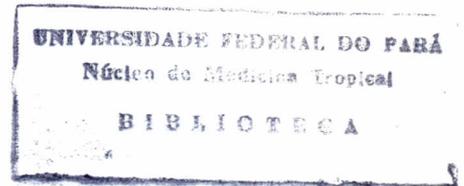


Ana Yecê das Neves Pinto

**Plasmodium vivax: Avaliação
da Resposta de anticorpos IgG
em crianças expostas à Malária**

Belém - Pará
1997

Ana Yecê das Neves Pinto



**Plasmodium vivax: avaliação da resposta de anticorpos
IgG em crianças expostas à malária**

Belém - Pará

1997

GIG. 9362
P659P
DIS

ANA YECÊ DAS NEVES PINTO

***Plasmodium vivax*: avaliação da resposta de anticorpos
IgG em crianças expostas à malária**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará e do Instituto Evandro Chagas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Tropical

Orientador: Prof. Dr. José Maria de Souza

Belém - Pará

1997

Pinto, Ana Yecê das Neves

Plasmodium vivax: avaliação da resposta de anticorpos IgG em crianças expostas à malária, 1997. Belém, 1998.

100 p.

Dissertação (Mestrado)

1. Malária por *Plasmodium vivax* - Imunologia 2. Imunidade 3. Imunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgG3. I. Título.

CDD: 616.936.2

CDU: 616.936

CLASS. 616.9362
CUTTER P659p
TOMBO 03 21/03/99

ANA YECÊ DAS NEVES PINTO

***Plasmodium vivax*: avaliação da resposta de anticorpos
IgG em crianças expostas à malária**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará em colaboração com o Instituto Evandro Chagas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Tropical, sob a orientação do Prof. Dr. José Maria de Souza, para a apreciação da banca examinadora formada pelos doutores:

Presidente: Prof. Dr. José Maria de Souza
Programa de Malária do Instituto Evandro Chagas

1º) Examinador: Carlos Eduardo Tosta

2º) Examinador: Manoel Barbosa de Resende

3º) Examinador: Marinete Marins Póvoa

À Deus que ilumina todos os caminhos,
À D.Yolanda e S.Antonio, que mostraram o meu caminho
Ao Preto, Rômulo e Morgana, que enchem este caminho de alegrias,
e me mantêm seguindo sempre em frente.

À Deus que ilumina todos os caminhos,
À D.Yolanda e S.Antonio, que mostraram o meu caminho
Ao Preto, Rômulo e Morgana, que enchem este caminho de alegrias,
e me mantêm seguindo sempre em frente.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. José Maria de Souza, amigo, incentivador e exemplo maior de amor ao trabalho.
- Ao amigo Ricardo Luís Dantas Machado e Dr^a Marinete Marins Póvoa pela força e estímulos em horas bastante difíceis, e pela valiosa introdução nos conhecimentos técnicos laboratoriais.
- À Dr^a Salma Gomes de Oliveira pelo auxílio fundamental na introdução de técnicas de imunofluorescência, e contribuições significativas.
- À Dr^a Irene da Silva Soares e Prof. Cor de Jesus Fontes, pela criteriosa revisão do manuscrito e sugestões valiosas.
- Aos amigos do curso de mestrado: Ana Maria Revorêdo Ventura, Eliete Araújo, Érika Riebisch, Judith Weirich, Nagib Abdon, Paulo Cartágenes e Vânia Noronha. Nossos caminhos se cruzaram, e assim permanecerão, mesmo tendo chegado o fim de nossa jornada. Em especial à Ana Maria Revorêdo Ventura, pelo rigoroso acompanhamento pediátrico das crianças estudadas.
- Ao Prof. Manuel Ayres e D. Isa Ayres, inesquecíveis para todos os alunos e ex-alunos do curso de mestrado.
- À amiga Maria Angélica Nunes, pela disponibilidade em ajudar em um momento decisivo.
- Ao amigo José Maria Nascimento, pela amizade leal e apoio técnico constantes.
- A todos os funcionários de Programa de Malária do IEC, médicos, paramédicos, em especial ao amigo Miguel Arcanjo e laboratoristas, pelo auxílio técnico permanente na busca e controle dos pacientes.
- Ao Dr. Antonio Walter Ferreira, Dra. Sandra Ávila e Dr. Hernando Del Portillo pela

disponibilidade em nos esclarecer dúvidas, em todos os momentos que necessitamos.

- À Dr^a. Ermelinda Rosário Moutinho da Cruz, coordenadora do Curso de Mestrado em Medicina Tropical e ao Núcleo de Medicina Tropical, na pessoa de seu coordenador Dr. Ângelo Barletta Crescente, pelo apoio logístico e financeiro recebidos.
- Ao Instituto Evandro Chagas, em nome de seu diretor, Dr. Jorge Travassos da Rosa, pelo apoio administrativo e logístico recebidos.
- Ao amigo Alan Ayan pelo apoio técnico dado na área da informática.
- Aos colegas do Seminário Laveran (Teresópolis, novembro de 1996) em nome do Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro, pelas sugestões decisivas dadas ao plano de dissertação.
- A todos os professores do curso de mestrado, que invariavelmente somaram esforços e contribuíram significativamente para nossa formação.
- Aos funcionários da biblioteca do Instituto Evandro Chagas, Nazária Higashi, Gladys Marins e Raimundo Nonato, pela orientação na pesquisa bibliográfica.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

	pg
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 A MALÁRIA EM CRIANÇAS COMO UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA	15
1.2 RESPOSTA IMUNE NATURALMENTE ADQUIRIDA À MALÁRIA	22
1.2.2 Características gerais	22
1.2.3 Resposta imune adquirida à malária por <i>P. vivax</i>	24
1.2.3 Resposta imune mediada por anticorpos contra o parasita	25
1.2.4 Anticorpos citofílicos e malária	31
1.3 JUSTIFICATIVA	37
1.4 OBJETIVOS	38
1.4.1 Objetivos gerais	38
1.4.2 Objetivos específicos	38
2 MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 POPULAÇÃO E ÁREA DE ESTUDO	40
2.2 DEFINIÇÕES E CRITÉRIOS	41
2.2.1 Aspectos éticos	41
2.2.2 Elegibilidade	41
2.2.3 Critérios de exclusão	41
2.2.4 Definições	42
2.3 DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS	42
2.3.1 Coleta de dados	42
2.3.2 Procedimento terapêutico	50
2.3.3 Processamento dos dados e procedimentos estatísticos	51

3	RESULTADOS	53
3.1	DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS CLASSE IgG DURANTE A FASE AGUDA E CONTROLE DE CURA	56
3.2	INFLUÊNCIA DA IDADE	58
3.3	PARASITEMIA ASSEXUADA E TÍTULOS DE ANTICORPOS TOTAIS ANTI-PV	59
3.4	DADOS CLÍNICOS E TÍTULOS DE ANTICORPOS TOTAIS ANTI-PV	63
3.5	SUBCLASSES DE IMUNOGLOBULINAS G ANTI-PV	66
4	DISCUSSÃO	71
5	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
	ANEXOS	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC = "Antibody Dependent Citotoxicity Cellular" (Citotoxicidade celular dependente de anticorpos)

ADCI = "Antibody dependent cellular inhibition of parasite growth" (Inibição celular do crescimento parasitário, dependente de anticorpos)

APM/IEC = Ambulatório do Programa de Malária do Instituto Evandro Chagas

Células NK = Células "Nature Killer"

cm³ = Centímetro cúbico

CS = Circunsporozoíto

DNA = Ácido desoxiribonucleico

ELISA = "Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay"

Fc = Fração cristalizável

FITC = "Immunoglobulin Fraction of Mouse Ascites Fluid"

FNS = Fundação Nacional de Saúde

IFI = Imunofluorescência Indireta

IgA = Imunoglobulina classe A

IgE = Imunoglobulina classe E

IgD = Imunoglobulina classe D

IgG = Imunoglobulinas classe G

IgG1 = Imunoglobulina classe G, subclasse 1

IgG2 = Imunoglobulina classe G, subclasse 2

IgG3 = Imunoglobulina classe G, subclasse 3

IgM = Imunoglobulina classe M

IUIS = "International Union of Immunological Societes"

MGDP = Média geométrica da densidade parasitária

mg/kg = miligramas por quilograma

MGTAG = Média geométrica de títulos de anticorpos classe G

MGTS = Média geométrica dos títulos de anticorpos subclasses IgG1, IgG2 e IgG3

mm³ = milímetro cúbico

MSP-1 = "Merozoite Surface Protein 1" - Proteína principal do merozoíto - 1

OPS = Organização Pan-Americana de Saúde

OMS = Organização Mundial de Saúde

PBS = "Phosphate Buffer Saline" (Solução salina tamponada com fosfatos)

PV = *Plasmodium vivax*

PN = Posto de Notificação

TDR= Research and Training in Tropical Diseases

VD = Volume de PBS para diluição do sedimento de hemácias

N = Número médio de hemácias parasitadas com esquizontes por campo microscópico

WHO = World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Número	Título	pg
1	Diluições dos conjugados monoclonais específicos para anticorpos IgG, frações IgG1, IgG2, e IgG3, sugeridas pelo fabricante e diluições que foram testadas, para fins de titulação dos conjugados.	49
2	Idade, sexo, passado malárico, número de episódios anteriores de malária, espécie de plasmódio envolvida no episódio anterior, e títulos de anticorpos IgG em D0 de 34 pacientes. APM/IEC, Belém/PA. 1997	55
3	Médias geométricas dos títulos de anticorpos classe IgG no grupo estudado, conforme dia de coleta durante a fase aguda e controle de cura. APM/IEC, Belém/PA. 1997.	56
4	Número absoluto e frequência percentual (%) de pacientes distribuídos conforme os grupos etários. APM/IEC, Belém/PA. 1997.	58
5	Títulos de anticorpos totais anti- <i>P.vivax</i> encontrados no primeiro dia de tratamento, conforme as grupos etários. APM/IEC. Belém, 1997.	59
6	Médias geométricas da parasitemia assexuada/mm ³ de sangue em 34 pacientes, conforme dia de acompanhamento e história prévia de malária. APM/IEC, Belém/PA. 1997	60
7	Frequência dos principais sinais e sintomas observados no 1º dia de tratamento, entre pacientes priminfetados e pacientes com exposição prévia à malária. APM/IEC, Belém/PA. 1997	65
8	Distribuição dos títulos de anticorpos classe IgG anti-PV em D0 e presença ou ausência de esplenomegalia. APM/IEC, Belém/PA. 1997	66
9	Títulos de anticorpos antiplasmodiais subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 anti-PV na fase aguda e pós-tratamento, de 34 pacientes. APM/IEC, Belém/PA. 1997	67
10	Médias geométricas dos títulos de subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 anti-PV, e proporção de indivíduos positivos na primeira e segunda coleta conforme exposição anterior à malária. APM/IEC, Belém/PA. 1997	68
11	Número absoluto de indivíduos positivos e negativos à IFI para os anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 anti-PV e valores de p obtidos na comparação de proporções. APM/IEC, Belém/PA. 1997	69

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	pg
1	Freqüência (%) de resposta positivas de anticorpos da classe IgG anti- <i>P. vivax</i> , na fase aguda e controle de cura em 34 pacientes. APM/IEC, Belém/PA. 1997.	53
2	Médias geométricas dos títulos de anticorpos IgG anti-PV durante a fase aguda e controle de cura de 34 pacientes. APM/IEC, Belém/PA. 1997	57
3	Médias geométricas dos títulos de anticorpos IgG anti-PV em pacientes priminfetados e pacientes que apresentaram mais de um ataque malárico, durante os controles de cura. APM/IEC, Belém/PA. 1997	58
4	Correlação entre títulos de anticorpos tipo IgG anti-PV e parasitemia assexuada/mm ³ no dia zero, em 34 pacientes. APM/IEC. Belém/PA. 1997	60
5	Correlação entre títulos de anticorpos tipo IgG anti-PV em D7 e parasitemia assexuada/mm ³ no dia zero, em 34 pacientes. APM/IEC. Belém/PA. 1997	61
6	Correlação entre títulos de anticorpos IgG anti-PV e parasitemia assexuada/mm ³ em D0, de 6 pacientes com história anterior de malária. APM/IEC. Belém/PA. 1997	62
7	Correlação entre títulos de anticorpos IgG anti-PV e parasitemia assexuada/mm ³ em D0, de 28 pacientes priminfetados. APM/IEC. Belém/PA. 1997	62
8	Correlação entre tempo de doença e títulos de anticorpos IgG em D0 de 34 pacientes. APM/IEC. Belém/PA. 1997	63
9	Correlação entre tempo de doença e títulos de anticorpos IgG anti-PV em D0 de 28 pacientes priminfetados. APM/IEC. Belém/PA. 1997	64
10	Correlação entre tempo de doença e títulos de anticorpos IgG anti-PV em D0 de 6 pacientes com história anterior de malária. APM/IEC. Belém/PA. 1997	64
11	Médias geométricas dos títulos de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 anti-PV, na fase aguda (pré-tratamento ou D0), e fase pós-tratamento de 34 crianças estudadas. APM/IEC, Belém/PA. 1997	

RESUMO

❖ As estratégias atuais de combate à malária estimulam o conhecimento mais profundo dos mecanismos de defesa humana antiplasmodiais. A cooperação de anticorpos citofílicos com monócitos sangüíneos facilitando a fagocitose de células infectadas, tem mostrado ser um mecanismo efetivo nesta defesa. Estudos comparativos entre populações semi-imunes e não imunes, têm sido feitos a fim de identificar o padrão de imunoglobulinas nestas populações. Somando-se a estes, o presente trabalho objetivou avaliar a resposta de anticorpos IgG anti-*P.vivax* (IgG anti-PV), subclasses citofílicas: IgG1 e IgG3 - e não citofílicas: IgG2, em crianças com malária por *P.vivax*. Foram avaliadas 34 crianças portadoras de malária vivax, diagnosticadas pela gota espessa, acompanhadas desde a fase aguda até o último controle de cura, as quais tiveram seus níveis de anticorpos IgG anti-PV e subclasses mensurados pela técnica de imunofluorescência indireta. Os pacientes foram subdivididos em dois grupos: priminfetados (n=28) e pacientes com história de malária anterior (n=6). A média geométrica dos títulos de anticorpos IgG anti-PV, foi demonstrada nos diferentes períodos relativos ao controle de cura, sendo que os níveis de anticorpos mensurados durante a fase aguda (dias zero e sete) foram comparados (teste t de Student). Níveis de anticorpos IgG anti-PV foram correlacionados com parasitemia e tempo de doença, (Correlação de Spearman). Sinais e sintomas clínicos foram descritos em ambos subgrupos. A proporção de indivíduos positivos e negativos quanto as subclasses foi comparada nos dois subgrupos (teste exato de Fisher). Os resultados mostraram um aumento inicial dos títulos de IgG anti-PV entre o dia zero (D0) e o dia sete (D7), sendo esta diferença significativa ($p=0,027$), independente de exposição anterior ou não à malária. Aos 60, 120 e 180 dias pós-tratamento, obteve-se uma curva descendente de títulos, com as seguintes proporções de respostas positivas: aos 60 dias: 95,2%, com títulos variando entre 40 e 2560; aos 120 dias: 62,5%, com variação de 40 e 320; e aos 180 dias apenas 28,5% de positivos, com variação entre 40 e 160. Foi encontrada correlação positiva entre tempo de doença e níveis de anticorpos totais entre indivíduos priminfetados. As médias geométricas dos títulos de anticorpos IgG anti-PV subclasses encontradas em D0 foram: IgG1(598,41) > IgG3 (4,064) > IgG2 (1,422). Não ocorreram diferenças entre proporções de indivíduos positivos e negativos para as subclasses de IgG anti-PV, quando se comparou priminfetados e pacientes sem história anterior de malária. Concluiu-se que, no grupo estudado: 1) Ocorre inicialmente aumento de anticorpos IgG anti-PV entre o primeiro e oitavo dia de tratamento; 2) Os níveis de anticorpos totais anti-PV declinam gradativamente durante o controle de cura: 4,76% dos pacientes apresentaram resultados negativos até D60, 37,5% até D120, e 71,42% até 180 dias após o início do tratamento 3) Não há associação entre parasitemia assexuada no dia zero e títulos de anticorpos IgG anti-PV no primeiro e oitavo dias de tratamento; 4) Em crianças expostas a ataques anteriores, quanto maior o tempo de evolução da doença, maiores são os níveis de anticorpos, ao contrário do que ocorreu com crianças priminfetadas; 5) Não há correlação entre títulos de anticorpos anti-PV totais e presença de esplenomegalia; 6) Houve predominância de anticorpos citofílicos (IgG1> IgG3), sobre os anticorpos não citofílicos, na amostra estudada.

ABSTRACT

An improved knowledge of human antiplasmodial defense mechanisms is part of current strategies against malaria. One of the effective defense mechanisms is the relationship between cytophilic antibodies and monocytes in order to increase the phagocytosis of infected cells. Comparative studies on immunoglobulin patterns have been carried out in immune and semi-immune populations. The present work is a further contribution to the subject and has the objective to study the response of IgG antibodies anti-*P.vivax* (IgG anti-PV), and their cytophilic (IgG1 e IgG3) and non-cytophilic (IgG2) subclasses in 34 outpatient children with malaria by *P.vivax*. Diagnosis of malaria was established by thick blood films. IgG levels, with their respective subclasses, were identified by indirect fluorescent antibody technique in the children enrolled in the study, during the acute phase and up to ultimate established cure. Patients were divided in 2 groups according to a previous malaria history (primarily infected, n= 28) and patients with history of previous malaria attack (n=6). The geometric means of antibodies IgG anti-PV levels were demonstrated during different periods of sera assessment. The IgG anti-PV levels obtained in the days zero and seven were compared (Student's t test). IgG anti-PV levels were correlated with asexual parasitaemia and the period of sickness, (Spearman's correlation test). A description of clinical features occurred in both subgroups. Regarding immunoglobulin subclasses, the proportion of positive and negative sera was compared (Exact Fisher's test), in the 2 subgroups with the following results: a significant statistical difference ($p=0,027$) occurred in the IgG levels between day zero (D0) and day seven (D7), with no correlation with previous malaria history. A descending curve was observed in IgG levels, with mean and variable values respectively of 95,2% (40-2560) on the 60th day, 62,5% (40-320) on the 120th day, and 28% (40-160) on the 180th day after treatment. There was a positive association between the time of sickness and total antibody IgG anti-PV levels in primarily infected patients. The rank order for geometric means of IgG subclasses encountered was: IgG1(598,41) > IgG3 (4,06) > IgG2 (1,42). There were no significant differences in IgG anti-PV subclasses among primarily infected patients and those without previous malaria history. The following conclusions were made: 1) An increase of IgG anti-PV levels was seen between D0 and D7; 2) During the follow up the IgG anti-PV levels showing a gradual tendency to decline: 4,76% of the patients had negative results until D60, 37,5% until D120, and 71,42% had negative results until 180 days after treatment; 3) There was no association between asexual parasitemia in day zero and antibody levels IgG anti-PV in the first and in the eighth day of treatment; 4) In children with previous malaria attacks the time of sickness evaluation is proportional to antibody IgG anti-PV levels, and the reverse occurs, in the primarily infected children; 5) There was no correlation between total antibodies anti-PV levels and evidence of splenomegaly; 6) Cytophilic antibodies (IgG1 > IgG3) predominated over non-cytophilic antibodies (IgG2) in the study sample.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A MALÁRIA EM CRIANÇAS COMO UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

A malária inclui um conjunto de infecções produzidas por algumas espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo uma doença possivelmente muito antiga, talvez tão antiga quanto a nossa própria espécie (Deane, 1992). Entretanto, até os dias de hoje, em pleno século vinte, na era da informática e da tecnologia avançada em todas as áreas do conhecimento humano, principalmente na área médica, determinada parcela de nossa população (o chamado mundo subdesenvolvido), mantêm-se como vítima indefesa deste flagelo.

Estimativas imprecisas calculam em 300 a 500 milhões de casos clínico por ano distribuídos na África, Ásia e Américas, além de um a dois milhões de mortes no mundo (WHO, 1995).

A análise da situação dos programas de controle da doença nas Américas, correspondente ao ano de 1996, indicou o Brasil como o país que mais notificou casos de malária neste mesmo ano (OPS, 1996[a]). Apesar disso, no Brasil, grandes progressos foram obtidos na luta contra a malária, e sua incidência é hoje restrita à região Amazônica. Na região extra-Amazônia, as profundas alterações sócio-econômicas e ambientais, principalmente no sentido da urbanização crescente e do intenso desmatamento, aliados a um programa sistemático e disciplinado de erradicação da doença, permitiram que, as áreas mais densamente povoadas do Brasil estejam atualmente, livres da transmissão da doença. Na Amazônia, entretanto, a malária tem se tornado perene, e com preocupantes índices de aumento do número de casos a cada ano, desde 1970 (Tauil, 1984).

O valor mais baixo já atingido de casos de malária, no Brasil, ocorreu entre 1968 e 1970 (variação de cinqüenta mil a cinqüenta e três mil casos da doença por ano), imediatamente após a campanha de erradicação da doença. Nesta época, a transmissão praticamente confinava-se à região amazônica.

Inúmeros fatores de natureza física e biológica, além de fatores sócio-econômicos existentes na Amazônia, tornam esta região bastante vulnerável a interação parasito-vetor-homem, propiciando a manutenção da transmissão.

Ao considerarmos a população mundial, as crianças são particularmente afetadas. Em áreas altamente endêmicas, o maior impacto da doença é em crianças menores de cinco anos de idade. Estima-se que, em áreas rurais da África tropical, 1 em cada 20 crianças morre com malária, antes dos 5 anos de idade (Philips *et al*, 1993).

