsonization as an effectors mechanisms in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of the IgG subclasses. ***Rev. Immunol.*** 141:529-542, 1990.
- GROUX, H., PERRAUT, R., GARRAUD, O., POINGT, J. P., GYSIN, J. Functional characterization of the antibody-mediated protection against blood stages of *Plasmodium falciparum* in the monkey *Saimiri sciureus*. ***Eur. J. Immunol.*** 20:2317-23, 1990.
- GUERRA, C. A., SNOW, R. W., HAY, S. I. Mapping the global extent of malaria in 2005. ***Trends Parasitol.*** 2006.
- GUEVARA-PATINO, J. A., HOLDER, A. A., McBRIDE, J. A. Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies. ***J. Exp. Med.*** 186:1689-1699, 1997.
- HAY, S. I., GUERRA, C. A., TATEM, A. J., ATKINSON, P. M., SNOW, R. W. Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. ***Nat. Reviews.*** 3:81-90, 2005.
- HAY, S. I., GUERRA, C. A., TATEM, A. J., NOOR, A. M., SNOW, R. W. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. ***Lancet.*** 4:327-336, 2004.
- HIIV, L., THEANDER, T. G., ABU-ZEID, Y. A. Perturbation and proinflammatory type activation of  $\delta\gamma$  T cells in African children with *Plasmodium falciparum* malaria. ***Infec. Immun.*** 69:3190-3196, 2001.
- HIRUNPETCHARAT, C., STANISIC, D., LIU, X. Q., VADOLAS, J., ASTRUNGNELL, R., LEE, R., MILLER, L. H., KASLOW, D. C., GOOD, M. F. Intranasal immunization with yeast-expressed 19kD carboxil-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein-1 (yMSP1-19) induces protective immunity to blood stage malaria infection in mice. ***Parasite Immunol.*** 20:413-420, 1998.
- HIRUNPETCHARAT, C., TIAN, J. H., KASLOW, D. C. Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein 1 (MSP1 [19]) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effectors CD4+ T cells. ***J. Immunol.*** 159:3400-3411, 1997.

- HISAEDA, H., MAEKAWA, Y., IWAKAWA, D., OKADA, H., HIMENO, K., KISHIHARA, K., TSUKUMO, S., YASUTOMO, K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat. Med.* 10:29-30, 2004.
- HOFFMANN, E. H. E., da SILVEIRA, L. A., TONHOSOLO, R., PEREIRA, F.J.T., RIBEIRO, W.L., TONON, A.P., KAWAMOTO, F., FERREIRA, M.U. Geographic patterns of allelic diversity in the *Plasmodium falciparum* malaria-vaccine candidate, merozoite surface protein-2. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 95:117-132, 2001.
- HOLDER, A. A. Preventing merozoite invasion of erythrocytes. In: HOFFMAN, S. L., ed. Malaria vaccine development: a multi-immune response approach. Washington D. C.: *ASM Press.* 77-104, 1996.
- HOLDER, A. A. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog. Allergy.* 41:72-97, 1988.
- HOLDER, A. A., FREEMAN, R. R. The three major antigens on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites are derived from a single high molecular weight precursor. *J. Exp. Med.* 160:624, 1984.
- HOLDER, A. A., SANDHU, J. S., HILLMAN, Y., DAVEY, L. S., NICHOLLS, S. C., COOPER, H., LOCKYER, M. J. Processing of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol.* 94:199-208, 1987.
- HOLDER, A. A., FREEMAN, R. R., NICHOLLS, S. C., Immunization against *Plasmodium falciparum* with recombinant polypeptides produced in *Escherichia coli*. *Parasite Immunol.* 10:607-617, 1988.
- HOWARD, R. J., PASLOSKE, B. L. Target antigens for asexual malaria vaccine development. *Parasitol. Today.* 9:369-374, 1993.
- HUGHES, M. K., HUGHES, A. L. Natural selection on *Plasmodium falciparum* proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 71:99-113, 1995.
- IRION, A., BECK, H-P., FELGER, I. New repeat unit and hot spot of recombination in FC27-type alleles of the gene coding for *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 90:367-370, 1997.
- JAFARSHAD, A., DZIEGIEL, M. H., LUNDQUIST, R., NIELSEN, L. K., SING, S., DRUILHE, P. L. Anovel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIII. *J. Immunol.* 178:3099-3106, 2007.
- JIANG, X. M., AREPALLY, G., PONCZ, M., MCKENZIE, S. E. rapid detection of the Fc gamma RIIA-H/R 131 ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J. Immunol. Methods.* 199:55-59, 1996.
- JOHN, C. C., O'DONNELL, R. A., SUMBA, P. O., MOORMANN, A. M., KONING-WA, T. F., KING, C. L., KAZURA, J. W., CRABB, B. S. Evidence that invasion-inhibitory antibodies specific for the 19 kDa fragment of merozoite surface protein-1 (MSP-1 19) can play a protective role against blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in individuals in a malaria endemic area Africa. *J. Immunol.* 173:666-672, 2004.



