

**ROSILENE MALCHER RAMOS LEITE**

**RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG CONTRA A REGIÃO  
C-TERMINAL DA PROTEÍNA 1 DA SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTOS  
DE *Plasmodium vivax* EM INDIVÍDUOS QUE RESIDEM EM ÁREAS  
DE TRANSMISSÃO DE MALÁRIA NO ESTADO DO PARÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maristela Gomes da Cunha

**BELÉM - PARÁ**

2007

ROSILENE MALCHER RAMOS LEITE

RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG CONTRA A REGIÃO C-TERMINAL DA  
PROTEÍNA 1 DA SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTOS DE *Plasmodium vivax* EM  
INDIVÍDUOS QUE RESIDEM EM ÁREAS DE TRANSMISSÃO DE MALÁRIA  
NO ESTADO DO PARÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora                      Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maristela Gomes da Cunha  
   Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Banca Examinadora              Prof. Dr. Alvaro Augusto D`Almeida Couto  
   Faculdade SEAMA - AP

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Vanja Calvosa D`Almeida Couto.  
Ministério da Saúde, NES - AP

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Edilene Oliveira da Silva  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA (suplente)

Belém, 14 de Dezembro de 2007

**EPÍGRAFE**

*“Teus passos ficaram. Olhes para trás... mas vá em frente, pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te”.*

*Charles Chaplin*

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Adail Oliveira Ramos e Risete Malcher Ramos, pelo exemplo de dignidade e integridade, que tão dedicados sempre cuidaram com especial carinho da formação dos filhos. Obrigada por me aceitar como filha. Sempre amarei vocês!

Ao meu querido Francisco Furtado Leite, pela grata satisfação de tê-lo como um amigo e companheiro nesta encarnação. Agradeço a Deus por ter o merecimento de viver ao teu lado. Amo você!

Aos meus tesouros: André Felipe, Ananda e Ania Beatriz, mamãe sempre amará vocês! A minha irmã dessa jornada Helenir Malcher, pelo apoio e compreensão por minha ausência em diversas ocasiões; obrigada pelos cuidados dispensados.

Á todos da minha família que sempre torceram por mim, meus irmãos: Adailson, Alan Eder, Adson (em outro plano) e minhas irmãs: Rosely Lyenne e Rosane. Meus cunhados, André e Bonifácio, e cunhadas Tatiana e Marla Tatiane e a todos meus queridos sobrinhos.

Ao grande amigo do “Caminho” Dr. Fernando Brasil do Couto, agradeço pelo apoio a realização deste curso. Que esta obra de forma despretensiosa possa servir de fonte de conhecimento e incentivo para a realização de pesquisas para o controle malária.

## AGRADECIMENTO

Em especial, a **DEUS**, pelo seu amor incondicional e pela grande dádiva desta reencarnação para minha evolução moral e intelectual.

A Profa. Dra. Maristela Gomes Cunha, pela proposta de realização deste estudo, pelo esforço incondicional de tantas horas dispensada, pelo privilégio deste aprendizado, pelo estímulo sempre renovado em nossos encontros e a confiança depositada em mim neste estudo. Admiro muito você!

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia dos Agentes Infecciosos e parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, pelo apoio imprescindível na realização do Mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UFPA, Cassiana, Sheyla Patrícia, Eliane Silva, Tássia, Tiago Medina e Tiago Sabóia e do laboratório de Genética Humana da UFPA, Greice Moraes e Ailton, pela colaboração e disposição em ajudar nas coletas das amostras e nas análises laboratoriais.

A querida amiga Margareth Gomes, pelo incentivo na realização deste curso de Pós-Graduação e a todos os amigos que colaboraram em minha estadia na cidade de Belém.

À Universidade Federal do Pará e a Secretaria de Saúde do Estado do Amapá.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Esquema do processo de invasão.	15
Figura 2 – Resposta imune contra os diferentes estágios do ciclo de vida do parasito.	22
Figura 3 – Esquema do processamento enzimático da MSP1.	28
Figura 4 – Mapa político do estado do Pará.	38
Figura 5A – Percentagem de soros que apresentaram anticorpos IgG específicos contra a proteína recombinante His <sub>6</sub> -MSP1 <sub>19</sub> .	45
Figura 5B – Índice de reatividade (IR) das amostras positivas.	45
Figura 6A – Percentagem de soros que apresentaram anticorpos da classe IgG específicos contra a proteína recombinante His <sub>6</sub> -MSP1 <sub>19</sub> em relação a idade, na localidade de Três Boeiras.	50
Figura 6B – Índice de reatividade (IR) das amostras positivas, na localidade de Três Boeiras.	50
Figura 7A – Percentagem dos soros que apresentaram anticorpos IgG específicos contra a proteína recombinante His <sub>6</sub> -MSP1 <sub>19</sub> em relação ao número de episódios prévios de malária, na localidade de Três Boeiras.	50
Figura 7B – Índice de reatividade (IR) das amostras positivas, na localidade de Três Boeiras.	50
Figura 8A – Percentagem dos soros que apresentaram anticorpos da classe IgG específicos contra a proteína recombinante His <sub>6</sub> -MSP1 <sub>19</sub> em relação ao tempo decorrido desde o último episódio de malária, na localidade de Três Boeiras	51
Figura 8B – Índice de reatividade (IR) das amostras positivas, na localidade	51

de Três Boeiras.

Figura 9A – Percentagem dos soros que apresentaram anticorpos da classe IgG específicos contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> em 55 relação a idade, na localidade de São Luiz do Tapajós.

Figura 9B – Índice de reatividade (IR) das amostras positivas, na 55 localidade de São Luiz do Tapajós.

## RESUMO

Neste estudo avaliamos o potencial antigênico da proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> contendo a região C-terminal da Proteína 1 da Superfície de Merozoítos de *Plasmodium vivax*. Analisamos a aquisição e os níveis de anticorpos IgG, e comparamos duas áreas com transmissão de malária, localizadas nos municípios de Trairão e Itaituba, Pará. Foram analisadas 391 amostras, sendo 208 amostras coletadas em Três Boeiras (TB) e 183 em São Luiz do Tapajós (SLT). No momento da coleta, foi realizado o exame da gota espessa e foram obtidos dados como idade, número de episódios prévios de malária e tempo decorrido desde o último episódio. As amostras foram analisadas por (ELISA) e os aspectos imunoepidemiológicos foram descritos. A comparação entre as duas áreas mostrou que tanto a frequência de soros que reconheceram a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> como a concentração dos anticorpos IgG foi maior na população de TB, quando comparado com SLT. A frequência de soros positivos foi 64,42% e 20,22% e a média dos índices de reatividade foi  $6,11 \pm 4,58$  e  $2,56 \pm 1,96$ , respectivamente. A idade não influenciou a aquisição de anticorpos IgG na população mais expostas (TB), mas na população menos exposta (SLT) a percentagem de positivos aumentou entre os adultos. Nos grupos de indivíduos que relataram nunca terem tido malária, a frequência de positivos foi semelhante nas duas localidades. No grupo que relatou ter tido malária, a percentagem de positivos foi maior em TB. Nesses dois grupos, a concentração de anticorpos IgG foi maior na população de TB. Nas duas áreas, o número de episódio influenciou a resposta de anticorpos específicos, sendo que em TB contribuiu para o aumento da percentagem de positivos e da concentração de anticorpos, mas em SLT influenciou apenas na percentagem de positivos. Entretanto, nas duas áreas, não foi possível associar a resposta de anticorpo com proteção, uma vez que os mais expostos estavam tendo malária recentemente. As áreas de estudo apresentaram perfil diferente quanto à intensidade da transmissão de malária e a aquisição natural de anticorpos. Os aspectos imunoepidemiológicos mostraram que a exposição contínua ao parasito contribuiu para a aquisição de anticorpos IgG específicos contra antígeno da fase sangüínea de *P. vivax*. No entanto, esta resposta não foi efetiva para conferir proteção.



## ABSTRACT

In this study we evaluated the antigenic potential of recombinant protein His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> containing the C-terminal region from Merozoite Surface Protein -1 of the *Plasmodium vivax*. We analyzed the acquisition and the levels of IgG antibodies, and we compared two areas where there is malaria transmission, located in Trairão and Itaituba municipality of Pará state. Were analyzed 391 samples, which 208 were collected in Três Boeiras (TB) and 183 in São Luiz do Tapajós (SLT). In the moment of the collect of the samples, was performed the thick film examination and obtained the data as age, number of previous episodes of malaria and the time since the last episode. Samples were analyzed by ELISA and the immunoepidemiological aspects were described. The comparison between the two areas showed that either the percentage of sera that recognized His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> and the concentration of antibodies IgG were more higher into TB population when compared with SLT. The percentages of positive serum were 64.42% and 20.22% and the averages of reactivity were  $6.11 \pm 4.58$  e  $2.56 \pm 1.96$ , respectively. The age did not influence the IgG antibodies response acquired by more exposed populations (TB), however, in less exposed population (SLT) the positive percentage increased among the adults. In the group of individuals that reported never ever had malaria, the percentage of positives samples was similar in two localities. In exposed groups to malaria, the percentage of positive samples was higher in TB. The number of episodes influenced the specific antibodies response in both areas, and in TB contributed for the increase of the positive percentage and antibodies concentration, but in SLT, it influenced only the frequency of positives. However, it was not possible to associate the IgG antibodies response with protection, because the most exposed one related that had malaria recently. In different areas of study we observed different profile for the transmission intensity of malaria and natural acquisition of antibodies. Immunoepidemiological aspects showed that the continuous exposition to the parasite contributed for IgG specific antibodies acquisition against the antigens of the blood stage of *P. vivax*, however antibodies response was not protective.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	5
<b>RESUMO</b>	7
<b>ABSTRACT</b>	8
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	11
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	11
1.2 BIOLOGIA DO <i>PLASMODIUM</i> .	12
1.3 RESPOSTA IMUNE NA MALÁRIA	18
1.3.1 <b>Resposta imune contra o estágio pré-eritrocítico</b>	20
1.3.2 <b>Resposta imune contra o estágio eritrocítico</b>	21
1.4 PRINCIPAIS ANTÍGENOS DO ESTÁGIO SANGÜÍNEO DE <i>PLASMODIUM VIVAX</i>	25
1.5 RESPOSTA IMUNE CONTRA A REGIÃO C-TERMINAL DA MSP1 DE <i>PLASMODIUM VIVAX</i>	28
1.6 IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS IMUNOEPIDEMIOLÓGICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS	33
1.7 OBJETIVOS	36
1.7.1 <b>Objetivo Geral</b>	36
1.7.2 <b>Objetivos Específicos</b>	36
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	37
2.1 DESCRIÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO	37
2.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE	38
2.3 DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA PELO EXAME DA GOTA ESPESSA	39
2.4 OBTENÇÃO DO DNA	39
2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA PESQUISA DE <i>PLASMODIUM VIVAX</i> E <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	40
2.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE His <sub>6</sub> -MSP1 <sub>19</sub> DE <i>PLASMODIUM VIVAX</i>	41
2.7 ASPECTOS ÉTICOS	43
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43

		10
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	44
3.1	FREQÜÊNCIA DE SOROS QUE RECONHECERAM A PROTEÍNA RECOMBINANTE His <sub>6</sub> -MSP <sub>1-19</sub> CONTENDO A REGIÃO C-TERMINAL DA PROTEÍNA 1 DA SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTOS DE <i>P. VIVAX</i> (MSP <sub>1-19</sub> )	44
3.2	PERFIL IMUNOEPIDEMIOLÓGICO DA RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG ESPECÍFICOS CONTRA A MSP <sub>1-19</sub> NA LOCALIDADE DE TRÊS BOEIRAS, MUNICÍPIO DE TRAIRÃO, PA	45
3.3	PERFIL IMUNOEPIDEMIOLÓGICO DA RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG ESPECÍFICOS CONTRA A MSP <sub>1-19</sub> NA LOCALIDADE DE SÃO LUIZ DO TAPAJÓS, MUNICÍPIO DE ITAITUBA, PARÁ	53
3.4	ANÁLISE COMPARATIVA DA AQUISIÇÃO DE ANTICORPOS IgG QUE RECONHECEM ANTÍGENO DA FASE SANGÜÍNEA DE <i>P. VIVAX</i> E TRANSMISSÃO DE MALÁRIAS EM DUAS ÁREAS DE ESTUDO	61
	<b>DISCUSSÃO</b>	64
	<b>CONCLUSÕES</b>	72
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	74
	<b>ANEXOS</b>	86

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária é uma doença causada por protozoários intracelulares do filo Apicomplexa, ordem Eucoccidiida, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Neste gênero são identificadas cerca de 120 espécies, incluindo parasitos de roedores, aves, répteis, primatas não humanos e humanos. Entre estas espécies apenas quatro podem infectar humanos: *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium malarie* (Laveran, 1881) e *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922). Os parasitos que causam a malária são transmitidos ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles* (Bruce-Chwatt, 1985; Neves, 2005).

A malária é uma doença infecciosa que apresenta manifestação episódica de caráter agudo. Após a descrição do modo de transmissão, considerou-se que seria possível erradicar a doença, no entanto, a malária ainda é endêmica em cerca de 100 países. Atualmente, a Organização Mundial de Saúde estima que aproximadamente 300 a 500 milhões de casos clínicos de malária ocorram por ano, distribuídos em regiões tropical e subtropical da África, Ásia e América Central e do Sul (WHO, 2006).

As espécies mais prevalentes são *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. O *P. falciparum*, ocorre, principalmente, no continente Africano, com grande impacto na África Sub-Saariana, onde a mortalidade e a morbidade devido à malária representam um grave problema de saúde pública, causando um milhão de mortes por ano, afetando na grande maioria crianças menores de cinco anos e mulheres grávidas (Greenwood & Mutabingwa, 2002). O *P. vivax* é a segunda espécie mais prevalente, ocorrendo, principalmente, nos países da Ásia,

América Central e do Sul, sendo que dos 70 a 80 milhões de casos de malária registrados anualmente, cerca de 15% ocorrem na América do Sul. O *P. malariae* e o *P. ovale* apresentam distribuição restrita a determinadas áreas, e somente o *P. malariae* ocorre no continente Americano (Mendis *et al.*, 2001).

No Brasil, a malária é a mais expressiva das endemias, aproximadamente 99,5% dos casos da doença ocorrem na região da Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão. A permanência da malária na Amazônia Brasileira está diretamente associada às alterações demográficas, ecológicas, socioeconômicas e culturais ocorridas na região, as quais determinaram a reorganização do espaço geográfico e influenciaram a manutenção da transmissão (Brasil/SIVEP/MS, 2005, Motta, 1992).

Durante o ano de 2005, foram registrados 600.952 casos de malária na Amazônia brasileira, distribuídos nos estados do Amazonas (222.545 casos), Pará (122.442), Rondônia (118.534), Acre (57.105), Roraima (31.961), Amapá (28.052), Maranhão (11.159), Mato Grosso (8.436) e Tocantins (718). Em 2006, houve redução no número de casos, e foram registrados 540.047 casos. O *P. vivax* foi a espécie responsável por 73,4% desse total de casos (Brasil/SIVEP/MS, 2005; 2006). No Estado do Pará, a distribuição da malária é variável, assim como em toda a Amazônia, ocorrendo áreas com alta, média e baixa transmissão.

## 1.2. BIOLOGIA DO *PLASMODIUM*

O *Plasmodium* tem complexo ciclo de vida envolvendo dois hospedeiros, um invertebrado (hospedeiro definitivo), onde ocorre a fase sexuada. A fase assexuada da reprodução ocorre em vertebrados (hospedeiro

intermediário). Nesta fase, o ciclo inicia no fígado com a esquizogônia exo-eritrocítica, e, posteriormente, ocorre na circulação sangüínea a reprodução esquizogônica eritrocítica.

No homem, o ciclo de vida do parasito inicia-se quando o inseto *Anopheles* infectado inocula o esporozoíto. Esses migram, rapidamente, através da pele do indivíduo, a partir do local onde foram inoculados. Estudos em camundongos permitiram estimar que após o tempo de dez minutos, os esporozoítos entram na circulação sangüínea, e são levados ao fígado (Frevert, 2004; Gaur *et al.*, 2004). Esse curto período de tempo, provavelmente, é importante para o estabelecimento de uma infecção no hospedeiro, e minimiza possíveis interações com anticorpos circulantes ou com células do sistema imune inato presente no sangue (Mota, 2001). Embora os mosquitos possuam centenas de esporozoítos nas glândulas salivares, eles inoculam apenas um pequeno número. Estima-se que o número de esporozoítos inoculados seja de 15 a 200 parasitos (Mota & Rodriguez, 2004).

A sobrevivência e transmissão do esporozoíto dependem da capacidade do parasito em reconhecer o tipo de célula do hospedeiro apropriada e realizar a sua invasão. Após uma hora da inoculação, os esporozoítos não estão mais na circulação sangüínea e o parasito alcança o fígado, infectando os hepatócitos, após atravessar as células de Kupffer (Sinnis & Sim, 1997).

No hepatócito, o parasito encontra condições para iniciar a fase do ciclo denominada de esquizogonia hepática, quando os esporozoítos sofrem diferenciação e reprodução para dar origem aos esquizontes hepáticos, contendo milhares de merozoítos (Mota & Rodriguez, 2004). O esporozoíto transforma-se em uma forma arredondada, o criptozoíto. Estes iniciam o ciclo pré-eritrócítico ou

esquizogonia pré-eritrocítica com duração de 6 a 16 dias, dependendo da espécie de *Plasmodium*. Os esporozoítos do *P. falciparum* e *P. malariae* iniciam imediatamente a esquizogonia, enquanto que esporozoítos do *P. vivax* e *P. ovale* podem permanecer latentes no interior do hepatócito, na forma conhecida como hipnozoítos (Krotoski, 1985). O número de merozoítos originados por reprodução assexuada do tipo esquizogonia em cada hepatócito infectado, varia dependendo da espécie de *Plasmodium*. Após um período de 6 a 15 dias, dependendo da espécie, ocorre a ruptura dos hepácitos e, conseqüentemente, a liberação de milhares de merozoítos (Mota & Rodriguez, 2004; Moore *et al.*, 2002).