Recentemente, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS)/ Organização Mundial de Saúde (OMS), vem divulgando estatísticas impressionantes acerca de doenças prevalentes na infância. Cinco doenças causam sete de cada dez mortes infantis, desde 1990: infecções respiratórias agudas, desnutrição, diarréia, sarampo e malária. Neste mórbido "ranking" a malária figura como a quinta causa principal de morte infantil, sendo responsável por 7,7% das mortes (OPS, 1996[b]).

No continente africano, onde a situação é grave, muito se tem feito no sentido de diagnosticar a doença na infância, em todos os seus aspectos. Todavia, no Brasil, os estudos de malária em crianças ainda são escassos. Extrapolações da experiência com adultos, são feitas frequentemente para crianças, e geralmente não satisfazem às classes que dispensam atenção a infância (Tonelli, 1987).

A malária não é uma doença peculiar da criança. Em nosso país, por exemplo, até pouco tempo atrás, as distâncias geográficas existentes entre a população infantil e as áreas de maior endemicidade da doença, resguardavam as crianças, de certo modo, do risco de adoecer de malária. Além disso, o uso de inseticidas residuais como estratégia básica do Programa de Erradicação da Malária, aplicado na década de 50, determinou relativa diminuição da transmissão domiciliar da doença (Marques, 1995). É possível que estes dois fatores, além de outros, tenham se somado para garantir uma certa proteção da criança à malária em nosso país. Esta "proteção" é observável pela escassa literatura existente a respeito do tema (Tonelli, 1987), sugerindo que até pouco tempo atrás, a malária em crianças era um problema de pouca relevância entre nós.

Entretanto, mais recentemente, a crescente participação feminina em atividades que há pouco tempo eram eminentemente do domínio masculino, como por exemplo, a atividade extrativista em áreas de desmatamento (Médici, 1989), determinou um incremento do número de casos de malária em crianças, particularmente na região Amazônica, dotada de grandes riquezas naturais e extensa área geográfica.

Outro fato importante que sugere a maior interação do binômio criança e malária, é o fenômeno de urbanização que a doença vem apresentando nos últimos anos. A cidade de Manaus, por exemplo, figurou em 1993 como a área de maior incidência malarígena no estado do Amazonas (Marques, 1995). Neste mesmo ano, foram registrados 23.189 casos (41,9% dos casos registrados no estado do Amazonas) no município de Manaus, dos quais 13.638 eram autóctones (Histórico, 1997). Na cidade de Belém, em 1993, foram registrados em subestimativa (notificação referente a apenas um dos seis postos de notificação

existentes na área Metropolitana de Belém), 293 casos autóctones confirmados de malária por *P. vivax* (Silva *et al.* , 1994). Podemos considerar, portanto, que a atividade extrativista com maior participação feminina e a urbanização crescente da doença, aproximando geograficamente as crianças e a infecção malárica, expõem cada vez mais a população infantil ao risco da doença na região Amazônica.

Infelizmente, em virtude de inúmeras falhas que ocorrem no sistema de informação, e o fato de a doença atingir uma população que geralmente vive em precárias condições de vida e níveis de atenção à saúde muito baixos, torna-se difícil analisar dados numericamente, restando neste momento, a observação simples do fenômeno e pretensões futuras de melhoria nos serviços de informação em malária.

A malária em crianças da região amazônica brasileira, detentora do infeliz índice de 99% dos casos de malária do Brasil (Marques, 1995), surge portanto, como um grave problema de saúde pública, pelo crescente número de casos incidentes em uma faixa etária que influi diretamente sobre os indicadores de saúde de determinada população.

As estratégias na busca de soluções para o problema emergente de elevação do número de casos de malária em crianças no Brasil, devem ser consideradas dentro do enfoque atual que os programas mundiais de combate à esta endemia vem assumindo, desde 1992: o controle integrado.

O Programa de Controle da Malária teve seu primeiro enfoque oficial durante a conferência ministerial de Amsterdã, no ano de 1992, em substituição ao Programa de Erradicação, após o reconhecimento da impossibilidade de erradicação da doença em determinadas regiões do globo (OMS, 1971). Define-se

assim, o abandono das estratégias coletivas de combate à malária e o privilegiamento do enfoque de risco, valorizando mais a intervenção sobre o indivíduo, e menos a intervenção sobre o meio ambiente (Barata, 1995).

As diretrizes aprovadas na referida conferência, baseiam-se em 3 conjuntos principais de atividades: 1) Gestão da doença, incluindo-se aqui as atividades de diagnóstico precoce e tratamento eficaz dos casos; 2) Prevenção da doença, com medidas de proteção individual, quimioprofilaxia quando indicada, imunização quando estiver disponível e controle domiciliar de vetores; 3) Prevenção e controle de epidemias, incluindo as ações de vigilância epidemiológica.

Dentro do segundo conjunto de diretrizes (prevenção) destaca-se como elemento técnico básico para a nova estratégia do controle da doença, o papel das vacinas antimaláricas, um dos maiores investimentos atuais no combate à doença.

Uma das maiores limitações ao desenvolvimento das vacinas é a alta complexidade estrutural e funcional do plasmódio, determinando sua diversidade antigênica em vários níveis: entre espécies, entre fases do ciclo parasitário, entre diferentes isolados da mesma espécie e colhidos de indivíduos diferentes, entre isolados do mesmo indivíduo colhidos em diferentes etapas, e ainda a própria diversidade antigênica do parasita. (McGregor & Wilson, 1988; Tosta, 1992). Assim, torna-se claro que não devemos nos referir ao desenvolvimento de apenas uma vacina antimalárica, mas a diferentes vacinas antimaláricas contra um parasita complexo.

Segundo Mendis (1991), vários estudos demonstraram os estágios parasitários que funcionam como alvos potenciais para o desenvolvimento das vacinas antimaláricas, incluindo: a) os esporozoítos, estágio de introdução

parasitária no organismo do hospedeiro, e seus estágios seqüenciais, desenvolvidos no hepatócito (pré-eritrocíticos). Atuando nesta fase, a vacina idealizada preveniria contra o estabelecimento da infecção; b) os estágios eritrocíticos assexuados, seriam indutores de imunidade anti-doença, refletindo nos índices de morbi-mortalidade da doença, porém sem determinar proteção duradoura ou efetiva; c) e finalmente, os estágios sexuados (gametas, gametócitos), que determinariam um bloqueio a transmissão em áreas endêmicas.

Documento do TDR (UNDP/WHO/TDR, 1995), divide empiricamente a era das vacinas antimaláricas em seis períodos. O primeiro período é marcado pelos experimentos com esporozoítos irradiados protetores contra a infecção (Nussenzweig, 1967). O segundo período antevê a impraticabilidade de produção de uma vacina antimalárica contendo o parasita como um todo, e afirma que a vacina deverá conter determinados componentes antigênicos do parasita. A terceira era é baseada na caracterização de frações antigênicas capazes de induzir resposta imune protetora. O 4º período, foi influenciado pelos resultados limitados com as vacinas antiesporozoíticas em humanos, e pela valorização do complexo envolvimento de células T na resposta imune à malária. Neste período, centenas de antígenos potenciais candidatos à vacina, foram determinados e tiveram seus genes clonados, tanto para *P. vivax* (revisado por Galinski & Barnwell, 1996), quanto para *P. falciparum* (revisado por Amador & Patarroyo, 1996). Isto mostrou que o desenvolvimento da vacina seria, a partir de então, um trabalho árduo, requerendo análises sofisticadas e entendimento perfeito da complexa interação estabelecida entre o parasita e o sistema imune. O quinto período é marcado pelo desenvolvimento da "SPf66", uma vacina sintética que contém um epítopo derivado da região repetitiva (NANP) da proteína circunsporozoíta (CS) e

três epítomos de estágios sangüíneos, incluindo a proteína principal da superfície do merozoíto (MSP-1) de *P.falciparum*, idealizada pelo colombiano Manuel Patarroyo (Patarroyo *et al.*, 1988).

Atualmente encontramos-nos no sexto período, onde se observam alguns avanços no desenvolvimento de novas estratégias de vacinação, como por exemplo, a utilização de proteínas recombinantes, vírus recombinantes e ácidos nucleicos (DNA) (revisado por Soares e Rodrigues, 1997).

Observou-se dentro do 4º período, uma verdadeira desilusão em relação às vacinas antimaláricas, quando se constatou a necessidade do entendimento pormenorizado da interação parasita-hospedeiro. Isto incluiria basicamente duas dificuldades já bem reconhecidas: 1) Complexidade antigênica estrutural do parasita; 2) O desenvolvimento de uma resposta imune particular, conforme as características epidemiológicas existentes nas diferentes regiões endêmicas. Tais características, teoricamente, definiriam o tipo de transmissão efetivada nestes contextos epidemiológicos, influenciando diretamente no estado imunitário daquela população.

O Brasil é formado por regiões geo-político-sociais bastante distintas entre si, apresentando áreas de alto, médio, baixo, e sem risco de transmissão de malária, distribuídas por todo o território brasileiro. São clássicos os trabalhos que definem a transmissão de malária dentro do território nacional, como sendo predominantemente do tipo focal, ligada a fenômenos sazonais, e intimamente relacionada a fatores intrínsecos da dinâmica dos povos, tais como movimentos migratórios, assentamentos agrícolas em fronteiras e atividades profissionais (Marques & Gutierrez, 1994). Estas características levam a uma instabilidade patente nessa transmissão, originando uma população cuja imunidade à malária,

em sua grande maioria, existe em proporções mínimas ou é praticamente inexistente (WHO, 1988). A chamada imunidade anti-doença, muito comum em populações da África Tropical, onde é grande a proporção de indivíduos assintomáticos portadores do parasita, raramente é relatada no Brasil (Prata *et al.*, 1988), ou então é relatada em comunidades bastante específicas (Andrade *et al.*, 1995), sendo questionável sua inclusão dentre as características imunológicas adquiridas contra o plasmódio em populações da Amazônia.

1.2 RESPOSTA IMUNE NATURALMENTE ADQUIRIDA À MALÁRIA

1.2.1 Características gerais

Observações “in vivo” sugerem que, em relação à espécie de plasmódio mais bem estudada, o *P.falciparum*, a resposta imune à infecção é determinada tanto por características inatas do hospedeiro, que desempenham o papel principal, como por mecanismos imunobiológicos de intensa resposta do sistema imune do indivíduo, que representam a chamada imunidade naturalmente adquirida, obtida após numerosos ataques da doença. Estes mecanismos viabilizam vários estágios de imunidade, como a resistência à malária cerebral, imunidade antidoença, imunidade cepa-específica e, finalmente, após um longo tempo de exposição (em áreas hiperendêmicas e holondêmicas), o equilíbrio da relação parasita-hospedeiro, característico do estágio de premunição. No entanto, o efeito protetor dessa resposta nem sempre é ideal. Ao contrário, pode muitas vezes contribuir para a exacerbação do quadro fisiopatogênico, a exemplo do que ocorre com a malária grave induzida pelo *P.falciparum* (Hommel, 1993).

Algumas características fundamentais da resposta imune adquirida à malária devem ser ressaltadas: 1) Suscetibilidade à malária-infecção, excluindo-se

aqueles portadores de resistência inata; 2) A imunidade naturalmente adquirida é específica para cada espécie de plasmódio, e para cada estágio do parasita, durante seu ciclo no hospedeiro vertebrado; 3) A resposta imune ocorre lentamente e tem pouca duração, persistindo somente enquanto existir o contato entre o hospedeiro e o parasita. Esta característica tem por base a análise da situação de imunidade que ocorre nas áreas ditas endêmicas, onde a incidência de malária decresce à medida que aumenta a idade (Mc Gregor & Wilson, 1988; Tosta, 1992; THE HUMAN, 1993; Baird, 1995). Assim, em áreas endêmicas, certas peculiaridades do comportamento imunitário em crianças, podem ser agrupados por faixas etárias. Na África tropical, região holoendêmica de malária, as crianças são relativamente protegidas da infecção, até os dois anos de idade, por meio de anticorpos de origem materna, transferidos via transplacentária (Nardin, 1981), e pela presença da hemoglobina fetal (Pasvol *et al.*, 1977; McLeod, 1988). Estes anticorpos apresentam níveis cada vez menores a partir dos 6 meses de vida (Mc Gregor & Wilson, 1988; Calvosa, 1995). Dos dois aos cinco anos, a imunidade persiste ou desaparece, de acordo com a continuidade e freqüência da exposição à transmissão. Este é o período de maior risco, representando os maiores índices de morbi-mortalidade da malária, que constitui a primeira causa de morte em crianças desta faixa etária (The HUMAN, 1993; UNDP/WHO/TDR, 1995). A partir dos cinco anos, o comportamento passa a ser semelhante ao que ocorre nos adultos, onde as defesas são incrementadas, a severidade dos sintomas e a densidade parasitária no sangue periférico são reduzidas. (Mc Gregor & Wilson, 1988).

Após numerosos ataques de malária, após um estágio crônico de infecção, um equilíbrio é obtido, caracterizado por baixa parasitemia e doença

oligossintomática, somada à única habilidade do parasita quando em hospedeiro normal: sua habilidade em se fazer tolerado. Em hospedeiro imunocompetente este fator indica claramente que o parasita tem mecanismos sofisticados de assegurar a neutralidade do hospedeiro (Druilhe & Perignón, 1994). Assim, após o estabelecimento desses fenômenos, o hospedeiro adquire a chamada imunidade "antitóxica" ou imunidade "antidoença", que protege contra a doença, mas não contra a infecção.

1.2.2 Resposta imune adquirida à malária por *P.vivax*

Como agente etiológico da malária "benigna", o *Plasmodium vivax* não determina milhões de mortes por ano, não está freqüentemente envolvido com resistência a drogas antimaláricas e nem é a mais importante doença parasitária do homem. O *P.vivax* exerce sua função parasitária de forma inteligente e com relativo sucesso, sendo a espécie de malária humana mais amplamente distribuída em nosso meio. No entanto, apesar de sua importância epidemiológica, a maioria dos estudos de avaliação da resposta imune humana a antígenos de malária têm sido feitos para *P.falciparum*. Os estudos de imunidade contra o *P.vivax* têm sido limitados, principalmente por dois fatores: as parasitemias presentes em pacientes infectados são relativamente baixas, e apenas recentemente o parasita pôde ser cultivado "in vitro" (Golenda *et al.*, 1997), o que dificultava bastante os experimentos em laboratório.

Sendo duas espécies diferentes de plasmódios, o *P.vivax* e *P.falciparum* apresentam inúmeras características biológicas que os distinguem, e que determinam diferenças marcantes nas situações de imunidade humana contra estes parasitas. Por outro lado, estudos relacionados à estrutura antigênica do

P.vivax demonstram graus de paralelismo bastante próximos ao *P.falciparum*. Um exemplo destas semelhanças, pôde ser evidenciado nos estudos feitos em proteínas contidas na superfície dos merozoítos (MSP1- Merozoite Surface Protein 1) descritas por Holder & Freeman (1982), que constituem alvos potenciais nos estudos vacinais contra as formas sangüíneas do *P.falciparum*. Os estudos de caracterização feitos em uma porção da MSP1 do *P.vivax* (Del Portillo *et al.*, 1988), demonstraram que a estrutura primária deste gene, o Pv200, é similar à MSP1 do *P.falciparum*, Pf190 (Holder *et al.*, 1985; Tanabe *et al.*, 1987); e também à proteína dos parasitas de malária de roedores, Py230 (Lewis *et al.*, 1989).

As defesas adquiridas contra o *P.vivax* não são efetivas contra o *P.falciparum* (Jeffery, 1966). São fortes as evidências que os mecanismos efetores envolvendo a proteção sejam diferentes para as duas espécies (Snewin *et al.*, 1991). Em constraste com a ação protetora conferida por anticorpos anti-*P.falciparum* transferidos passivamente, o soro de indivíduos considerados imunes após vários ataques de malária por *P.vivax*, foram inábeis em conferir proteção contra *P.falciparum*. (Clyde, 1989).

1.2.3 Resposta imune mediada por anticorpos contra o parasita

Apesar dos mecanismos efetores da imunidade antimalárica envolverem anticorpos, células, e outras substâncias solúveis destaca-se entre estes, o papel dos anticorpos, atualmente bastante valorizado, auxiliando de forma efetiva a ação imunitária em nível celular, e comprovadamente modificando o curso da infecção em primatas (Muniz-Junqueira 1996).

Segundo McGregor e Wilson (1988), a resposta imune humoral na malária humana vem sendo estudada há muito tempo, desde 1918, com experimentos que

demonstraram a presença de anticorpos específicos antimaláricos, através de técnicas atualmente em desuso: imunoprecipitação; fixação do complemento; e imunoaglutinação. Um dos maiores óbices ao desenvolvimento dessas técnicas, era a obtenção de antígenos que reproduzissem resultados confiáveis, limitando bastante a padronização desses testes. Somente a partir de 1959, com o advento das técnicas de imunofluorescência, foi possível levar a efeito os estudos de imunidade humoral em malária, incluindo estudos de malária induzida em voluntários e investigações soroepidemiológicas (McGregor & Wilson, 1988).

McGregor e Wilson (1988) relataram que o efeito protetor natural dos anticorpos antimaláricos foi primariamente estudado por Sotiriádes, em 1917, e Kauders, em 1927, que reportaram melhora clínica de pacientes com malária injetados com soro de doadores naturalmente imunizados. Cohen *et al.* (1961), mostraram que a imunidade protetora pode ser transferida por anticorpos IgG, presentes no soro de indivíduos imunes do Oeste da África. Esta fração quando era administrada em grandes doses para crianças jovens com malária clínica, reduzia a parasitemia a baixos níveis. Não houve evidências de que os parasitas intraeritrocíticos sofriam danos, e foi observado que a redução da parasitemia ocorreu durante a esquizogonia, sugerindo que os anticorpos protetores interagem com estágios tardios ou com merozoítos livres.

Em voluntários adultos infectados com *Plasmodium vivax*, os anticorpos são detectados entre três a seis dias após a parasitemia se tornar patente, e esta relação é mantida a despeito da infecção ser induzida por esporozoítos ou por formas sangüíneas do parasita. Após tratamento, com o desaparecimento da parasitemia, os níveis de anticorpos declinam gradualmente, mas permanecem detectáveis por períodos prolongados (Abele *et al.*, 1965; Lunn *et al.*, 1966; Tobie

et al., 1966). Os episódios secundários de parasitemia (recaídas) estão associados a um rápido aumento dos níveis de anticorpos, segundo Tobie *et al.* (1966). No mesmo trabalho, os autores mostraram não haver influência da duração da parasitemia sobre os títulos de anticorpos obtidos de cada paciente individualmente, ou seja, a quantidade de parasitas sangüíneos não era proporcional à quantidade de anticorpos séricos. Lunn *et al.* (1966) mostraram achados diferentes aos anteriores em relação as parasitemias reincidentes, as quais estariam associadas a uma queda inicial, porém transitória, dos níveis de anticorpos, sugerindo a ligação pré-existente de anticorpos ao antígeno.

Targett (1970) e Collins *et al.* (1971), mostraram que, tanto os voluntários infectados, como os residentes de áreas endêmicas, mostram o envolvimento dos isotipos de imunoglobulinas IgM, IgA e IgG na resposta imune humoral.

Embora seja referida uma relação entre os níveis de anticorpos inibidores do crescimento do plasmódio "in vitro" e o desenvolvimento de imunidade protetora, esta associação não ocorre sempre. Tanto em áreas de média (Tosta & Moura, 1986) como de alta (Marsh *et al.* 1989) endemicidade de malária, tornou-se difícil relacionar a freqüência e a atividade destes anticorpos com o grau de imunidade antimalárica.

Anticorpos contra a proteína circunsporozoíta (CSP), a proteína de superfície do esporozoíto, têm mostrado ser protetores. Estão presentes no soro de animais protegidos por vacinação com esporozoítos irradiados e também em indivíduos de áreas hiperendêmicas (Clyde *et al.*, 1973; Nardin *et al.*, 1981). Estes anticorpos podem inibir a motilidade do parasita, facilitar sua eliminação por fagocitose, bloquear a invasão do hepatócito, ou ainda dificultar o desenvolvimento do esporozoíto dentro da célula hepática (Muniz-Junqueira,

1996).

Anticorpos protetores talvez atuem diretamente sobre os parasitas da malária ou sobre as hemácias parasitadas, ou ajam sinergicamente com o sistema complemento ou com células efectoras (monócitos ou neutrófilos) de vários tipos. No papel auxiliar da fagocitose, os anticorpos que apresentam função efetora mais destacada são os anticorpos citofílicos. (Abbas *et al.*, 1994). Para que se possa compreender a atividade citofílica desses anticorpos é imprescindível o entendimento da estrutura básica das imunoglobulinas humanas, como moléculas bifuncionais, constituídas por uma região Fab ou Fragmento ligante do antígeno ("Fragment antigen binding"), responsável pela ligação do antígeno, e uma porção Fc ou fragmento cristalizável, que orienta a atividade biológica da imunoglobulina, promovendo as chamadas funções efectoras, que incluem, a fixação da imunoglobulina a tecidos do hospedeiro, a várias células do sistema imune, a algumas células fagocitárias, e ao primeiro componente (Cq1) do sistema complemento. (Roitt *et al.*, 1997). Sua estrutura básica consiste em 2 cadeias polipeptídicas leves idênticas e 2 cadeias polipeptídicas pesadas idênticas, ligadas entre si por pontes dissulfeto. No homem, a variabilidade nas classes de imunoglobulinas (variação isotípica), se deve às cadeias pesadas, que determinam as classes e subclasses de uma molécula de imunoglobulina.