- JOUIN, H., ROGIER, C., TRAPE, J-F., MERCEREAU-PUIJALON, O. Fixed, epitope-specific, cytophilic antibody response to the polymorphic block 2 domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSP-1 in humans living in a malaria-endemic area. *Eur. J. Immunol.* 31:539-550, 2001.
- KANEKO, O., KIMURA, M., KAWAMOTO, F., FERREIRA, M. U., TANABE, K. *Plasmodium falciparum*: allelic variation in the merozoite surface protein 1 gene in wild isolates from southern Vietnam. *Exp. Parasitol.* 86:45-57, 1997.
- KANEKO, O., JONGWUTIWES, S., KIMURA, M., KANBARA, H., ISHII, A., TANABE, K. *Plasmodium falciparum*: variation in block 4 of merozoite surface protein 1 (MSP-1) in natural populations. *Exp. Parasitol.* 84:92-95, 1996.
- KANUNFRE, K. A., LEORATTI, F. M. S., HOFFMANN, E. H. E., DURLACHER, R. R., FERREIRA, A. W., MORAES-AVILA, S. L., FERREIRA, M.U. Differential recognition of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 variants by antibodies from malaria patients in Brazil. *Clin. Diag. Labor. Immunol.* 10:973-976, 2003.
- KAPPE, S. H. I., BUSCAGLIA, C. A., NUSSENZWEIG, V. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 20:29-59, 2004.
- KAPPE, S. H. I., KAISER, K., MATUSCHEWSKI, K. The *Plasmodium* sporozoite journey.: a rite of passage. *Trends Parasitol.* 19:135-143, 2003.
- KARUNAWEEERA N. D., CARTER R., GRAU G.E., MENDIS K. Demonstration of anti-disease immunity to *Plasmodium vivax* malaria in Sri Lanka using a quantitative method to assess clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 58:204-210, 1998.
- KEMP, D. J. Antigenic diversity and variation in blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Cell Biology.* 70:201-207, 1992.
- KONING-WARD, T. F., O'DONNELL, R. A., DREW, D. R., THOMSON, R. SPEED, T. P., CRABB, B.S. A new model to blood stage immunity to the *Plasmodium falciparum* antigen merozoite surface protein 1<sub>19</sub> reveals a protective role for invasion inhibitory antibodies. *J. Exp. Med.* 198:869-875, 2003.
- KRAMER, K. J., OBERST, R. Antibodies to the major merozoite surface coat protein of *Plasmodium falciparum* (gp195) in a human population living in a malaria-endemic area of the Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47:429-439, 1992.
- KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite a new theory of malaria relapse. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79:1-11, 1985.
- KUMAR, S., COLLINS, W., EGAN, A., YADAVA, A., GARRAUD, O., BLACKMAN, M. J., PATINO, J. A. G., DIGGS, C., KASLOW, D. C. Immunogenicity and efficacy in *Aotus* monkeys of four recombinant *Plasmodium falciparum* vaccines in multiple adjuvant formulations based on the 19-kilodalton C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect. Immun.* 68:2215-2223, 2000.
- KUMAR, S., YADAVA, A., KEISTER, D. B., TIAN, J. H., OHL, M., PURDUE-GREENFIELD, K. A., MILLER, L. H., KASLOW, D. C. Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in *Aotus* monkeys. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1:325-332, 1995.

- KUN, F. J., SCHIDT-OTT, R. J., LEHMAN, L. G., LELL, B., LUCKNER, D., GREVE, B., MOTOUSEK, P., KREMSNER, P. G. Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and resetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambarene, Gabon. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 92:110-114, 1998.
- KURTIS, J. D., MTALIB, R., ONYANGO, F. K., DUFFY, P. E. Human resistance to *Plasmodium falciparum* increases during puberty and is predicted by dehydroepiandrosterone sulfate levels. **Infect. Immun.** 69:123-128, 2001.
- LADEIA-ANDRADE, S. Aspectos epidemiológicos da malária no parque nacional do rio Jaú, Amazonas, Brasil. 2005. [Tese de doutorado, Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz].
- LANDGRAF, B., KOLLARITSCH, H., WIEDERMANN, G., WERNSDORFER, W. H. Parasite density of *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian schoolchildren: evidence for influence of sex hormones? **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** 88:73-74, 1994.
- LASERSON, K. F., PETRALANDA, I., ALMERA, R., BARKER, R., SPIELMAN, A., MAGUIRE, J. H., WIRTH, D. F. Genetic characterization of an epidemic of *Plasmodium falciparum* malaria among Yanomami Amerindians. **J. Infect. Dis.** 180:2081-2085, 1999.
- LEENSTRA, T., TER KUILE, F. °, KARIUKI, S. K., NIXON, C P., OLOO, ° J., KAGER, P. A. Dehydroepiandrosterone sulfate levels associated with decreased malaria parasite density and increased hemoglobin concentration in pubertal girls from western Kenya. **J. Infect. Dis.** 188:297-304, 2003.