Os merozoítos que não foram destruídos pelas células de Kupffer invadem as hemácias e/ou reticulócitos e dão início à segunda fase do ciclo de reprodução assexuada do *Plasmodium*, o ciclo eritrocítico. Durante esta fase, ocorre à destruição das hemácias, sendo responsável pelas manifestações clínicas na malária. A invasão do eritrócito pelo parasito é um processo complexo, que envolve uma seqüência definida de eventos necessários para o reconhecimento e invasão. Estes eventos incluem a reorientação da extremidade apical ligante, formação juncional e formação da membrana do vacúolo parasitosporo (PVM) e a internalização do parasito (Gaur *et al.*, 2004). A organela apical é composta por micronema e roptrias, que são fontes de grânulos densos, os quais estão envolvidos em vários desses eventos (Wertheimer & Barnwell, 1989, Gaur *et al.*, 2004).

O ataque e a reorientação acontecem após o rompimento do hepatócito, quando as formas jovens são liberadas para a circulação sangüínea e os merozoitos hepáticos entram em contato com eritrócitos e iniciam reorientação da sua extremidade apical, para que os seus ligantes possam interagir com os

respectivos receptores presentes na superfície do eritrócito (Galinski & Barnwell, 1995).

Estudos realizados com merozoítos de *P. knowlesi* mostraram que o processo de invasão envolve interação molecular específica, e pode ocorrer sobre qualquer parte da superfície do merozoíto (Galinski & Barnwell, 1996). A dissociação e uma nova reorientação podem levar a correta orientação sobre a membrana do eritrócito. Para que ocorra este ajuste é necessária pouca afinidade, tornando o ataque um processo reversível (Cowman & Crabb, 2006). A proteína 1 da superfície do merozoíto (MSP1) tem sido proposta como um possível candidato para esta interação molecular (Holder & Riley, 1996; Gaur *et al.*, 2004) (Figura 1).

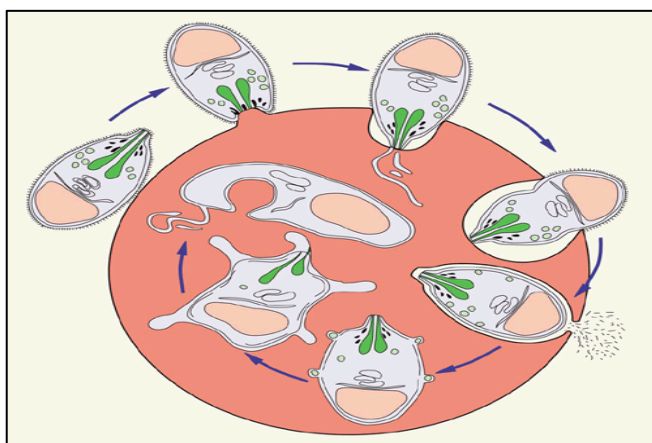


Figura 1: Esquema do processo de invasão (Fonte: Adaptado e Cowman & Crabb, 2006).

Estudos têm demonstrado que a porção C-terminal da MSP-1 do merozoíto está ancorada na molécula de glicosilfosfatidilinositol de 19-KDa, rica em cisteína e com propriedades para se ligar ao eritrócito, iniciando a entrada do



merozoíto. Possivelmente, a ligação seqüencial com o eritrócito, produz um gradiente de contato que facilita a orientação do movimento para a extremidade apical. Esta reorientação é um passo necessário para a entrada do merozoíto no eritrócito. A molécula que participa desta etapa da invasão ainda não está bem identificada, mas existem evidências que o antígeno 1 da membrana apical (AMA-1) pode ser a molécula responsável pela reorientação apical (Mitchel *et al.*, 2004).

Todos os ligantes que estão envolvidos na extremidade apical do merozoíto e na formação juncional estão localizados no micronema. Entre os ligantes está a MSP1, AMA1 e a proteína ligante do fator Duffy, encontrada no *P. vivax* e *P. Knowlesi*. Estas proteínas, ao contrario da circumesporozoíta que é encontrada na superfície do esporozoíto, não são visualizadas na superfície do merozoíto. Entre as funções do micronema tem sido incluída a regulação da capacidade secretora dos grânulos, com a liberação do conteúdo desses grânulos apenas quando há contato com o eritrócito alvo (Gaur *et al.*, 2004).

Após a interiorização, o merozoíto é envolvido pela membrana do vacúolo parasitoforo (Wertheimer & Barnwell, 1989). As proteínas das roptrias são liberadas dentro desse vacúolo e proteínas eritrocíticas são excluídas, ocorrendo a fusão da membrana eritrocítica (Frevort, 2004; Cowman & Crabb, 2006). Assim, o merozoíto não é interiorizado no eritrócito, mas envolvido pela membrana do vacúolo (Galinski & Barnwell, 1995, Sinnis & Sim, 1997).

A importância desses receptores e ligantes foi demonstrada em estudos que usaram ensaio de eritrócitos e parasitos marcados, e foi possível identificar a ligação desses parasitos com antígeno do grupo sangüíneo Duffy e com a glicoforina A. No *P. vivax* identificou-se a proteína de 140-KDa ligante de

Duffy e no *P.falciparum* a EBA-175, ligante da glicoforina A. As seqüências do gene e da proteína ligante de Duffy são semelhantes a EBA-175, constituindo membros de uma família ligante de eritrócitos. Essas proteínas apresentam três exons, que codificam a porção transmembrana e o domínio citoplasmático rico em cisteína, as quais são conservadas (Gaur *et al.*, 2004). Após algum tempo de evolução da infecção, aparece no interior das hemácias formas que já não se dividem mais; os gametócitos, que podem ser ingeridos pelos mosquitos e evoluírem para a forma esporozoíto, quando inoculados iniciarão o ciclo sexuado no inseto vetor.

O *P.falciparum* e o *P. vivax* apresentam diferenças na biologia do parasito, que determinam aspectos importantes da patologia, visto que essas duas espécies podem causar anemia severa, mas somente a infecção por *P. falciparum* causa malária cerebral (Miller *et al.*, 2002, Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003). Outra diferença é que o *P. vivax* pode permanecer no fígado na forma de hipnozoíto, e pode iniciar a infecção no estágio sangüíneo, após meses da infecção inicial pelo esporozoíto. Esta espécie também forma o complexo vesicular na membrana do eritrócito infectado, que contém as granulações de Schüffner (Galinski & Barnwell, 1996). O *P. falciparum* pode invadir hemácias jovens e maduras, enquanto o *P. vivax* invade somente reticulócitos. Esta invasão preferencial por reticulócitos é devido à presença da proteína ligante de reticulócito, além da restrição para invadir apenas hemácias de indivíduos Duffy positivos (Barnwell *et al.*, 1989).

A biologia da transmissão também é diferente, enquanto o *P. vivax* desenvolve-se em gametócito logo após a liberação do merozoíto pelo fígado, o *P. falciparum* desenvolve muito mais tarde os gametócitos. Assim, a transmissão do

*P. vivax* inicia antes do estado sintomático da doença, as altas parasitemias são raras e a mortalidade é limitada (Sinnis & Sim, 1997).

Em decorrência do ciclo eritrócítico, os sintomas são observados e se apresentam a cada 48 a 72 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. malariae*, respectivamente. Na infecção por *P. falciparum* as manifestações podem ocorrer em períodos variáveis ou mesmo continuamente (De Souza *et al.*, 1997).

O padrão de transmissão da malária é um aspecto epidemiológico que influencia a resposta imune dos indivíduos expostos naturalmente aos antígenos do parasito (Struik & Riley, 2004). Assim, estudos que analisam a epidemiologia da transmissão e a aquisição de anticorpos podem contribuir para a compreensão de mecanismos envolvidos na aquisição de resposta imune capaz de conferir algum grau de proteção.

### 1.3. RESPOSTA IMUNE NA MALARIA

A resposta imune na malária é complexa e ocorre contra combinações antigênicas distintas, formadas por antígenos polimórficos e/ou variações antigênicas que cada estágio do parasito pode apresentar. Desta forma, a constituição molecular do *Plasmodium sp* constitui uma complexidade necessária para o ciclo de vida, e a resposta imune contra esta diversidade de alvos antigênicos encontra uma organização do parasito que busca evadir de cada fase da resposta imune do hospedeiro (Struik & Riley, 2004; Riley *et al.*, 2006). Assim, o hospedeiro utiliza diferentes mecanismos efetores que envolvem a imunidade inata ou inespecífica e a adaptativa ou específica. Porém, os mecanismos imunológicos que participam da proteção clínica não estão bem definidos, apesar de diferentes modelos animais contribuírem, significativamente,

para a compreensão de vários aspectos da resposta imune na malária (Good & Doolan, 1999; Good *et al.*, 2004, Good, 2005).

A primeira evidência da participação dos anticorpos na malária humana foi observada a partir da transferência de imunoglobulinas purificadas do soro de indivíduos imunes que conferiram proteção no controle da parasitemia (McGregor *et al.*, 1963). Posteriormente, foi demonstrado que os anticorpos de indivíduos imunes podem controlar eficientemente a parasitemia levando a uma malária sub-clínica (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990; Bouharoun-Tayoun & Druilhe, 1992). Estudos *in vitro* demonstraram que anticorpos de indivíduos clinicamente imunes à malária são predominantemente imunoglobulinas citofílicas das subclasses IgG1 e IgG3. Estes anticorpos promovem a inibição da multiplicação do *Plasmodium* (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1999).

Após infecções repetidas, indivíduos que vivem em áreas de alta transmissão adquirem anticorpos contra vários antígenos do parasito e podem apresentar certo grau de imunidade clínica (Garraud *et al.*, 2003). Estes indivíduos desenvolveram mecanismos que podem controlar a densidade parasitária, prevenindo, assim, as manifestações graves e reduzindo o número de hemácias infectadas no sangue. Embora não elimine completamente a infecção, confere imunidade parcial. Em áreas de baixa transmissão, não é possível manter os níveis elevados de anticorpos. Desta forma, a aquisição deste tipo de proteção natural pode não ocorrer, mostrando que os mecanismos imunes efetores na proteção contra a doença podem não persistir na ausência da re-infecção (Struik & Riley, 2004; Stevenson & Riley, 2004).

Em humanos e em modelos animais, observou-se que as respostas mediadas pelas células do sistema imune podem controlar efetivamente a

parasitemia através de diferentes mecanismos efetores que envolvem a imunidade inata, as células dendríticas e os linfócitos B e T (Good *et al.*, 2004). Embora anticorpos e células T possam controlar a multiplicação do parasito, tem sido observado que o polimorfismo de antígenos alvos pode impedir uma resposta imune adequada. (Riley *et al.*, 2006).

Com base em estudos que mostraram que na malária a memória imunológica é de curta duração, foi proposto que característica como a diversidade antigênica e a imunidade estágio especificada interferem no desenvolvimento desta memória. Além disso, o parasito pode evadir dos mecanismos imune específicos, interferindo na apresentação de antígenos pelas células dendríticas (DCs) e na apoptose das células B de memória, e como consequência pode não ocorrer a ativação de clones celulares específicos (Riley *et al.*, 2006). Deve ser considerado que vários estudos analisaram os níveis de anticorpos séricos, a proliferação celular, a produção de citocinas e produção das células T e B, porém tais estudos não contribuíram para esclarecer a contribuição efetiva de cada subpopulação celular na resposta imune protetora na malária (Struik & Riley, 2004).

### **1.3.1. Resposta imune contra o estágio pré-eritrocítico**

No estágio pré-eritrocítico, que envolve esporozoítos e esquizontes hepáticos, a resposta imune adquirida contra os esporozoítos é específica e difere da resposta contra esquizontes. Os esporozoítos, apesar de sua rápida permanência no sangue, são capazes de estimular a produção de anticorpos que se liga a proteína circumsporozoíto (CS) localizada na superfície do *Plasmodium*, impedindo a invasão dos hepatócitos. Também ocorre indução de resposta imune

celular contra a proteína CS e outros antígenos presentes no esporozoito, esta resposta apresenta correlação entre a idade e a exposição repetida ao parasito (Herrera & Herrera, 2001; Lee *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2003; Herrera *et al.*, 2004).

Desde a década de 60, tem sido intensivamente estudada a resposta imune contra a CS, com a finalidade de identificar os mecanismos envolvidos na resposta imune protetora, visando o desenvolvimento de uma vacina contra a malária. Os resultados mostraram que a participação do interferon-  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e do óxido nítrico (NO) nesses mecanismos é importante, assim como a participação da Interleucina-12 (IL-12). Esta resposta caracteriza o perfil de resposta de células T helper do tipo TH1, que favorece a imunidade mediada por célula (Good *et al.*, 2005).

No estágio de esquizonte a imunidade protetora envolve anticorpos, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, células NK e citocinas. A principal citocina capaz de inibir o desenvolvimento do estágio hepático é o interferon-  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Struik & Riley, 2004).

Os mecanismos efetores da resposta imune que conferem proteção contra os parasitos na fase hepática foram descritos tanto em modelos murinos como na malária humana. A proteção imune foi caracterizada pela proliferação de linfócios T CD4+ e CD8+, produção de IFN- $\gamma$  e síntese de óxido nítrico (NO) (Good *et al.*, 2004; Good, 2005; Struik & Riley, 2004;).

### **1.3.2. Resposta imune contra o estágio eritrocítico**

A destruição de hemácias, durante o ciclo eritrocítico contribui, significativamente, para o agravamento da doença, e desencadeia uma cascata de

resposta inflamatória, como podemos observar na Figura 2. Se esta destruição não for controlada pode levar o paciente ao óbito. Durante esta resposta, ocorre a liberação de citocinas pelas células que participam da imunidade inata e adaptativa, resultando na manifestação dos sintomas clássicos; febre, cefaléia e calafrio. Esta mesma resposta decorrente da ativação do sistema imune pelo estágio sangüíneo também contribui para o controle da replicação do parasito, mantendo densidades parasitárias compatíveis com a sobrevivência do hospedeiro (De Souza *et al.*, 1997).

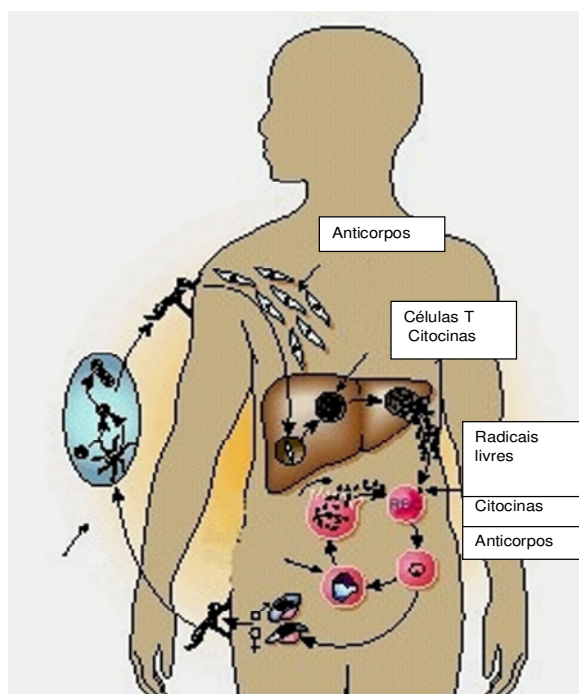


Figura 2: Resposta imune contra os diferentes estágios do ciclo de vida do parasito. (Fonte: Adaptado de Richie & Saul, 2002).

A produção do Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) tem sido demonstrada em estudos que interfere na supressão da hematopoeiese na médula óssea e na eritrofagocitose de células vermelhas, contribuindo significativamente, para a anemia na malária. Os estudos têm confirmado que o

TNF- $\alpha$  está envolvido com esses dois mecanismos. Assim, componentes do parasito, toxinas e moléculas de glicofosfatidilinositol, podem estimular diretamente os macrófagos para produzirem esta citocina (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003).

A ativação da resposta imune humoral por antígenos das formas sangüíneas é responsável pelo fenômeno de premunicação, que consiste no aumento ou manutenção da infecção crônica com a produção de altos níveis de anticorpos, induzindo inibição celular dependente de anticorpo (ADCI) (Bouharoun-Tayon & Druilhe, 1992; Tebo *et al.*, 2001), em geral este fenômeno tem sido descrito em situações onde os indivíduos residem em áreas de alta transmissão, promovendo proteção clínica ao indivíduo (Bouharoun-Tayon *et al.*, 1990, Shi *et al.*, 1999, Tebo *et al.*, 2001, Singh *et al.*, 2001).

A transferência passiva de soro imune foi capaz de causar redução significativa na parasitemia periférica, melhorando as condições clínicas, porém esse resultado temporário, com duração de 10 a 15 dias estava associado com um notável aumento no volume do baço. Existem relatos de que somente o anticorpo não bloqueia a invasão da célula vermelha pelo parasito. Em experimentos com *P. falciparum*, observou-se que a proteção contra o estágio sangüíneo assexuado envolve, preferencialmente, as subclasses de anticorpos citofílicos, IgG1 e IgG3, que juntamente com monócitos e macrófagos, têm papel fundamental na imunidade antimalária (Ferreira & Ribeiro, 2000).

A resposta imune contra os estágios eritrocíticos assexuados também envolve mecanismos independentes de anticorpos, sendo que as células T CD4+ têm um papel importante na indução e manutenção desta resposta (Carvalho *et al.*, 2002). O IFN- $\gamma$  e as células T CD4+ de memória ativam macrófagos para capturar parasito intra-eritrocíticos e merozoitos livres, e, assim,



promovem a retirada desses parasitos da circulação. (Bouharoun-Tayon *et al.*, 1990). As células T CD4<sup>+</sup> podem ser divididas em duas sub-populações, dependendo do perfil de secreção de citocinas. Os linfócitos TH1 induzem, preferencialmente, a resposta imune celular com produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, que levam à ativação de macrófagos e outras células efetoras, como células dendríticas. Os linfócitos TH2 induzem, preferencialmente, a resposta imune humoral com produção das citocinas IL-4, IL-10, que antagonizam a ação das citocinas pró-inflamatórias (Malaguarnera & Musumeci, 2002; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003).