A imunoglobulina G constitui a principal imunoglobulina do soro, contribuindo para 70-75% do total de imunoglobulinas humanas. Segundo Roitt *et al.*, 1997) as quatro subclasses de imunoglobulinas da classe G humanas, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, ocorrem, aproximadamente, em proporções de 66%, 23%, 7% e 4% respectivamente.

A função primária do anticorpo é se ligar ao antígeno, porém, em poucos casos isso tem efeito direto, sendo necessário que funções “efetoras” secundárias sejam estabelecidas para que a interação antígeno-anticorpo seja efetiva. A ativação da cascata enzimática do sistema complemento é um dos mecanismos efetores mais importantes das moléculas de IgG1 e IgG3. Uma vez ligada ao antígeno, as imunoglobulinas IgM, IgG1, e IgG3 podem ativar a cascata enzimática do sistema complemento. A IgG2 parece ser menos eficiente, enquanto IgG 4, IgA, IgD e IgE são ineficientes (Abbas *et al.*, 1994).

As imunoglobulinas apresentam um poderoso complexo de interações com vários tipos celulares, mediadas por receptores de anticorpos existentes nas superfícies celulares. Os receptores para IgG promovem várias funções efetoras e possuem atividades biológicas que se sobrepõe e que são desencadeadas pela ligação cruzada com a imunoglobulina apropriada. Entre as principais atividades destacam-se: a fagocitose, a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), a liberação de mediadores e o favorecimento da apresentação do antígeno (Abbas *et al.*, 1994).

Spielgelberg (1974) refere que, uma das muitas funções secundárias das imunoglobulinas, sua propriedade citofílica, ou a habilidade de se ligar a receptores celulares, passou a ser neste período, objeto constante de investigação para diversos patógenos, apesar de já se conhecer esta ação desde 1960, a partir de trabalhos de Boyden e Sorkin. Os estudos ganharam novos estímulos a partir da demonstração de que anticorpos IgE, quando ligados a basófilos e mastócitos promovem sua desgranulação após contato com antígeno, levando a inúmeros estudos de interação entre anticorpos e diferentes tipos de célula. Os dados sugeriam que leucócitos humanos têm receptores de membrana que reagem

especificamente com a fração Fc de certas imunoglobulinas.

Assim, mais recentemente, passaram a ser reconhecidos três grupos de receptores para IgG humana nas superfícies celulares: Fc γ RI (CD64), de distribuição restrita; Fc γ RII (CD32), que se encontra amplamente distribuído nas células e freqüentemente é o único receptor expressado; e o Fc γ RIII (CD16), extremamente glicosilado, expressa-se em macrófagos, células NK e em algumas células T. Esses receptores parecem estar distribuídos aleatoriamente na superfície celular e normalmente são ocupados pelos anticorpos citofílicos, assim chamados por apresentarem afinidade específica por leucócitos humanos. (Abbas *et al.*, 1994)

No homem, monócitos apresentam receptores para IgG1 e IgG3, mas não os possuem para IgG2 e IgG4. Receptores para IgG1 e IgG3 humanas já foram detectados também em neutrófilos (Messner & Jelinek, 1973).

Segundo Abbas *et al.* (1994), tanto os fagócitos mononucleares e granulócitos têm habilidade para ingerir partículas, funcionando como um prelúdio para morte intracelular e degradação destas partículas. A eficiência do processo de fagocitose é marcadamente melhorada se a membrana da célula fagocitária pode atacar com especificidade o objeto que necessita ser fagocitado.

Quando a molécula de IgG se liga e recobre partículas antigênicas, o processo é chamado opsonização; a IgG ligada é reconhecida através dos receptores Fc γ R existentes na superfície dos leucócitos, servindo como incrementadoras da fagocitose. Ambas, afinidades altas e baixas dos receptores Fc γ R, contribuem para fagocitose e os subtipos de IgG que melhor se ligam a estes receptores são IgG1 e IgG3, e por isso são chamadas anticorpos citofílicos.

1.2.4 Anticorpos citofílicos e malária

Recentemente, muita importância tem sido dada às classes e subclasses de imunoglobulinas, contra extratos de diversos agentes infecciosos, incluindo diversas infecções parasitárias, tais como toxoplasmose, leishmanioses, filarioses, amebíase, e malária (Kwan-Lim *et al.*, 1990; Kollaritsch *et al.*, 1990; El Assad *et al.*, 1994; Aribot *et al.*, 1996)

Na esquistossomose mansônica, por exemplo, Khalife *et al.* (1989), demonstraram o efeito mortal dos anticorpos das subclasses IgG1 e IgG3, para esquistossômulos de *S.mansoni*, em crianças. Kwan-Lim *et al.* (1990) demonstraram que na resposta imune humoral contra filárias em Papua Nova Guiné, a fração IgG4 desempenha papel importante nas alterações do estado infeccioso, predominando na população não exposta à infecção, podendo funcionar como um marcador soroepidemiológico das infecções por *Wuchereria bancrofti*.

Em malária de primatas não humanos há amplas evidências de que anticorpos antimaláricos podem mudar o curso da infecção nestes animais (Gysin *et al.*, 1980). No homem, muitos estudos têm sido esclarecedores, porém persistem dúvidas acerca do verdadeiro papel desempenhado por estes anticorpos na imunidade à malária.

Em 1961 já se estudava a interferência de imunoglobulinas purificadas, transferidas passivamente de adultos procedentes de áreas endêmicas, sobre o crescimento de formas assexuadas de *P.falciparum* e *P.malariae* em crianças (Cohen *et al.*, 1961). A esta época (1961), foram propostas duas hipóteses para explicar a função dos anticorpos protetores: 1) Os anticorpos se ligariam à

superfície do merozoíto e bloqueariam a invasão dos eritrócitos (McGregor *et al.*, 1963; Miller *et al.*, 1977); 2) Os anticorpos facilitariam a fagocitose (opsonização) dos eritrócitos infectados e/ou merozoítos, os quais seriam subsequentemente fagocitados por monócitos e macrófagos (Shear, *et al.* 1979; Hunter, *et al.*, 1979).

A segunda hipótese, que enfatizava o envolvimento de sistema fagocítico mononuclear, foi reforçada por duas evidências. Uma delas, observada clinicamente em humanos, onde 70 a 80% dos pacientes com malária aguda apresentam esplenomegalia, e 50% apresenta hepatomegalia (Neva *et al.*, 1970). A outra é a evidência histológica de intensa hiperplasia do sistema fagocítico-monocitário hepático e esplênico que ocorre na doença (Tosta *et al.*, 1983). A partir daí, inúmeros estudos "in vitro" evidenciaram a cooperação existente entre monócitos e anticorpos nas defesas humanas antiplasmodiais.

Chow e Kreier (1972) demonstraram este efeito cooperativo na imunidade de ratos contra o *P.berghei*. Seus resultados indicaram que a combinação de macrófagos imunes com soro imune é mais efetiva na fagocitose de parasitas que estes componentes isolados, e que os macrófagos interagem diferentemente com parasitas isolados de diferentes fases da infecção. Os macrófagos imunes são hábeis na ingestão de parasitas isolados, tanto nos estágios precoce, quanto nos estágios tardios da infecção. Ao contrário, os macrófagos normais (sem o auxílio do soro imune) são capazes de ingerir apenas os parasitas isolados dos estágios precoces da infecção. O soro imune portanto, aumenta a capacidade fagocítica de ambos os macrófagos, imunes e normais.

Em 1978 Green & Kreier, demonstraram o papel dos anticorpos citofílicos na resistência aos parasitas de malária de ratos. Em seguida a inúmeras demonstrações em malária de roedores, acreditou-se também em uma função

protetora potencial destes anticorpos contra os estágios eritrocíticos do *P.falciparum*, tanto em modelos animais (Brown *et al.*, 1970; Groux *et al.*, 1990), como em humanos, com evidências de predominância das subclasses citofílicas em indivíduos imunes. Em humanos, Groux & Gysin (1990) encontraram as quatro subclasses de IgG no soro de indivíduos considerados imunes. Estes anticorpos foram purificados a partir dos soros, e todas as frações se ligavam à superfície do eritrócito infectado, porém somente IgG1 e IgG3 foram hábeis em mediar a opsonização. IgG2 e IgG4 não o fizeram e, contrariamente, inibiram a ação opsonizante de IgG1 e IgG3.

Khusmith e Druilhe estudaram por pelo menos 10 anos a cooperação entre anticorpos e células na defesa contra o *P.falciparum*, ressaltando que praticamente todos os estudos foram feitos com *P.falciparum* devido à facilidade de seu cultivo "in vitro", que torna seus antígenos acessíveis e propicia os ensaios de proliferação celular. Em um de seus primeiros ensaios, Khusmith & Druilhe (1983), avaliaram "in vitro" a ligação entre anticorpos antimaláricos e monócitos do sangue periférico, e a habilidade destes monócitos "armados" de atacar e ingerir merozoítos de *P.falciparum*, esquizontes e eritrócitos infectados. Para isto, foram utilizados monócitos de indivíduos normais (insensíveis) que foram pré-incubados com soro de indivíduos portadores de vários estágios imunes à malária e soro de indivíduos normais (controle). Os monócitos de indivíduos hiperimunes foram significativamente mais eficientes na ingestão de merozoítos, que aqueles obtidos de indivíduos não imunes, observando-se assim, marcada diferença nos níveis de fagocitose de merozoítos, dependendo do estágio imune do soro. Não houve diferença nos níveis (quantidades) de anticorpos mensurados por imunofluorescência ou precipitação. Os dados sugeriram que: 1) Os merozoítos,

mais do que os eritrócitos infectados eram os principais alvos dos fagócitos mononucleares na malária por *P.falciparum* humana; 2) A fagocitose de merozoítos por monócitos do sangue periférico aumenta dependendo do nível de imunidade específica. As imunoglobulinas retiradas da pré-incubação com monócitos foram hábeis em se ligar aos parasitas, conforme visto por testes de imunofluorescência, sugerindo que a fagocitose parecia ser mediada por imunoglobulinas da classe G. Os resultados mostram a capacidade de monócitos humanos de se "armarem" com IgG citofílica com especificidade antimalárica e obterem um efeito maior no desaparecimento de parasitas livres, mas não sobre os esquizontes. Esta foi a primeira demonstração de que merozoítos de *P.falciparum* foram mais eficazmente fagocitados por macrófagos, com o auxílio de anticorpos (Khusmith & Druilhe, 1983). Os mesmos autores, utilizando células infectadas de primatas não humanos (Khusmith & Druilhe, 1982), e outros ensaios utilizando diversas células fagocitárias, tais como polimorfonucleares (Celada *et al.*, 1983), relataram achados muito semelhantes.

Neste contexto, várias demonstrações foram feitas evidenciando que o efeito cooperativo monócito/anticorpos é mediado por imunoglobulinas G citofílicas antimerozoíticas (Khusmith & Druilhe, 1983).

Os estudos feitos inicialmente sugeriram que a quantidade de anticorpos produzidos por indivíduos imunes não era preditiva em termos de proteção (Druilhe & Khusmith, 1987; Marsh *et al.*, 1989).

Alguns indivíduos, mesmo apresentando altos títulos de anticorpos antimaláricos, desenvolvem parasitemia acompanhada de sintomas. Os anticorpos de indivíduos não protegidos são incapazes de cooperar "in vitro" com monócitos. Por outro lado, anticorpos de indivíduos que têm alguma proteção não são

quantitativamente mais abundantes, mas conferem proteção quando transferidos passivamente, e “in vitro” promovem o mecanismo de inibição celular do crescimento parasitário dependente de anticorpos (ADCI ou “antibody-dependent cellular inhibition of parasite growth”).

Bouharoun-Tayoun *et al.* (1990), demonstraram definitivamente o papel da ADCI na proteção imune à malária, mostrando que IgGs isoladas de pacientes imunes, quando utilizadas isoladamente nos ensaios de inibição celular, paradoxalmente aumentavam o crescimento parasitário. Da mesma forma, monócitos de indivíduos imunes quando utilizados isoladamente não inibem o crescimento parasitário. Entretanto, quando se une IgG imune e monócito imune, ocorre forte inibição do crescimento parasitário.

Nos ensaios em laboratório, IgG de indivíduos “protegidos” cooperam eficientemente com monócitos sangüíneos, enquanto que IgG de indivíduos não protegidos não conseguem fazê-lo. A ADCI é portanto, não somente um ensaio “in vitro” que detecta anticorpos protetores, mas também um eficiente mecanismo “in vivo” de defesa contra parasitas de malária (Pérignon & Druilhe, 1994).

Desde que ADCI se realiza somente com anticorpos citofílicos e monócitos é interessante entender detalhadamente a distribuição das classe e subclasses de IgG e anticorpos diretos contra *P.falciparum*, no soro de indivíduos com estados definidos de resistência ou suscetibilidade à malária. A partir desta hipótese, vários estudos de comparação entre populações intensamente expostas à transmissão de malária (consideradas semi-imunes) e populações não expostas (não imunes), foram realizados, na tentativa de estabelecer o padrão de classes e subclasses de imunoglobulinas presentes nestes indivíduos. (Boharoun-Tayoun & Druilhe, 1992[a]; Aribot *et al.* 1996; Ferreira *et al.*, 1996).

Bouharoun-Tayoun & Druilhe (1992[a]) investigaram indivíduos com estados clínicos definidos de resistência ou suscetibilidade à malária, e encontraram profundas diferenças na distribuição das imunoglobulinas, nos quais IgG1 e IgG3 (subclasses citofílicas) predominaram naqueles indivíduos considerados protegidos. Os indivíduos considerados não protegidos (crianças e adultos com ataques primários recentes) apresentaram basicamente 3 diferentes tipos de respostas: 1) IgG2 (subclasse não citofílica) predominando em indivíduos adultos que sofreram ataques primários; 2) Predomínio de IgM (classe não citofílica), em crianças; 3) Menos frequentemente, encontraram baixo nível geral de anticorpos antimaláricos.

A maioria dos estudos de resposta imune humoral, feitos em populações da África (região holoendêmica) comparando-as com populações não expostas ao risco de malária, demonstram uma clara predominância de anticorpos citofílicos, classe IgG e subclasses 1 e 3, em indivíduos expostos intensamente à transmissão, e contrariamente, anticorpos não citofílicos predominando em indivíduos não imunes. Assim, a aquisição de proteção em malária, pelo menos nos contextos epidemiológicos acima referidos, parece estar relacionada com a habilidade em desenvolver maiores níveis de anticorpos IgG1 e IgG3, e inibir a produção de anticorpos IgG2 (Druilhe & Boharoun-Tayoun, 1991).

Os estudos feitos em populações brasileiras apresentam achados diversos, alguns concordando com os estudos anteriores e outros apresentando algumas discordâncias. Ferreira *et al.* (1994) por exemplo, estudaram pacientes portadores de malária em uma comunidade rural de Rondônia, constituída basicamente por imigrantes procedentes das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Neste grupo houve predominância de anticorpos IgG2, reagindo contra exoantígenos de *P.falciparum*,

em contraste com os padrões usualmente encontrados em indivíduos adultos africanos clinicamente imunes. Por outro lado, o contraste existente entre as diferenças de títulos de IgG1 e IgG2 contra antígenos somáticos encontrados nesse estudo, teve significância estatística apenas aproximada do nível desejado ("borderline").

Em outro estudo brasileiro, Ferreira *et al.* (1996), compararam indivíduos africanos clinicamente imunes e pacientes da Amazônia brasileira, com ataques agudos da doença. Seus principais achados evidenciaram: 1) Anticorpos citofílicos de alta avidéz predominando nos indivíduos africanos clinicamente imunes 2) Os pacientes procedentes da Amazônia com malária aguda produziram altos títulos de anticorpos citofílicos, porém de baixa avidéz; 3) Como a resposta é de curta duração, dois meses depois os níveis de anticorpos citofílicos eram significativamente mais baixos.

1.3 JUSTIFICATIVA

Somente a ampla distribuição e incidência de casos de malária por *Plasmodium vivax* em nosso meio, predominando em 60 a 70% dos casos registrados na Amazônia Legal (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1997), e o número crescente, porém não quantificado até o momento, da infecção malárica em crianças, já justificariam suficientemente os estudos relacionados à malária por *Plasmodium vivax* em crianças da Amazônia brasileira. Além disso, nunca, em nenhum momento da história do combate mundial a esta endemia, investiu-se e acreditou-se tanto em pesquisa vacinal antimalárica como nos últimos anos, em decorrência dos próprios avanços que a pesquisa científica obteve nas áreas de

imunologia e biologia molecular.

A procura de metodologias desenvolvidas para a análise da eficácia das vacinas, exige estudos de padrões de resposta imune à malária, apesar de toda a dificuldade encontrada neste sentido, conseqüência das diferenças existentes nos padrões de transmissão da doença nas áreas endêmicas e da complexidade estrutural aliada a capacidade excepcional dos plasmódios de desenvolverem mecanismos de escape às defesas humanas antiplasmodiais.

O presente estudo foi idealizado, a fim de demonstrar o comportamento dos anticorpos do tipo IgG totais e subclasses citofílicas anti-*P.vivax* em crianças portadoras de malária por *P.vivax*, em acompanhamento ambulatorial durante e após o tratamento, sugerindo respostas semelhantes àquelas desenvolvidas contra o *P.falciparum*, de forma a subsidiar os estudos dos padrões de resposta imune humoral à malária, com ênfase na inibição celular dependente de anticorpos.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivos gerais

- Avaliar a freqüência e níveis de anticorpos da classe IgG e subclasses (IgG1, IgG2 e IgG3) em crianças de 0 a 15 anos, portadoras de malária por *P.vivax*, atendidas ambulatorialmente, e tratadas com o esquema terapêutico padrão, durante o ataque agudo da doença (primeiro dia de tratamento), e o seguimento que se convencionou chamar controle de cura.

1.4.2 Objetivos específicos

- Correlacionar níveis de anticorpos classe IgG, com tempo de doença e parasitemia assexuada, entre crianças priminfetadas e crianças com história de ataques maláricos anteriores.
- Correlacionar graus de imunidade clínica, isto é, presença de sintomas e/ou sinais indicativos de maior gravidade, às subclasses de imunoglobulinas predominantes, com ênfase na hepatoesplenomegalia.
- Comparar as respostas de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 durante o ataque agudo e em fase de controle de cura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÃO E ÁREA DE ESTUDO

Foram estudadas um total de 34 crianças entre 0 a 15 anos de idade, portadoras de malária por *P. vivax*, diagnosticadas pelo método da gota espessa, procedentes da demanda espontânea do ambulatório do Programa de Malária do Instituto Evandro Chagas (APM/IEC), avaliadas em 2 momentos:

- a) Durante a fase aguda (D0 - dia zero), aqui distribuídas em dois grupos:
 - Priminfectadas
 - Crianças com história anterior de malária (mais de 1 episódio anterior ao atual)
- b) Durante o controle de cura (crianças tratadas): correspondente aos dias: D7 (dia 7), D60 (dia sessenta), D120 (dia cento e vinte), e D180 (dia cento e oitenta)

O estudo foi realizado no APM/IEC, situado em Belém, estado do Pará, que funciona como Posto de Notificação (PN) da Fundação Nacional de Saúde recebendo em média quatro a cinco casos novos de malária por dia, ou cerca de 120 a 150 casos ao mês, e constituindo a referência ambulatorial para o atendimento de malária na nossa região. Entre os casos atendidos, cerca de 80% dos casos são de malária por *P. vivax*, de diversas procedências e 30% corresponde a faixa etária pretendida para o estudo.

Os casos, são provenientes não só do estado do Pará, mas também de outros estados, entre eles, principalmente, Maranhão, Amazonas e Amapá. Dentro do Pará, o maior índice de procedência inclui: a cidade de Belém, área metropolitana (Belém e Ananindeua), e distritos: vila de Icoaraci, Ilha de Cotijuba, e vila de Mosqueiro), municípios vizinhos: Marituba e Benevides, além de

municípios relativamente distantes: Acará, Altamira, Breves, Ipixuna Moju, Paragominas, Vizeu. Os pacientes do estado do Maranhão são provenientes principalmente das cidades que fazem fronteira com o Pará.

2.2 DEFINIÇÕES E CRITÉRIOS

2.2.1 Aspectos éticos

Os responsáveis foram esclarecidos previamente de todo o processo de participação no projeto, através de uma carta de esclarecimento e orientação, sendo obrigatória a assinatura do termo de participação em anexo (Anexo 1)

2.2.2 Elegibilidade

- Idade entre 0 a 15 anos;
- Portadores de malária por *P.vivax*, diagnosticados pelo método da gota espessa, corada pela técnica de Walker, com quaisquer níveis de parasitemia.
- Disponibilidade em participar do estudo, através de aceitação do responsável.

2.2.3 Critérios de exclusão

- Adolescentes gestantes ou lactantes
- Recusa do responsável, ou da própria criança (nos casos de escolares e adolescentes que manifestem vontade própria), em participar do estudo.
- Impossibilidade de permanência em Belém pelo período necessário ao acompanhamento clínico-evolutivo e sorológico.
- Pacientes que tenham feito tratamento antimalárico anterior há menos de 60 dias.

2.2.4 Definições

Caso de malária: Paciente portador de malária vivax, diagnosticado por gota espessa, com quaisquer níveis de parasitemia, priminfestado ou não.

Priminfestado: Paciente que nunca apresentou sintomas e/ou parasitas de malária no sangue periférico, evidenciados por exame laboratorial e/ou referência de malária anterior pelo responsável.

Criança com história anterior de malária: Aquela que apresenta referência de 1 ou mais episódios de malária, antecedendo o episódio atual.

Clínica de malária: Tríade principal de febre, calafrios e cefaléia.

Tempo de doença: Tempo decorrido entre a data do aparecimento do primeiro sintoma e data do primeiro atendimento no ambulatório.