- LEWIS, A. P. Cloning and analysis of the gene encoding the 230-kDA merozoite surface antigen of *Plasmodium yoelii*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 36:271-282, 1990.
- LIEBERMAN, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. **Nat. Rev. Immunol.** 3:361-370, 2003.
- MACGREEVY, P. B., DIETZE, R., PRATA, A., HEMBREE, S. C. Effects of immigrations on the prevalence of malaria in rural areas of the Amazon basin of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 84:485-491, 1989.
- MAGESA, S. M., MDIRA, K. Y., BABIKER, H. A., ALIFRANGIS, M., FARNERT, A., SIMONSEN, P. E., BYGBJERG, I. C., WALLIKER, D., JAKOBSEN, P. H. Diversity of *Plasmodium falciparum* clones infecting children living in a holoendemic area in north-eastern Tanzania. **Acta Trop.** 84:83-92, 2002.
- MARQUES, A. C. Epidemiological data on malaria in the Amazon region, by municipality, in 1992. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 26:43-59, 1993.
- MARSH, K., KINYANJUI, S. Immune effectors mechanisms in malaria. **Parasite Immunol.** 28:51-60, 2006.
- MARSHALL, V. M., ANTHONY, R. L., BANGS, M. J., PURNOMO, ANDERS, R. F., COPPEL, R. L. Allelic variants of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2 (MAS-2) in a geographically area of Irian Jaya. **Mol. Biochem. Parasitol.** 63:13-21, 1994.

- McGREGOR, I. A. The passive transfer of human malaria immunity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13:237-239, 1964.
- McGREGOR, I. A., WILSON, R. J. M. Specific immunity: acquired in man. In *Malaria. Principles and practice of malariology*. Vol. I. ed. W. H. Wernsdorfer and I. McGREGOR. Churchill Livingstone (Edinburgh-London-Melbourne-New York), 559-619, 1988.
- McKEAN, P. G., ODEA, K., BROWN, K. N. Nucleotide sequence analysis and epitope mapping of the merozoite surface protein-1 from *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62:199-209, 1993.
- MERCEREAU-PUIJALON, O., FANDEUR, T., GUILLOT, M., BONNFOY, S. Parasite features impeding malaria immunity: antigenic diversity, antigenic variation and poor immunogenicity. *Res. Immunol.* 142:691-697, 1991.
- METZGER, W., OKENU, D. M. N., CAVANAGH, D. R., ROBINSON, J. V., BOJANG, K., WEISS, H. A., MCBRIDE, J. S., GREENWOOD, B. M., CONWAY, D. J. Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasite Immunol.* 25:307-312, 2003.
- MILLER, I. H., BARUCH, D. I., MARSH, K., DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nat. Review.* 415:673-679, 2002.
- MILLER, L. H., ROBERTS, T., SHAHABUDDIN, M., McCUTCHAN, T. F. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol. Biochem. Parasitol.* 59:1-14, 1993.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (SISMAL, SIVEP-Malaria). A máalaria no Brasil. 2005.
- MOHAN, K., MOULIN, P., STEVENSON, M. M., Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J. Immunol.* 159:4990-4998, 1997.
- MOND, J. J., LEES, A., SNAPPER, C. M. T-cell independent antigens type 2. *Annu. Rev. Immunol.* 13:655-692, 1995.
- MOTA, M. M., PRADEL, G., VANDERBERG, J. P., HAFALLA, J. C. R., FREVERT, U., NUSSENZWEIG, R. S., NUSSENZWEIG, V., RODRIGUEZ, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science.* 291:141-144, 2001.
- MSHANA, R. N., BOULANDI, J., MAYOMBO, J., MENDOME, G. In vitro lymphoproliferative responses to malaria antigens: a prospective study of a holoendemic area with perennial malaria transmission. *Parasite Immunol.* 15: 35-45, 1993.
- MÜLLER, H. M., FRUH, K., VON BRUNN, A., ESPOSITO, F., LOMBARDI, S., CRISANTI, A., BUJARD, H. Development of the human immune response against the major surface protein (gp190) of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 57:3765-3769, 1989.
- NGUER, C. M., DIALLO, T. O., DIOUF, A., TALL, A., DIEYE, A., PERRAUT, R., GARRAUD, O. *Plasmodium falciparum*- and merozoite surface protein 1-specific antibody isotype balance in immune Senegalese adults. *Infect. Immun.* 65:4873-4876. 1997.

- NTOUMI, F., CONTAMIN, H., ROGIER, C., BONNEFOY, S., TRAPE, J. F., MERCEREAU-PUIJALON, O. Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52:81-88, 1995.
- NTOUMI, F., FLORI, L., MAYENGUE, P. I., MAYA, D. W. M., ISSIFOU, S., DELORON, P., LELL, B., KREMSNER, P. G., RIHET, P. Influence of carriage of hemoglobin AS and the Fc $\gamma$  receptor Iia-R<sub>131</sub> allele on levels of immunoglobulin G2 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in Gabonese children. *J. Infect. Dis.* 192:1975-1980, 2005.