A existência de subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> específicas contra antígenos de *Plasmodium* tem sido demonstrada *in vitro*, tanto em camundongos como em humanos. A análise da reatividade de clones de células T CD4<sup>+</sup> específicos contra antígenos eritrocíticos de *P. Chabaudi* mostrou heterogeneidade consistente com a participação dos dois subtipos de células T CD4<sup>+</sup>, as quais são funcionalmente diferentes. As células derivadas de infecção primária secretavam IL-2 e IFN- $\gamma$  e, após estímulo antigênico, *in vitro*, observou-se negatificação da parasitemia. Durante o curso da infecção, observou-se declínio da subpopulação TH1 e aumento de TH2, ou seja, subpopulação de células produtoras de IL-4 e com função auxiliar na síntese de anticorpos, os quais atuaram no controle da infecção (Taylor-Robinson *et al.*, 1993).

O curso da infecção é dependente do equilíbrio entre as citocinas secretadas por vários tipos de células ativadas. A exacerbação da produção de citocinas pode causar efeitos sistêmicos, tais como anemia grave e malária cerebral (Luty *et al.*, 1999; Malaguarnera & Musumeci, 2002).

Os eritrócitos não expressam moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) de classe I e II, limitando, portanto, a imunidade celular. Desta forma, a resposta imune contra o estágio eritrocítico é predominantemente dependente dos mecanismos da imunidade humoral, tais como neutralização dos merozoítos, lise mediada pelo sistema complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), embora outros mecanismos protetores também participam, como os mediados por linfócitos T CD4+ (Moore *et al.*, 2002).

#### 1.4. PRINCIPAIS ANTÍGENOS DO ESTÁGIO SANGÜÍNEO DE *P. VIVAX*

Os principais antígenos do estágio eritrocítico utilizados para estudar a resposta imune contra o *P. vivax* são as proteínas da superfície do merozoíto (PvMSP-1), a "Duffy-binding protein" (PvDBP), o Antígeno-1 da membrana apical (PvAMA) e as proteínas de ligação do reticulócito 1 e 2 (PvRBP-1 e PvRBP-2) (Espinosa *et al.*, 2003) e os antígenos variantes das subfamílias vir A, B, C, D e E (Del Portillo *et al.*, 2001), reconhecidos por soros de pessoas que relataram terem tido malária. (Rodrigues *et al.*, 2003).

A família das MSPs de *P. vivax* é constituída de dez proteínas MSP-1, MSP-3 $\alpha$ , MSP-3 $\beta$ , MSP-3 $\gamma$ , MSP-4, MSP-5, MSP6, MSP-7, MSP-8 e MSP-9 (Espinosa *et al.*, 2003). A proteína 1 da superfície do merozoíto (MSP-1) tem sido a mais intensamente estudada como um alvo potencial para proteção imune. Esta glicoproteína foi completamente seqüenciada em várias espécies de *Plasmodium* e sua massa molecular varia de 180 KDa a 230KDa (Holder & Blackman, 1994).

A proteína AMA1 também tem sido estudada, constituindo com a MSP1 os principais antígenos candidatos para o desenvolvimento de vacinas

contra a malária causada por *P. vivax*. Durante a esquizogonia, estas duas proteínas são processadas por clivagens proteolíticas e geram fragmentos imunogênicos e estão relacionadas com o processo de invasão das hemácias pelo parasito. AMA-1 está localizada no micronema do complexo apical e apresenta uma forma precursora de 83 KDa. Existem duas proteases nas organelas secretoras que são responsáveis pelo processamento e geração de dois produtos solúveis, um de 44KDa e outro de 48 KDa (Dutta *et al.*, 2003).

O gene que codifica a proteína MSP1 apresenta segmentos conservados, semiconservado e polimorfo ou bloco variado. Este gene é constituído por 10 blocos conservados denominados de ICBs (Interespecies Conserved Blocks), o bloco ICB2 está localizado na região que codifica para a porção N-terminal e o bloco ICB-10 localizado na região que codifica para a porção C-terminal, correspondendo a MSP1<sub>19</sub> (Del Portillo *et al.*, 1991).

A região conservada apresenta homologia intra-espécies, quando comparadas com outras espécies de *Plasmodium*. A porção de 19 KDa de *P. vivax*, apresenta uma variação dimórfica, que foi caracterizada nas cepas Belém e Salvador (Gibson *et al.*, 1992). O dimorfismo relatado em isolados da Ásia não foi verificado em isolados no Brasil (Soares *et al.*, 1999a). Posteriormente, foi descrito em cepas de parasito do Sri-Lanka, Colômbia e Tailândia um terceiro tipo de região variável, gerado por recombinação inter-alélica (Lim *et al.*, 2000). A MSP-1 do *P. vivax* é muito semelhante a do *P. falciparum* em quase toda a estrutura, incluindo os dois domínios semelhantes ao fator de crescimento epidermal na região carboxil-terminal, assim como outras proteínas desta família, e também é ligada à superfície da membrana por âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Ferreira & Soares, 2000).

Durante a esquizogonia intracelular, ocorre clivagem proteolítica, liberando outras moléculas para a superfície do merozoíto (Figura 3). O polipeptídeo da cadeia primária sofre a primeira clivagem, originando quatro fragmentos de 82, 28, 38 e 42 KDa. Após uma segunda clivagem, o fragmento 42 KDa origina dois fragmentos, um de 33 KDa, que corresponde a porção N-terminal, e outro de 19 KDa, que corresponde a porção C-terminal (MSP1<sub>19</sub>). Esse último fragmento permanece ligado à superfície do merozoíto (Blackman *et al.*, 1990). A porção C-terminal da MSP1 (MSP1<sub>19</sub>) de várias espécies consiste de dois domínios, cada um com seis resíduos de cisteína e um domínio ligante do Fator de Crescimento Epidermal Like (EGF). Esta estrutura constitui um alvo antigênico importante para o desenvolvimento de vacina (Soares *et al.*, 1997; Ferreira & Soares, 2000, Cunha *et al.*, 2001; Rosa *et al.*, 2004).

Apesar da conservação da estrutura de MSP1, existem várias modificações de aminoácidos entre as diferentes espécies de parasito. Este polimorfismo observado em cepas da mesma espécie é um aspecto importante para o desenvolvimento de vacina. Em estudo com *P. yoelii*, as substituições encontradas na MSP1 foram imunologicamente importantes, visto que anticorpos protetores reconheciam epítomos polimórficos (Ferreira & Soares, 2000).

A importância biológica da MSP-1 para sobrevivência do parasito é desconhecida. No entanto, está bem estabelecido que anticorpos que reconhecem a região C-terminal são capazes de bloquear a invasão do merozoíto de *P. falciparum* in vitro e conferir imunidade passiva em modelos murinos e primatas não humanos, atuando na opsonização e fagocitose das células parasitadas, aglutinação dos esquizontes evitando a dispersão e inibição de citoaderência ou formação de rosetas (Tebo *et al.*, 2001, O'Donnell *et al.*, 2000).

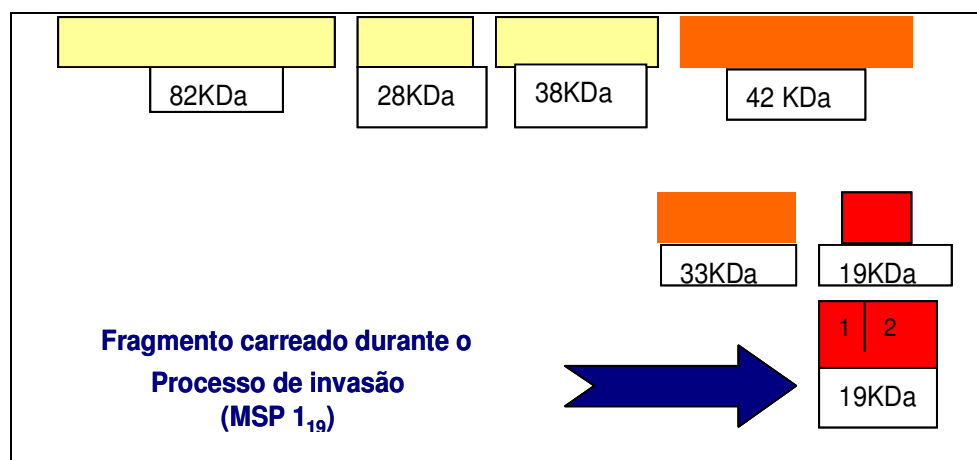


Figura 3: Esquema do processamento enzimático da MSP1 (Fonte: primária)

### 1.5. RESPOSTA IMUNE CONTRA A REGIÃO C-TERMINAL DA MSP1 DE *PLASMODIUM VIVAX*.

A porção C-terminal da MSP1 de *P.vivax* (PvMSP1<sub>19</sub>) é um dos alvos para a resposta imune contra o parasito, quando os indivíduos são expostos naturalmente à malária. Vários estudos mostraram que esta proteína é reconhecida por anticorpos IgG e sugerem que o seu potencial imunogênico é capaz de induzir resposta imune protetora em humanos (Soares *et al.*, 1997; 1999a; 1999b; 1999c; Park *et al.*, 2000; Cunha 2001; Nina, 2004). Os estudos em modelos experimentais utilizados para avaliar a imunogenicidade de proteínas recombinantes contendo esta porção de 19KDa mostraram que esse antígeno induziu imunidade protetora em camundongos (Perera *et al.*, 1998) e em macacos (Yang *et al.*, 1999).

Em 1997, Soares e colaboradores realizaram o primeiro estudo acerca da resposta imune humana contra a MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax*. O reconhecimento de dez proteínas recombinantes contendo diferentes porções da

MSP1 foi comparado e a porção C-terminal foi mais reconhecida por soros de indivíduos residentes em Belém, Pará, que as proteínas da região N-terminal.

A proteína recombinante ICB10, que representava a região C-terminal foi reconhecida por 62,2% dos soros, enquanto que a porcentagem de indivíduos que reconheceram as proteínas da região N-terminal foi 51,4%. Entre as proteínas recombinantes da região N-terminal a ICB2-3, ICB3-4, ICB2-5 e P4-ICB5 foram as mais reconhecidas. Neste estudo também foi verificado que os títulos de anticorpos específicos contra a ICB10 foram significativamente mais altos, quando comparados com os títulos de anticorpos que reconheceram a proteína recombinante ICB2-5, o antígeno da porção C-terminal mais reconhecido. Os níveis de anticorpos foram influenciados pela exposição repetida, uma vez que os indivíduos que relatam mais de quatro episódios de malária apresentaram níveis mais altos, quando comparados com os que tiveram apenas um episódio de malária (Soares *et al.*, 1997).

Estudo imunoepidemiológico realizado na Ilha de Cotijuba, analisou a influência da exposição natural e da idade na aquisição de anticorpos IgG. Foram analisadas 104 amostras, sendo que 31 indivíduos tiveram malária a menos de seis meses, 41 tiveram pelo menos um episódio de malária há mais de seis meses e 32 nunca apresentaram episódio de malária. Observou-se que o grupo exposto mais recentemente, apresentou maior frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos da classe IgG que reconheceram duas proteínas recombinantes derivadas da MSP1 de *P. vivax*. As proteínas recombinantes utilizadas neste estudo foram produzidas em fusão com a glutathione S-transferase

e denominadas de MSP1<sub>19</sub> e ICB2-5, representando as porções C e N-terminais, respectivamente. (Soares *et al.*, 1999c)

Nos grupos que relataram terem tido malária, a proteína MSP1<sub>19</sub> foi mais reconhecida que a ICB2-5. No entanto, a resposta não aumentou com a idade. A ICB2-5 foi menos reconhecida, porém a resposta foi influenciada pela idade. Também foi verificado por imunofluorescência que 76,6% dos indivíduos apresentavam anticorpos capazes de reconhecerem proteínas nativas do parasito (Soares *et al.*, 1999c)

A persistência da resposta de anticorpos capaz de reconhecer a porção C-terminal da MSP1 de *P. vivax* foi avaliada em amostras coletadas durante a infecção patente e dois meses após o tratamento. Nesta comparação, observou-se que após o tratamento houve diminuição significativa no número de pacientes que continuava positivo (Soares *et al.*, 1997; 1999a; 1999b; Cunha *et al.*, 2001).

O papel das diferentes subclasses de anticorpos IgG específicos contra a PvMSP1<sub>19</sub> ainda é pouco conhecido. Os estudos imunoepidemiológicos realizados no Brasil destacaram que anticorpos citofílicos das subclasses IgG1 e IgG3 são predominantes na resposta contra este antígeno (Soares *et al.*, 1997; 1999a; Nina 2004). Durante a infecção patente e após o tratamento estas subclasses foram detectadas em maior número de indivíduos, quando comparado com as subclasses IgG2 e IgG4 (Soares *et al.*, 1999a).

O reconhecimento imune da PvMSP1<sub>19</sub> também foi analisado com amostras de soros de indivíduos Koreanos. Neste estudo, observou-se que cerca de 90% de indivíduos infectados por *P. vivax* apresentaram anticorpos específicos

para PvMSP1<sub>19</sub> (Lim *et al.*, 2000). Outro estudo realizado na Korea mostrou que a resposta de anticorpos IgG anti-PvMSP1 é mantida por período longo. Os anticorpos foram detectados no soro por período que variou de 4 a 6 meses, após o tratamento com drogas antimaláricas. Além dos anticorpos IgG também foram detectados anticorpos da classe IgM (Park *et al.*, 2000).

A comparação da imunogenicidade da região C-terminal e N-terminal foram realizados avaliando a resposta de célula T em camundongos BALB/c imunizados com os antígenos PvMSP1<sub>42</sub> e PvMSP1<sub>19</sub>, utilizando diferentes adjuvantes. Observou-se que esses dois antígenos induziram proliferação específica das células mononucleares, quando utilizaram os adjuvantes CFA (adjuvante completo de Freund) e alum (hidróxido de alumínio). A imunização com a PvMSP1<sub>19</sub> em CFA e alum estimulou a produção de IFN- $\gamma$ , caracterizando a participação de linfócitos TH1 na resposta. Em relação à resposta de anticorpos, houve produção de altos títulos de anticorpos da classe IgG1 e níveis baixos de IgG2a, caracterizando o perfil de resposta TH2. Este estudo além de confirmar a imunogenicidade da PvMSP1<sub>19</sub>, mostrou que a ativação das subpopulações TH1 e TH2 é a situação ideal ser alcançada com a imunização com um antígeno candidato ao desenvolvimento de uma vacina contra o estágio sangüíneo do parasito (Sachdeva *et al.*, 2004).

Recentemente, a imunização de macacos *Aotus* com polipeptídeos recombinantes derivados da MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax* mostrou que a resposta de anticorpos e a produção de IFN- $\gamma$  estavam associadas com a indução de imunidade. Observou-se que todos os macacos imunizados produziram anticorpos contra o parasito, apresentando títulos altos com negatificação da parasitemia. Este resultado mostra que os anticorpos foram protetores em macacos *Aotus* vacinados



e desafiados. No entanto, a associação da produção de IFN- $\gamma$  com a proteção não ficou bem estabelecida (Barrero *et al.*, 2005).

Os anticorpos citofílicos, devido as suas propriedades, podem participar dos mecanismos efetores mediados por uma resposta específica contra a PvMSP1<sub>19</sub>. Tem sido proposto que estas subclasses atuam em cooperação com monócitos, levando a liberação de TNF- $\alpha$ , que seria responsável pela ação direta para inibir o crescimento do parasito, além de participarem da opsonização de eritrócitos infectados, favorecendo a fagocitose (Garraud *et al.*, 2003).

A PvMSP1<sub>19</sub> é imunogênica durante a infecção natural induzindo também resposta mediada por linfócitos T, sendo mais reconhecida que antígenos da região N-terminal da MSP1, provavelmente, devido a região C-terminal ser menos polimórfica que a região N-terminal. Além disso, a conformação também poderia favorecer a expressão de epítomos de linfócitos B e T (Soares *et al.*, 1999b; Rodrigues *et al.*, 2003a).

Cunha e colaboradores (2001) caracterizaram a resposta de anticorpos IgG contra seis proteínas recombinantes contendo a MSP1<sub>19</sub>, e observaram que a proteína expressa em fusão com apenas seis resíduos de histidina e contendo 89 aminoácidos para a região C-terminal da proteína 1 da superfície do merozoito (His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>) foi a mais reconhecida por soros de indivíduos expostos à malária. Estes resultados indicaram que essa proteína recombinante apresentava características mais próximas da proteína nativa que o recombinante utilizado nos estudos anteriores, produzidos em fusão com a glutathione s-transferase (Soares *et al.*, 1997; 1999b; 1999c). Tais estudos são relevantes para esclarecer se esses anticorpos podem favorecer a aquisição de algum grau de proteção na malária causada por *Plasmodium vivax*

Com o intuito de ampliar o conhecimento acerca do perfil imunoepidemiológico da resposta contra a PvMSP1<sub>19</sub>, foi analisada a resposta de anticorpos em amostras de soros de indivíduos que residiam na Ilha de Cotijuba, Belém, Pará, uma área de transmissão exclusiva de *P. vivax*. Foram analisadas 444 amostras quanto à presença de anticorpos IgG específicos contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> e a proteína nativa. Os anticorpos foram capazes de reconhecer tanto a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, o antígeno recombinante, como antígenos das formas sangüíneas. A freqüência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> e contra as formas sangüíneas foi 22,7% e 13,7%, respectivamente (Nina, 2004).

#### 1.6. IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS IMUNOEPIDEMIOLÓGICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

O controle da malária tem sido feito através de medidas profiláticas individuais, ou de massa, como quimioterapia e controle dos mosquitos vetores usando inseticidas. Com base nos dados da Organização Mundial da Saúde observa-se que nos últimos 50 anos, a área geográfica afetada pela malária diminuiu consideravelmente graças a essas medidas estratégicas de combate à doença. Entretanto, na maioria das áreas de transmissão, o controle está cada vez mais difícil e o número de casos têm aumentado ano a ano. As razões para o aumento no risco de casos de malária são de ordem sócio-econômica, mudanças climáticas globais e locais, e biológicas pelo aparecimento de parasitas resistentes a múltiplas drogas e vetores resistentes aos inseticidas.