Grupos etários: Estudados a partir das definições existentes de delimitações etárias em áreas endêmicas de malária:

- 0 a 6 meses de idade exclusive
- 6 meses a 2 anos exclusive
- 2 anos a 7 anos exclusive
- Acima de 7 anos inclusive

2.3 DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

2.3.1 Coleta de dados

a) Dados epidemiológicos e clínicos

Feita sob a forma de entrevista, através de questionários (Anexo 2), aplicados por entrevistadores. Os dados foram coletados na chegada do paciente (virgens de tratamento, portanto), ou seja no dia zero (ou D0, que corresponde ao

1º dia de tratamento), em D1, D2, D3, D4, e assim sucessivamente até a negatificação da parasitemia em 2 (duas) lâminas consecutivas, e ainda em D7 e D14.

As variáveis clínicas verificadas foram: presença de sintomas clínicos, incluindo a tríade malárica, dor abdominal, diarreia, prurido, artralgias, astenia, anorexia e tosse. Além de sinais, como vômitos, colúria, icterícia e hepatoesplenomegalia.

O exame clínico constou de anamnese e exame físico geral simplificado, com verificação de pressão arterial, temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e palpação abdominal, em D0, D1, D7 e D14. O exame clínico e físico simplificado, sem verificação de sinais vitais foi feito nos dias 1, 2, 3 e enquanto permanecessem sintomas importantes e/ou parasitemia, e ainda em D7 e D14. Nos dias não incluídos aqui (controle de cura) o exame clínico e físico foi direcionado para a referência (queixa principal) do paciente.

O acompanhamento clínico-evolutivo de cada caso foi realizado diariamente até que o exame direto de gota espessa mostrasse, pelo menos, 2 (dois) resultados negativos, durante o acompanhamento do tratamento (D0 a D7) e em todos os retornos de controle de cura, que foram feitos rotineiramente obedecendo critérios da Fundação Nacional de Saúde (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

b) Dados laboratoriais

b.1) Quantificação de parasitas no sangue periférico

Foi avaliada em material coletado nos dias: 0, 1, 2, 3, 4 e assim sucessivamente, até que se obtivesse 2 (dois) exames negativos consecutivos e

ainda nos dias 7 e 14. Os exames foram processados pelo método da gota espessa, conforme descrição:

Após assepsia adequada, sangue total foi obtido por punção digital, com microlanceta descartável, sendo a primeira gota de sangue desprezada e colhida a gota seguinte, equivalente a cerca de 30 μ l de sangue, que então foi distribuído em lâmina seca numa superfície de aproximadamente 1 cm³. Procedeu-se a identificação da mesma (nome completo do paciente) com posterior secagem a 37° C para realização das etapas de coloração (técnica de Walker) e leitura.

Conforme preconiza a técnica de Walker a desmembramento foi obtida pela imersão da lâmina em solução de azul de metileno fosfatada. Em seguida, a lâmina foi lavada com solução tamponada para retirada do excesso da solução anterior. O corante de Giemsa foi então distribuído na superfície da lâmina contendo o material. Após intervalo de tempo de 20 minutos a lâmina foi imersa em solução fosfatada, e em seguida secada para leitura em microscópio óptico para ser lida com objetiva de imersão.

A contagem dos parasitas foi feita percorrendo-se 100 campos microscópicos (correspondente 0,2 mm³ de sangue). Então, multiplicou-se o número de parasitas visualizados nos referidos campos, por um valor numérico constante (5 - cinco), obtendo-se desta forma um resultado que expressa a média de parasitas/ mm³ de sangue (Antuñano, 1988).

Os controles de cura foram realizados pelo método da gota espessa, nos dias 30, 60, 90, 120, 150 e 180 após início do tratamento, conforme preconizam os Programas de Controle de Malária da Fundação Nacional de Saúde/Ministério da Saúde (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

b.2) Testes sorológicos

Cerca de 3ml de sangue foram coletados para realização dos testes sorológicos. Para detecção de anticorpos IgG anti-*P. vivax* (IgG anti-PV), as coletas eram feitas na chegada do paciente, portanto antes do início do tratamento, considerado dia zero (D0), e posteriormente aos sete dias após o início do tratamento (D7), aos sessenta dias (D60), aos cento e vinte dias (D120), e finalmente, aos cento e oitenta dias (D180) após o início do tratamento. Para detecção de anticorpos subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 anti-PV, foram utilizadas apenas duas destas mesmas coletas, sendo a primeira referente a D0 e a segunda escolhida entre as coletas posteriores (D60 ou D120 ou D180) correspondentes a diferentes fases do período de controle de cura.

O material foi imediatamente processado por centrifugação para obtenção do soro e armazenado em 3 (três) alíquotas glicerinadas (1:1) de 1ml e guardadas em freezer à -70 °.

b.2.1) Detecção de anticorpos anti-plasmodiais classe IgG anti-PV pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI)

Os soros foram testados para pesquisa de anticorpos antiplasmodiais para anti-PV.

Obtenção dos antígenos para detecção de anticorpos totais

Plasmodium vivax foi obtido a partir de sangue de pacientes primoinfectados, não tratados com infecção recente e imediatamente processado para preparação de lâminas (cepa 435/Pv).

Preparação das lâminas de *P. vivax*

Após a determinação do número de hemácias parasitadas por campo, o sedimento foi lavado e suspenso em solução salina tamponada com fosfatos (Phosphate Buffer Saline – PBS, preparada conforme Anexo 3) e a diluição ótima do antígeno foi calculada pela fórmula $VD = (2,5 \times N) - 1$, onde VD é o volume de PBS para diluição do sedimento de hemácias e N é o número médio de hemácias parasitadas com esquizontes por campo microscópico. A suspensão obtida foi imediatamente depositada sobre áreas demarcadas nas lâminas de vidro próprias para IFI (20 μ l/área) e aspiradas, formando uma fina camada de hemácias. Após secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram armazenadas, uma a uma com papel absorvente, e em grupos de 10 com papel alumínio, seladas com plástico, e conservadas a -70° C. Para realização dos exames foram colocadas em dessecador contendo sílica-gel, por 30 minutos, à fim de que atingissem a temperatura ambiente.

Escolha dos soros padrões

Para padrão positivo foi selecionado um painel de oito (8) soros com títulos iguais ou acima de 320 e soros com títulos menores que 320, exclusive, obtidos a partir de pacientes com infecção atual pelo *P. vivax* confirmado pelo exame parasitológico. Para padrão negativo foi selecionado um painel de soros não reagentes obtidos a partir de indivíduos não infectados, clínica e parasitologicamente examinados, sem história de exposição anterior à malária.

Conjugados

Foram utilizados os conjugados fluorescentes líquidos produzidos pela BIOLAB, Fluoline G (anti γ), globulina de carneiro anti IgG humano marcada pelo isotiocianato de fluoresceína (Código 022.009), com suas titulações ótimas identificadas em 1:200, após titulação em bloco.

Desenvolvimento da técnica

As lâminas fixadas com o antígeno foram retiradas do freezer e colocadas a 37° C para descongelar e secar. Após secagem foram fixadas com acetona por 2 minutos e lavadas com PBS poço por poço. Alíquotas de 10 μ l dos soros diluídos (1/20 a 1/20480) foram adicionadas a cada poço da lâmina conforme esquema prévio. As lâminas foram então incubadas a 37° C por 30 minutos em câmara úmida. Após a incubação, foram submetidas a três lavagens de 5 minutos cada, com PBS. O conjugado foi diluído a 1:200 em solução de Azul de Evans a 1% e adicionado às lâminas na quantidade de 10 μ l por poço. Após nova incubação em câmara úmida durante 30 minutos a 37° C, as lâminas foram submetidas a nova lavagem de 5 minutos com PBS por 3 vezes. Após secagem foram montadas com glicerina tamponada (0,5 M Na_2CO_3 e Na_2HCO_3) e lidas em microscópio de imunofluorescência, com objetiva de 40 X e ocular de 10X.

Os soros foram diluídos em série, a partir da diluição de 1:20. Foram considerados positivos todos os soros com fluorescência igual ou maior àquela apresentada pelo controle positivo, a partir da diluição de 1:40, em conformidade com estudos de sensibilidade e especificidade da técnica desenvolvidos por outros autores (Sulzer *et al.*, 1969). A gradação em cruces foi feita comparando-se os soros testados com os controles positivo e negativo.

b.2.2 Detecção dos anticorpos antiplasmodiais subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 anti-PV, pela técnica de IFI.

A obtenção dos antígenos foi feita da mesma forma que aquela realizada para anticorpos totais.

Soros padrões

Em virtude da dificuldade de obtenção de soros padrões positivos para as frações de IgG específicas para *P. vivax*, sua escolha foi feita da seguinte forma: uma amostra de oito soros de pacientes conhecidamente positivos para *P. vivax*, contendo títulos de anticorpos antiplasmodiais totais do tipo IgG, elevados (títulos variando entre 1280 a 20840), detectados por técnicas de IFI e ELISA (Enzimatic Linked Imunosorbent Assay) foi escolhida. Estes soros foram então testados em duas diluições (1:40 e 1:80) para as três subclasses de IgG, evidenciando-se títulos positivos para IgG1 e IgG3. Não foram encontrados títulos de IgG2 nesta amostra. Posteriormente foram testados outros soros de indivíduos conhecidamente positivos, na tentativa de encontrar um padrão para IgG2, porém sem sucesso. Desta forma, utilizou-se como padrão positivo de IgG2 um soro conhecidamente positivo para IgG2 porém obtido de paciente infectado por *P. falciparum*.

Conjugados

Foram utilizados os conjugados específicos: Monoclonal Anti-Human IgG1, IgG2 e IgG3 FITC Conjugate, clones 8c/6-39, HP-6014, HP-6050 respectivamente, da SIGMA Chemical Co. (Lotes: 086H4812, 095H4825 e 068TF48741). Estes conjugados foram avaliados em trabalhos anteriores, quanto a sua especificidade,

b.2.2 Detecção dos anticorpos antiplasmodiais subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 anti-PV, pela técnica de IFI.

A obtenção dos antígenos foi feita da mesma forma que aquela realizada para anticorpos totais.

Soros padrões

Em virtude da dificuldade de obtenção de soros padrões positivos para as frações de IgG específicas para *P.vivax*, sua escolha foi feita da seguinte forma: uma amostra de oito soros de pacientes conhecidamente positivos para *P.vivax*, contendo títulos de anticorpos antiplasmodiais totais do tipo IgG, elevados (títulos variando entre 1280 a 20840), detectados por técnicas de IFI e ELISA (Enzimatic Linked Imunosorbent Assay) foi escolhida. Estes soros foram então testados em duas diluições (1:40 e 1:80) para as três subclasses de IgG, evidenciando-se títulos positivos para IgG1 e IgG3. Não foram encontrados títulos de IgG2 nesta amostra. Posteriormente foram testados outros soros de indivíduos conhecidamente positivos, na tentativa de encontrar um padrão para IgG2, porém sem sucesso. Desta forma, utilizou-se como padrão positivo de IgG2 um soro conhecidamente positivo para IgG2 porém obtido de paciente infectado por *P.falciparum*.

Conjugados

Foram utilizados os conjugados específicos: Monoclonal Anti-Human IgG1, IgG2 e IgG3 FITC Conjugate, clones 8c/6-39, HP-6014, HP-6050 respectivamente, da SIGMA Chemical Co. (Lotes: 086H4812, 095H4825 e 068TF48741). Estes conjugados foram avaliados em trabalhos anteriores, quanto a sua especificidade,

usando uma grande variedade de técnicas imunológicas em estudos colaborativos desenvolvidos pela International Union of Immunological Societies (IUIS) e World Health Organization (Jeffferis *et al.*, 1985).

A titulação dos conjugados foi feita a partir dos soros positivos e negativos previamente encontrados, nas seguintes etapas:

Etapa 1: O conjugado foi diluído em quatro diferentes diluições, utilizando como base a diluição sugerida pelo fabricante. A Tabela 1 mostra as diluições sugeridas pelo fabricante, e as diluições que foram testadas.

Tabela 1 - Diluições dos conjugados monoclonais específicos para anticorpos IgG, frações IgG1, IgG2, e IgG3, sugeridas pelo fabricante e diluições que foram testadas, para fins de titulação dos conjugados.

Conjugado monoclonal	Diluições sugeridas	Diluições testadas
Anti-humano	Pelo fabricante	
IgG1	1:64	1:16, 1:32, 1:64, 1:128
IgG2	1:8	1:8, 1:16, 1:32, 1:64
IgG3	1:8 a 1:16	1:8, 1:16, 1:32, 1:64

Etapa 2: Para controles negativos foram utilizados quatro soros padrões negativos em diluição 1:40

Etapa 3: Os soros padrões, cujos títulos das frações IgG1, IgG2 e IgG3 foram obtidos na etapa 1, foram testados com as diluições dos conjugados mostradas na Tabela 1. Obteve-se assim, uma curva de titulação e determinou-se a melhor diluição para os conjugados:

Conjugado monoclonal anti-humano IgG1: 1:64

Conjugado monoclonal anti-humano IgG2: 1:8

Conjugado monoclonal anti-humano IgG3: 1:32

Desenvolvimento da técnica

Desenvolvida da mesma forma descrita para anticorpos totais, acrescida de uma etapa inicial, onde os soros foram submetidos a três diluições de triagem de 1:20, 1:40 e 1:80. A partir dos resultados iniciais procedeu-se a continuação ou não das diluições para o estabelecimento do títulos finais. Foram considerados positivos todos os soros com fluorescência igual ou maior àquela apresentada pelo controle positivo.

Para efeito de resultado positivo foi estabelecido um ponto de corte de 1:20, devido a alta especificidade dos conjugados monoclonais utilizados, e baseado em estudo longitudinal de acompanhamento do padrão de anticorpos IgG1, IgG2, e IgG3, realizado em comunidades da Região Amazônica. (Ferreira *et al.*, 1994)

2.3.2 Procedimento terapêutico

Os pacientes foram submetidos ao tratamento clássico preconizado pelo Ministério da Saúde (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

Crianças maiores de 1 ano: cloroquina 10 mg/Kg no primeiro dia, 7,5 mg/Kg no

segundo dia e 7,5 mg/Kg no terceiro dia + primaquina 0,25 mg/Kg/dia durante 14 dias.

Crianças menores de 1 ano: cloroquina 10 mg/Kg no primeiro dia, 7,5 mg/Kg no segundo dia e 7,5 mg/Kg no terceiro (dose total de 25mg/Kg).

2.3.3 Processamento dos dados e procedimentos estatísticos

A digitação e sistematização das informações foram realizadas em banco de dados próprio, produzido em microcomputador e programa de análise de dados epidemiológicos: EPI-INFO, versão 6.04.

Foi feita a descrição dos títulos de anticorpos totais e frações, além de dados individuais dos pacientes. Os títulos de anticorpos totais no primeiro dia de tratamento (D0) foi descrita nos grupos etários estudados.

A média geométrica dos títulos de anticorpos classe G anti-PV (MGTAG) em D0 foi calculada, utilizando-se os títulos de anticorpos positivos e negativos, tanto no grupo total, quanto nos subgrupos de priminfetados e pacientes com história de malária anterior.

A média geométrica da densidade parasitária (MGDP) foi calculada com um intervalo de confiança de 95%, através dos níveis de parasitemia dos pacientes (positivas e negativas), tendo sido avaliada em D0, D1, D2, D3 e D4 para observação do desaparecimento dos parasitas do sangue periférico.

A média geométrica dos títulos de anticorpos subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 anti-PV (MGTS), foi calculada através dos títulos de anticorpos positivos e negativos.

As médias dos títulos de anticorpos totais anti-PV foram descritos nos

diferentes grupos etários.

Dados clínicos foram avaliados conforme presença ou ausência de sintomas e sinais descritos para cada subgrupo. A esplenomegalia foi correlacionada com títulos de anticorpos totais anti-PV.

O tempo de doença foi correlacionado com níveis de parasitemia e níveis de anticorpos totais em D0, à fim de verificar possíveis diferenças devidas ao tempo decorrido entre início dos sintomas e coleta do soro, tanto no grupo total, como nos subgrupos de priminfetados e pacientes com história de malária anterior.

As MGTAG dos dias 0 e 7 foram comparadas, no grupo total e subgrupos, à fim de estabelecer diferenças destes níveis, entre indivíduos priminfetados e indivíduos com história de malária anterior. Esta comparação foi feita através do teste t de Student para amostras pareadas, com transformação dos valores absolutos dos títulos em valores logaritmos.

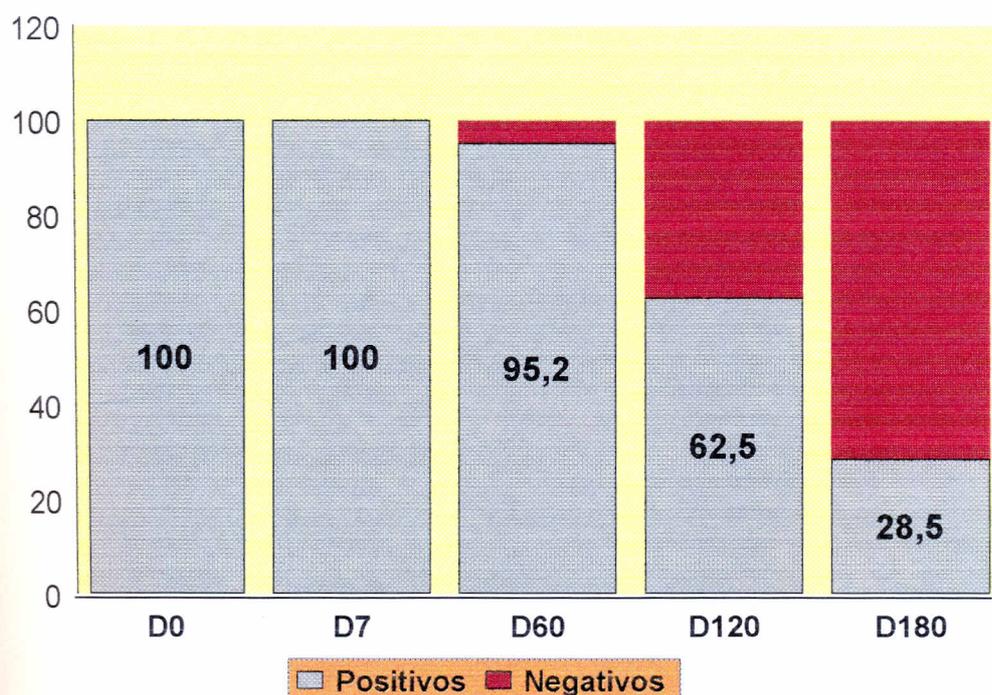
As correlações entre níveis de anticorpos totais e parasitemia e/ou tempo de doença, foram calculadas pelo coeficiente de correlação de Spearman, com nível α de 0,05.

A comparação de proporções entre indivíduos positivos e negativos para as subclasses de IgG, foi feita através do teste Exato de Fisher.

3 RESULTADOS

Os títulos de anticorpos classe IgG avaliados durante o seguimento mostraram, na maioria dos doentes, aumento entre D0 e D7, com posterior declínio gradativo. A freqüência de indivíduos positivos e negativos durante o acompanhamento pode ser visto na Figura 1, onde observa-se, que em D0 e D7 todos os pacientes apresentavam títulos positivos (100%). Em D60, 95,2% dos doentes ainda apresentavam títulos positivos, variando entre 40 a 2560. Em D120, 62,5% persistiam com títulos positivos, variando entre 40 e 320, e finalmente em D180 somente 28,5% dos pacientes apresentavam títulos, variando entre 40 a 160.

Figura 1 – Freqüência (%) de resposta positivas de anticorpos da classe IgG anti-*P.vivax*, na fase aguda e controle de cura de 34 pacientes. APMIEC, Belém/PA. 1997.



Vinte e oito pacientes eram primoinfectados, e apenas 6 apresentavam história de malária anterior. Encontram-se descritos na Tabela 2, o número de ataques maláricos anteriores; a espécie de plasmódio envolvida no episódio anterior; os títulos de anticorpos classe IgG anti-*P.vivax* referentes ao primeiro dia de tratamento, além de outros dados epidemiológicos de importância.

Tabela 2 – Idade, sexo, passado malárico, número de episódios anteriores de malária, espécie de plasmódio envolvida no episódio anterior, e títulos de anticorpos IgG anti-*P. vivax*, em D0 de 34 pacientes. APM/IEC, Belém/PA. 1997.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Passado malárico (nº de ataques)	Tipo de malária anterior	Tempo de Doença	Títulos de anticorpos anti- <i>P. vivax</i> em D0
1	11	F	0		14	10240
2	13	M	0		14	10240
3	6	F	0		2	160
4	13	F	0		10	1280
5	11	M	0		5	80
6	10	F	2	Falciparum	5	2560
7	6	M	0		124	640
8	5	M	0		27	2560
9	12	F	0		30	5120
10	5	M	0		9	10240
11	8	M	0		5	1280
12	11	F	0		1	80
13	0,12	M	0		7	640
14	14	M	0		2	1280
15	4	F	1	Vivax	3	1280
16	3	F	1	Vivax	3	2560
17	10	M	0		2	10240
18	9	F	0		29	10240
19	14	F	0		4	1280
20	0,9	F	0		3	40
21	8	F	0		18	2560
22	12	M	0		18	10240
23	13	M	0		7	160
24	13	F	0		3	320
25	12	M	0		8	10240
26	7	F	0		13	320
27	5	M	0		13	2560
28	7	M	0		4	640
29	9	F	1	Vivax	4	10240
30	13	F	0		7	5120
31	5	F	0		9	640
32	4	M	1	Vivax	6	640
33	1	F	0		22	1280
34	12	M	1	Vivax	27	640

Fonte: Dados primários

3.1 Determinação dos títulos de anticorpos classe IgG durante a fase aguda e controle de cura.

As médias geométricas dos títulos de anticorpos classe G (MGTAG) durante a fase aguda e o controle de cura, podem ser vistas na Tabela 3. Observa-se uma elevação significativa de títulos em D7, e posterior queda progressiva durante o controle de cura. As coletas feitas aos 60 dias após tratamento mostraram diminuição significativa de títulos, e as coletas feitas após 120 dias ou mais, mostraram, em sua maioria, a negatificação dos títulos de anticorpos totais.