- NTOUMI, F., NGOUNDOU-LANDJI, J., LEKOULOU, F., LUTY, A., DELERON, P., RINGWALD, P. Site-based study on polymorphism of *Plasmodium falciparum* MSP-1 and MSP-2 genes in isolates from two villages in Central Africa. *Parassitologia.* 42:197-203, 2000.
- O'DONNELL, R. A., DE KONING-WARD, T. F., BURT, R. A., BOCKARIE, M., REEDER, J. C., COWMAN, A. F., CRABB, B. S. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1<sub>19</sub> are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J. Exp. Med.* 193:1403-1412, 2001.
- OCANÃ-MORGNER, C., MOTA, M. M., RODRÍGUEZ, A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197:143-151, 2003.
- OEUVRAY, C., BOUHAROUN-TAYOUN, H., GRAS-MASSE, H., BOTTIUS, E., KAIDOH, T., AIKAWA, M., FILGUEIRA, M. C., TARTAR, A., DRUILHE, P. Merozoite surface protein: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood.* 84:1594-1602, 1994.
- OEUVRAY, C., HEISEN, M., ROGIER, C., TRAPE, J-F., JEPSEN, S., DRUILHE, P. Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infect. Immun.* 68:2617-2620, 2000.
- OFOFU-OKYERE, A., MACKINNON, M. J., SOWA, M. P., KORAM, K. A., NKURUMAH, F., OSCI, Y. D., F., HILL, W. G., WILSON, M. D., ARNOT, D. E. Novel *Plasmodium falciparum* clones and rising clone multiplicities are associated with the increase in malaria morbidity in Ghanaian children during the transition into the high transmission season. *Parasitol.* 123:113-123, 2001.
- PARREN, P., WARMERDAM, P. A., BOEIJE, L. C., ARTS, J., WESTERDAAL, N. A., VLUG, A., CAPEL, P. J., AARDEN, L. A., VAN de WINKEL, J. G. On the interaction of IgG subclass with the low affinity Fc $\gamma$ RIIA (CD32) in human monocytes, neutrophils and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *J. Clin. Invest.* 90:1537, 1992a.
- PARREN, P., WARMERDAM, P. A., BOEIJE, L. C., CAPEL, P. J., VAN de WINKEL, J. G., AARDEN, L. A. Characterization of IgG FcR-mediated proliferation of human T cells induced by mouse and human anti-CD3 monoclonal antibodies. Identification of a functional polymorphism to human IgG2 anti-CD3. *J. Immunol.* 148:695, 1992b.
- PATINO, J. A. G., HOLDER, A. A., McBRIDE, J. S., BLACKMAN, M. J. Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally occurring human antibodies. *J. Exp. Med.* 186:1689-1699.
- PAUL, R. E. L., HACKFORD, I., BROCKMAN, C., MULLER-GRAF, C., PRICE, R., LUXEMBURGER, C., WHITE, N. J., NOSTEN, F., DAY, K. P. Transmission intensity and

- Plasmodium falciparum* diversity on the northwestern border of Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58:195-203, 1998.
- PERIGNON, J. L., DRUILHE, P. Immune mechanisms underlying the premunition against *Plasmodium falciparum* malaria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 89:51-53, 1994.
- PERRIN, L. H., MERKLI, B., LOCHE, M., CHIZZOLINI, C., SMART, J., RICHLER, R. Antimalarial immunity in *Saimiri* monkeys. Immunization with surface components of asexual blood stages. *J. Exp. Med.* 160: 441-451, 1984.
- PERRY, J. A., RUSH, A., WILSON, R. J., OLVER, C. S., AVERY, A. C. Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC. *J. Immunol.* 172:475-482, 2004.
- PETERSON, M. G., COPPEL, R. L., MOLONEY, M. B., KEMP, D. J. Third form of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell. Biology.* 8:2664-2667, 1988.
- PLEASS, R. J., HOLDER, A. A. Antibody-based therapies for malaria. *Nat. Reviews.* 3:893-899, 2005.
- POLLEY, S. D., CONWAY, D. J., CAVANAGH, D. R., McBRIDE, J. S., LOWE, B. S., WILLIAMS, T. N., MWANGI, T. W., MARSH, K. High levels of serum antibodies to merozoites surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced risk of clinical malaria in coastal Kenya. *Vaccine.* 24:4233-4246, 2006.
- POLLEY, S. D., TETTEH, K. K. A., CAVANAGH, D. R., PEARCE, R. J., LLOYD, J. M., BOJANG, K. A., OKENU, D. M. N., GREENWOOD, B. M., McBRIDE, J. S., CONWAY, D. J. Repeat sequences in block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are targets of antibodies associated with protection from malaria. *Infect. Immun.* 71:1833-1842, 2003.
- PRADEL, G., FREVERT, U. Malaria sporozoites actively enter and passage through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology.* 33:1154-1165, 2001.