Para impedir essa expansão e controlar a doença será necessário mais esforço para programar as estratégias propostas para o controle da malária, bem como desenvolver novas estratégias. No âmbito desta proposta acredita-se que o desenvolvimento de vacinas seria uma estratégia importante para complementar as medidas convencionais empregadas para a prevenção e controle da doença.

Nos últimos 40 anos, foram feitos inúmeros avanços na caracterização dos antígenos e dos mecanismos imunológicos efetores na malária humana, visando o desenvolvimento de vacinas. Em geral, os estudos avaliaram preparações vacinais contendo antígenos de *P. falciparum*. Foram testadas vacinas multi-estágio com antígenos das diferentes formas do parasito, preparações vacinais de vírus atenuado geneticamente contendo antígenos da fase pré-eritrocítica e preparações contendo antígenos da fase eritrocítica, incluindo os antígenos MSP1 e AMA1 de *P. falciparum*. Também tem sido proposto o desenvolvimento de vacina contendo antígenos de gametócitos.

Vários estudos estão sendo conduzidos com a finalidade de desenvolver uma vacina contra a malária (Carvalho *et al.*, 2002, Herrera *et al.*, 2007). Os estudos realizados em áreas endêmicas de malária levaram ao conhecimento de que a exposição contínua aos antígenos de *Plasmodium* pode contribuir para a aquisição de imunidade protetora, tais estudos avançaram quando a engenharia genética por meio da tecnologia do DNA recombinante possibilitou produzir quantidades suficientes de antígenos candidatos a compor uma vacina (Rodrigues *et al.*, 2003b).

Apesar de detectar resposta imune em modelos experimentais e voluntários humanos, ainda não há vacina disponível para uso humano (Moore *et al.*, 2002). No caso do *P. vivax*, as preparações também incluem antígenos de diferentes estágios, porém os estudos são mais restritos. No entanto, deve ser destacado que tais estudos são de grande relevância para países onde esta espécie de *Plasmodium* é predominante, como é o caso do Brasil.

Nas áreas de transmissão de malária, a exposição contínua aos antígenos do parasito contribui para a aquisição de anticorpos específicos, sendo que a detecção e a análise dos níveis desses anticorpos em estudos imunoepidemiológicos podem fornecer informações sobre o grau de imunidade dos indivíduos que residem nestas áreas, contribuindo para a compreensão da resposta imune natural, com ênfase ao desenvolvimento de vacinas.

Neste estudo pretendemos avaliar a resposta de anticorpo contra a porção C-terminal da PvMSP1, para melhor compreender os aspectos epidemiológicos que podem influenciar na resposta imune contra antígenos da fase assexuada. Para tanto, será caracterizado o perfil imunoepidemiológico em duas áreas de transmissão de malária, localizadas no estado do Pará, com a finalidade de avaliar se a idade, número de episódios prévios de malária e o tempo decorrido desde o último episódio de malária podem influenciar na resposta de anticorpos IgG específicos contra o antígeno das formas assexuadas sangüíneas de *Plasmodium vivax*.

## **1.7 OBJETIVOS**

### **1.7.1 Objetivo Geral**

Avaliar a resposta imune de anticorpos IgG que reconhecem antígeno da fase sangüínea de *Plasmodium vivax* em indivíduos expostos naturalmente à malária.

### **1.7.2 Objetivos Específicos**

1. Avaliar o reconhecimento imune e os níveis de anticorpos IgG que reconhecem a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> contendo a porção C-terminal da Proteína 1 da Superfície de Merozoítos de *P. vivax*.
2. Descrever o perfil imunoepidemiológico da aquisição de anticorpos IgG de acordo com a idade, número de episódios prévios de malária e tempo decorrido desde o último episódio de malária.
3. Comparar a resposta de anticorpos IgG que reconhecem antígeno candidato vacinal da fase sangüínea de *P. vivax*, em duas áreas de transmissão de malária, localizadas nos municípios de Itaituba e Trairão, no estado do Pará.
4. Comparar a ocorrência de casos malária nas duas áreas de estudo, durante os anos de 2005 e 2006.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. DESCRIÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

As amostras de sangue analisadas nesse estudo foram obtidas de indivíduos que residiam em duas áreas de transmissão de malária, a localidade de Três Boeiras, localizada na área do município de Trairão com área territorial de 11.991,02 km<sup>2</sup>, microrregião de Trairão, no Sudoeste Paraense e a localidade ribeirinha de São Luiz do Tapajós, no município de Itaituba, área territorial de 62.040,95km<sup>2</sup>, Microrregião de Itaituba, no Sudoeste Paraense, tem as seguintes coordenadas geográficas: 04° 16' 24" S e 55° 59' 09" W Gr (Figura 4). A região é caracterizada pelo clima tropical típico da Amazônia (quente e úmido). A estação chuvosa tem duração de dezembro a março e o período seco estende-se de abril a novembro, neste período registra-se o maior número de casos de malária.

As duas localidades possuem população em torno de 300 a 400 habitantes que sobrevivem da pesca, da agricultura familiar e do extrativismo vegetal. A transmissão de malária é variável, sendo que o maior número de casos ocorre por *P. vivax*. As condições sanitárias são precárias, uma vez que não existe saneamento básico, como esgoto e abastecimento de água tratada.

As duas áreas de estudo caracterizam-se por estarem localizadas na área de abrangência da BR-163 (Cuiabá-Santarém), sendo que esta rodovia atravessa a localidade de Três Boeiras, cuja população é formada em grande parte por migrantes de outros estados. A localidade de São Luiz do Tapajós está à margem do rio Tapajós, afastada cerca de 60 km desta rodovia e a maior parte da sua população é descendente de índios nativos e negros residentes, com pouca influência das migrações



Figura 4: Mapa político do estado do Pará (Fonte: IBGE, 2006).

## 2.2. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Para a realização deste estudo transversal foram coletadas amostras de sangue de 391 indivíduos de ambos os sexos, sendo 208 de três Boeiras e 183 de São Luiz do Tapajós. A amostra da população de Três Boeiras foi constituída por 52,29% (115/208) de indivíduos do sexo feminino e 44,71% (93/208) do sexo masculino, e a idade variou de 1 ano a 82 anos, sendo que a média foi  $27,04 \pm 16,93$ . A amostra da população de São Luiz do Tapajós foi constituída por 61,21% (112/183) de indivíduos do sexo feminino e 38,79% (71/183) do sexo masculino, e a idade variou de 1 ano a 81 anos, sendo que a média foi  $26,75 \pm 20,66$ . As amostras foram coletadas durante as ações do projeto de pesquisa “Estudos moleculares e imunoepidemiológicos visando estratégias de controle da malária em municípios localizados na área de abrangência da rodovia BR-163: Itaituba, Jacareacanga e Novo progresso”.

### 3.3. DETERMINAÇÃO DA PARASITEMIA PELO EXAME DA GOTA ESPESSA

As amostras foram coletadas após o atendimento, realizado por médicos do laboratório de genética humana e médica da Universidade Federal do Pará (UFPA), em conjunto com os técnicos da secretaria municipal de saúde de cada município. Para esta etapa do trabalho foi utilizada a infra-estrutura do posto de saúde local. A população foi esclarecida sobre o trabalho, assepsia, e utilizando lanceta estéril. A primeira gota de sangue foi removida com algodão seco. Após comprimir, suavemente, o dedo foi obtida sobre a pele seca outra gota de sangue, com aspecto esférico (Brasil, Ministério da Saúde, 2006).

A face limpa da lâmina foi colocada em contato com a gota e com o auxílio de outra lâmina, o sangue foi espalhado, formando um retângulo. A preparação foi corada pelo Método de Walker, utilizando-se o corante Giemsa. A pesquisa do parasito foi realizada em microscópio óptico comum (Olympus cover-015), sob óleo de imersão com aumento de 1000X e foi determinado o número de parasitos por  $\text{mm}^3$  de sangue (Brasil, Ministério da Saúde, 2006).

### 2.4. OBTENÇÃO DO DNA

A extração do DNA genômico foi realizada pela técnica do Fenol/Clorofórmio após lise celular por adição de proteinase K, conforme método descrito por Sambrook & Russel (2001), com modificações. Foi utilizado 150  $\mu\text{l}$  de sangue coletado com EDTA, que foi diluído em igual volume de PBS. Em seguida, foi adicionados 480  $\mu\text{l}$  da solução de extração (0,375 M NaCl/0,12 M EDTA pH 8,0, proteinase K/20 mg/mL e SDS 20%) e foi incubada a 37°C, durante 16 horas. Após esse período, o material foi centrifugado a 8.000 rpm, à temperatura



ambiente, durante 5 minutos e foram realizados dois ciclos de extração com 500 µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e uma extração com 500 µl de clorofórmio. No final de cada ciclo, foi obtida separação das fases, após centrifugação a 15.000 rpm à temperatura ambiente, durante 15 minutos.

Em seguida, foram transferidos 400 µl do sobrenadante para um tubo contendo 40 µl de acetato de sódio 3M (pH 4,7) e foi adicionado 1,0 mL de etanol absoluto gelado. Após homogeneizar lentamente por inversão, o material foi mantido a -20°C, durante 16 horas. Decorrido esse período, o material foi centrifugado a 8.000 rpm, durante 1 hora. O sobrenadante foi desprezado e, foram adicionados 200µl de etanol a 70% gelado ao precipitado, que foi centrifugado por 20 minutos a 8.000 rpm. Após descartar o sobrenadante e deixar o precipitado secar ao ar, foram adicionados 50µl de tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1mM, pH 8,0).

A quantificação do DNA foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizado com brometo de etídio 1µg/mL. O DNA foi mantido a -20°C até o momento da realização do diagnóstico molecular.

### 3.5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA PESQUISA DE *PLASMODIUM VIVAX* E *PLASMODIUM FALCIPARUM*

O diagnóstico molecular foi realizado pelo método da PCR padronizado por Cunha *et al.* (comunicação pessoal) para amplificar seqüências alvo de DNA mitocondrial de *P. vivax* e *P. falciparum*. Os oligonucleotídeos para a reação em cadeia da polimerase foram desenhados para amplificar uma seqüência alvo de 290 pb do gene da citocromo oxidase I (Cox 1) do DNA

mitocondrial de *P. vivax* e uma seqüência de 273 pb do gene da citocromo oxidase III (Cox 3) de *P. falciparum*.

As reações de PCR para detectar *P. vivax* e *P. falciparum* foram realizadas em um volume final de 20,0 µl. Para tanto, adicionou-se 2 µL de tampão de PCR 10x (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 1,8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de dNTP, 250 pMol de cada iniciador, 1,0 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 11 µL de água deionizada e 2 µL de DNA. A amplificação das seqüências alvo de *P. vivax* e de *P. falciparum* foi realizada nas seguintes condições; desnaturação inicial a 96°C durante 10 minutos; seguida de 30 ciclos a 95°C durante 1 minuto, e 60°C (*P. falciparum*) ou 62°C (*P. vivax*) durante 5 minutos; e uma extensão final a 60°C durante uma hora. A amplificação do DNA de cada espécie foi realizada com a mesma temperatura para anelar os iniciadores e amplificar as seqüência alvo.

Os produtos da PCR foram analisados após eletroforese, utilizando gel de agarose a 2%, e foram visualizados em transiluminador, após serem corados com brometo de etídio a 1µg/mL.)

### 3.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> DE *PLASMODIUM VIVAX*

Os anticorpos IgG anti-MSP1<sub>19</sub> foram detectados através do Ensaio imunoenzimático do tipo Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), conforme descrito por Cunha *et al* (2001), utilizando como antígeno a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> contendo os aminoácidos 1616-1704 da MSP1 (Cepa Belém) de *P. vivax*. Neste trabalho utilizamos a proteína recombinante produzida

em bactéria BL-21 transformada com o plasmídeo pET14b contendo o gene da MSP1<sub>19</sub>, e purificada por cromatografia de afinidade, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (Soares *et al.*, 1997).

A concentração da proteína recombinante MSP1<sub>19</sub> foi ajustada para 4 µg/ml em tampão carbonato 0,05 M pH 9,6. Em seguida, foram adicionados 50 µL por poço nas placas de 96 poços (Corning-costar). As placas foram mantidas temperatura ambiente, durante a noite. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% e bloqueadas com PBS-leite 5% por 2 horas a 37°C. As amostras foram diluídas 1:100 (dilução determinada por padronização prévia) na solução de PBS-leite 5% e 50 µL de cada amostra foram adicionados por poço, o ensaio de cada amostra foi realizado em duplicata. Após 2 horas, as placas foram lavadas e adicionados 50 µL/poço de uma solução contendo IgG de cabra anti-IgG humano conjugado a peroxidase (Sigma) diluído em solução de PBS-leite.

Após 1 hora, a reação enzimática foi revelada pela adição de 1 mg/ml de O-fenilenodiamino (OPD, Sigma) diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 0,03% (v/v) de peróxido de hidrogênio. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de uma solução contendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. A Densidade óptica foi determinada em um leitor de placas de ELISA usando comprimento de onda de 490 nm (DO<sub>490</sub>). A densidade óptica discriminante entre os resultados positivos e negativos (*cut off*) foi estabelecida pela média das absorbâncias de 12 amostras de soro de indivíduos sem história clínica de malária, residentes em Belém, Pará, acrescida de três desvios padrões. Esses

indivíduos foram selecionados entre doadores de sangue do centro de hemoterapia do estado do Pará (HEMOPA).

### 3.7. ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo é parte do projeto de pesquisa “Estudos moleculares e imunoepidemiológicos visando estratégias de controle da malária em municípios localizados na área de abrangência da rodovia BR-163: Itaituba, Jacareacanga e Novo progresso”, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto/UFGA (protocolo nº 3686/2005), em obediência à resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde, que trata das diretrizes e normas regulamentares da pesquisa envolvendo seres humanos.

### 3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando recursos do programas Excel e Biostat 4.0 (Ayres *et al.*, 2005). Para verificar a relação entre frequência de anticorpos IgG e as variáveis idade, número de episódios de malária e tempo decorrido desde a última malária, foi utilizado o teste do Qui-quadrado. A comparação das médias dos índices de reatividade nos diferentes grupos será realizada pelo teste t de Student. Para todas as análises foi estabelecido nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS

3.1. FREQUÊNCIA DE SOROS QUE RECONHECERAM A PROTEÍNA RECOMBINANTE His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> CONTENDO A REGIÃO C-TERMINAL DA PROTEÍNA 1 DA SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTOS DE *P. vivax* (MSP1<sub>19</sub>).

Com o objetivo de avaliar a resposta imune humoral específica contra antígeno da fase assexuada de *P. vivax*, analisamos 391 soros de indivíduos que vivem em duas áreas de transmissão de malária, localizadas na área de abrangência da BR-163 (Cuiabá-Santarém). Foram analisadas 208 amostras coletadas na localidade de Três Boeiras e 183 coletadas na localidade de São Luiz do Tapajós. Na Figura 5A, podemos observar que a frequência de soros que apresentaram anticorpos IgG capazes de reconhecer a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> foi 64,42% (134/208), na amostra de Três Boeiras e 20,22% (37/183), na amostra São Luiz do Tapajós. A frequência de indivíduos positivos em Três Boeiras foi 3,2 vezes maior que em São Luiz do Tapajós. Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ; Qui-Quadrado=75,52).

Nas amostras positivas estimamos os níveis dos anticorpos IgG específicos contra a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> pela determinação do índice de reatividade (IR). Os valores dos índices das amostras de Três Boeiras variaram de 1,03 a 14,85, enquanto que os índices de São Luiz variaram de 1,01 a 10,10. Na Figura 5B, observa-se que a média dos índices dos soros positivos coletados de indivíduos que residem em três Boeiras foi  $6,11 \pm 4,58$ , enquanto que o valor da média dos positivos de São Luiz do Tapajós foi  $2,56 \pm 1,96$ .

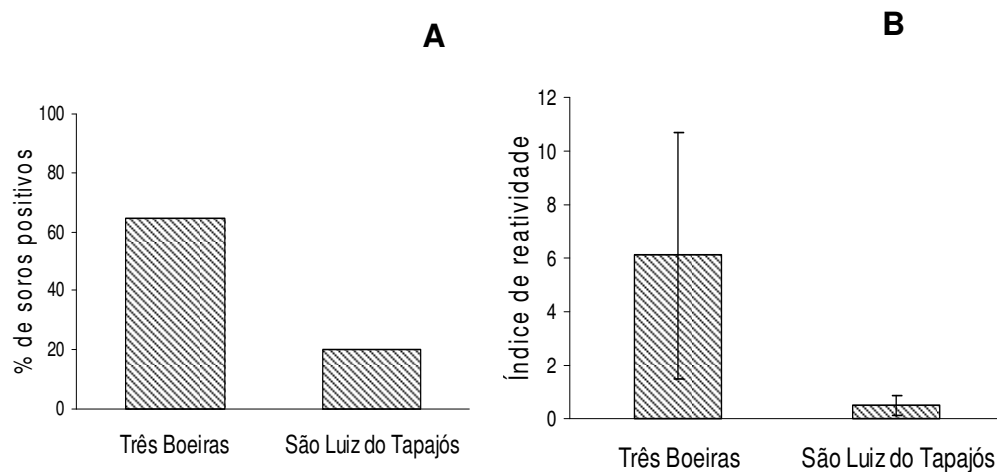


Figura 5. (A) Percentagem de soros que apresentaram anticorpos IgG específicos contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>. Os soros foram testados na diluição 1:100 por ensaio imunoenzimático (ELISA) e foram consideradas positivas as amostras que apresentaram densidade óptica (DO<sub>490</sub>) acima do valor de cut-off (0,198), estabelecido pela média das DO de 12 soros de indivíduos saudáveis, residentes em Belém, Pará, acrescida de três desvios. (B) Índice de reatividade (IR) das amostras positivas (média ± dp). O valor de IR foi determinado pela razão entre a DO da amostra e o valor do cut-off.