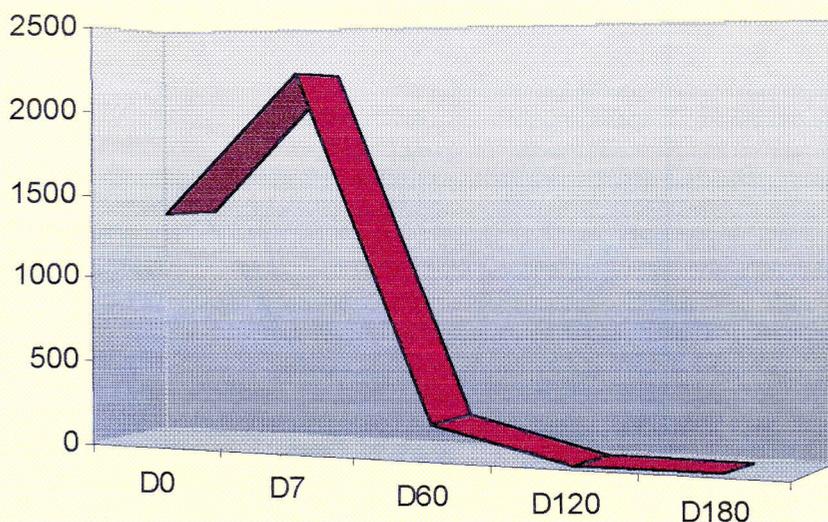
Tabela 3 - Médias geométricas dos títulos de anticorpos classe IgG anti-*P. vivax*, conforme dia de coleta durante a fase aguda e controle de cura. APM/IEC, Belém/PA. 1997.

	Dia de acompanhamento				
	D0	D7	D60	D120	D180
	n=34	n=34	N=21	n=16	n=14
Títulos *	1388,75	2209,96	217,89	6,25	0,68
	± 4,901	± 4,519	± 7,595	± 28,789	± 23,233

*Títulos = Média geométrica dos título de anticorpos IgG *anti- P. vivax* ± desvio padrão geométrico
Fonte: Dados primários

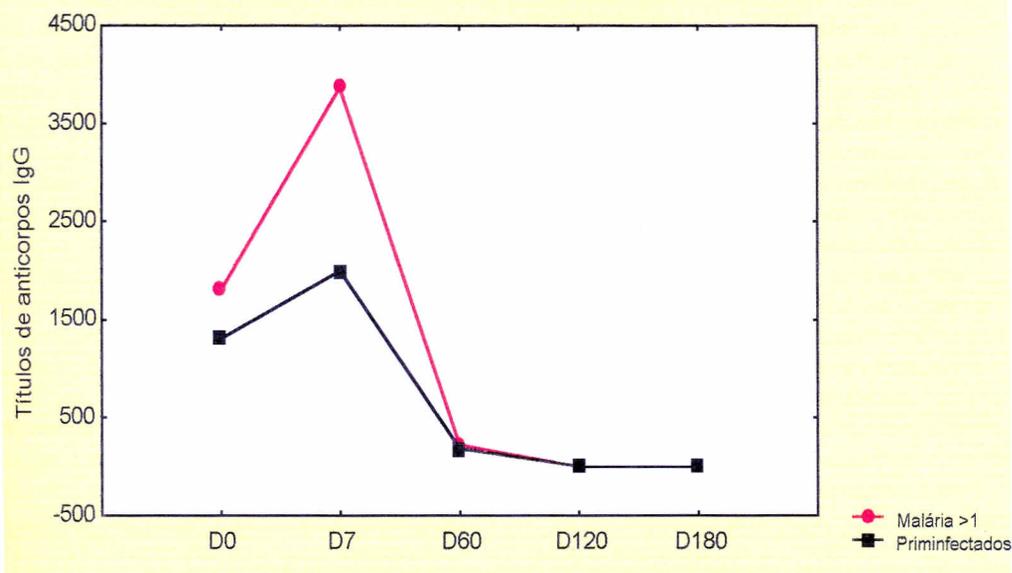
A Figura 2 mostra a variação de MGTAG, durante a fase aguda e controles de cura dos 34 pacientes estudados. Houve aumento importante de títulos de anticorpos entre o 1º e o 8º dia de acompanhamento. A comparação dos logaritmos dos títulos de IgG anti-PV entre D0 e D7 para o grupo total, mostrou diferença significativa ($p=0,027$ / t de Student).

Figura 2 - Médias geométricas dos títulos de anticorpos IgG anti-*P.vivax*, durante a fase aguda e controle de cura do grupo estudado. APM/IEC, Belém/PA. 1997



A Figura 3 mostra comparativamente, as MGTAG em D0, D7, D60, D120 e D180 dos grupos de crianças priminfetadas e aquelas com história prévia de malária, evidenciando-se uma resposta quantitativamente maior em D7 em ambos os subgrupos, principalmente para o grupo de indivíduos já expostos anteriormente à doença. Não ocorreram diferenças estatisticamente significativas nas comparações dos valores logaritmos dos títulos de anticorpos anti-PV em D0 e D7 dos dois grupos (priminfetados: $p=0,0606$ / t de Student; crianças com história de malária anterior: $p=0,235$).

Figura 3 - Médias geométricas dos títulos de anticorpos IgG anti- *P.vivax* em pacientes priminfetados e pacientes que apresentaram mais de um ataque malárico, durante os controles de cura. APM/IEC, Belém/PA. 1997



Priminfetados: $p = 0,0606$ (t Student)

Pacientes com história de malária anterior: $p = 0,235$ (t Student)

3.2 Influência da idade

A média de idade do grupo estudado foi de 8,51 anos. A distribuição das frequências de pacientes em cada faixa etária pode ser vista na Tabela 4.

Tabela 4 – Número absoluto e frequência percentual (%) de pacientes distribuídos conforme os grupos etários. APM/IEC, Belém/PA. 1997.

Faixa etária	Nº absoluto de pacientes	Frequência (%)
0 a 6 meses	1	2,9
6 meses a 2 anos exclusive	2	5,8
2 anos a 5 anos exclusive	3	8,8
5 anos a 7 anos exclusive	6	17,6
Acima de 7 anos inclusive	22	64,7
TOTAL	34	100

Os títulos de anticorpos totais anti-*P.vivax* encontrados no primeiro dia de tratamento, conforme as faixas etárias estudadas, pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5 - Títulos de anticorpos totais anti-*P.vivax* encontrados no primeiro dia de tratamento, conforme os grupos etários. APM/IEC. Belém, 1997.

Faixa etária	Média aritmética dos títulos de anticorpos anti-PV	Valor mínimo	Valor máximo
0 a 6 meses	640	640	640
7 meses a 2 anos	660	40	1280
3 anos a 5 anos	1493,33	640	2560
5 anos a 7 anos	2783,33	160	10240
Acima de 8 anos	4290,9	80	10240

3.3 Parasitemia assexuada e títulos de anticorpos totais anti - *P.vivax*

O clareamento da parasitemia assexuada ocorreu até o 4º dia de tratamento em todos os pacientes estudados. A Tabela 6 mostra as médias geométricas das parasitemias assexuadas de pacientes priminfetados e pacientes com história prévia de malária, durante os dias de acompanhamento.

Foi observado, durante o tratamento, coincidentemente com o aumento de títulos de anticorpos, a queda progressiva da parasitemia assexuada, observada no máximo até o 4º dia de acompanhamento. Nas coletas realizadas durante o controle de cura as parasitemias persistiram negativas, não tendo ocorrido nenhum caso de recaída.

Tabela 6 – Médias geométricas da parasitemia assexuada/mm³ de sangue em 34 pacientes, conforme dia de acompanhamento e história prévia de malária.

APM/IEC, Belém/PA. 1997.

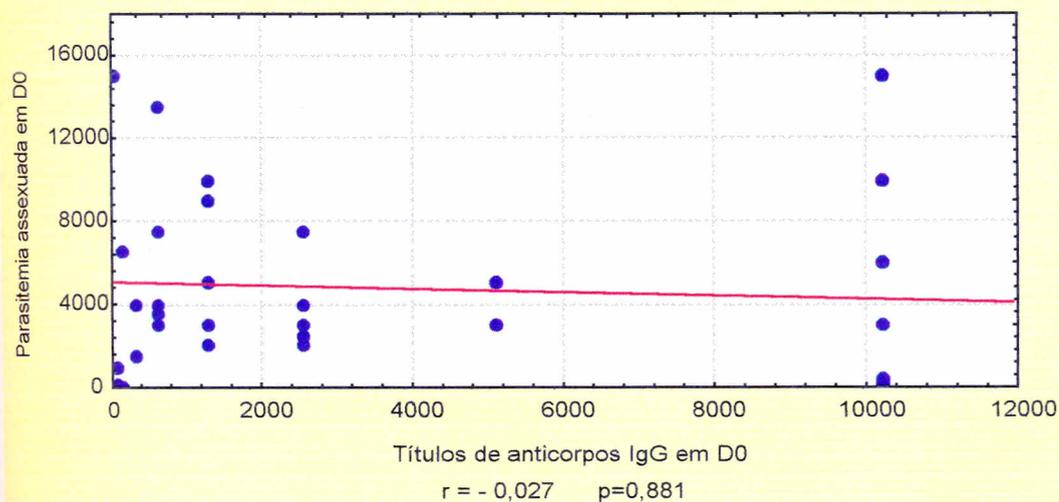
Dia de acompanhamento	Médias geométricas das parasitemias assexuadas/ mm ³ de sangue		
	Primiinfectados n = 28	Pacientes com história anterior de malária n = 6	Grupo total n = 34
D0	2517,67	3647,54	2691,53
D1	250,03	121,06	219,77
D2	4,42	3,27	4,19
D3	1,11	0	1,09
D4	0	0	0

Fonte: Dados primários

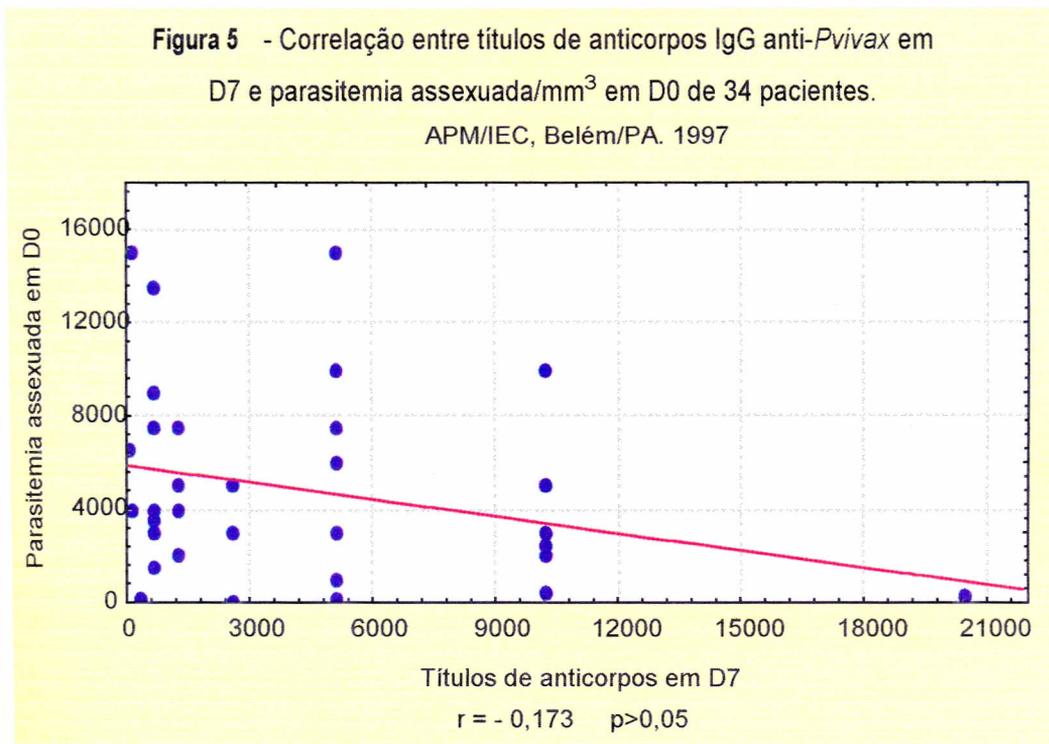
A correlação entre títulos de anticorpos e parasitemia assexuada em D0 no grupo total, evidenciou tendência negativa, sugerindo que títulos de anticorpos maiores estariam relacionados a parasitemias menores, porém, sem resultados significativos ($r = -0,027/ p=0,881$) (Figura 4).

Figura 4 -Correlação entre títulos de anticorpos tipo IgG anti- *P. vivax* parasitemia assexuada/mm³ no dia zero, em 34 pacientes.

APM/IEC, Belém/PA. 1997



A mesma correlação anterior feita entre parasitemia assexuada em D0 e títulos de anticorpos totais em D7, manteve a tendência negativa, não ocorrendo igualmente, diferenças significativas ($r = -0,173$ $p > 0,05$), não sendo estabelecida portanto nenhuma correlação (Figura 5).



As figuras 6 e 7 mostram que a correlação entre títulos de anticorpos anti-PV e parasitemia assexuada em D0 de cada grupo, demonstrou tendência positiva entre indivíduos com história de exposição prévia à doença, e negativa entre os primoinfectados, porém sem resultados significativos

Figura 6 - Correlação entre títulos de anticorpos IgG anti-*P. vivax* e parasitemia assexuada/mm³ em D0, de 6 pacientes com história anterior de malária. APM/IEC, Belém/PA. 1997

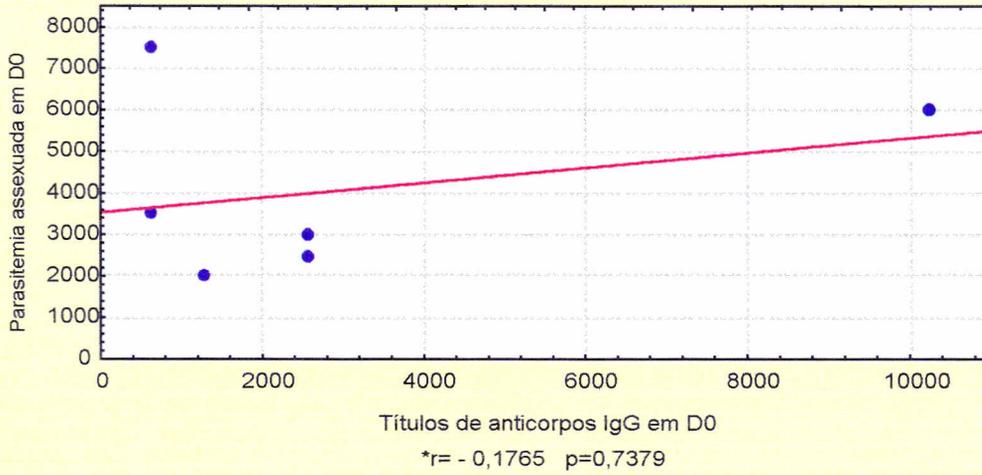
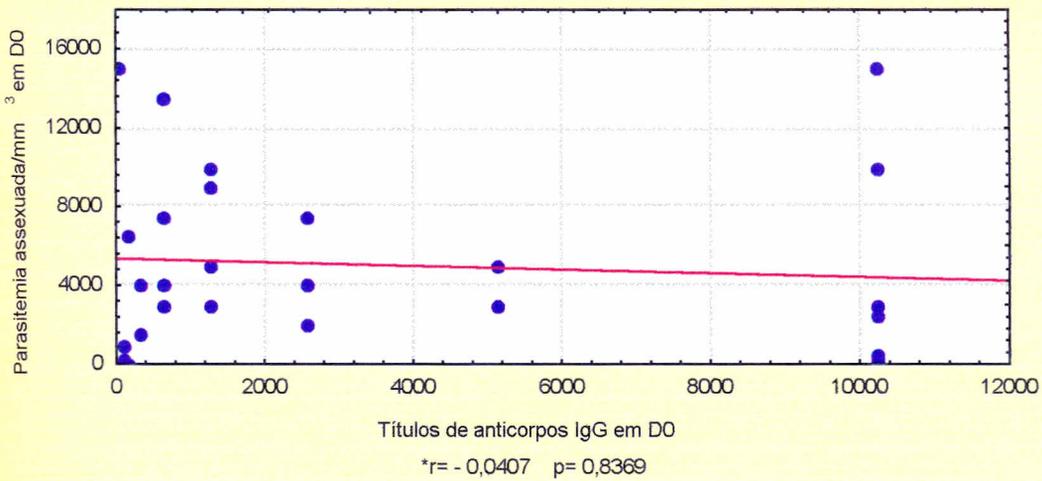


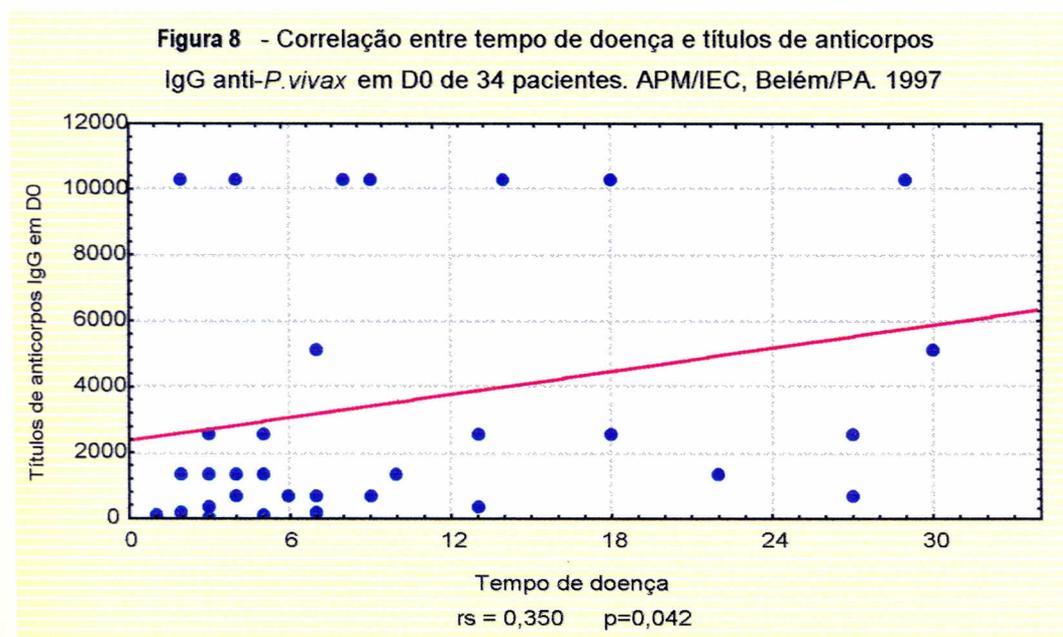
Figura 7 - Correlação entre títulos de anticorpos IgG anti-*P. vivax* e parasitemia assexuada/mm³ em D0 de 28 pacientes primoinfectados. APM/IEC, Belém/PA. 1997



3.4 Dados clínicos e títulos de anticorpos

A média do tempo de doença dos indivíduos estudados foi de 13,4 dias, variando entre 1 e 124 dias.

Foi estabelecida correlação positiva entre o tempo de doença e títulos de anticorpos IgG em D0 para o grupo total (Figura 8) com resultados significativos ($r = 0,350 / p = 0,042$). O valor extremo de 124 dias de doença de um paciente, foi eliminado do cálculo da correlação.



Nos subgrupos de priminfetados e pacientes com história malária anterior a relação tempo de doença e títulos de anticorpos totais pode ser vista nas figuras 9 e 10. Não houve significância na correlação em indivíduos expostos anteriormente à malária, para os quais houve uma tendência negativa, porém sem resultados significativos ($r = -0,5822$ $p = 0,2254$). Contrariamente, em indivíduos priminfetados, estabeleceu-se correlação fortemente positiva entre os títulos de anticorpos e tempo de doença ($r = 0,5469 / p = 0,003$), sugerindo que o tempo de

evolução da doença em indivíduos priminfetados está diretamente relacionada proporcional a quantidade de anticorpos IgG anti-*P. vivax*, durante a fase aguda da doença.