- PRATA, A., URDANETA, M., MCGREEVY, P. B., TADA, M. S. Infrequency of asymptomatic malaria in an endemic area in Amazonas, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 21:51-52, 1988.
- PRESCOTT, N., STOWERS, A. W., CHENG, Q., BOBOGARE, A., RZEPczyk, C. M. and SAUL, A. J. *Plasmodium falciparum* genetic diversity can be characterized using the polymorphic merozoite surface antigen 2 (MSA2) gene as a single locus marker. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63:203-212, 1994.
- PRUDENCIO, M., RODRIGUEZ, A., MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature.* 4:849-856, 2006.
- QUIN, S., LANGHORNE, J. Different regions of the malaria merozoite surface protein 1 of *Plasmodium chabaudi* elicit distinct T-cell and antibody isotype response. *Infect. Immun.* 69:2245-2251, 2001.
- RAMASAMY, R., JONES, G., LORD, R. Characterization of an inhibitory monoclonal antibody defined epitope on a malaria vaccine candidate antigen. *Immunol. Letters.* 23:305-310, 1990.

- RANFORD-CARTWRIGHT, L. C., TAYLOR, R. R., ASGARI-JIRHANDEH, N. Differential antibody recognition of the FC27-like *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein MSP-2 antigens which lack 12 amino acid repeats. *Parasite Immunol.* 18:411-420, 1996.
- RBM (Roll Back Malaria). What is Roll Back Malaria? 2000. [www.rbm.who.int](http://www.rbm.who.int)
- REDPATH, S., MICHAELSEN, T. E., SANDLIE, I., CLARK, M. R. The influence of the hinge region length in binding of human IgG to human Fc $\gamma$  receptors. *Hum. Immunol.* 59:720-727, 1998.
- RICH, S. M., FERREIRA, M. U., AYALA, F. L. The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today.* 16:390-396, 2000.
- RILEY, E. M. The role of MHC- and non-MHC associated genes in determining the human immune response to malaria antigens. *Parasitol.* 112:S39-51, 1996.
- RILEY, E. M., ALLEN, S. J., WHELLER, J. G. BLACKMAN, M. J, BENNETT, S., TAKACS, B., SCHÖNFELD, H-J., HOLDER, A. A., GREENWOOD, B. M. Natural Acquired cellular and humoral immune response to major merozoite surface antigen (PfMSP-1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.* 14:321-337, 1992.
- RILEY, E. M., MORRIS-JONES, S., BLACKMAN, M. J., GREENWOOD, B. M., HOLDER, A. A. Longitudinal study of naturally acquired cellular and humoral immune responses to a merozoite surface protein (MSP-1) of *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal malaria transmission. *Parasite Immunol.* 15:513-524, 1993.
- RILEY, E. M., WAGNER, G. E., OFORI, M. F., WHEELER, J. G., AKANMORI, B. D., TETTEH, K., McGUINNESS, D., BENNET, S., NKURUMAH, F. G., ANDERS, R. F., KORAM, K. A. Lack of association between maternal antibody and protection of African infants from malaria infection. *Infect. Immun.* 68:5856-5863, 2000.
- RILEY, E. M., WAHL, S., PERKINS, D. J., SCHOFIELD, L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol.* 28:35-49, 2006.
- SABCHAREON, A., BURNOUT, T. OUATTARA, D. ATTANAH, P., BOUHAROUT-TAYOUN, CHANTAVANICH, P., FOUCAULT, C., CHOXSU PHAJAISIDDNI, T., DRUILHE, P. Parasitological and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45:297-308, 1991.
- SACHES, J., MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. *Nature.* 415:680-685, 2002.
- SAFEUKUI, I., MANGOU, F., MALVY, D., VINCENDEAU, P., MOSSALAYI, D., HAUMONT, G., VATAN, R., OLLIARO, P., MILLET, P. *Plasmodium berghei*: dehydroepiandrosterone sulfate reverses chloroquino-resistance in experimental malaria infection; correlation with glucose 6-phosphate dehydrogenase and glutathione synthesis pathway. *Biochem. Pharm.* 68:1903-1910, 2004.
- SAKIHAMA, N., KANEKO, A., HATTORI, T., TANABE, K. Limited recombination events in merozoite surface protein-1 alleles of *Plasmodium falciparum* on islands. *Gene.* 279:47-54, 2001.

- SAKIHAMA, N., NAKAMURA, M., PALANCA, A. A., ARGUBANO, R. A., REALON, E. P., LARRANCAS, A. L., ESPINA, R. L., TANABE, K. Allelic diversity in the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium falciparum* on Palawan Island, the Philippines. *Parasitol. Intern.* 2007, in press.
- SAKIHAMA, N., OHMAE, H., BAKOTE, B., KAWABATA, M., HIRAYAMA, K., TANABE, K. Limited allelic diversity of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 gene from populations in the Solomon Islands. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74:31-40, 2006.