### 3.2. PERFIL IMUNOEPIDEMIOLÓGICO DA RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG ESPECÍFICOS CONTRA A MSP1<sub>19</sub> NA LOCALIDADE DE TRÊS BOEIRAS, MUNICÍPIO DE TRAIRÃO, PARÁ.

Com a finalidade de verificar se os aspectos epidemiológicos podem influenciar a resposta imune humoral contra antígeno da fase assexuada sangüínea de *P. vivax*, analisamos a freqüência de soros positivos e os níveis de IgG de acordo com a faixa etária, o número de episódios prévios de malária e o tempo decorrido desde do último episódio de malária.

Na Figura 6A, observa-se a percentagem de soros que apresentaram anticorpos IgG específicos contra a proteína recombinante distribuídos de acordo com a idade. Nas diferentes faixas etárias a percentagem de soros positivos variou de 50,00% (21/42) a 80,95% (17/21). O grupo com idade abaixo de dez anos apresentou a menor frequência de positivos, enquanto que a maior frequência de positivos ocorreu no grupo com idade de 40 a 49 anos.

Na faixa etária de 10 a 39 anos, a percentagem de soros positivos foi semelhante. Nos grupos com idade entre 10 e 19 anos, 20 e 29 anos e 30 a 39 anos, a percentagem de positivos foi 63,41% (26/41), 65,71% (23/35), 57,69% (15/26), respectivamente.

Nos grupos com idade acima de 40 anos, a percentagem de positivos foi semelhante. Nos grupos com idade entre 40 e 49 anos, 50 e 59 anos e >60 anos a percentagem de positivos foi 80,95% (17/21), 72,41% (21/29) e 78,57% (11/14), respectivamente. A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa quando comparamos as frequências em todas as faixas etárias ( $p=0,2224$ ; Qui-Quadrado=8,194).

Para avaliar se a idade pode influenciar nos níveis de anticorpos IgG específicos contra a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, determinamos o índice de reatividade (IR) dos soros positivos nos diferentes grupos (Figura 6B). Nas diferentes faixas etária a média dos IR variou de  $5,23 \pm 4,11$  a  $6,92 \pm 4,58$ . O grupo que apresentou a menor média de IR foi o grupo com idade abaixo de 10 anos, enquanto que a maior média de IR foi do grupo com idade entre 20 e 29 anos.

As médias dos valores de IR na faixas de 10 a 19 anos, 20 a 29 anos e 30 a 39 anos foi  $6,45 \pm 4,59$ ,  $6,92 \pm 4,58$  e  $5,48 \pm 4,77$ , respectivamente. Nos grupos com idade acima de 40 anos, a média dos valores de IR no grupo com 40

a 49 anos, 50 a 59 anos e > 60 anos foi  $5,85 \pm 4,84$ ,  $6,19 \pm 4,71$  e  $6,36 \pm 5,12$ , respectivamente. A comparação entre todos os grupos mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,9993$ ; Qui-Quadrado= $0,341$ ).

Na Figura 7A, observa-se a freqüência de soros que apresentaram anticorpos específicos contra a proteína recombinante, distribuídos de acordo com o número de episódios prévios de malária. No grupo de indivíduos que relatou nunca ter tido malária à percentagem de soros positivos foi 22,45% (11/49).

Nos grupos de indivíduos que relataram exposição prévia à malária a percentagem de soros positivos variou de 61,10% (11/18) a 84,21% (16/19), sendo que a menor percentagem ocorreu no grupo que relatou ter tido um episódio de malária e a maior percentagem no grupo que relatou ter tido três episódios de malária.

Nos grupos que relataram terem tido dois, quatro e cinco ou mais episódios a percentagem de soros positivos foi 71,43% (15/21), 75,00% (6/8) e 81,32% (74/91), respectivamente. A comparação entre todos os grupos mostrou que houve diferença estatisticamente significativa ( $p<0,0001$ ; Qui-Quadrado= $148,278$ ).

A comparação entre o grupo que relatou nunca ter sido exposto à malária e o grupo que relatou ter tido 5 ou mais episódios de malária mostrou que a diferença nas freqüências de positivos foi significativa ( $p<0,0001$ ; Qui-Quadrado= $46,694$ ). Portanto, a exposição prévia contribuiu para a aquisição de anticorpos. A comparação entre os grupos que tiveram 1, 2, 3, ou 4 episódios com o grupo que teve 5 ou mais episódios de malária, mostrou que houve diferença estatisticamente significativa; comparando 1 episódio com 5 ou mais ( $p<0,0001$ ; Qui-Quadrado= $46,694$ ); 2 episódios com 5 ou mais ( $p<0,0001$ ; Qui-



Quadrado=39,112); 3 episódios com 5 ou mais ( $p<0,0001$ ; Qui-Quadrado=37,378) e 4 episódios com 5 ou mais ( $p<0,0001$ ; Qui-Quadrado=57,80).

Para avaliar se a exposição prévia a malária pode influenciar nos níveis de anticorpos IgG específicos contra a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> determinamos o índice de reatividade (IR) dos soros positivos nos grupos de indivíduos que relataram nunca terem tido malária ou que relataram terem tido um, dois, três, quatro, cinco ou mais episódios (Figura 7B).

No grupo de indivíduos que relatou nunca ter tido malária a média dos IR foi de  $4,53 \pm 4,62$ . Nos grupos que relataram exposição prévia à malária a média dos IR variou de  $5,28 \pm 4,56$  a  $8,72 \pm 5,21$ , sendo que a menor média ocorreu no grupo que relatou ter sido exposto uma vez à malária, e a maior média ocorreu no grupo que relatou ter tido dois episódios de malária.

Nos demais grupos expostos à malária as médias dos IR foram semelhantes. No grupo que relatou 3, 4, 5 ou mais episódios a média dos IR foi  $6,07 \pm 4,44$ ;  $7,99 \pm 3,55$  e  $5,78 \pm 4,44$ , respectivamente. A comparação entre todos os grupos mostrou que não houve diferença significativa ( $p=0,8412$ ; Qui-Quadrado=2,057).

Neste estudo também avaliamos a freqüência de soros positivos de acordo com o tempo decorrido desde o último episódio de malária. Na figura 8A, observa-se que o grupo de indivíduos que relatou terem tido malária há mais de 10 anos a freqüência de positivos foi 63,10% (12/19), sendo esta a menor freqüência de soros positivos. Enquanto que no grupo que relatou ter tido malária há menos de um ano a freqüência de positivos foi 86,10% (56/65), sendo esta a maior freqüência de positivos.

Nos grupos que relataram terem tido malária a mais de um ano observa-se discreta diminuição na frequência de positivos. A frequência de soros positivos nos grupos que relataram terem tido malária no período de 1 a 2 anos, 2 a 5 anos e 5 a 10 anos foi 80,0% (20/25), 77,70% (14/18), e 64,70 (12/17), respectivamente. A comparação entre todos os grupos mostrou que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ; Qui-Quadrado=62,316). As comparações mostraram que houve diferença entre o grupo que relatou ter tido malária a menos de 1 ano e os demais grupos foram estatisticamente significativa; menos de 1 ano x 1 a 2 anos ( $p < 0,0001$ ; Qui-Quadrado=17,053); menos de 1 ano x 2 a 5 anos ( $p < 0,0001$ ; Qui-Quadrado=25,20); menos de 1 ano x 5 a 10 anos ( $p < 0,0001$ ; Qui-Quadrado=28,471) e menos de 1 ano x > 10 anos ( $p < 0,0001$ ; Qui-Quadrado=28,471).

Com a finalidade de estimar os níveis de anticorpos IgG específicos contra a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, analisamos os IR de acordo com o tempo decorrido desde o último episódio de malária. Na figura 8B, observa-se que os valores das médias dos IR variaram de  $4,82 \pm 4,20$  a  $7,04 \pm 4,55$ , sendo que o grupo que relatou ter tido malária há mais de 10 anos apresentou a menor média de IR, enquanto que no grupo que relatou ter tido malária a menos de um ano apresentou a maior média de IR. Os valores das médias dos grupos que relataram terem tido malária no período de 1 a 2 anos, 2 a 5 anos e 5 a 10 anos foi  $5,88 \pm 4,38$ ,  $5,66 \pm 4,62$  e  $7,02 \pm 4,79$ , respectivamente. Estas diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p = 0,9638$ ; Qui-Quadrado=0,593).

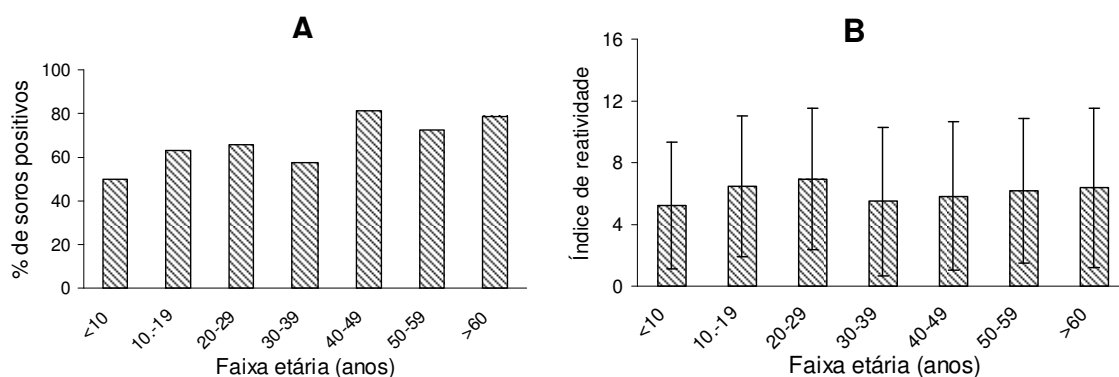


Figura 6. (A). Percentagem de soros que apresentaram anticorpos da classe IgG específicos contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> em relação a idade. Faixa etária: <10 anos, n=42; 10-19, n=41; 20-29, n=35; 30-39, n=26; 40-49, n=21; 50-59, n=29; >60 anos, n=14. (B) Índice de reatividade (IR) das amostras positivas (média ± dp). O valor de IR foi determinado pela razão entre a DO da amostra e o valor do *cut-off*.

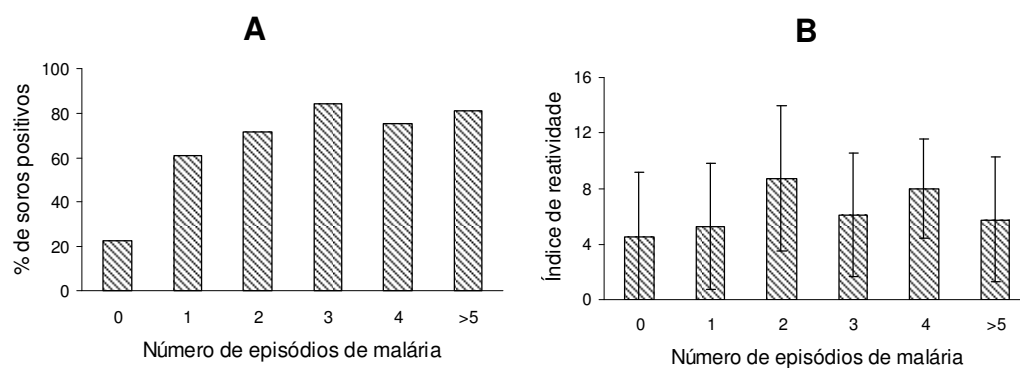


Figura 7. (A) Percentagem dos soros que apresentaram anticorpos IgG específicos contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> em relação ao número de episódios prévios de malária: nunca teve n=49; 1 episódio n=18; 2 episódios n=21; 3 episódios n=19; 4 episódios n=8 e 5 ou mais n=74. (B) Índice de reatividade (IR) das amostras positivas (média ± dp). O valor de IR foi determinado pela razão entre a DO da amostra e o valor do *cut-off*.

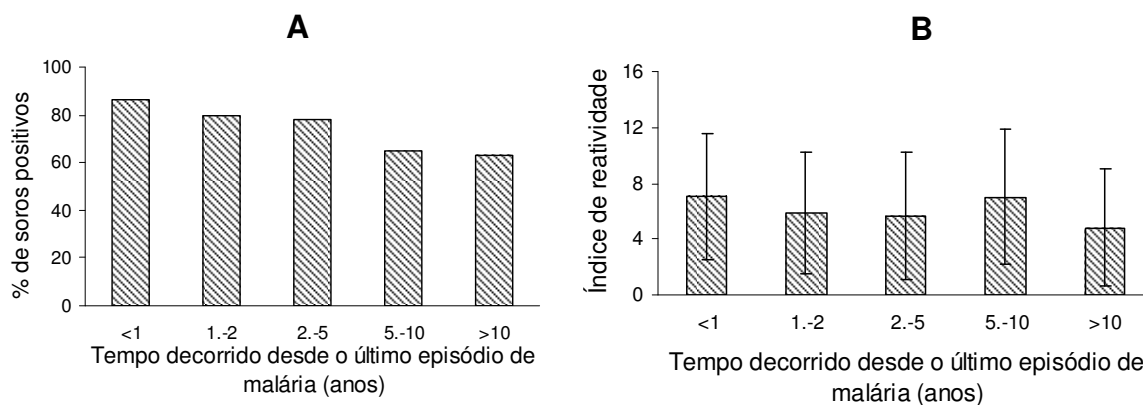


Figura 8 (A) Percentagem dos soros que apresentaram anticorpos da classe IgG específicos contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> em relação ao tempo decorrido desde o último episódio de malária. O número de indivíduos em cada grupo de acordo com tempo decorrido após infecção: <1 ano n=65; 1-2 anos n=25; 2-5 anos n=18; 5-10 anos n=17 e >10 anos n=19. (B) Índice de reatividade (IR) das amostras positivas (média ± dp). O valor de IR foi determinado pela razão entre a DO da amostra e o valor do *cut-off*.

Com o intuito de verificar se a aquisição de anticorpos IgG específicos contra a porção C-terminal da MSP1 pode conferir alguma proteção, analisamos se os indivíduos que relataram terem tido mais episódios de malária, ou seja, os que foram mais expostos ao parasito, poderiam estar há mais tempo sem manifestar episódio de malária. Para tanto, distribuimos o número de soros positivos de acordo como o número de episódios e o tempo decorrido desde o último relato de malária.

Na Tabela 1, observa-se que nos grupos de indivíduos que relataram terem tido um ou mais episódios de malária, o maior número de amostras positivas ocorreu entre os indivíduos que tiveram malária há menos de um ano. No

grupo que relatou ter tido 3 episódios de malária 55,55% (10/18) tiveram malária a menos de um ano e deste grupo apenas 5,55% (1/10) relataram esta há mais de dez anos sem manifestar episódio de malária.

Tabela 1. Comparação entre o número de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG específicos contra a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> nos grupos com exposição prévia a malária considerando o tempo decorrido desde a última malária.

Fonte: Dados Primários

Número de episódios prévios de malária	% de soros positivos	Tempo decorrido desde o último episódio de malária (anos) / Número de amostras positivas				
		<1	1 a 2	2 a 5	5 a 10	> 10
<b>1</b>	64,70 (11/17)	2	3	2	3	1
<b>2</b>	66,66 (10/15)	8	1	0	0	1
<b>3</b>	77,77 (14/18)	<b>10</b>	1	2	0	1
<b>4</b>	75,00 (6/8)	3	2	1	0	0
<b>5 ou mais</b>	81,76 (69/85)	<b>31</b>	13	9	7	9

No grupo que relatou ter tido 5 ou mais episódios de malária 44,92% (31/69) tiveram malária há menos de um ano e deste grupo apenas 13,04% (9/69) relataram estar há mais de dez anos sem manifestar episódio de malária. Nestes dois grupos o número de amostras positivas foi maior entre os indivíduos que tiveram episódio de malária há menos de um ano. Devido ser restrito o número de amostras em cada intervalo de tempo não foi possível realizar a análise estatística.

### 3.3. PERFIL IMUNOEPIDEMIOLÓGICO DA RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG ESPECÍFICOS CONTRA A MSP<sub>1-19</sub> NA LOCALIDADE DE SÃO LUIZ DO TAPAJÓS, MUNICÍPIO DE ITAITUBA, PARÁ.

Neste estudo também avaliamos a resposta contra antígeno da fase assexuada sangüínea em outra área, que também apresenta transmissão de malária. Porém, a população é composta, principalmente de indivíduos que relatam que nasceram e residem nesta localidade, sendo a maioria descendente de índios e negros.

A resposta de anticorpos contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP<sub>1-19</sub> também foi analisada com base em informações coletadas, durante inquérito epidemiológico, faixa etária, o número de episódios de malária e o tempo decorrido desde o último episódio de malária.

Na Figura 9A, podemos observar a percentagem de soros que apresentaram anticorpos IgG específicos contra a proteína recombinante. Nas diferentes faixas etárias a percentagem de positivos variou de 5,66% (3/53) a 42,85% (12/28). O grupo com idade abaixo de dez anos apresentou a menor freqüência de positivos, enquanto que a maior freqüência de positivos ocorreu no grupo com idade entre 20 e 29 anos.

Na faixa etária de 10 a 29 anos a freqüência de positivos apresentou-se variável, sendo que no grupo com idade entre 10 a 19 anos e 20 a 29 anos a percentagem de positivos foi 9,67% (3/31) e 42,85% (12/28), respectivamente. Nos grupos de indivíduos com idade entre 30 e 59 anos, a percentagem de soros positivos foi semelhante. A percentagem de positivos nas faixas de 30 a 39 anos, 40 a 49 anos e 50 a 59 anos foi 20,0% (4/20), 27,27%

(6/22) e 21,42% (3/14), respectivamente. As maiores freqüências de positivos foram observadas nos grupos com idade entre 20 e 29 e no grupo com mais de 60 anos. As freqüências foram semelhantes, sendo 42,85% (12/28) e 40,00% (6/15), respectivamente.