Figura 9 - Correlação entre tempo de doença e títulos de anticorpos IgG anti-*P. vivax* em D0 de 28 pacientes priminfetados. APM/IEC, Belém/PA. 1997

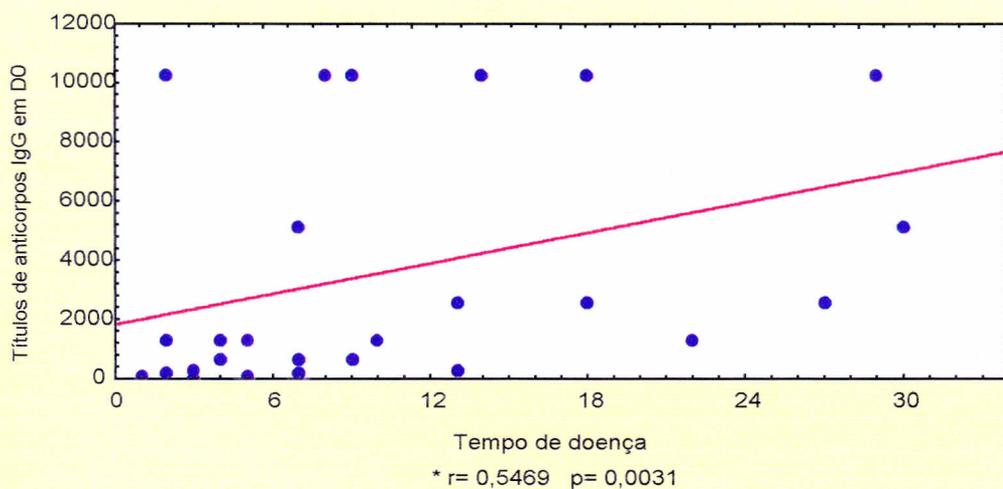
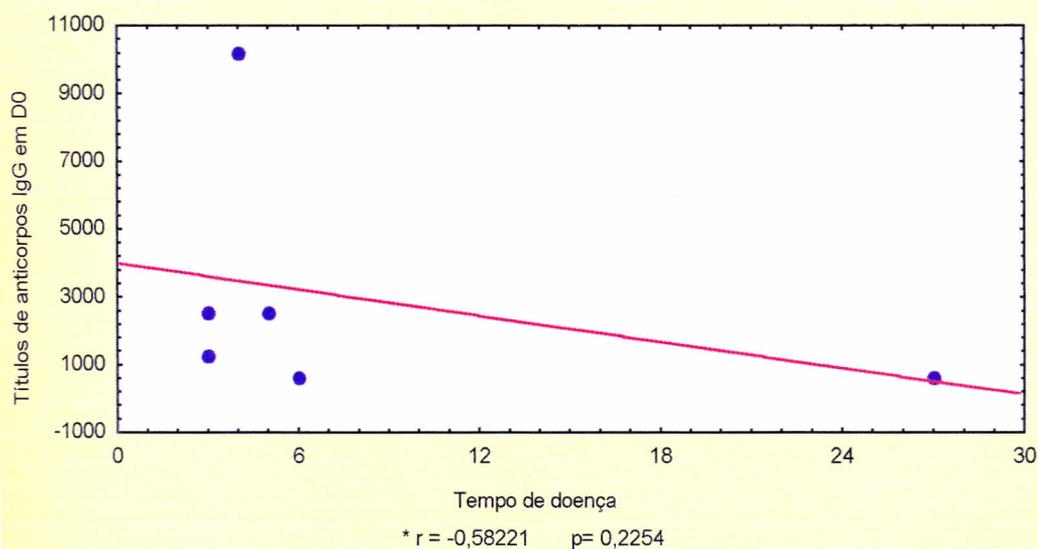


Figura 10 - Correlação entre tempo de doença e títulos de anticorpos IgG em 6 pacientes com história anterior de malária. APM/IEC, Belém/PA. 1997



Os principais sinais e sintomas observados na amostra estudada são descritos na Tabela 7, entre indivíduos priminfectedados e indivíduos expostos anteriormente à doença. Observa-se que os sintomas mais evidentes são febre, calafrios, palidez, colúria, tosse, esplenomegalia e anorexia em ambos subgrupos. A astenia e dores articulares perderam a importância devido sua diminuída objetividade, determinando dúvidas em sua avaliação, principalmente em crianças menores. A icterícia se apresentou em 100% dos indivíduos com exposição prévia a malária, e em apenas 10,7% dos indivíduos priminfectedados.

Tabela 7 - Frequência dos principais sinais e sintomas observados no 1º dia de tratamento, entre pacientes priminfectedados e pacientes com exposição prévia à malária. APM/IEC, Belém/PA. 1997

Sinais e sintomas	Percentual de positividade dos sintomas e/ou sinais avaliados no dia zero (%)	
	*Malária > 1 (n = 6)	Priminfectedados (n = 28)
Febre	100	96,4
Calafrio	83,3	89,3
Palidez	83,3	92,9
Anorexia	66,7	82,1
Colúria	100	74,1
Cefaléia	100	71,4
Dor abdominal	50	67,9
Vômitos	50	53,6
Esplenomegalia	50	50
Tosse	100	53,6
Hepatomegalia	0	32,1
Diarréia	16,7	21,4
Icterícia	100	10,7

*Malária >1= Pacientes que tiveram 1 ou mais episódios de malária

Fonte: Dados primários

A esplenomegalia por se tratar de um sinal freqüentemente relacionado com títulos altos de anticorpos e maior resposta imune à doença, foi analisada individualmente, tendo se apresentado como sinal importante nos dois subgrupos, ocorrendo em metade dos indivíduos.

A Tabela 8 mostra a relação entre títulos de anticorpos IgG anti-*P.vivax* e número de indivíduos com ou sem esplenomegalia.

Tabela 8 - Distribuição dos títulos de anticorpos classe IgG anti-PV em D0 e presença ou ausência de esplenomegalia. APM/IEC, Belém/PA. 1997

Títulos de anticorpos em D0	Esplenomegalia (nº absolutos de indivíduos)		Total de pacientes
	Presença	Ausência	
40	1	0	1
80	2	0	2
160	1	1	2
320	0	2	2
640	2	4	6
1280	3	3	6
2560	2	3	5
5120	1	1	2
10240	5	3	8
Total	17	17	34

Fonte: Dados primários

3.5 Subclasses de imunoglobulinas G anti-PV

Nas coletas realizadas em D0 os títulos de anticorpos IgG1 anti-PV predominaram sobre as demais subclasses, com títulos iguais ou próximos dos títulos de IgG total. Os títulos de IgG3 anti-PV foram bem menores, tendo sido detectados apenas nos pacientes que apresentavam altos títulos iniciais de IgG total. A subclasse IgG2 foi evidenciada em títulos limítrofes ao ponto de corte

considerado e apenas na primeira coleta, tanto em indivíduos sem história anterior de malária, como nos priminfectedos.

As coletas realizadas aos 60 ou, aos 120, ou aos 180 dias após o tratamento, evidenciaram manutenção dos títulos de IgG1 próximos aos níveis de IgG total e desaparecimento de IgG2 e IgG3 em ambos subgrupos. Os títulos de IgG3 desapareceram no pós-tratamento apenas nos pacientes já expostos a infecção anteriormente. No subgrupo de priminfectedos IgG3 manteve-se positiva no pós-tratamento, em níveis baixos. (Tabela 9)

Tabela 9 - Títulos de anticorpos antiplasmodiais subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 na fase aguda e pós-tratamento, de 34 pacientes.

APM/IEC, Belém/PA. 1997

Paciente	IgG1		IgG2		IgG3		Paciente	IgG1		IgG2		IgG3	
	(D0)	2ª coleta	(D0)	2ª coleta	(D0)	2ª coleta		(D0)	2ª coleta	(D0)	2ª coleta	(D0)	2ª coleta
3	2560	Neg	Neg	Neg	20	Neg	53	2560	320	Neg	Neg	Neg	Neg
4	5120	Neg	Neg	Neg	20	Neg	54	320	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
9	320	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	56	40	40	Neg	Neg	Neg	Neg
12	1280	80	Neg	Neg	20	Neg	57	2560	160	20	Neg	20	Neg
13	80	40	Neg	Neg	Neg	Neg	58	640	160	Neg	Neg	Neg	Neg
16	1280	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	62	80	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
17	640	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	63	320	Neg	Neg	Neg	40	Neg
21	640	80	Neg	Neg	Neg	Neg	64	10240	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
22	2560	320	Neg	Neg	80	Neg	66	640	Neg	Neg	Neg	20	Neg
29	320	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	78	1280	Neg	20	Neg	20	20
30	1280	Neg	Neg	Neg	20	Neg	82	320	Neg	Neg	Neg	20	Neg
35	20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	83	640	320	Neg	Neg	20	Neg
38	320	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	86	5120	640	Neg	Neg	20	Neg
40	1280	40	Neg	Neg	Neg	Neg	87	320	Neg	Neg	Neg	20	Neg
42	640	Neg	Neg	Neg	20	Neg	88	160	160	Neg	Neg	40	Neg
45	2560	40	Neg	Neg	Neg	Neg	89	320	320	Neg	Neg	20	Neg
52	1280	40	Neg	Neg	Neg	Neg	90	1280	80	Neg	Neg	40	Neg

As médias geométricas dos títulos de subclasses de IgG anti-*P. vivax*, desvio padrão e proporção de indivíduos positivos para as subclasses de anticorpos IgG anti-PV, encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Médias geométricas dos títulos de subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 anti-*P. vivax*, e proporção de indivíduos positivos na primeira e segunda coleta conforme exposição anterior à malária. APM/IEC, Belém/PA. 1997

IgG		*Malária >1 (n= 6)		Priminfectedos (n=28)	
		1ª amostra	2ª amostra	1ª amostra	2ª amostra
IgG Total	Proporção de positivos (%)	100	61,8	100	58,1
	Títulos**	1810,19 ±2,861	160 ± 1,633	1312,08 ± 5,433	236,29 ± 1,517
IgG1	Proporção de positivos (%)	100	83,3	96,4	46,4
	Títulos**	806,35 ±2,578	139,29 ± 4,494	709,21 ± 4,038	122,99 ± 3,919
IgG2	Proporção de positivos (%)	16,7	-	10,7	3,6
	Títulos**	20 ± 1	-	20 ± 1	-
IgG3	Proporção de positivos (%)	66,6	-	39,3	7,1
	Títulos**	28,28 ± 1,492	-	22,69 ± 1,519	28,28 ± 1,633

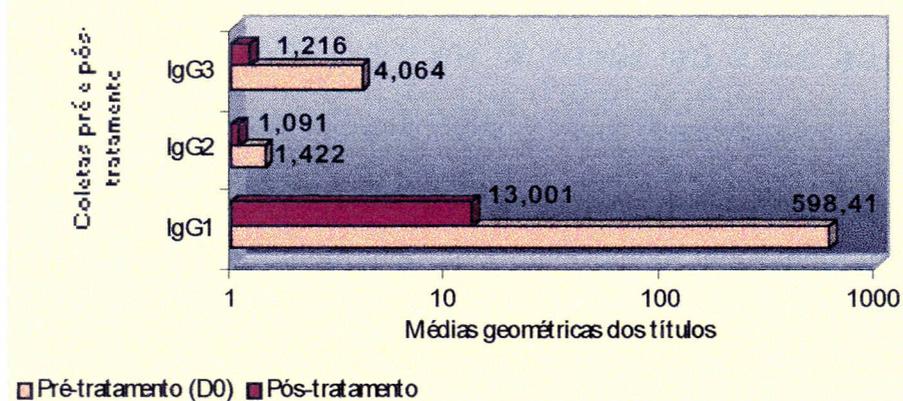
** Médias geométricas dos títulos de anticorpos e desvio padrão geométrico

* Pacientes que tiveram 1 ou mais episódios anteriores de malária

Fonte: Dados primários

A Figura 11 mostra a distribuição das médias geométricas dos títulos de anticorpos subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 anti-*P. vivax* no grupo estudado.

Figura 11 - Médias geométricas dos títulos de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 anti-*P.vivax*, na fase aguda (pré-tratamento ou D0), e fase pós-tratamento de 34 crianças estudadas. APM/IEC, Belém/PA. 1997



As comparações de proporções entre indivíduos positivos e negativos para as subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 anti-PV resultaram não significativas (Tabela 11)

Tabela 11- Número absoluto de indivíduos positivos e negativos à IFI para os anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 anti-*P.vivax* e valores de p obtidos na comparação de proporções. APM/IEC, Belém/PA. 1997

	Indivíduos	Malária >1	Priminfectados	Valor de p *
IgG1	Número de positivos	6	27	0,823
	Número de negativos	0	1	
IgG2	Número de positivos	1	3	0,865
	Número de negativos	5	25	
IgG3	Número de positivos	4	10	0,173
	Número de negativos	2	18	

* Teste Exato de Fisher

4 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou, por meio da técnica de imunofluorescência indireta, a distribuição dos anticorpos antimaláricos da classe IgG e subclasses, em um grupo de crianças portadoras de malária por *P.vivax*, atendidas ambulatorialmente e acompanhadas pelo período que se convencionou chamar controle de cura em malária vivax.

A maioria dos estudos demonstrativos do padrão de resposta imune à malária humana feitos anteriormente utilizou voluntários humanos nos quais a infecção malárica era induzida, seja por inoculação direta de formas sangüíneas assexuadas do parasita, seja por exposição destes indivíduos à picada de anofelinos infectados (inoculação de esporozoítos). Essas metodologias atualmente seriam inviáveis em virtude dos importantes avanços obtidos na área de bioética em pesquisa.

Fato já demonstrado em áreas endêmicas, é que a chamada imunidade antitóxica, ou premunição, é incompleta, não esterilizante e adquirida progressivamente após inúmeras exposições (revisado por Baird, 1993). A maior parte desta proteção relativa é atribuída a anticorpos da classe IgG, cuja efetividade foi demonstrada graças aos experimentos de transferência passiva de anticorpos feitos por Cohen *et al.*, (1961); Edozien *et al.* (1962) e McGregor *et al.* (1963). Em um estudo mais recente Sabchareon *et al.* (1991), usando IgG purificada, obtida de doadores semi-imunes africanos, conseguiu diminuir a parasitemia assexuada de 11 indivíduos com malária por *P.falciparum* recrudescente. Estes autores purificaram IgG obtida de doadores semi-imunes africanos e injetaram-na por via endovenosa, em 3 diferentes doses, em 11

adultos tailandeses com malária recrudescente. Desta forma, obtiveram redução da parasitemia assexuada, em concordância com estudos anteriores. Apesar desta proteção não ter sido esterilizante, ela provou ser consistente, estágio específica e espécie-específica, corroborando os estudos feitos anteriormente.

O ideal nos estudos de imunidade humoral em quaisquer doenças, infecciosas ou não, seria a avaliação da resposta efetora dos anticorpos "in vivo", ou seja, a definição exata do mecanismo de ação destes elementos frente aos diversos antígenos. As dificuldades técnicas neste sentido são inúmeras, restando assim, as respostas obtidas com os experimentos "in vitro", e os estudos quantitativos de acompanhamento dos níveis destes anticorpos, feitos na tentativa de estabelecer um padrão na resposta imune humoral do hospedeiro, em diversas populações.

No presente estudo, os níveis de anticorpos IgG anti-PV, obtido no 1º e 7º dia de acompanhamento, seguiu uma linha ascendente dos títulos, independente da faixa etária estudada. Esta elevação mostrou diferenças significativas no grupo total, revelando níveis de anticorpos mais elevados em relação ao primeiro dia de tratamento, na ausência de parasitemia ao exame da gota espessa. Por outro lado, os estudos feitos na década de sessenta, referem a importância da presença do parasita no sangue periférico, como estímulo primordial de anticorpopogênese efetiva. Contudo, a comparação de estudos anteriores e o presente trabalho, não pode ser feita, já que se trata de duas formas distintas de abordagem (malária clínica e malária induzida). O aumento dos títulos ocorrido entre D1 e D7, poderia ser explicado por tres hipóteses: 1) O tempo decorrido entre a última parasitemia e a coleta de soro feita no oitavo dia de tratamento, foi um tempo relativamente curto (em média 4 dias) para que os fenômenos ausência de parasita pós-tratamento e

conseqüente diminuição da produção de anticorpos fosse devidamente evidenciado. Desta forma, o achado pode ser resultado apenas de um fenômeno casual de tendência ao aumento de títulos, considerando inclusive alguma subjetividade que o teste de imunofluorescência indireta permite por dificuldades inerentes ao teste; 2) O exame realizado para detecção de parasitas no sangue periférico (gota espessa) pode não traduzir a parasitemia patente, conseqüência da sensibilidade do método.

O rápido aumento de títulos de anticorpos até o oitavo dia (D7), pós-tratamento, principalmente em indivíduos com história anterior de malária, apesar de não significativo, pode sugerir uma resposta quantitativamente mais rápida em ataques secundários da doença em concordância com estudos de malária induzida. (Tobie, 1966).

Lunn *et al.* (1966), estudaram a resposta de anticorpos à malária por *P.vivax* e por *P.falciparum* em ataques primários induzidos e recaídas e/ou recrudescências. As recaídas por *P.vivax* demonstraram duas respostas distintas. Na primeira, os títulos apresentaram uma queda inicial transitória, atribuída a possível ligação de anticorpos pré-existentes aos antígenos produzidos naquele momento. O segundo tipo de resposta foi um aumento no títulos de anticorpos, com algumas poucas evidências de que tais anticorpos eram mais "protetores" que aqueles do ataque primário. Os experimentos feitos em voluntários adultos com malária induzida por *P.falciparum*, mostram um aumento dos títulos de anticorpos em média 3 a 6 dias após a parasitemia patente. Estes títulos são mantidos enquanto se mantiver a parasitemia. Tobie *et al.* (1966), demonstraram que altos títulos de anticorpos são mantidos por aproximadamente 3 semanas, após as quais, caem gradativamente. Estes mesmos autores observaram que, não

havendo supressão completa da parasitemia, os parasitas presentes funcionavam como estímulo adequado para produção de anticorpos pelo hospedeiro. Lunn *et al.* (1965) demonstraram que se a parasitemia é completamente suprimida por terapia com cloroquina (utilizada neste estudo como antimalárico), os anticorpos usualmente não são produzidos.

Outros estudos muito semelhantes foram feitos e todos obtiveram a mesma resposta, de queda progressiva dos títulos de anticorpos com o término da parasitemia (uso do tratamento esquizonticida), permanecendo estes níveis detectáveis por um período prolongado (Abele, 1965; Collins, 1971). Em áreas não endêmicas foram demonstrados períodos variáveis de persistência destes anticorpos, reportados entre 13 e 20 anos (Luby *et al.*, 1967).

É bastante conhecida a correlação existente entre títulos de anticorpos e exposição cumulativa a malária. Estes anticorpos persistem por muitos anos após o último ataque malárico em indivíduos previamente expostos a intensa transmissão (Bruce-Chwatt, 1982; OMS, 1989). Paradoxalmente, estudos longitudinais de pacientes procedentes da Amazônia têm mostrado que anticorpos antimaláricos de curta duração (especialmente IgM e IgG3) podem desaparecer alguns meses depois do ataque malárico (Ferreira *et al.*, 1994).

Fontes *et al.* (1991) demonstraram que anticorpos contra a proteína circunsporozoíta de *P.vivax* (CSP) são rapidamente sintetizadas e persistem por até oito meses, em indivíduos não imunes expostos a ataques primários da doença, em área não endêmica.

No presente estudo, todas as crianças foram tratadas com esquema clássico, utilizando cloroquina como esquizonticida sangüíneo e apresentaram clareamento da parasitemia assexuada até o 4º dia de tratamento. Os títulos de

IgG no 8º dia após início do tratamento, portanto pelo menos quatro dias após a supressão da parasitemia assexuada evidente ao exame da gota espessa, foram maiores em relação ao dia zero.

Collins *et al.* (1964), demonstraram persistência dos anticorpos anti-*P.falciparum* frente a duas cepas diferentes inoculadas em voluntários. Este estudo mostrou diferentes padrões de resposta imune conforme a cepa estudada; tendo ocorrido persistência de títulos de anticorpos em níveis relativamente estáveis até 20 meses após inoculação do esporozoíto para a cepa colombiana.

Collins *et al.* (1975), inocularam em voluntários seis diferentes cepas de *P.vivax* e mediram os anticorpos tipo IgG através de duas técnicas: imunofluorescência indireta e hemaglutinação. A imunofluorescência indireta mostrou picos máximos de anticorpos entre 11 a 20 dias após parasitemia patente. Após este tempo os títulos declinaram gradativamente. Ao fim de 60 dias alguns títulos caíram até diluição de 1:10. Aos 240 dias a mediana de títulos permanecia em 10. Nesse mesmo experimento também foram inoculados com cepas de *P.vivax*, indivíduos com história de recaídas de longa duração (média de 189 dias após a infecção primária). Conforme se esperava, as médias geométricas dos títulos de anticorpos se elevaram a altos níveis em comparação com as respostas obtidas na infecção primária, reafirmando o conceito já conhecido de resposta imune secundária quantitativamente maior. Estes títulos permaneciam elevados até 120 dias ou mais, quando comparados aos da infecção primária.

No presente estudo, em virtude de a avaliação do paciente ter sido feita conforme sua chegada, portanto de forma aleatória, não foi possível identificar início da anticorpopogênese e nem picos máximos de anticorpos. Os títulos, com exceção do aumento inicial obtido em D7, foram acompanhados por até 180 dias

em intervalos de dois meses, mostrando declínio gradativo. Aos 60 dias após início do tratamento apenas um doente (4,7%) apresentava exame sorológico negativo. Aos 120 dias após o tratamento específico, 31,2% dos pacientes apresentavam resultados negativos, e os títulos positivos variavam entre 40 e 320 (média geométrica de títulos de 2,63). Aos 180 dias após o início do tratamento, 71,4% dos indivíduos apresentavam resultado negativo, e aqueles cujos títulos de anticorpos IgG anti-PV persistiam, apresentavam níveis variáveis entre 40 e 160 (média geométrica de títulos de 0,13).

Seria esperado que a resposta inicial de aumento dos títulos obtidas entre os dias zero e sete fosse mais evidente no grupo de indivíduos com história anterior de malária. Esta evidência, apesar de ter sido verificada em números absolutos, não resultou significativa, sugerindo que talvez para um tamanho maior de amostra de indivíduos que apresentavam história anterior de malária, esta diferença tivesse sido estabelecida estatisticamente.

Lunn *et al.* (1966) mostraram em estudos de malária induzida por inoculação de esporozoítos de *P. vivax* em adultos, um nível máximo de anticorpos entre 8 a 26 dias e 8 a 16 dias após a patência. Até 252 dias após o fim da parasitemia patente, persistiram títulos que variaram entre 10 e 160.