- SALLENAVE-SALLES, S., DAUBERSIES, P., MERCEREAU-PUJALON, O., RAHIMALALA, L., CONTAMIN, H., DRUILHE, P., DANIEL-RIBEIRO, C. T., FERREIRA-DA-CRUZ, M. F. *Plasmodium falciparum*: a comparative analysis of genetic diversity in malaria-mesoendemic areas of Brazil and Madagascar. *Parasitol. Res.* 86:692-698, 2000.
- SALLENAVE-SALLES, S., FERREIRA-DA-CRUZ, M. F., FARIA, C. P., CERRUTI JR, C., DANIEL-RIBEIRO, C. T., ZALIS, M. G. *Plasmodium falciparum*: limited genetic diversity of MSP-2 in isolates circulating in Brazilian endemic areas. *Exp. Parasitol.* 103:127-135, 2003.
- SALMON, J. E., EDBERG J. C., KIMBERLY, R. P. Fcγ receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest.* 85:1287-1295, 1990
- SANDER, L. A. M., FELDMAN, R. G, VOORHORST-OGINK, M. M. Human immunoglobulin G (IgG) FcγRIIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infect. Immun.* 63:73-81, 1995.
- SARR, J. B., PELLEAU, S., TOLY, C., GUITARD, J., KONATÉ, L., DELORON, P., GARCIA, A., MIGOT-NABIAS, F. Impact of red blood cell polymorphisms on the antibody response to *Plasmodium falciparum* in Senegal. *Microbes Infect.* In Press, 2006.
- SCHERF, A., MATTEI, D., SARTHOU, J-L. Multiple infections and unusual distribution of block 2 of the MSA 1 gene of *Plasmodium falciparum* detected in West African isolates by polymerase chain reaction analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44:297-300, 1991.
- SCHOFIELD, L. On a function of repetitive domains in a protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasites. *Parasitol. Today.* 7:269-275, 1991.
- SCOPEL K. K. G., FONTES, C. J. F., NUNES, A. C., HORTA, M. F., BRAGA, H. M. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from thick blood smears or blood conserved on filter paper: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitemias in a Brazilian Amazon endemic area. *Mal. J.* 3:8, 2004b
- SCOPEL, K. K. G., FONTES, C. J. F., NUNES, A. C., HORTA, M. F., BRAGA, H. M. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop.* 90:61-64, 2004a
- SCOPEL, K.K.G. Infecção assintomática por *Plasmodium* sp na Amazônia Brasileira: Detecção por PCR e resposta de anticorpos anti-proteína 1 de superfície de merozoítos. 2003. [Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais].
- SEIXAS, E., CROSS, C., QUIN, S., LANGHORNE, J. Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Eur. J. Immunol.* 31:2970-2978, 2001.

- SENOCK, A. C., LI, K., NELSON, E. A., ARUMANAYAGAM, M., LI, C. K., Flow cytometric assessment of oxidant stress in age-fractionated thalassaemic trait erythrocytes and its relationship to in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. **Parasitol.** 116:1-6, 1998.
- SERGHIDES, L., SMITH, T. G., PATEL, S. N., KAIN, K. C. CD36 and malaria: friends or foes? **Trends Parasitol.** 19:461-469, 2003.
- SHI, Y. P., NAHLEN, B. L., KARIUKI, S., HILL, A. Fc $\gamma$  receptor Iia (CD32) polymorphism is associated with protection of infants against high-density *Plasmodium falciparum* infection. VII. Asembo Bay Cohort Project. **J. Infect. Dis.** 184:107-111, 2001.
- SHI, Y.P., SAYED, U., QUARY, S. H., ROBERTS, J. M., UDHAYAKUMAR, V., OLOO, A.J., HAWLEY, W. A., KASLOW, D.C., NAHLEN, B.L., LAL, A.A., Natural immune response to the C-terminal 19-Kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. **Infect. Immun.** 64:2716-2723, 1996.
- SILVEIRA, L. A., DORTA, M. L., KIMURA, E. A. S., KATZIN, A. M., KAWAMOTO, F., TANABE, K., FERREIRA, M. U. Allelic diversity and recognition of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 during hypoendemic malaria transmission in the Brazilian Amazon region. **Infect. Immun.** 67:5906-5916, 1999.
- SMYTHE, JA., COPPEL, R. L., DAY, K. P., MARTIN, R. K., ODUOLA, A. M. J., KEMP, D. J., ANDERS, R. F. Structural diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 88:1751-1755, 1991.
- SMYTHE, JA., PETERSON, M. G., COPPEL, R. L., SAUL, A. L., KEMP, D. J., ANDERS, R. F. Structural diversity in the 45-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 39:227-234, 1990.
- SNEWIN, V. A, PREMAWANSA, S., KAPILANANDA, G. M., RATNAYAKA, L., UDAGAMA, P. V., MATTEI, D. M. Transmission blocking immunity in *Plasmodium vivax* malaria: antibodies raised against a peptide block parasite development in the mosquito vector. **J. Exp. Med.** 181:357-362, 1995.