A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa quando comparamos as freqüências em todas as faixas etárias ( $p=0,0620$ ; Qui-quadrado=12,00).

Para avaliar se a idade pode influenciar nos níveis de anticorpos IgG específicos contra a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> determinamos o índice de reatividade (IR) dos soros positivos nos diferentes grupos. Nas diferentes faixas etária, a média dos IR variou de  $1,04 \pm 1,24$  a  $4,35 \pm 2,49$ . O grupo que apresentou o menor valor médio foi o grupo com idade abaixo de 10 anos, enquanto o maior valor da média dos IR foi observado no grupo com idade acima de 60 anos.

Nos demais grupos as médias dos IR foram semelhantes ao grupo com idade menor que 10 anos, exceto o grupo com idade entre 40 e 49 anos. Nas diferentes faixas etárias, 10 a 19 anos, 20 a 29 anos, 30 a 39 anos e 40 a 49 anos e 50 a 59 anos a média dos IR foi  $1,45 \pm 0,49$ ;  $1,86 \pm 0,71$ ;  $1,70 \pm 0,64$ ;  $3,50 \pm 3,39$  e  $1,83 \pm 1,00$ , respectivamente. A comparação entre todos os grupos mostrou que não houve diferença significativa ( $p=0,06936$ ; Qui-quadrado=3,875).

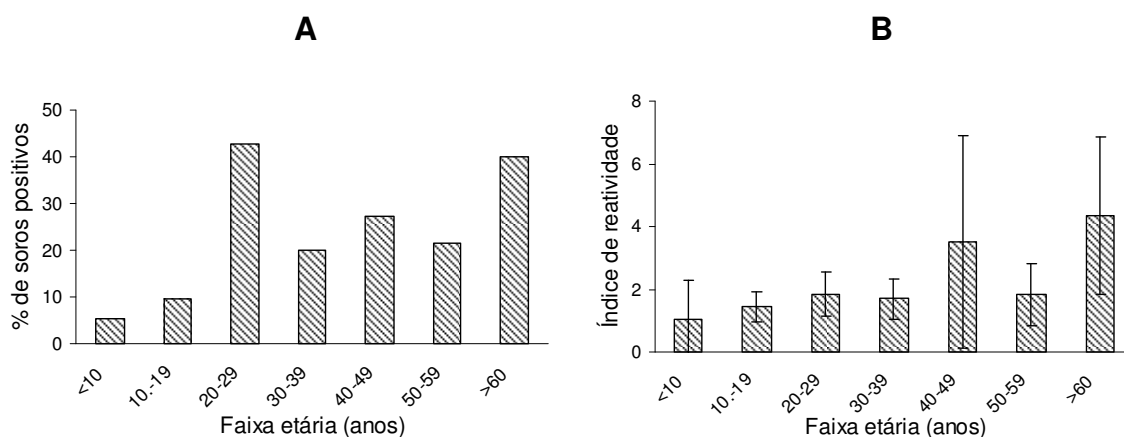


Figura 9: (A) Percentagem dos soros que apresentaram anticorpos da classe IgG específicos contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> em relação a idade. Faixa etária: <10 anos, n= 53; 10-19, n=31; 20-29, n=28; 30-39, n=20; 40-49, n=22; 50-59, n=14; >60 anos, n=15. (B) Índice de reatividade (IR) das amostras positivas (média ± dp). O valor de IR foi determinado pela razão entre a DO da amostra e o valor do *cut-off*.

Na Tabela 2, podemos observar a frequência de soros que apresentaram anticorpos específicos contra a proteína recombinante e a média dos índices de reatividade, distribuídos de acordo com o número de episódios prévios de malária. No grupo de indivíduos que relatou nunca ter tido malária a percentagem de soros positivos foi 8,82% (9/102).

Nos grupos de indivíduos que relataram exposição prévia à malária a percentagem de soros positivos variou de 20,00% (1/5) a 50,00% (9/18), sendo que a menor percentagem ocorreu no grupo que relatou ter tido 4 episódios de malária e a maior percentagem no grupo que relatou ter tido 5 ou mais episódios de malária. Nos grupos que relataram terem tido 1, 2 e 3 episódios a percentagem



de soros positivos foi 29,72% (11/37), 31,25% (05/16) e 40,00% (02/05), respectivamente.

A comparação entre todos os grupos mostrou que houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0172$ ; Qui-quadrado=13,757). A partir deste resultado realizou-se testes qui-quadrado de homogeneidade entre os pares de categorias da variável números de episódios prévios de malária em relação a frequência de positivos.

A comparação entre o grupo que relatou nunca ter sido exposto à malária e o grupo que relatou ter tido 4 episódios de malária mostrou que houve diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,0269$ ; Qui-quadrado=6,40). A frequência de positivos nestes grupos foi 8,82% (9/102) e 20,00% (1/5), respectivamente. A comparação entre as frequências de positivos nos grupos que relataram 1 episódio e 3 episódios mostrou que houve diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,0265$ ; Qui-quadrado=6,231). A frequência de positivos nestes grupos foi 29,72% (11/37) e 40,00% (02/05), respectivamente.

Também houve diferença entre o grupo de 1 episódio quando comparado com 4 episódios ( $p= 0,0094$ ; Qui-quadrado=8,333). A frequência de positivos nestes grupos foi 29,72% (11/37) e 40,00% (02/05), respectivamente. A frequência de positivos nestes grupos foi 29,72% (11/37) e 20,00% (1/5), respectivamente. A comparação entre 4 e 5 episódios também mostrou diferença significativa ( $p= 0,0269$ ; Qui-quadrado=6,40). Estes resultados mostram que a exposição prévia contribuiu para a aquisição de anticorpos.

Para avaliar se a exposição prévia a malária pode influenciar nos níveis de anticorpos IgG específicos contra a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> determinamos o índice

de reatividade (IR) dos soros positivos nos grupos de indivíduos que relataram nunca terem tido malária ou que tiveram 1, 2, 3, 4, 5 ou mais episódios de malária. No grupo de indivíduos que relatou nunca terem tido malária a média dos IR foi de  $1,96 \pm 0,86$ . Nos grupos que relataram exposição prévia a malária a média dos IR variou de  $1,88 \pm 0,97$  a  $3,70 \pm 2,17$ . Nos grupos expostos, a menor média ocorreu no grupo que relatou ter tido 1 episódio de malária, enquanto que a maior média ocorreu no grupo que relatou ter tido 3 episódios de malária. Nos demais grupos expostos à malária as médias dos IR foram semelhantes. No grupo que relatou 2 e 5 ou mais episódios a média dos IR foi  $3,09 \pm 1,26$  e  $3,54 \pm 3,37$ , respectivamente. A comparação destes grupos mostrou que não houve diferença ( $p=0,8956$ ; Qui-quadrado= $1,647$ ). Somente um indivíduo relatou ter tido 4 episódios de malária, e o IR foi 1,57.

Neste estudo também avaliamos a freqüência de soros positivos de acordo com o tempo decorrido desde o último episódio de malária. Na Tabela 3, observa-se que a freqüência de positivos nos grupos de indivíduos que relataram terem tido malária no período de 1 a 2 anos ou 2 a 5 anos foi a mesma, 25% (1/4) e 25% (3/12), sendo esta a menor freqüência de soros positivos. Enquanto que no grupo que relatou ter tido malária a menos de 1 ano a freqüência de positivos foi 50% (8/16), sendo esta a maior freqüência de positivos.

Nos grupos que relataram terem tido malária no período de 5 a 10 anos ou há mais de dez anos a freqüência de positivos foi semelhante, sendo 33,33% (5/15) e 37,50% (9/24), respectivamente. A comparação entre todos os grupos mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,07515$ ; Qui-quadrado= $8,615$ ).

Tabela 2: Frequência de soros positivos e média dos índices de reatividade distribuídos de acordo com o número de episódios prévios de malária.

<b>Números de episódios</b>	<b>Soros positivos (%)</b>	<b>Índice de reatividade (média ± dp)</b>
0 (n=102)	8,82 (9/102)	1,96 ± 0,86
1 (n=37)	29,72 (11/37)	1,88 ± 0,97
2 (n=16)	31,25 (05/16)	3,09 ± 1,26
3 (n=05)	40,00 (02/05)	3,70 ± 2,17
4 (n=05)	20,00 (01/05)	1,57
5 (n=18)	50,00 (09/18)	3,54 ± 3,37
<b>Total 183</b>	<b>20,22 (37/183)</b>	<b>2,56 ± 1,96</b>

Fonte: Dados Primários.

Tabela 3: Freqüência de soros positivos e média dos índices de reatividade distribuídos de acordo com o tempo decorrido desde o último episódio de malária.

<b>Tempo decorrido desde o último episódio de malária (anos)</b>	<b>Soros positivos (%)</b>	<b>Índice de reatividade (média ± dp)</b>
< 1 (n=16)	50,00 (8/16)	2,71 ± 3,03
1 a 2 (n=04)	25,00 (1/4)	3,32
2 a 5 (n=12)	25,00(3/12)	3,16 ± 1,14
5 a 10 (n=15)	33,33 (5/15)	1,74 ± 0,58
> 10 (n= 24)	37,5 (9/24)	3,02 ± 2,39
<b>Total 71</b>	<b>36,61 (26/71)</b>	<b>2,71 ± 2,20</b>

Fonte: Dados Primários.

Com a finalidade de estimar os níveis de anticorpos IgG específicos contra a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, analisamos os IR de acordo com o tempo decorrido desde o último episódio de malária. Na Tabela 3, observa-se que os valores das médias dos IRs variaram de 1,74 ± 0,58 a 3,16 ± 1,14, sendo que o grupo de indivíduos que relatou terem tido malária no período de 5 a 10 anos apresentou a menor média de IR, enquanto que o grupo que relatou ter tido malária 2 a 5 anos apresentou a maior média de IR.

Os valores das médias dos grupos que relataram terem tido malária no período de menos de 1 ano e mais de 10 anos foi  $2,71 \pm 3,03$  e  $3,02 \pm 2,39$ . Somente um indivíduo relatou ter tido malária no período de 1 a 2 anos, e o IR foi 3,32. A comparação entre todos os grupos mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,9667$ ; Qui-quadrado=0,566).

Com o intuito de verificar se a aquisição de anticorpos IgG específicos contra a porção C-terminal da MSP1 pode conferir alguma proteção, analisamos se os indivíduos que relataram terem tido mais episódios de malária, ou seja, foram mais expostos ao parasito, poderiam estar há mais tempo sem manifestar episódio de malária. Para tanto, distribuimos o número de soros positivos de acordo como o número de episódios e o tempo decorrido desde o último relato de malária.

Na Tabela 4, observa-se que nos grupos de indivíduos que relataram terem tido um ou mais episódios de malária o número de amostras positivas nos grupos de indivíduos que tiveram malária há menos de 1 ano ou há mais de dez anos foi semelhante. No grupo que relatou ter tido 1 episódio de malária 27,27% (3/11) tiveram malária há menos de um ano e 45,45% (5/11) relataram estar há mais de dez anos sem manifestar episódio de malária. No grupo que relatou ter tido 5 ou mais episódios de malária 44,44% (4/9) tiveram malária há menos de um ano e 33,33% (3/9) relataram estar há mais de dez anos sem manifestar episódio de malária. Nos grupos que tiveram 1 ou 5 ou mais episódios a percentagem de positivos foi semelhante quando analisamos os que tiveram malária a menos de um ano, e também quando analisamos o grupo que teve malária há menos de um ano e o grupo que estar há mais de dez anos sem ter tido malária não observamos diferença.

Tabela 4. Comparação entre o número de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG específicos contra a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> nos grupos com exposição prévia a malária considerando o tempo decorrido desde a última malária.

Fonte: Dados Primários.

Número de episódios prévios de malária	% de soros positivos	Tempo decorrido desde o último episódio de malária (anos)				
		Número de amostras positivas				
		<1	1 a 2	2 a 5	5 a 10	> 10
<b>1 episódio</b>	32,35 (11/34)	3	0	1	2	5
<b>2 episódios</b>	36,36 (4/11)	1	1	1	0	1
<b>3 episódios</b>	25,00 (1/4)	0	0	0	1	0
<b>4 episódios</b>	20,00 (1/5)	0	0	0	1	0
<b>5 ou mais</b>	56,25 (9/16)	4	0	1	1	3

#### 3.4. ANÁLISE COMPARATIVA DA AQUISIÇÃO DE ANTICORPOS IgG QUE RECONHECEM ANTÍGENO DA FASE SANGÜÍNEA DE *P. vivax* e TRANSMISSÃO DE MALÁRIA NAS DUAS ÁREAS DE ESTUDO.

Com a finalidade de comparar as duas áreas analisamos aspectos relacionados à transmissão de malária e a aquisição de anticorpos. Com base no número de casos de malária registrados nas duas localidades, no período de 2005 a 2006 (Tabela 5), observamos que no ano de 2005 a incidência parasitária anual (IPA) de Três Boeiras foi cerca de 1000 vezes maior que em São Luiz do Tapajós. Porém em 2006, houve aumento da transmissão em São Luiz do Tapajós, e o IPA

aumentou de 2,64 para 108,46. Nas duas localidades houve predomínio de casos de *P. vivax*, quando comparado com *P. falciparum* ou infecção mista.

Considerando que a amostra analisada da população das duas áreas foi semelhante, comparamos a frequência de positivos e verificamos que na população de Três Boeiras houve resposta de anticorpo em 64,42% dos indivíduos, enquanto que em São Luiz do Tapajós apenas 20,22% dos indivíduos apresentaram resposta de anticorpo.

No momento da coleta das amostras, realizamos o exame da gota espessa e somente na localidade de Três Boeiras houve casos positivos. Foram diagnosticados pelo exame da gota espessa quatro casos de indivíduos infectados por *P. vivax*. Todas as amostras também foram analisadas pelo método molecular (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR) e, foram diagnosticados 10 casos positivos, sendo 8 casos de infecção por *P. vivax*, 1 por *P. falciparum* e 1 caso de infecção mista. Em São Luiz do Tapajós, todas as amostras coletadas foram negativas tanto no exame pela gota espessa, como no método molecular (PCR).

As duas áreas apresentaram perfil diferente quanto a história de exposição prévia a malária. Na amostra da população de São Luiz do Tapajós 55,73% (102/183) dos indivíduos relataram nunca terem tido malária, enquanto em Três Boeiras este grupo representou 23,55% (49/208) das amostras coletadas. A aquisição de anticorpos nos grupo que nunca tiveram malária mostrou que não houve diferença quanto a frequência de positivos, quando comparamos as duas localidades. A percentagem de positivos em São Luiz do Tapajós e Três Boeiras no grupo que nunca teve malária foi 8,82% (9/102) e 22,45% (11/49), respectivamente.

Tabela 5: Número de caso de malária registrados nas localidades de Três Boeiras e São Luiz do Tapajós, no período de 2005 a 2006.

<i>Localidade</i>		<i>Casos</i>				
<i>Ano</i>	<i>População</i>	<i>positivos</i>	<i>IPA</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf</i>	<i>Mista</i>
T. Boeiras 2005	199	555	2.788,90	376	165	14
T. Boeiras 2006	199	506	2.542,70	339	145	22
S.L.Tapajós 2005	378	01	2,64	0	01	0
S.L.Tapajós 2006	378	41	108,46	39	01	01

Fonte: Sivep/Ministério da Saúde, 2006. IPA: Incidência Parasitária Anual.

A comparação dos grupos de indivíduos das duas áreas, que relataram exposição prévia à malária, mostrou que a aquisição natural de anticorpos que reconhecem antígeno candidato vacinal da fase sangüínea de *P. vivax* foi diferente. A percentagem de positivos no grupo exposto de São Luiz do Tapajós foi significativamente menor, quando comparado com o grupo exposto de Três Boeiras. A percentagem de positivos em São Luiz do Tapajós e Três Boeiras foi 34,56% (28/81) e 77,70% (122/157), respectivamente.



#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo analisamos a prevalência dos soros positivos e determinamos o índice de reatividade (IR) para estimar os níveis dos anticorpos IgG específicos contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, contendo antígeno candidato vacinal de *P. vivax*, e comparamos os resultados obtidos em duas áreas de transmissão de malária, localizadas no sudoeste do estado do Pará.

Nos anos de 2005 e 2006, a incidência parasitária anual (IPA) nas áreas de estudo foi 2.788,9 e 2.542,7 na localidade de Três Boeiras e 2,64 e 108,46 em São Luiz do Tapajós. A transmissão foi muito mais intensa na localidade de Três Boeiras, que é cortada pela BR-163 (Cuiabá-Santarém), portanto, com fluxo intenso de pessoas. Em São Luiz do Tapajós, localidade ribeirinha e pouco exposta a influência de migrações, a incidência nesse período foi muito baixa que em Três Boeiras.

Em São Luiz do Tapajós, a população é constituída por descendentes de índios e negros, e mais de 50% dos indivíduos que participaram do estudo relataram nunca terem tido malária. Assim, um aspecto que deve ser considerado é a proteção por fatores genéticos, como a ausência do fator Duffy. No momento, ainda não há relatos na literatura sobre a frequência deste fator nessa população. Porém, este é um aspecto importante a ser investigado.

A frequência de soros positivos foi maior em Três Boeiras (64,42%), que em São Luiz do Tapajós (20,22%). Esta diferença no reconhecimento pode ser explicada pelo distinto perfil de transmissão, uma vez que em Três Boeiras a população está naturalmente mais exposta à malária. A influência do grau de exposição foi observada em outros estudos, os quais mostraram que é alta a

proporção de indivíduos naturalmente expostos ao *P. vivax* e que apresentam anticorpos específicos contra a PvMSP1<sub>19</sub> (Soares *et al.*, 1997, 1999a, b; Park *et al.*, 2001; Morais *et al.*, 2005), confirmando a alta imunogenicidade desta molécula. Durante o processo de invasão, o fragmento de 19KDa da MSP1 permanece na membrana do merozoíto e, por não apresentar polimorfismos apresenta-se bastante imunogênico para o hospedeiro (Soares *et al.*, 1999a).