No grupo de crianças estudadas, não puderam ser estabelecidas as definições de semi-ímmunes e não ímmunes, devido a referência infreqüente de crianças com história anterior de malária, e quando presente, esta evidência era de baixa intensidade (no máximo dois episódios anteriores). Nos subgrupos formados de primíntectados e crianças com história de ataque anterior, a doença se apresentou de forma muito semelhante, não havendo diferenças quanto à clínica dos dois subgrupos, exceto para o sinal icterícia, sendo interessante o fato

de estar presente em 100% dos indivíduos já expostos a um ou mais ataques anteriores da doença, e em apenas 10,7% dos priminfectedos. Dentre as crianças com icterícia, nenhuma delas apresentava doença anterior, do tipo hepatobiliar e/ou outras, que pudessem justificar a predisposição para o desenvolvimento da icterícia, tornando este achado difícil de ser explicado. Icterícia em malária foi vista por outros autores que concluíram tratar-se de hepatite reativa não tóxica própria da doença, independente da espécie envolvida (Ramachandran e Perera, 1976).

A esplenomegalia já foi considerada importante medida malariométrica dos níveis de endemicidade de uma dada população, através do índice esplênico, sendo utilizada desde 1848 por Dempster na Índia (OMS, 1964). Por ser um sinal pouco sujeito a variações sazonais por exemplo, demonstra relativamente o nível de transmissibilidade de uma dada população, apesar de algumas opiniões contrárias à existência de correlação malária e esplenomegalia, principalmente em áreas onde o largo uso de quimioprofilaxia (cloroquina) seja utilizado (De *et al.*, 1990).

Adedoyin & Fagbule (1993), estudando crianças com esplenomegalia em uma comunidade no estado de Kwara (África), não encontraram correlação entre presença de esplenomegalia e presença de plasmódios no sangue periférico.

Adekile *et al.* (1993) em estudo feito com crianças portadoras de anemia falciforme, estabeleceram interessante correlação positiva entre tamanho do baço e presença de altos títulos de anticorpos antimaláricos. Este estudo constou de uma avaliação da esplenomegalia em dois grupos de crianças com anemia falciforme, sendo um grupo de área não malárica (Georgia) e o segundo grupo de área hiperendêmica de malária (Nigeria-África). Nas crianças africanas foi avaliada também a presença de anticorpos antimaláricos (IgG e IgM), além da

presença de plasmódio no sangue periférico. A correlação entre presença de esplenomegalia e parasitemia não foi estabelecida. Entretanto, foi observado que quanto maior o tamanho do baço palpado, maiores eram os títulos de anticorpos antimaláricos.

Outros estudos porém, já demonstraram que em áreas hipoendêmicas, a esplenomegalia não está correlacionada com parasitemia ou endemicidade, em concordância com os resultados obtidos no presente estudo, no qual não foi estabelecida nenhuma associação entre títulos de anticorpos e presença ou ausência de esplenomegalia.

Nesta amostra, correlações significativas foram estabelecidas entre tempo de doença e títulos de anticorpos totais, sendo esta correlação positiva em indivíduos primoinfectados, e negativa em indivíduos já expostos anteriormente à malária. Estes achados sugerem que em um tempo maior de evolução de doença (estímulo antigênico persistente), menores níveis de anticorpos são encontrados, em indivíduos expostos anteriormente a episódios de malária. Contrariamente, em indivíduos não expostos previamente a ataques maláricos, quanto maior o tempo de doença, maiores são os títulos de anticorpos. Este fenômeno poderia ser explicado em parte pelo fato de que, em indivíduos semi-imunes os anticorpos produzidos são qualitativamente melhores, ou seja, estão armados especificamente contra determinados alvos (Bouharoun-Tayoun e Druilhe, 1992[b]), de modo a limitar eficientemente, porém de forma parcial, a parasitemia assexuada. Como um efeito retroativo negativo, a diminuição progressiva da parasitemia assexuada induz níveis de anticorpos séricos cada vez menores. Os indivíduos não imunes, possuem anticorpos não eficazes, que se formariam contra determinado alvo inespecificamente, limitando de forma menos eficaz a densidade

parasitária, cujos níveis sangüíneos permaneceriam persistentemente estimulando a formação de mais anticorpos (efeito retroativo positivo).

Um papel crítico para os anticorpos citofílicos tem sido proposto recentemente na malária por *P.falciparum*, na qual o efeito destes anticorpos dependeria de sua cooperação com células. Conforme citamos anteriormente, Khusmith e Druilhe (1983), além de outros autores (Gysin *et al.*, 1980; Khusmith *et al.*, 1982) demonstraram tanto em humanos como em modelos animais que merozoítos e/ou hemácias infectadas por *P.falciparum* eram fagocitados por macrófagos ou monócitos, e que a presença de anticorpos opsonizantes estava correlacionada com estado de proteção (Khusmith & Druilhe, 1982; Celada *et al.*, 1982).

Dessa forma, estabeleceu-se definitivamente o conceito de imunidade celular dependente de anticorpos (ADCI) na proteção imune à malária por *P.falciparum*, através dos experimentos de Bouharoun-Tayoun *et al.* (1990). A ADCI é portanto, não somente um ensaio *in vitro* que detecta anticorpos protetores, mas também um eficiente mecanismo *in vivo* de defesa contra parasitas de malária (Pérignon & Druilhe, 1994). Simultaneamente, diversos estudos foram feitos em populações pertencentes a diversos contextos epidemiológicos de transmissibilidade de malária, com o objetivo de identificar os perfis de resposta dos anticorpos citofílicos nestas populações. Profundas diferenças foram encontradas quanto a distribuição destes anticorpos.

Os anticorpos monoclonais utilizados para detecção de anticorpos de diferentes subclasses de IgG têm mostrado elevada especificidade tanto em ensaios de ELISA, como de inibição da hemaglutinação e imunofluorescência indireta (Wahlgren *et al.*, 1983; Lowe *et al.*, 1982)

Na amostra estudada, utilizando a imunofluorescência indireta, houve um predomínio evidente de anticorpos IgG1 sobre as demais subclasses, seguida da presença de IgG3 e a quase inexistência de IgG2, independente de exposição anterior à malária. Este padrão sugere uma resposta muito semelhante ao comportamento de indivíduos procedentes de áreas hiperendêmicas, exceto pela predominância quase absoluta de IgG1.

Wahlgren *et al.* (1986) demonstraram que, em ensaios de imunofluorescência, os anticorpos IgG de subclasse mais rara, assim como anticorpos de baixa afinidade, poderiam ser subestimados, devido a competição dos antígenos com as subclasses mais comuns. Além do mais, a vida média dos anticorpos IgM e IgG3, bastante curta quando comparada a IgG1, IgG2 e IgG4 (Spiegelberg, 1974), poderia também resultar em baixa estimativa daquelas duas subclasses, particularmente em indivíduos com níveis de anticorpos séricos baixos, ou coletados muito tempo após a doença manifesta.

Em nossos achados, títulos de anticorpos baixos foram evidenciados muito raramente, ao contrário, a maioria dos pacientes apresentava altos níveis séricos de anticorpos antimaláricos. Por outro lado, é concreta a possibilidade de baixa afinidade dos anticorpos, tornando a subclasse IgG2 quase indetectável. Assim como, é concreta a possibilidade de desaparecimento de IgG3 devido a sua vida média curta, visto que os doentes se apresentaram para primeira consulta, em média referindo 13,4 dias de doença. Os doentes que apresentaram IgG3 positiva, mesmo em baixos níveis, tinham um tempo de doença variável entre 3 a 30 dias (média de 11,6 dias).

Bouharoun-Tayoun e Druilhe (1992[a]) estudaram as subclasses de anticorpos em indivíduos portadores de diferentes graus de resistência à malária:

em indivíduos hiperimunes 2 classes citofílicas de anticorpos foram predominantes (IgG1 e IgG3). Ao contrário, em indivíduos não imunes (crianças e adultos primariamente infectados foram encontradas diversas situações: 1) uma classe não citofílica de anticorpos (IgG2), predominando principalmente naqueles indivíduos adultos primoinfectados; 2) predomínio de anticorpos do tipo IgM (classe não citofílica) mais frequentemente em crianças; 3) menos freqüentemente, níveis totais baixos de anticorpos antimaláricos não citofílicos (IgG2 e/ou IgM) em indivíduos não protegidos. Estes autores demonstraram ainda que ocorria um decréscimo das taxas de IgG2 em crianças pequenas, quando comparadas a crianças maiores, em concordância com os achados de Morell *et al.* (1972) de que IgG2 inespecífica é produzida em baixos níveis em crianças muito jovens (menores de dois anos de idade).

Aribot *et al.* (1996) avaliaram o padrão de imunoglobulinas em uma comunidade africana, incluindo adultos e crianças. Os adultos apresentaram altos títulos de anticorpos específicos em relação às crianças. A parasitemia não mostrou nenhuma correlação com os níveis de IgG total. O achado mais interessante neste trabalho é o fato de que níveis mais elevados de IgG3 estão relacionados a menor risco de ataque malárico. Em relação a presença de IgG3, as comparações feitas entre crianças primoinfectadas e crianças com história anterior de ataques maláricos no presente estudo, não se estabeleceu nenhuma evidência significativa de predominância de IgG3 em indivíduos previamente expostos, sendo este resultado talvez influenciado pelo tamanho da amostra de pacientes previamente expostos.

Ferreira *et al.*, (1994) realizaram um estudo cruzado seccional em 50 indivíduos de uma comunidade rural de Rondônia, na Amazônia ocidental

brasileira, avaliando as subclasses de IgG contra diversos antígenos somáticos e exoantígenos de *P.falciparum*, tendo encontrado um marcante contraste com os achados clássicos de subclasses de IgG descritos para indivíduos semi-ímmunes africanos. Nesta comunidade da Amazônia, a subclasse IgG2 contra exoantígenos, predominou sobre as outras subclasses de forma significativa, porém em relação aos anticorpos IgG1 contra antígenos somáticos a diferença estatística foi duvidosa ($p=0,052$).

Mais recentemente, os estudos de resposta imune à malária têm sido desenvolvidos com proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos correspondentes a regiões imunologicamente relevantes, consideradas alvos potenciais para composição de vacinas. Assim é, que por exemplo Soares *et al.* (1997), estudaram a resposta de anticorpos e células T contra onze proteínas recombinantes, correspondentes às regiões N e C-Terminais da MSP1 de *P.vivax*, em indivíduos apresentando ataques agudos, e em indivíduos convalescentes, procedentes de Belém, e observaram que 83% dos indivíduos estudados têm anticorpos contra estas proteínas. Além disso, observaram que estes anticorpos eram predominantemente das subclasses IgG1 e IgG3, semelhante aos resultados encontrados no presente trabalho em relação à resposta de anticorpos anti-PV.

No presente estudo, questões fundamentais surgem: considerando-se a assertiva clássica que considera a imunidade à malária como sendo espécie-específica, poderíamos esperar que o comportamento da chamada ADCI na imunidade humoral não fosse o mesmo para as diferentes espécies de plasmódio? As populações a serem estudadas na tentativa de estabelecer um padrão de resposta qualitativa de anticorpos antimaláricos frente à doença, poderiam

manifestar padrões semelhantes para as duas espécies de plasmódio mais prevalentes no Brasil?

Na tentativa de responder em parte estas questões seriam necessários estudos experimentais do comportamento do *Plasmodium vivax* frente ao fenômeno de ADCI, de forma a estabelecer semelhanças com o comportamento do *P.falciparum*, que atualmente tem sido a única espécie de plasmódio estudada neste sentido. Infelizmente, os experimentos *in vitro* com *Plasmodium vivax* enfrentam inúmeras dificuldades técnicas, tornando relativamente difíceis os ensaios de ADCI com esta espécie de plasmódio.

Por outro lado, muitas considerações têm sido feitas atualmente, quanto a possibilidade de imunidade cruzada entre *P.vivax* e *P.falciparum* (Maitland *et al.*, 1997). Estas considerações têm por base várias observações e experimentos que demonstraram o desenvolvimento de imunidade após inúmeras infecções por *P.vivax*, suficiente para atenuar o curso subsequente de infecções potencialmente letais por *P.falciparum*.

Desta forma, os estudos de resposta imune ao *P.vivax* devem ser persistentes a despeito das dificuldades, e estimulados pelas correntes de pensamento que postulam de forma inovadora, que esta espécie de plasmódio, em decorrência de seu modelo de adaptação ao homem melhor estruturado, mostre o melhor caminho a seguir na tentativa de elucidação de uma das mais complexas e sedutoras questões da imunopatologia da malária: a interação parasita-hospedeiro.

5 CONCLUSÕES

- ❖ O grupo de crianças estudadas desenvolveu anticorpos classe G anti-plasmodiais totais anti-*P. vivax*, que seguiram um padrão de títulos semelhantes àqueles estudados em malária induzida, com exceção de uma elevação significativa ocorrida entre o primeiro e oitavo dia de acompanhamento, independente de exposição anterior ou não à malária.
- ❖ Durante o controle de cura os níveis de anticorpos totais anti-PV declinaram gradativamente, na seguinte escala: 4,76% das crianças apresentaram negatificação dos títulos até D60, 37,5% até D120, e 71,42% tiveram os títulos de anticorpos negativos até 180 dias após o início do tratamento. Neste período, os pacientes que permaneceram positivos apresentavam títulos que variavam entre 40 e 160, sem relação com exposição prévia à malária.
- ❖ Não houve associação entre parasitemia assexuada no dia zero, e níveis de anticorpos totais anti-PV no pré-tratamento e/ou no oitavo dia pós-tratamento.
- ❖ Em crianças com história anterior de malária o tempo de doença é diretamente proporcional aos títulos de anticorpos IgG no primeiro dia de tratamento. Em crianças não expostas anteriormente à malária, o tempo de doença é inversamente proporcional aos títulos de anticorpos no primeiro dia de tratamento.

- ❖ Não há correlação entre títulos de anticorpos anti-PV totais e presença de esplenomegalia, na amostra estudada.

- ❖ Houve predominância de anticorpos citofílicos nas seguintes proporções na amostra estudada: IgG1 > IgG3. A classe não citofílica (IgG2) não foi evidenciada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. Antibodies and antigens. In: _____ **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2.ed., p.31-64, 1994.
- ABELE, D.C., TOBIE, J.E., HILL, G.J., CONTACOS, P.G, EVANS, C.B. Alteractions in serum proteins and 19S antibody production during the course of induced malarial infections in man. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, v.14, p.191-197, 1965.
- ADEDOYIN, M.A., FAGBULE, D. Splenomegaly, malarial parasitaemia and anemia in two Nigerian villages. **Central African Journal of Medicine**. Harare, v.38, n.9. p.371-375, 1993.
- ADEKILE, A.D., MCKIE, K.M., ADEODU, O.O. SULZER, A.J.; LIU, J.-S.; McKIE, V.C.; KUTLAR, F.; RAMACHANDRAN, M.; KAINE, W.; AKENZUA, G.I; OKOLO, A.A.; OBINYAN, E.A.; OGALA, W.N.; IBRAHIM, M.; HUISMAN, T.H.J. Spleen in sickle cell anemia: comparative studies of Nigerian and U.S patients. **American Journal of Hematology**. New York, v.42, p.316-321, 1993.
- AMADOR, R., PATARROYO, M.E. Malaria vaccines. **Journal of Clinical Immunology**. New York, v.16, n.4, p. 183-189, 1996.
- ANDRADE, A.L.S.S., MARTELLI, M.T., OLIVEIRA, R.M., ARIAS JR, ZICKER F & PANG L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v.20, p.475, 1995.
- ANTUÑANO, F.J.L. Diagnóstico microscópico en la sangre. In: **Diagnóstico da malária**. Washington, DC: OPAS, 1988, p.78-86 (Publication científica nº 512).
- ARIBOT, G., ROGIER, C., SARTHOU, J.L., TRAPE JF, BALDE T, DRUILHE P. ROUSSILHON C. Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, West Africa). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, v.54, n.5, p.449-457, 1996.
- BAIRD, J.K. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Today**. London, v.11, n.3, p.105-111, 1995.
- BARATA, R.C.B. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.11, n.1, p.128-136, 1995.
- BORHAROUN-TAYOUN, H., DRUILHE, P. *Plasmodium falciparum* malaria: Evidence for an isotype imbalance wich may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. **Infection and Immunity**. Washington, p.1473-1481, 1992[a].

- BORHAROUN-TAYOUN, H., ATTANATH, P., SABCHAREON, A., CHONGSUPHAJASIDDHI, T. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion *in vitro*, but act in cooperation with monocytes. **Journal of Experimental Medicine**. New York, v.172, p.1633-1641, 1990.
- BOUHAROUN-TAYOUN, H., DRUILHE, P. Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.87, sup. III, p.229-234, 1992[b].
- BROWN, K.N., BROWN, I.N., TRIGG, P.I., PHILILPS, R.S., HILL, L.A. Immunity to malaria. II. Serological response of monkeys sensitized by drug-suppressed infection or by dead parasitized cells in Freund's complete adjuvant. **Experimental Parasitology**. New York, v.28, p.318-338, 1970.
- BRUCE-CHWATT, L.J. Transfusion malaria revisited. **Tropical Diseases Bulletin**. London, v.34, p.827-840, 1982.
- CALVOSA, V.S.P. **Avaliação do papel de anticorpos (IgG) antimaláricos transferido da mãe para o feto na ocorrência de malária neo-natal. Outros fatores de importância**. Belém: Universidade Federal do Pará, 1995. Dissertação de mestrado.
- CELADA, A., CRUCHAUD, A., PERRIN, L.H. Phagocytosis of *P. falciparum* parasitized erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Parasitology**. Lawrence, v.69, n.1, p.49-53, 1983.
- CELADA, A., CRUCHAUD, A., PERRIN, L.H. Opsonic activity of human immune serum on *in vitro* phagocytosis of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells by monocytes. **Clinical and Experimental Immunology**. London, v.47, p.635-664, 1982.
- CHOW, J.S., KREIER, J.P. *Plasmodium berghei* adherence and phagocytosis by rat macrophages *in vitro*. **Experimental Parasitology**. New York, v.31, p.13-18. 1972.
- CLYDE, D.F. Epidemiologic significance of immunity in vivax malaria. **Epidemiologic Reviews**. Baltimore, v.11, p.109-125, 1989.
- CLYDE, D.F., McCARTHY, V.C., MILLER, R.M., HORNICK, R.B. Specificity of the protection of man immunized against sporozoite-induced falciparum malaria. **American Journal of Medical Science**. Hagerstown, v.266, p.398-403, 1973.
- COHEN, S., MCGREGOR, I.A., CARRINGTON, S.P. Gammaglobulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**. London, v.192, p.733-737, 1961.
- COLLINS, W.E., JEFFERY, G.M., SKINNER, J.C. Fluorescent antibody studies in human malaria. Development and persistence of antibodies to *Plasmodium*

- falciparum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, v.13, p.256-260, 1964.
- COLLINS, W.E., CONTACOS, P.G., SKINNER, J.C., HARRISON, A.J., GELL, L.S. Patterns of antibody and serum proteins in experimentally induced human malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. London, v.65, p.43-58, 1971.
- COLLINS, W.E., LUNDE, M.N., SKINNER, J. Development of antibodies to *Plasmodium vivax* as measured by two different serologic techniques. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, v.24, n.3, p.413-422, 1975.
- DE, M.K., CHANDRA, G., CHATTERJEE, K.K., HATI, A.K. *et al.* Role of splenomegaly in diagnosis and epidemiology of malaria. **Indian Journal of Malariology**. Kanpur, v.27, p.45-46, 1990.
- DEANE, L.M. Os grandes marcos na história do controle da malária. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brasília, v.25, supl. 2, n.12, p.22, 1992.
- DEL PORTILLO, H.A., GYSIN, J., MATTEI, D.M., KHOURI, E. UDAGAMA, P.V., MENDIS, K.N., DAVID, P.H. *Plasmodium vivax*: cloning and expression of a major blood-stage surface antigen. **Experimental Parasitology**. New York, v.67, n.2, p.346-353, 1988.
- DRUILHE, P., BOUHAROUN-TAYOUN, H. Natural immunity. **Research in Immunology**. Paris, v.142, p.637-643, 1991.
- DRUILHE, P., KHUSMITH, S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria-immune status. **Infection and Immunity**. Washington, v. 55, n.4, p.888-891, 1987.
- DRUILHE, P., PÉRIGNON, J.L. Mechanisms of defense against *P.falciparum* asexual blood stages in humans. **Immunology Letters**. Amsterdam, v.41, p.115-120, 1994.
- EDOZIEN, J.C., GILLES, H.M., UDEOZO, I.O.K. Adult and cord-blood immunoglobulin immunity to malaria in Nigerians. **The Lancet**. London, v.2, p.591-955, 1962.
- ELASSAD, M.A.S., YOUNIS, A.S, SIDDIG, M., GRAYSON, J., PETERSEN, E., GHALIB, H. W. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients **Clinical and Experimental Immunology**. Oxford, v.95, p.294-299, 1994.