- SNEWIN, VA., HERRERA, M., SANCHEZ, G., SCHERF, A., LANGSLEY, G., HERRERA, S. Polymorphism of the alleles of the merozoite surface antigens MSA1 and MSA2 in *Plasmodium falciparum* wild isolates from Colombia. **Mol. Biochem. Parasitol.** 49:265-276, 1991.
- SNOW, R. W., GUERRA, C. A., NOOR, A. M., MYINT, H. Y., HAY, S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature.** 434:214-217, 2005.
- SODEIND, O., CLARKE, J. L., VULLIAMY, T. J., LUZZATTO, L., MASON, P. J. Expression of *Plasmodium falciparum* G6PD-6PGL in laboratory parasites and in patients isolates in G6PD-deficient and normal Nigerian children. **Br. J. Haematol.** 122:662-668, 2003.
- SOE, S., THEISEN, M., ROUSSILHON, C., A. Y. E, K-S., DRUILHE, P. Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: Complementarily between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. **Infect. Immun.** 72:247-252, 2004.
- STEVENSON, M. M., RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nat. Reviews.** 4:169-180, 2004.



- STURM, A., AMINO, R., VAN DE SAND, C., REGEN, T., RETZLAFF, S., RENNENBERG, A., KRUEGER, A., POLLOCK, J.-M., MENARD, R., HEUSSLER, V. T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasites for delivery into liver sinusoids. *Science*. 313:1287-1290, 2006.
- SU, S. D., SANADI, A. R., IFON, E., DAVIDSON, E. A. A monoclonal antibody capable of blocking the binding of Pf200 (MSA-1) to human erythrocytes and inhibiting the invasion of *Plasmodium falciparum* merozoites into human erythrocytes. *J. Immunol.* 151:2309-2317, 1993.
- SULTAN, A. A., THATHY, V., FREVERT, U., ROBSON, K. J., CRISANTI, A. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell*. 90:511-522, 1997.
- TAMI, A., GRUNDMANN, H., SUTHERLAND, C., McBRIDE, J. S., CAVANAGH, D. R., CAMPOS, E., SNOUNOU, G., BARNABÉ, C., TIBAYRENC, M., WARHURST, C. Restricted genetic and antigenic diversity of *Plasmodium falciparum* under mesoendemic transmission in the Venezuelan Amazon. *Parasitol.* 124:569-581, 2002.
- TANABE, K., MACKAY, B., GOMAN, M., SCAIFE, J. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of malaria parasite isolated from *Plasmodium falciparum* merozoites. *J. Mol. Biol.* 195: 273, 1987.
- TANABE, K., MURAKAMI, K., DOI, S. *Plasmodium falciparum*: dimorphism of the p190 alleles. *Exp. Parasitol.* 68:470-473, 1989.
- TAYLOR, R. R., ALLEN, S. J., GREENWOOD, B. M., RILEY, E. M. IgG3 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 (MSP-2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58:406-413, 1998.
- TAYLOR, R. R., EGAN, A., McGUINNESS, D., JEPSON, A., ADAIR, R., DRAKELY, C., RILEY, E. Selective recognition of malaria antigens by human serum antibodies is not genetically determined but demonstrates some features of clonal imprinting. *Infect. Immun.* 63:4382-4388, 1996.
- TAYLOR, R. R., SMITH, D. B., ROBINSON, V. J., McBRIDE, J. S., RILEY, E. M. Human antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is serogroup-specific and predominantly of the immunoglobulin G3 subclass. *Infect. Immun.* 63:4382-4388, 1995.
- TEBO, A. E., KREMSNER, P. G., LUTY, J. F. Fc $\gamma$  receptor mediated phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in vitro. *Exp. Parasitol.* 130:300-306, 2002.
- THEANDER, T. G. Defense mechanism and immune evasion in the interplay between the human immune system and *Plasmodium falciparum*. *Dan. Med. Bull.* 39:49-63, 1992.
- THOMAS, A. W., CARR, D. A., CARTER, J. M., LYON, J. A. Sequence comparison of allelic forms of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSA2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43:211-220, 1990.
- TIAN, J.H., MILLER, L.H., KASLOW, D. C., AHLERS, J., GOOD, M. F., ALLING, D. W., BERZOFKY, J. A., KUMAR, S. Genetic regulation of protective immune response in strains of mice vaccinated with a subunit malaria vaccine. *J. Immunol.* 157:1176-1183, 1996.

- TOLLE, R., FRUH, K., DOUMBO, O., KOITA, O., N'DIAYE, M., FISCHER, A., DETZ., BUJARD, H. A prospective study of the association between human humoral response to *Plasmodium falciparum* blood stage antigen gp190 and control of malarial infections. *Infect. Immun.* 61:40-47, 1993.
- TONGREN, J. E., DRAKELEY, C. J., MCDONALD S. L. R., REYBURN, H. G., MANJURANO, A., NKYA, W. M. M., LEMNGE, M. M., GOWDA, C. D., TODD, J. E., CORRAN, P. H., RILEY, E. M. Targets antigen, age, and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria. *Infect. Immun.* 74:257-264, 2006.