Estudos anteriores que caracterizaram a resposta de anticorpos IgG adquirida por indivíduos que residem em áreas de transmissão de malária mostraram que a PvMSP1<sub>19</sub> apresenta elevada imunogenicidade, sendo encontrada freqüências de soros positivos que variaram de 40 a 90% em populações naturalmente expostas ao *P. vivax* (Soares *et al.*, 1997, 1999b; Park *et al.*, 2001). Esta variação na freqüência pode ser devida a exposição ou a fatores relacionados ao hospedeiro e que ainda não foram identificados, mas que podem influenciar na resposta de anticorpos, bem como determinar a suscetibilidade à malária em diferentes grupos étnicos.

A aquisição desses anticorpos também foi analisada com a finalidade de propor o desenvolvimento de teste sorológico, com aplicação em estudos epidemiológicos, triagem de doadores e diagnóstico de malária em regiões não endêmicas. O ensaio imunoenzimático (ELISA) mostrou alta sensibilidade e especificidade na detecção de indivíduos naturalmente infectados (Rodrigues *et al.*, 2003a).

Em Três Boeiras, área com transmissão mais intensa, a idade não influenciou na prevalência de soros positivos e nem nos níveis de anticorpos. Porém, em São Luiz do Tapajós o grupo de indivíduos com idade abaixo de 19 apresentou menor freqüência de soros positivos. Esta diferença pode ser devida à

baixa intensidade de transmissão nesta área, sendo que as crianças podem ter sido menos expostas.

Estudo realizado em populações que residem na margem do Rio Negro, no Amazonas, mostrou que 46,9% dos soros apresentavam anticorpos que reconheciam o antígeno recombinante MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax*, sendo que o índice de avidéz desses anticorpos foi mais alto entre os indivíduos com idade acima de 15 anos. Nesta mesma localidade, 69,0% dos indivíduos com idade abaixo de 15 anos apresentaram avidéz intermediária ou baixa para IgG anti-*P. falciparum*, mostrando que infecção recente por *P. falciparum* foi mais freqüente neste grupo que em indivíduos adultos. Este resultado mostra que o tempo de exposição à malária pode contribuir para melhorar a resposta imune, e assim, conferir algum grau de proteção (Alves *et al.*, 2002)

Áreas altamente endêmicas, a imunidade natural é adquirida após longo tempo de exposição. Este estado imune foi denominado de “premunição” e pode ser adquirido após anos de exposição contínua para o parasito; sendo caracterizado por infecção assintomática ou por parasitemia sub-patente. O tempo para adquirir imunidade clínica depende da intensidade de transmissão, da diversidade genética do parasito e da maturidade do sistema imune do hospedeiro. Este fenômeno é bem caracterizado na África, porém nas Américas central e do sul existem evidências, mas ainda não está bem caracterizado (Druillhe & Perignon, 1994).

Estudo realizado na Colômbia mostrou que na cidade de Buenaventura, o risco de infecção foi mais alto nos indivíduos menores de dez anos (Méndez *et al.*, 2000).

Outro estudo mostrou que a idade do hospedeiro afeta a quantidade e a qualidade da resposta imune contra antígeno de *Plasmodium*. No entanto, a exposição repetida à malária, independente da idade do hospedeiro, mostrou ser um fator importante para determinar a resposta quantitativa de IgG que reconheceu a proteína ligante de Duffy de *P. vivax* (Fraser *et al.*, 1997).

A análise por imunofluorescência da resposta de indivíduos da Ilha de Cotijuba, Pará, mostrou que a prevalência de soros que reconheceram a proteína nativa aumentou com a idade, sendo que na faixa entre 41 a 50 anos foi observada a maior frequência de positivos. No entanto, a resposta contra a proteína recombinante contendo a porção C-terminal da MSP1 de *P. vivax* não apresentou associação com a idade (Soares *et al.*, 1999b).

Nas duas localidades estudadas, a porcentagem de positivos aumentou com o número de episódios prévios, indicando que a re-exposição favorece a aquisição desses anticorpos IgG específicos contra a MSP1<sub>19</sub>. Em Três Boeiras, a frequência de positivos após o primeiro episódio e após cinco ou mais episódios foi 61,10% e 81,32%, enquanto em São Luiz São Luiz do Tapajós a frequência de positivos foi mais baixa que em Três Boeiras, sendo que após o primeiro episódio e cinco ou mais episódios foi 29,70% e 50,00%, respectivamente. No entanto, o aumento na frequência de positivos após cinco ou mais episódios foi semelhante ao de Três Boeiras. Este aumento na frequência de positivos após a exposição repetida também foi observado em outros estudos que analisaram o perfil imunoepidemiológico da resposta contra a MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax* (Soares *et al.*, 1997,1999b; Morais *et al.*, 2005).

Estudo realizado em Cotijuba, Pará analisou a frequência de soros positivos quanto ao número de episódios prévios de malária e observou que entre

os indivíduos que relataram terem tido um ou dois episódios da doença, a porcentagem de amostras positivas foi 25,5% e 27,4%, respectivamente. Após o terceiro ou quarto episódio de malária houve aumento significativo na frequência de soros positivos, sendo 51,8% e 49,2%, respectivamente (Nina, 2004).

Em 2005, Ceravolo e colaboradores analisaram a resposta contra duas proteínas recombinantes a Duffy Binding Protein (DBP) e a MSP1<sub>19</sub>, em três áreas da Amazônia brasileira de alta endemicidade, e verificaram que a frequência de anticorpos IgG foi influenciada pelo número de episódios, sendo que no grupo que teve um episódio de malária, a frequência de positivos que reconheceram a MSP1<sub>19</sub> foi 60%, e após múltiplas infecções, aumentou para 68%. Para a DBP não houve reconhecimento após um episódio de malária, e após múltiplas infecções, a frequência de positivos foi 49%.

Mais recentemente (Wickramarachchi *et al.*, 2007), confirmaram que após a primeira exposição, a PvMSP1<sub>19</sub> é altamente imunogênica durante infecção natural em humanos, induzindo expressiva resposta de IgG específica. Vários outros grupos haviam mostrado o potencial imunogênico desta proteína (Park *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2003a).

Embora a resposta de anticorpos apresenta-se aumentada após mais de um episódio, observamos que esta resposta não está associada a proteção, pois os indivíduos que tiveram mais malária estão incluídos no grupo que relatou ter tido malária recentemente. No entanto, tem sido proposto que os anticorpos têm papel principal na proteção total induzida por alguns mecanismos, incluindo a inibição da invasão do parasito, o bloqueio parasito intra-eritrocítico e a inibição mediada por células (Herrera *et al.*, 2007).

Estudos anteriores que compararam a resposta contra proteínas recombinantes contendo as porções N e C-terminal de PvMSP1 mostraram que a porção C-terminal da molécula foi mais imunogênica que a N-terminal, e a resposta de anticorpos estava associada à infecção recente (Soares *et al.*, 1997, 1999c). No entanto, não foi avaliado se havia associação com proteção clínica ou com o risco de infecção por *P. vivax*.

Recentemente, Nogueira e colaboradores em 2006 mostraram que existe uma associação da resposta de anticorpos IgG, adquiridos naturalmente, e, predominantemente IgG3, específicos contra antígeno derivado da porção N-terminal da MSP1 de *P. vivax*, com proteção clínica e redução do risco de infecção. Nesse estudo, foi comparada a resposta contra as duas porções da proteína que representam as regiões conservadas e polimórficas, N- e C-terminal, respectivamente. Foram analisadas amostras de portadores assintomáticos e observou-se que a resposta contra a porção N-terminal conferiu proteção clínica por período superior a um ano. Esta associação não exclui a possibilidade de outros mecanismos estarem associados à resposta de anticorpos contra o N-terminal. Assim, deve ser considerada a necessidade de ampliar os estudos com esta porção da molécula.

O efeito da diversidade de seqüência da PvMSP1 na aquisição de anticorpos foi analisado em indivíduos da população do estado do Acre. Comparou-se a resposta de adquiridos contra 3 domínios polimórficos derivados da porção N-terminal e o domínio C-terminal altamente conservado na PvMSP1 e observaram que a exposição repetida para a malária resultou na presença de anticorpos IgG específicos contra as variantes de PvMSP1. Também analisaram a presença de anticorpos IgG específicos contra a proteína recombinante ICB2-5,

que contém 3 blocos conservados (bloco 1, 3, 5) e dois blocos variados (blocos 2 e 4) do alelo PvMSP1 da cepa Belém. A resposta foi predominantemente contra os domínios variáveis (Bastos *et al.*, 2007).

O reconhecimento da proteína recombinante contendo a porção C-terminal é alto, porém não foi mostrada associação com resposta imune protetora. Esta parte da molécula possui atividade biológica importante para a manutenção do ciclo de vida do parasito. Ensaio realizado *in vitro* mostrou que peptídeo derivado da MSP1 de *P. vivax* participa da interação com o reticulócito, tornando mais eficiente o processo de invasão. Esta ligação apresentou maior afinidade para o reticulócito do que para o eritrócito maduro (Rodríguez *et al.*, 2001). Outro aspecto a ser considerado é se o tratamento efetivo da malária favorece a diminuição da concentração desses anticorpos. Mas deve ser enfatizado que a célula B de memória pode persistir na ausência do antígeno e ser rapidamente reativada em uma re-infecção (Struik & Riley, 2004).

Nas duas localidades, analisamos se o tempo decorrido desde a última exposição, relatado pelos participantes, influenciava na percentagem de soros positivos, bem como nos níveis de anticorpos. Observamos que na área onde a transmissão foi mais intensa, a percentagem de positivos no grupo que relatou ter tido malária há menos de um ano foi maior, quando comparada com a do grupo que estava há mais de dez anos sem manifestar episódio de malária. Porém, a concentração de anticorpos foi semelhante. Na área com transmissão menos intensa, a percentagem de positivos e os níveis de anticorpos nos dois grupos foram semelhantes. Com base neste estudo, confirmamos que a porção C-terminal da Proteína 1 da Superfície de *P. vivax* é imunogênica, durante infecção

natural. Porém, a análise dos aspectos imunoepidemiológicos não mostrou associação desta resposta de anticorpos com aquisição de proteção.

Atualmente, encontram-se na fase de ensaios pré-clínicos e clínicos 25 diferentes preparações vacinais contra a malária, sendo que destas apenas duas são para *P. vivax* (Herrera *et al.*, 2007). Apesar dos avanços nos estudos que visam o desenvolvimento de vacina contra a malária, ainda não temos perspectivas de uma vacina para uso humano. Portanto, a compreensão tanto da epidemiologia da transmissão como dos aspectos relacionados à aquisição de resposta imune podem contribuir com os estudos que visam o desenvolvimento de vacina contra a malária.



## 5. CONCLUSÕES

1. A frequência de soros que apresentaram anticorpos IgG capazes de reconhecer a proteína recombinante (His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>) contendo a porção C-terminal da MSP1 de *P. vivax* foi maior nos indivíduos da localidade de Três Boeiras, quando comparado com São Luiz do Tapajós. A frequência de positivos foi 64,42% e 20,22%, respectivamente.

2. A concentração de anticorpos IgG estimada pelo índice de reatividade também foi mais alta nas amostras de Três Boeiras, quando comparado com São Luiz do Tapajós. A média dos índices de reatividade foi  $6,11 \pm 4,58$  e  $2,56 \pm 1,96$ , respectivamente.

3. As áreas de estudo apresentaram perfil diferente quanto à transmissão de malária. No ano de 2005, a incidência parasitária anual (IPA) de Três Boeiras foi cerca de 1000 vezes maior que o de São Luiz do Tapajós.

4. Em Três Boeiras e em São Luiz do Tapajós, a percentagem de indivíduos que relataram nunca terem tido malária foi 23,55% e 55,73%, respectivamente.

5. No grupo de indivíduos que relatou nunca ter tido malária, a frequência de soros que reconheceram a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> foi semelhante nas duas localidades.

6. No grupo exposto à malária, a frequência de soros positivos foi maior na população que reside na localidade de Três Boeiras, área onde a transmissão de malária foi mais intensa.

7. Nos dois grupos, exposto e não exposto, a concentração de anticorpos IgG, estimada pelo índice de reatividade, foi maior na população de Três Boeiras, sugerindo que a transmissão nesta área influenciou a intensidade da resposta.

8. A idade não influenciou na resposta de anticorpos da população de Três Boeiras, mas em São Luiz do Tapajós a percentagem de positivos foi menor entre os indivíduos com idade abaixo de 19 anos.

9. A prevalência de soros positivos na população que reside em Três Boeiras aumentou de acordo com o número de episódios prévios de malária. Porém, não foi possível associar com proteção, uma vez que os mais expostos estavam tendo malária recentemente.

10. A prevalência de soros positivos na população que reside em São Luiz do Tapajós não aumentou no grupo que relatou mais episódio e nem no grupo que relatou ter tido malária há mais tempo.

## 6. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

- ALVES, F.P., DURLACHER, R.R., MENEZES, M.J., KRIEGER, H., DA SILVA, L. P., CAMARGO, E.P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native amazonian populations **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **66(6)**: pp. 641–648, 2002.
- RICHIE, T.L., SAUL, A. Progress and challenges for malaria vaccines. **Nature**, **415**: 694 - 01, 2002.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K; TONGREN, J.E., RILEY, E.M. The war between the malaria parasite and immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Experimental Immunology**, **133**: 145 - 152, 2003.
- AYRES, M., AYRES, Jr., M., AYRES, D.L., SANTOS, A.A.S. BIOESTAT 4.0. **Aplicação estatística nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém, Pará.** Sociedade civil Mamirauá/MCT/ Imprensa oficial do estado do Pará, 324p, 2005.
- BARNWELL, J.W.; NICHOLS, M.E.; RUBINSTEIN, P. In vitro evaluation of the role of the Duffy Blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. **Journal Experimental Medicine** **169**: 1795 - 1802, 1989.
- BARRERO, C.A., DELGADO, G., SIERRA, A.Y., SILVA, Y., LOPEZ, C.P., PATARROYO, M.A. Gamma interferon levels and antibody production induced by two PvMSP-1 recombinant polypeptides are associated with protective immunity against *P. vivax* in *Aotus* monkeys. **Vaccine**, **23**: 4048 -4053, 2005.
- BASTOS, M. S., DA SILVA-NUNES, M., MALFRONTE, R.S., HOFMANN, E.H., WUNDERLICH, G., MORAES, S.L., FERREIRA, M.U. Antigenic polymorphism

and naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in rural Amazonians. **Clin Vaccine Immunol.** **14 (10):**1249-59, 2007.

BOUHAROUN-TAYOUN, H., ATTANATH, P., SABCHAREON, A., CHONGSUPHAJASIDDHI, T., DRUILHE, P. 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 Experimental Medicine**, **172:** 1633 - 1641, 1990.

BOUHAROUN-TAYOUN, H.; DRUILHE, P. *P. falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. **Infection and Immunity**, **60:** 1473 - 1481, 1992.

BOUHAROUN-TAYOUN, H., OEUVRAY, C., LUNEL, F., DRUILHE, P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **Journal Experimental Medicine**, **182:** 409 - 418, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Serviço de Vigilância Epidemiológica. **Situação Epidemiológica da Malária no Brasil**. Brasília: MS, p. 1, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. BRASIL. Ministério da Saúde. Serviço de Vigilância Epidemiológica. **Situação Epidemiológica da Malária no Brasil**. Brasília: MS, p. 2-3, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Diagnóstico laboratorial da Malária. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**. Brasília: MS, p. 42-43, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. BRASIL. Ministério da Saúde. Serviço de Vigilância Epidemiológica. **Situação Epidemiológica da Malária no Brasil**. Brasília: MS, p. 3, 2006.

- BRUCE-CHWATT, L.J. **Essential malariology**. 2<sup>a</sup> ed. London: William Heinemann Medical Books. P. 452, 1985.
- CARVALHO, L.J., DANIEL-RIBEIRO, C.T, GOTO, H. Malaria Vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. **Scandinavian Journal of Immunology**, **56**: 327 - 343, 2002.
- CERÁVOLO, I. P., ROMERO, O. B., BRAGA, É. M., FONTES, C. J. F., BRITO, C. F. A., SOUZA, J. M., KRETTLI, A. U., ADAMS, J. H., CARVALHO, L. H. Anti-*plasmodium vivax* Duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **72(6)**: pp. 675–681, 2005.
- COWMAN, A.F., CRABB, B.S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, **124**: 755 - 766, 2006.
- CUNHA, M.G., RODRIGUES, M.M., SOARES, I.S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1<sub>19</sub> expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine**, **20**: 385 - 396, 2001.
- DE SOUZA, J.M., COUTO, A.A.R.D`A., SILVA, E.B., ABDON, N.P., SILVA, R.S.U.** Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. In malária. **Cejup, Universidade Federal do Pará, Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, p 886, 1997.**
- DEL PORTILLO, H.A., LONGACRE, S., KHOURI, E., DAVID, P.H. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **88**: 4030 - 4034, 1991.

- DRUILHE, P., PERIGNON, J. L. Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stage in humans. **Immunol. Lett**, **41**: 115-120, 1994
- DUTTA, S., HAYNES, J.D., MOCH, J.K., BARBOSA, A., LANAR, D.E. Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **100**: 295 - 300, 2003.
- FERREIRA, M.U., SOARES, I.S. The merozoite surface protein-1 (MSP-1) as a human malaria vaccine candidate: Geographic patterns of allelic diversity and immune recognition. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, **52**: 254 - 268, 2000.
- FRASER, T., MICHON, P., BARNWELL, J.W., NOE, A.R., AL-YAMAN, F., KASLOW, D.C., ADAMS, J.H. Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Infection and Immunity**, **65(7)**: 2772-2777, 1997.
- FREVERT, U. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. **Trends Parasitology**, **9**: 417 - 424, 2004.
- GALINSKI, M.R., BARNWELL, J.W. *Plasmodium vivax*: a glimpse into the unique and shared biology of the merozoite. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **89**: 113 - 120, 1995.
- GALINSKI, M.R., BARNWELL, J.W. *Plasmodium vivax*: Merozoites, Invasion of Reticulocytes and Considerations for Malaria Vaccine Development. **Parasitology Today**, **12**: 20 - 29, 1996.
- GARRAUD, O., MAHANTY, S., PERRAUT, R. Malaria-specific antibody subclass in immune individuals; a Key source of information for vaccine design. **Trends in Immunology**, **24**: 30 - 35, 2003.