- FERREIRA, M.U., KIMURA, E.S., CAMARGO, L.M.A., ALEXANDRE, C.O.P., PEREIRA DA SILVA, L.H., KATZIN, A.M. Antibody response against *Plasmodium falciparum* exoantigens and somatic antigens: a longitudinal survey in a rural community in Rondônia, Western Brazilian Amazon. **Acta Tropica**. Amsterdam, v.57, p.35-46, 1994.
- FERREIRA, M.U., KIMURA, E.A.S., SOUZA, J.M., KATZIN, A.M. The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: differential patterns in clinically immune africans and amazonian patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence, v.55, n.3, p.315-323, 1996.
- FONTES, C.J.; BATHURST, I.; KRETTLI, A.U. *Plasmodium vivax* sporozoite antibodies in individuals exposed during a single malaria outbreak in a non-endemic area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, v.44, n.1, p.23-33, 1991.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de terapêutica de malária**. Brasília: FNS, 1996. 99p.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - Coordenadoria Regional do Pará. seção de Epidemiologia. **Dados informatizados**, 1997.
- GALINSKI, M.R., BARNWELL, J.W. *Plasmodium vivax*: Merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. **Parasitology Today**. London, v.12, n.1, p.20-29, 1996.
- GOLEND, C.F., LI, J., ROSENBERG, R. Continuous *in vitro* propagation of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**: Washington, v.94, p.6786-6791, 1997.
- GREEN, T.J., KREIER, J.P. Demonstration of the role of cytophilic antibody in resistance to malaria parasites (*Plasmodium berghei*) in rats. **Infection and Immunity**. Washington, v.19, p.138-145, 1978.
- GROUX, H., GYSIN, J. Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. **Research in Immunology**. Paris, v.141, p.529-542, 1990.
- GROUX, H., PERRAULT, 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*. **European Journal of Immunology**. Baltimore, v.20, n.10, p.2317-2323, 1990.

- GYSIN, J., HOMMEL, M., PEREIRA DA SILVA, L. Experimental infection of the squirrel monkey *Saimiri sciureus* with *Plasmodium falciparum*. **Journal of Parasitology**. Lawrence, v.66, p.1003-1008, 1980.
- HISTÓRICO epidemiológico de malária no Amazonas e Manaus, período de 1985/1996. **Boletim Trimestral-IMT-AM**, Manaus, v.3, n.9, p.3, jan./mar., 1997.
- HOLDER, A.A., FREEMAN, R.R. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. **Journal Experimental Medicine**. New York, v.156, n.5, p.1528-1538, 1982.
- HOLDER, A.A., LOCKYER, J., ODINK, K.G., SANDHU, J.S., RIVEROS-MORENO, V. NICHOLS, S.C., HILLMAN, Y., DAVEY, L.S., TIZARD, M.L.V., SCHWARTZ, R.T., FREEMAN, R.R. Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum*. **Nature**. London, v.317, p.270-273, 1985.
- HOMMEL, M. Amplification of cytoadherence in cerebral malaria: towards a more rational explanation of disease pathophysiology. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. London, v.87, n.6, p.627-635, 1993.
- HUNTER, K.W., WINKELSTEIN, J.A., SIMPSON, T.W. Serum opsonic activity in rodent malaria: functional and immunochemical characteristics *in vitro*. **Journal of Immunology**. Baltimore, v.123, n.6, p.2582-2587, 1979.
- JEFFERIS, R., REIMER, C.B., SKVARIL, F., DE LANGE, G., LING, N.R., LOWE, J., WALKER, M.R., PHILLIPS, D.J., ALOISIO, C.H., WELLS, T.W., VAERMAN, J.P., MAGNUSSON, C.G., KUBAGAWA, H., COOPER, M., VARTDAL, F., VANDVIK, B., HAAIJMAN, J.J., MAKELA, O., SARNESTO, A., LANDO, Z., GERGELY, J., RAJNAVÖLYI, E., LÁSZLO, G., RADL, J., and MOLINARO, G.A. Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG subclasses: results of an IUIS/WHO collaborative study. **Immunology Letters**. Amsterdam, v.10, p.223-252, 1985.
- JEFFERY, G.M. Epidemiological significance of repeated infections with homologous and heterologous strains and species of *Plasmodium*. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v.35, n.6, p.873-882, 1966.
- KHALIFE, J., DUNNE, D.W., RICHARDSON, B.A., MAZZA, G., THORNE, K.J.I., CAPRON, A., BUTTERWORTH, A.E. Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Immunology**. Baltimore, v.142, p.4422-4427, 1989.
- KHUSMITH S, DRUILHE P. Specific arming of human monocytes by cytophilic IgG promotes *Plasmodium falciparum* merozoite ingestion [letter]. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.76, n.3, p.423-424, 1982.

- KHUSMITH, S., DRUILHE, P. Cooperation between antibodies and monocytes that inhibit *in vitro* proliferation of *P.falciparum*. **Infection and Immunity**. Washington, v.41, p.219-224, 1983.
- KHUSMITH, S., DRUILHE, P., GENTILINI, M. Enhanced *Plasmodium falciparum* merozoite phagocytosis by monocytes from immune individuals. **Infection and Immunity**. Washington, v.35, n.3, p.874-879, 1982.
- KOLLARITSCH, H., STOCK, C., SCHEINER, O., STEMBERGER, H. Immune response in patients with amoebiasis: evaluation of IgG-subclasses. **International Journal of Medical Microbiology**. Stuttgart, v.272, n.4, p.535-539, 1990.
- KWAN-LIM, G.E., FORSYTH, K.P., MAIZELS, R.M. Filarial-specific IgG4 response correlates with active *Wuchereria bancrofti* infection. **Journal of Immunology**. Baltimore, v.145, n.12, p.4298-4305, 1990.
- LEWIS, A.P. Cloning and analysis of the gene encoding the 230-kilodalton merozoite surface antigen of *Plasmodium yoelii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. Amsterdam, v.36, p.271-282, 1989.
- LOWE, J., BIRD, P., HARDIE, D., JEFFERIS, R., LING, N.R. Monoclonal antibodies (McAbs) to determinants on human gamma chains: properties of antibodies showing subclass restriction or subclass specificity. **Immunology**. Oxford, v.47, n.2, p.329-336, 1982.
- LUBY, J.P., COLLINS, W.E., KAISER, R.L. Persistence of antimalarial antibody. Findings in patients infected during the outbreak of malaria in Lake Vera, California 1952, 1953. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, v.16, p.255-257, 1967.
- LUNN, J.S., JACOBS, R.L., CONTACOS, P.G., COATNEY, G.R. Antibody production in *Plasmodium vivax* infections suppressed by weekly doses of chloroquine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, n.5, v.14, p.697-699, 1965.
- LUNN, S.J., CHIN, W., CONTACOS, M.P.G., COATNEY, G.R. Changes in antibody titers and serum protein fractions during the course of prolonged infections with vivax or with falciparum malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, v.15, p.3-10, 1966.
- MAITLAND, K., WILLIAMS, T.N., NEWBOLD, C.I. *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*: biological interactions and the possibility of cross-species immunity. **Parasitology Today**. London, v.13, n.6, p.227-230, 1997.
- MARQUES, A.C., GUTIERREZ, H.C. Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brasília, v.27, supl. 3, p.91-108, out./dez., 1994.

- MARQUES, A.C. Dados epidemiológicos de malária em todo o Brasil, referentes a 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brasília, v.28, n.2, p.141-155, 1995.
- MARSH, K., OTOO, L., CARSON, R.J., GREENWOOD, B.M. Antibodies to blood stage antigens of *P.falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**. v.83, p.293-303, 1989.
- McGREGOR, I.A., CARRINGTON, S.P., COHEN, S. Treatment of East African *P.falciparum* malaria with West African human gammaglobulin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.57, p.170-175, 1963.
- McGREGOR, I.A., WILSON, R.J.M. Specific immunity: acquired in man. In: WERNSDORFER, W.H., McGREGOR, I.A. **Malaria - Principles and practice of malariology**. London:Churchill Livingstone, 1988, v.1, p.559-619.
- McLEOD, C.L. Malaria. In: _____ **Parasitic Infections in Pregnancy and the Newborn**. Oxford: Oxford Medical Publications, 1988, p.8-42.
- MÉDICI, A.C. Mulher brasileira: muito prazer. In: _____. **Mulher, Saúde e Sociedade no Brasil**. E. Labra, org., Petrópolis: Vozes/Rio de Janeiro: Abrasco, 1989, p.71-118.
- MENDIS, K.N. Malaria vaccine research - a game of chess. In: TARGETT, G.A.T. **Malaria waiting for the vaccine**. London:John Wiley , 1991, p.183-196.
- MESSNER, R.P., JELINEK, J.G. Inhibition of gammaG-mediated in vitro phagocytosis by the C1q component of complement. **Clinical Immunology and Immunopathology**. New York, v.1, n.2, p.203-211, 1973.
- MILLER, L.H., POWERS, K.G., SHIROISHI, T. *Plasmodium knowlesi*: functional immunity and antimerozoite antibodies in *Rhesus* monkeys after repeated infection. **Experimental Parasitology**. New York, v.41, n.1, p.105-111, 1977.
- MORELL, A., SKVARIL, F., HIJZIG, W.H., BARANDUN, S. IgG subclasses: development of the serum concentrations in normal infants and children. **The Journal of Pediatrics**. St. Louis, v.80, p.960-964, 1972.
- MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I. Imunopatologia da malária: Mecanismos de imunidade. REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISADORES EM MALÁRIA, 5, SIMPÓSIO BRASIL COLÔMBIA SOBRE MALÁRIA, 1, Belém, 1996. Resumos. Belém: CNPq, SESP, IEC, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/MS. 1996, p. 76.
- NARDIN, E.H., NUSSENZWEIG, R.S., BRYAN, J.H., McGREGOR, I.A. Congenital transfer of antibodies against malarial sporozoites detected in

- Gambian infants. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, v.30, p.1159-1163, 1981.
- NEVA, F.A., SHEAGREN, J.N., SHULMAN, N.R., CANFIELD C.J. Malaria host-response mechanisms and complications. **Annals of Internal Medicine**. Philadelphia, v.73, n.2, p.295-306, 1970.
- NUSSENSZWEIG, R.S., VANDENBERG, J., MOST, H., ORTON, C. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. **Nature**. London, v.216, p.160-162, 1967.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Comité de Expertos en Malaria. 15º Informe. Ginebra:OMS, 1971. [Serie Informes Técnicos, 467].
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Diagnóstico de la malaria. Memorandum de una reunión de la OMS. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**. Washington, v.107, p.118-150, 1989.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Terminología del paludismo y de la erradicación del paludismo**. Ginebra, p.30-51, 1964.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Situación de los programas de malaria en las Américas**. XLVIII informe. Washington: OPS, sep. 1996[a].
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Atención de las enfermedades prevalentes en el contexto de la salud integral del niño**. Washington:1996[b]. p.1-2. (HCP/HCT/ARI/28.15/118-96 (E)).
- PASVOL, G., WEATHERALL, D.J., WILSON, R.J.M. Foetal haemoglobin on susceptibility of red cells to *Plasmodium falciparum*. **Nature**. London, v.270, n.5633, p.171-173, 1977.
- PATARROYO, M.E., AMADOR, R., CLAVIJO, P., MORENO, A., GUZMAN, F., ROMERO, P., TASCÓN, R., FRANCO, A., MURILLO, L.A., ONTON, G., TRUJILLO, G. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stage of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**. London, v.332, p.158-161, 1988.
- PÉRIGNON, J.L., DRUILHE, P. Immune mechanisms underlying premunition against *Plasmodium falciparum* malaria. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.89, supl. 2, p.51-53, 1994.
- PHILLIPS, R.E., FERVENZA, F.C., EICK, R.G. Malaria por *falciparum* na infância. **Anais da Academia Nacional de Medicina**. Rio de Janeiro, v.153, n.4, p.196-201, 1993.

- PRATA, A.L., URDANETA, M., MCGREEVY, P.B., TADA, M.S. Infrequency of asymptomatic malaria in an endemic area in Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brasília, v.21, n.2, p.51-54, 1988.
- RAMACHANDRAN, S., PERERA, M.V. Jaundice and hepatomegaly in primary malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, v.79, n.9, p.207-210, 1976.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. Anticorpos e seus receptores. In: _____. **Imunologia**. São Paulo. Ed. Manole., 4.ed., p.4.1-4.12, 1997.
- SABCHAREON, A., BURNOUF, T., OUATTARA, D., ATTANATH, P., BOUHAROUN-TAYOUN, H., CHANTAVANICH, P., FOUCAULT, C., CHONGSUPHAJASIDDHI, T., DRUILHE, P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, v.45, n.3, p.297-308, 1991.
- SHEAR, H.L., NUSSENZWEIG, R.S., BIANCO, C. Immune phagocytosis in murine malaria. **Journal of Experimental Medicine**. New York, v.149, n.6, p.1288-1298, 1979.
- SHUTE, G.T. The microscopic diagnosis of malaria. In: WERNSDORFER, W.H., MCGREGOR, I. **Malaria Principles and Practice of Malariology**. Curcill Livingstone, New York, 1988, v.1, p.781-814.
- SILVA, R.S.U., SOUZA, J.M., PINTO, A.Y.N., CALVOSA, V.S.P., ALMEIDA, P.M.M., SILVA, S.B., SANTOS, M.A., ABDON, N. Casos de malária autóctone na grande Belém (Belém e Ananindeua) em 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brasília, v.27, supl. I, p.410, 1994.
- SNEWIN, V.A., LONGACRE, S., DAVID, P.H. *Plasmodium vivax*: older and wiser? **Research in Immunology**. Paris, v.142, n.8, p.631-636, 1991.
- SOARES, I.S., RODRIGUES, M.M. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. In press. 1997.
- SPIEGELBERG, H.L. Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. **Advances in Immunology**. New York, v.19, n.0, p.259-294, 1974.
- SULZER, A.J., WILSON, M., HALL, E. Indirect fluorescent-antibody tests for parasitic diseases. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, v.18, n.2, p.199-205, 1969.
- TANABE, K., MACKAY, M., GOMAN, M., SCAIFE, J.G. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Journal of Molecular Biology**. London, v.196, p.273-287, 1987.

- TARGETT, G.A.T. Antibody response to *Plasmodium falciparum* malaria. Comparisons of immunoglobulin concentrations, antibody titres and the antigenicity of different asexual forms of the parasite. **Clinical and Experimental Immunology**. Lawrence, v.7, p.501-517, 1970.
- TAUIL, P.L. Agravar-se o quadro da doença no Brasil. **Ciência Hoje**. São Paulo, v.2 n.12, p.59-64, 1984.
- THE HUMAN immunity to the parasite is variable. **Prescriber (UNICEF)**. Washington, n.5, p.1-2, 1993
- TOBIE, J.E., ABELE, D.C., HILL, G.J., CONTACOS, P.G., EVANS, C.B. Fluorescent antibody studies on the immune response in sporozoite-induced and blood-induced vivax malaria and the relationship of antibody production to parasitemia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, v.15, p.676-683, 1966.
- TONELLI, E. Malária. In: _____. **Doenças infecciosas na infância**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1987, v.2, p.752-766.
- TOSTA, C.E., RUIZ G., WEDDERBURN N. Effects of lethal and non-lethal malaria on the mononuclear phagocyte system. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.16, p.58-67, 1983.
- TOSTA, C.E. Imunologia da malária. In: _____. **Imunologia das Infecções**. Belo Horizonte, p.93-126, 1992.
- TOSTA, C.E., MOURA, R.C.S. Protective antibodies to *Plasmodium falciparum* and immunity to malaria in an endemic area of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.81, p.177-184, 1986.
- UNDP/ World Bank/ WHO/ Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Malaria. In: **Tropical Disease Research: progress**. Twelfth report. Geneva, WHO, p.57-76, 1995.
- VOLLER, A. The immunodiagnosis of malaria. In: WERNSDORFER, W.H., MCGREGOR, Sir I. **Malaria - Principles and Practice of Malariology**. London: Curchill Livingstone, 1988, v.1, p.815-825.
- WAHLGREN, M., BERZINS, K., PERLMANN, P., PERSSON, M. Characterization of the immune response in *Plasmodium falciparum* malaria. II. IgG subclasses levels of anti-*P. falciparum* antibodies in different sera. **Clinical and Experimental Immunology**. Lawrence, v.53, p.135-142, 1983.
- WAHLGREN, M., PERLMANN, H., BERZINS, K., BJÖRKMAN, A. LARSSON, A., LJUNGSTRÖM, I., PATARROYO, M.E., PERLMANN, P. Characterization of the humoral immune response in *Plasmodium falciparum* malaria. III. Factors

influencing the coexpression of antibody isotypes (IgM and IgG1 to 4) **Clinical and Experimental Immunology**. Lawrence, v.63, p.343-353, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Exoerythrocytic and asexual blood-stage antigens of human malaria parasites: report of the tenth meeting of the scientific working group on the immunology of malaria**. WHO/TDR/IMMAL/SWG (10), 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZACION. **Vector control for malaria and other mosquito-borne diseases**. Geneva: WHO, p.1-3, 1995.

Anexo 1

TERMO DE PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO

Informação ao responsável do paciente participante do Protocolo do Projeto de pesquisa intitulado "**Plasmodium vivax**": **avaliação da resposta de anticorpos IgG em crianças expostas à malária**", sob coordenação dos pesquisadores Ana Yecê das Neves Pinto (médica) e Prof. Dr. José Maria de Souza.

Seu filho(a) está convidado a participar de um estudo que irá avaliar como se encontram as defesas do organismo de crianças no combate a malária vivax, doença que está atingindo sua criança no momento. Este estudo tem por objetivo avaliar quais anticorpos estão presentes no sangue destas crianças, a fim de entendermos melhor como funcionam as defesas humanas, contra o germe causador da malária

1 PROCEDIMENTOS

A partir de sua aceitação, a criança fará parte do grupo descrito, será submetida a exames de laboratório, ao contrário das crianças que não fizerem parte do projeto. O tratamento específico, será dado da mesma forma feita rotineiramente neste ambulatório, assim como os controles dos pacientes.

A criança vai ser inicialmente submetido a exame para diagnosticar a malária, antes mesmo de entrar no estudo, é o **EXAME DE PESQUISA DE PLÁSMODIO ("fura-dedo")**. **Se o resultado for positivo, então ela poderá ser eleita para participar do estudo, caso o Sr. responsável concorde.**

Também fará um exame de sangue (retirado da veia), que só é feito naqueles que participarem do projeto. Uma certa quantidade de sangue (20 ml) será retirada da veia da criança, para que seja feita pesquisa de anticorpos, no primeiro dia de tratamento, e ainda 7 dias, 60 dias, 120 dias e 180 dias após o início do tratamento.

2 POSSÍVEIS DESVANTAGENS

As coletas de sangue muito próximas (no primeiro e no oitavo dias de tratamento) serão provavelmente dolorosas e bastante difíceis, principalmente para crianças menores.

3 BENEFÍCIOS

Sua criança será avaliada por um pediatra diariamente, e enquanto durar o estudo terá acompanhamento médico e laboratorial gratuitos. Além disso, este estudo será feito na tentativa de descobriremos como as pessoas poderão se defender melhor contra os germes que causam malária, e aprendermos cada vez mais sobre como fazer uma vacina contra esta doença.

4 INCENTIVOS

Os participantes receberão vales - transporte diariamente, conforme sua necessidade, para o devido comparecimento às consultas.

Os participantes terão acompanhamento ambulatorial e laboratorial de sua doença, e poderão dispor de alguns exames de rotina, que porventura sejam necessários durante seu controle de cura, gratuitamente cedidos pelo Ambulatório do Programa de Malária do Instituto Evandro Chagas.

5 PARTICIPAÇÃO

A participação neste estudo **SÓ DEPENDE DA SUA VONTADE (é voluntária)**. Você pode se retirar sua criança do mesmo a qualquer momento que você (o responsável) deseje, ou mesmo a criança que já manifeste vontade própria. Neste caso, solicitamos que apenas explique seus motivos ao médico responsável. A relação com o médico e o tratamento de sua criança não serão de forma alguma afetadas, caso você não aceite participar, ou mesmo se interromper sua participação.

Antes e durante o estudo você tem o direito de esclarecer todas suas dúvidas com a médica responsável pelo estudo, e/ou quaisquer membro da equipe de atendimento do Ambulatório do Programa de Malária do Instituto Evandro Chagas.

CASO CONCORDE EM PARTICIPAR, VOCÊ DEVERÁ SEGUIR ESTRITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES QUE VENHAM A SER DADAS PELA EQUIPE, CASO CONTRÁRIO PODERÁ SER RETIRADO DO ESTUDO, DESDE QUE SEUS COORDENADORES ASSIM O DECIDAM.

TENDO DECIDIDO PELA PARTICIPAÇÃO DE SUA CRIANÇA NO ESTUDO, PEDIMOS ASSINAR E DATAR ABAIXO.

Declaro ter recebido informações satisfatórias referentes a minha participação no estudo acima referido.

Estou ciente dos benefícios e possíveis desvantagens de participar do estudo. Sei também que posso deixar o estudo se assim o desejar, sem que a qualidade dos cuidados médicos que me são oferecidos pelo Instituto Evandro Chagas seja afetada.

Assinatura: _____, Belém, _____/_____/_____

NOME DO RESPONSÁVEL (por extenso) _____

NOME DO PACIENTE _____

ASSINATURA DO MÉDICO _____

Anexo 3

Preparação do PBS (solução salina com fosfatos)

pH: 7,2

Osmolaridade:

Na₂HPO₄ (fosfato dissódico).....1,096g

KH₂PO₄ (fosfato monosódico).....0,315g

HCl (cloreto do sódio).....8,5g

Água destilada q.s.p.....1000ml

Anexo 2 (cont.)

15. DIAGNÓSTICO (mm³) ESQUEMA DIÁRIO

D/ DATA	PARASITEMIA	ESQUEMA TERAPÊUTICO
D0		
D1		
D2		
D3		
D4		
D5		
D6		
D7		
Dx		

16. TRATAMENTO

M.vivax 1. Cloroquina: 10 mg/kg 1º dia, 7,5 mg/kg 2º e 3º dia + primaquina: 0,25mg/kg/dia 14 dias
 2. Alternativo

17. RESPOSTA TERAPÊUTICA

1. Cura 2. Recaída 3. Reinfecção 4. Abandono

18. CONTRÔLE DE CURA (Parasitemia/mm³) / SOROLOGIA

EXAME/ D	D0	D7	D60	D120	D180
Parasitemia					
Títulos IgG					
Títulos IgG1					
Títulos IgG2					
Títulos IgG3					