- TONHOSOLO, R., WUNDERLICH, G., FERREIRA, M. U. Differential antibody recognition of four allelic variants of the merozoite surface protein-2 (MSP-2) of *Plasmodium falciparum*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48:556-563, 2001.
- TONON, A. P., HOFFMANN, E. H. E., DA SILVEIRA, L. A., RIBEIRO, A. G., GONÇALVES, C. R. S., RIBOLLA, P. E. M., WUNDERLICH, G., FERREIRA, M. U. Sequence diversity, antibody recognition and evolution of the malaria vaccine candidate antigen merozoite surface protein 2 (MSP2) of *Plasmodium falciparum*. *Exp. Parasitol.* 108:114-125, 2004.
- TROTTEIN, F., TRIGLIA, T., COWMAN, A. F. Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and plasmodia. *Mol. Biochem. Parasitol.* 74:129-141, 1995.
- URBAN, B. C., FERGUSON, D. J., PAIN, A., WILLCOX, N., PLEBANSKI, M., AUSTYN, J. M., ROBERTS, D. J. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature.* 400:73-77, 1999.
- URBAN, B. C., WILLCOX, N., ROBERTS, D. J. A role for CD36 in the regulation of dendritic cells function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:8750-8755, 2001
- UTHAIPIBULL, C., AUFIERO, B., SYED, S.E.H., HANSEN, B., PATIÑO, J. A. G., ANGOV, E., LING, I. T., FEGEDING, K., MORGAN, W. D., OCKENHOUSE, C., BIRDSALL, B., FEENEY, J., LYON, J. A., HOLDER, A. A. Inhibitory and blocking monoclonal antibody epitopes on merozoite surface protein 1 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* 307:1381-1394, 2001.
- VAN DER HEYDE, H. C., HUSZAR, D., WOODHOUSE, C., MANNING, D. D., WEIDAZ, W. P. The resolution of acute malaria in a definitive model of B cell deficiency, the JHD mouse. *J. Immunol.* 152:4557-4562, 1994.
- VANDERBERG, J. P., CHEW, S., STEWAT, M. J. *Plasmodium* sporozoite interactions with macrophages in vitro: a video microscopic analysis. *J. Protozool.* 37:528-536, 1990.
- VANDERBERG, P. J., FREVERT, U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immunobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int. J. Parasitol.* 34:991-996, 2004.
- VINETZ, J., GILMAN, R. H. Asymptomatic *Plasmodium falciparum* parasitemia and the ecology of malaria transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:639-640, 2002.
- WALTER, M., TONGREN, J. E., ANDREWS, L., KORBEL, D., KING, E., FLETCHER, H., ANDERSEN, R. F., BEJON, P., THOMPSON, F., DUNACHIE, S. J., EDELE, F., DE SOUZA, J.

- B., SINDEN, R. E., GILBERT, S. C., RILEY, E. M., HILL, A. V. S. Up-regulation of TGF- $\beta$ , FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity*. 23:287-296, 2005.
- WARMERDAM, P. A., VAN de WINKEL, J. G., VLUG, A., WESTERDAAL, N. A., CAPEL, P. J. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc $\gamma$  receptor II is critical for human IgG2 binding. *J. Immunol.* 147:1338, 1991.
- WIPASA, J., XU, H., MAKABONGO, M., GATTON, M., STOWERS, A., GOOD, M. F. Nature and specificity of the required protective immune response that develops post challenge in mice vaccinated with the 19-kilodalton fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 1. *Infect. Immun.* 70:6013-6020, 2002.
- WIPASA, J., XU, H., STOWERS, A., GOOD, M. G. Apoptotic deletion of Th cells specific for the 19-kDa carboxyl-terminal fragment of merozoite surface protein 1 during malaria infection. *J. Immunol.* 167:3903-3909, 2001.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Malaria Situation in 2000. <http://www.who.int/health-tropics/malaria.htm>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Malaria Situation in 2005. <http://www.who.int/health-tropics/malaria.htm>
- WURDERLICH, F., BENTEN, P. M., LIEBERHERR, M., GUO, Z., STAMM, O., WREHLKE, C., SEKERIS, C. E., MOSSMANN, H. Testosterone signaling in T cells and macrophages. *Steroids*. 67:535-538, 2002
- XU, H., WIPASA, J., YAN, H., ZENG, M., MAKOBONGO, M. O. The mechanisms and significance of deletion of parasite-specific CD4+ T cells in malaria infection. *J. Exp. Med.* 195:881-892, 2002.
- YAZDANI, S. S., MUKHERJEE, P., CHAUHAN, V. S., CHITNIS, C. E. Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. *Curr. Mol. Med.* 6:187-2003, 2006.
- ZWETYENGA, J., ROGIER, C., TALL, A., FONTENILLE, D., SNOUNOU, G., TRAPE, J-F., MERCEREAU-PUIJALON, O. No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:726-735, 1998.