- GAUR, D., MAYER, G.C.D., MILLER, H.L. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **International Journal for Parasitology**, **34**: 1413 - 1429, 2004.
- GIBSON, H.L., TUCKER, J.E., KASLOW, D.C., KRETTLI, A.U., COLLINS, W.E., KIEFER, M.C., BATHUST, L.C., BARR, P.J. Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **50**: 325-34, 1992.
- GOOD, M.F. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. **Trends in Parasitology**, **21**: 29 - 34, 2005.
- GOOD, M.F., DOOLAN, D.L. Immune effector mechanisms in malaria. **Current Opinion in immunology**, **11**: 412 - 419, 1999.
- GOOD, M.F., KASLOW, D.C., MILLER, L.H. Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. **Annual Review Immunology**, **16**: 57 - 87, 1998.
- GOOD, M.F., STANISIC, D., XU, H., ELLIOTT, S., WYKES, M. The immunological challenge to developing a vaccine to the blood stages of malaria parasites. **Immunological Reviews**, **201**: 254 - 267, 2004.
- GREENWOOD, B., MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, **415**: 670 - 672, 2002.
- HERRERA, M.A., HERRERA, S. *Plasmodium vivax* vaccine development. **Molecular Immunology**, **38**: 443 - 445, 2001.
- HERRERA, S., BONELO, A., PERLAZA, L.B., VALENCIA, Z.A., CIFUENTES, C., HURTADO, S., QUINTERO, G., LÓPEZ, A.J., CORRADIN, G., HERRERA, A.M. Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and

immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein.

**International Journal for Parasitology, 34:** 1535 - 1546, 2004.

HERRERA, S., CORRADIN, G., HERRERA, A. M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. **Trends in Parasitology Review, 23:** n°3, 2007.

HOLDER, A.A., BLACKMAN, M.J. What is the function of MSP1 on the malaria merozoite? **Parasitology Today, 10:** 182-4, 1994.

HOLDER, A.A.; RILEY, E.M. Human Immune Response to MSP1. **Parasitology Today, 12:** 173 - 174, 1996.

KROTOSKI, W.A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene, 79:** 1-11, 1985.

LEE, K.N., SUH, I.B., CHANG, E.A., KIM, S.D., CHO, N.S., PARK, P.W., AN, S.S.A., PARK, O., LIM, C. Prevalence of antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in five different regions of Korea. **Tropical Medicine and Internacional Health, 8:** 1062 - 1067, 2003.

LIM, C. S., KIM, S.H., KWON, S.I., SONG, J.W., SONG, K.N.L.J. Analysis of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 gene sequences from resurgent Korean isolates. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene, 62:** 261 - 265, 2000.

LUTY, A.J., LELL, B., SCHMIDT-OTT, R., LEHMAN, L.G., LUCKNER, D., GREVE, B., MATOUSEK, P., HERBICH, K., SCHMID, D., MIGOT-NABIAS, F., DELORON, P., NUSSENZWEIG, R.S., KREMSNER, P.G. Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium*



falciparum in young African children. **Journal Infection Diseases 179**: 980 - 988, 1999.

MACHADO, R.L.D., FILHO, A.F.F., CALVOSA, V.S.P., FIGUEREDO, M.C., NASCIMENTO, J.M., PÓVOA, M.M. Correlation Between *Plasmodium vivax* in Belém, Pará state, Brazil and symptoms and clearance of parasitaemia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases 7**: 175 - 177, 2003.

MALAGUARNERA, L.; MUSUMECI, S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. **The Lancet Infectious Diseases, 2**: 472 - 478, 2002.

McGREGOR, I.A., CARRINGTON, S., COHEN, S. Treatment of East African *P. falciparum* malaria with west African human gamm-globulin. **Trasnsaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 50**: 170 - 175, 1963.

MENDIS, K., SINA, B.J., MARCESINI, P., CARTER, R., The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene, 64**: 97 - 106, 2001.

MILLER, L.H., BARUCH, D.I., MARSH, K., DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. **Nature, 415**: 673 - 679, 2002.

MITCHELL, G.H., THOMAS, A.W., MARGOS, G. DLUZEWSKI, A.R. BANNISTER, L.H. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. **Infection and Immunity, 72**: 154 - 158, 2004.

MOORE, S.A., SURGEY, E.G., CADWGAN, A.M. Malaria vaccines: where are we and where are we going? **The Lancet Infectious Diseases, 2**: 737 - 743, 2002.

- MORAIS, C.G., SOARES, I.S., CARVALHO, L.H., FONTES, C.J.F., KRETTLI, A.U., BRAGA, E.M. IgG isotype to c-terminal 19 kda of *plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in brazil. **Parasitology** **95**: 420-426. 2005
- MOTA, M.M. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. **Science**, **291**: 141 - 144, 2001.
- MOTA, M.M., RODRIGUEZ, A. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. **Cellular Microbiology**, **6**: 1113 – 1118, 2004.
- MOTTA, E.G.F. Fatores determinantes da Situação da Malária na Amazônia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (supl II)**: 17 - 30, 1992.
- NEVES, D.V., De MELO, A.L., LINARDI, P.M., VÍTOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 11<sup>a</sup> ed. Atheneu, São Paulo, 494, 2005.
- NOGUEIRA,P.A., ALVES, F. P., BECERRA, C. F., PEIN,O., SANTOS, N.R., SILVA, L.H. P., CAMARGO,E. P., DEL PORTILLO, H. A. A Reduced Risk of Infection with *Plasmodium vivax* and Clinical Protection against Malaria Are Associated with Antibodies against the N Terminus but Not the C Terminus of Merozoite Surface Protein **Infection and Immunity**, , p. 2726–2733, 2006.
- NINA, J.C. **Prevalência de Portadores Assintomáticos de *Plasmodium vivax* e Avaliação da Resposta imune Humoral em Indivíduos que Residem em Área Endêmica de Transmissão Estável de Malária**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes infecciosos e parasitários), 108p., Belém, Pará, Universidade Federal do Pará, 2004.

- O'DONNELL, R.A., SAUL, A., COWMAN, A.F., CRABB, B.S. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP1<sub>19</sub> across distantly related *Plasmodium* species. **Nature Medicine**, **6**: 91 - 95, 2000.
- PARK, C.G., CHWAE, Y.J., KIM, J.I., LEE, J.H., HUR, G.M., JEON, B.H., KOH, J.S., HAN, H., LEE, S.J., PARK, J.W., KASLOW, D.C., STRICKMAN, D., ROH, C.S. Serologic responses of korean soldiers serving in malaria-endemic áreas during a regent outbreak of *Plasmodium vivax*. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, **96**: 720 - 725, 2000.
- PARK JW, MOON SH, YEOM JS, LIM KJ, SOHN MJ, JUNG WC, CHO YJ, JEON KW, JU W, KI CS, OH MD, CHOE K. Naturally Acquired antibody responses to the c-terminal region of merozoite Surface protein 1 of *plasmodium vivax* in korea. **Clindiagn Lab Immunol** **8**: 14-20, 2001.
- PERERA, K.L.R.L., HANDUNNETTI, S.M., HOLM, I., LONGACRE, S., MENDIS, K. Baculovirus merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant antigens are highly protective in a natural primate model for human *Plasmodium vivax* malaria. **Infection and Immunity**, **66**: 1500 - 1506, 1998.
- RICHIE, T.L., SAUL, A. Progress and challenges for malaria vaccines. **Nature**, **415**: 694 - 01, 2002.
- RODRIGUES, M.H.C., CUNHA, M.G., MACHADO, R.L.D., FERREIRA, Jr., OC., RODRIGUES, M.M., SOARES, I.S. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. **Malaria Journal**, **2**: 39 - 45, 2003a.

- RODRIGUEZ, L.E., URQUIZA, M., OCAMPO, M., CURTIDOR, H., SUÁREZ, J., GARCIA, J., VERA, R., PUENTES, A., LOPÉZ, R., PINTO, M., RIVERA, Z., PATARROYO, M. E. *Plasmodium vivax* MSP-1 peptides have high specific binding activity to human reticulocytes. **Vaccine**, **20**: 1331- 1339, 2001.
- RILEY, E.M. WAHL, S., PERKINS, D.J., SCHOFIELD, L. Regulating immunity to malaria. **Parasite Immunology**, **28**: 35 - 49, 2006.
- ROSA, S.D., TZELEPIS, F., CUNHA, M.G., SOARES, I.S., RODRIGUES, M.M. **Immunology Letters**, **92**: 259 - 268, 2004.
- SACHDEVA, S., AHMAD, G., MAIHOTRA, P., MUKHERJEE, P., CHAUHAN, V.S. Comparison of immunogenicities of recombinant *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 19- and 42-Kilodalton fragments expressed in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity** **72**: 5775 - 5782, 2004.
- SAMBROOK, J., Russel, DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3<sup>a</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- SHI, P.Y., UDHAYKUMAR, V., OLOO, A.J., NAHLEN, B.L., LAL, A.A. Differential effect and interaction of monocytes, hyperimmune sera, and immunoglobulin G on growth of asexual stage *Plasmodium falciparum* parasites. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, **60**: 135 -141, 1999.
- SINNIS, P. Remnant lipoproteins inhibit malaria sporozoite invasion of hepatocytes. **Journal Experimental Medicine**, **184**: 945 - 954, 1996.
- SINNIS, P., SIM, K.B. Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*. **Trends in Microbiology**, **5**: 52 - 58, 1997.

- SINGH, S., PANDEY, K., CHATTOPADHAYAY, R. Biochemical, biophysical, and characterization of bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. **Journal Biology Chemical** **276**: 17111 - 17116, 2001.
- SOARES, I.S., LEVITUS, G., SOUZA, J.M., DEL PORTILLO, H.A., RODRIGUES, M.M. Acquired immune responses to the N-and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. **Infection and Immunity**, 1606 - 1614, 1997.
- SOARES, I.S., BARNWELL, J.W., FERREIRA, M.U., CUNHA, M.G., LAURINO, J.P., CASTILHO, B.A., RODRIGUES, M.M. A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. **Molecular Medicine**, **5**: 459 - 470, 1999a.
- SOARES, I.S., CUNHA, M.G., SILVA, M.N., SOUZA, J M., DEL PORTILLO, H A., RODRIGUES, M.M. Longevity of natural acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, **60**: 357-363,1999b.
- SOARES, I.S., OLIVEIRA, S., SOUZA, J.M., RODRIGUES, M.M. Antibody response to the N and C-terminal regions of the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. **Acta Tropica** **72**: 13 - 24, 1999c.
- SOARES, I.S., RODRIGUES, M.M. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. **Brazilian Journal Medical Biology Research** **31**: 317 - 332, 1998.
- STEVENSON, M.M., RILEY, E.M. Innate immunity to Malaria **Nature Reviews Immunology**, **4**: 169 - 180, 2004

- STRUIK, S.S., RILEY, E.M. Does malaria suffer from lack of memory?  
**Immunological Reviews**, **201**: 268 - 290, 2004.
- TAYLOR-ROBINSON, A.W., PHILLIPS, R.S., SEVERN, A., MONCADA, S., LIEW, F.Y. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. *Science* **260**: 1931 - 1934, 1993.
- TEBO, A.E., KREMSNER, P.G., LUTY, A.J. *Plasmodium falciparum*: a major role for IgG3 in antibody-dependent monocyte-mediated cellular inhibition of parasite growth in vitro. **Experimental Parasitology**, **98**: 20 - 28, 2001.
- WERTHEIMER, S.P., BARNWELL, J.W. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy Blood Group Glycoprotein: identification of a Parasite Receptor-like Protein. **Experimental Parasitology**, **69**: 340 - 350, 1989.
- WICKRAMARACHCHI, T., ILLEPERUMA, R.J., PERERA, L., BANDARA, S., HOLM, I., LONGACRE, S., HANDUNNETTI, S.M., UDAGAMA-RANDENIYA, P.V. Comparison of naturally acquired antibody responses against the C-terminal processing products of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. **Int Journal Parasitol** **37**: 199-208. 2007.
- WHO. What is malaria? **Roll Back Malaria**. Disponível em: <http://>acesso em 09 de maio de 2006.
- YANG, C., COLLINS, W.E., SULLIVAN, J.S., KASLOW, D.C., XIAO, L., LAL, A.A. Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in *Saimiri* monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. **Infection and Immunity**, **67**: 342 -349, 1999.

## ANEXO I

### CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE

**1- Título do Projeto:** Estudos moleculares e imunoepidemiológicos visando estratégias de controle da malária em municípios localizados na área de abrangência da rodovia BR-163: Itaituba, Jacareacanga e Novo progresso.

**2- Instituição onde será desenvolvido o projeto:** Universidade Federal do Pará (UFPA)

**3- Objetivos:** O objetivo geral deste projeto será detectar a ocorrência de indivíduos que apresentam parasitemias, mas não apresentam os sintomas da malária e verificar nesses indivíduos aspectos relacionados aos mecanismos de defesa adquiridos naturalmente contra a malária, como a resposta de anticorpos e possíveis polimorfismos genéticos.

**4- Procedimentos:** Serão coletados 5 mL de sangue venoso em 2 tubos à vácuo, um com anticoagulante e outro sem. Todo o material utilizado na coleta é descartável e você não será submetido a qualquer risco.

**5- Benefícios:** A realização desse estudo poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos de defesa que contribuem para o controle da parasitemia, e assim, aumentar o conhecimento sobre o que ocorre no organismo de uma pessoa, quando ela teve malária.

**6- Ética:** Sua participação neste estudo será sigilosa e, portanto, seu nome não será utilizado em nenhuma etapa desta pesquisa. Você poderá desistir de participar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento. Além disso, você será esclarecido sobre qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento da sua doença. Também será apresentada uma carta de esclarecimento sobre o estudo e os procedimentos envolvidos, que será lida para você, e caso concorde em participar, você deve assinar para confirmar sua participação e o entendimento dessa pesquisa em malária.

## ANEXO II

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Projeto de Pesquisa:** Estudos moleculares e imunoepidemiológicos visando estratégias de controle da malária em municípios localizados na área de abrangência da rodovia BR-163: Itaituba, Jacareacanga e Novo progresso.

A malária é uma doença causada por um protozoário, transmitida pela picada do mosquito infectado e seus principais sintomas são calafrio, febre e suor. Poucas pesquisas são realizadas para entender como o organismo da pessoa doente reage para se defender da malária. Portanto, a finalidade desse estudo é avaliar o que ocorre no organismo de um indivíduo com malária, contribuindo para o conhecimento sobre essa doença.

A realização deste estudo precisa da participação de pessoas que estão com malária. Esta participação será sigilosa e, portanto, seu nome não será utilizado em nenhuma etapa da pesquisa. Você poderá desistir de participar a qualquer momento, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento. Além disso, você será esclarecido sobre qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento da sua doença. Todo o material utilizado na coleta é descartável. Serão coletados 10mL de sangue, e durante este procedimento, você não será submetido a qualquer risco.

Se desejar obter mais informações ou esclarecer qualquer dúvida sobre a sua participação, pode entrar em contato com o Professor João Guerreiro Farias, no Departamento de Patologia da Universidade Federal do Pará ou pelo telefone (91) 3249-0373.

Após a leitura e explicações, entendi, não tenho dúvidas e concordei voluntariamente em participar desse estudo.

NOME:

DATA:

RG:

ASSINATURA:

Confirmo ter explicado a natureza e objetivos deste estudo ao paciente acima,

NOME:

RG:

DATA:

ASSINATURA:



## ANEXO III

**Título do projeto:** Estudos moleculares e imunoepidemiológicos visando estratégias de controle da malária em municípios localizados na área de abrangência da rodovia BR-163: Itaituba, Jacareacanga e Novo progresso

**Ficha Epidemiológica**

Nº da amostra:.....Data:.....

Resultado do exame - parasitemia: .....

Nome:.....

Sexo: ( ) F ( ) M Idade:..... Local de Nasc.....

Endereço:.....

Quanto tempo mora neste endereço.....

Deslocou-se nos últimos 30dias?.....

Endereço nos últimos 10 anos:

1 .....Período: .....

2 .....Período:.....

Usa alguma proteção individual? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual? .....

Doenças tropicais:

( ) malária ( ) leishmaniose ( ) doença de Chagas ( ) toxoplasmose

Quantas vezes? ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) mais de 4

Última malária:..... Tipo: .....

Já fez transfusão de sangue ( ) Sim ( ) Não Quantas? .....

Está tomando medicamento? .....

História clínica atual .....

Temperatura corporal: .....Tipo sanguíneo:..... Fator Rh:.....

Se mulher, está grávida? ( ) Sim ( ) Não

SINAIS E SINTOMAS REFERENTES AO QUADRO CLÍNICO E/OU DECORRENTES DE INTOLERÂNCIA OU TOXICIDADE DEVIDAS AO MEDICAMENTO (OU ASSOCIAÇÃO DE DROGAS) EM ESTUDO.

Sinal/Sintoma / DIA	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	DX	DX
Febre										
Calafrio										
Cefaléia										
Artralgia/ Lombalgia										
Astenia / Mialgias										
Tonteira										
Zumbidos/ Surdez										
Insônia										
Náuseas/ Vômitos										
Dor Abdominal										
Erução / Flatos										
Diarréia										
Colúria										
Oligúria /Anúria										
Palidez / Icterícia										
Prurido /Alergia										
Tosse / Dispnéia										
Anorexia										
Esplenomegalia										
Hepatomegalia										
Pressão Arterial										
Freq. Respiratória										
Pulso										
Temperatura Axilar										

Data:

---

Assinatura do Médico