KARIN KIRCHGATTER

**Análise de seqüências *var* de
populações naturais de
Plasmodium falciparum da
Amazônia Brasileira**

Título da Tese: Análise de seqüências *var* de populações naturais de *Plasmodium falciparum* da Amazônia Brasileira.

5) Presidente _____

KARIN KIRCHGATTER

**Análise de seqüências *var* de
populações naturais de
Plasmodium falciparum da
Amazônia Brasileira**

**Tese apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Biologia
da Relação Patógeno Hospedeiro**

**Orientador: Prof. Dr. Hernando
Antonio del Portillo**

SÃO PAULO

2001

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Kirchgatter, Karin.

Análise de seqüências *var* de populações naturais de *Plasmodium falciparum* da Amazônia Brasileira / Karin Kirchgatter. -- São Paulo, 2001.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Departamento de Parasitologia.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Linha de pesquisa: Malária.

Orientador: del Portillo, Hernando Antonio.

Versão do título para o inglês: Analysis of *var* sequences from natural parasite populations of *Plasmodium falciparum* in the Brazilian Amazon.

Descritores: 1. Malária 2. *Plasmodium falciparum* 3. Malária grave 4. Genes *var* 5. Proteína PfEMP1 6. DBL1 α

ICB/SBIB181/2001

Às minhas duas famílias (Kirchgatter & Hildebrand) e aos meus amigos, pelo estímulo, compreensão e apoio que sempre me deram.

Ao Nilton, pelo carinho e
paciência nas horas difíceis.

Aos pacientes com malária, em especial
àqueles que fizeram este estudo possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hernando Antonio del Portillo, pela orientação, pelo esforço na obtenção dos recursos necessários e pela confiança que depositou em mim.

Ao Dr. Luiz Jacintho da Silva, Superintendente da SUCEN, e ao PqC José Carlos Rehder de Andrade, Diretor da Divisão de Programas Especiais, pelo apoio e incentivo à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Erney Plessman Camargo, por disponibilizar a infra-estrutura do departamento.

À PqC Silvia Maria Di Santi, pelos momentos difíceis que passou no Laboratório de Malária da SUCEN para que eu pudesse realizar este trabalho e pela amizade com que sempre pude contar.

Ao Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira, pelo fornecimento de amostras de Rondônia, Acre e Tanzânia e ao Dr. Crispim Cerutti Jr., pelo fornecimento de amostras de Mato Grosso.

Aos Drs. Cris Newbold e Alister Craig, por compartilharem protocolos de PCR e “primers” antes de sua publicação.

À Profa. Dra. Marta Teixeira e aos membros de seu laboratório, por facilitarem a utilização do Seqüenciador Automático.

Ao Prof. Dr. Carlos Winter, pela co-orientação e auxílio nas análises das seqüências e ao Prof. Dr. Marcos Boulos, pela ajuda na análise de dados laboratoriais de pacientes graves.

Aos Drs. Anamaria Aranha Camargo, Alex Fiorini Carvalho e Luiz Fernando Lima Reis, do Instituto Ludwig, pela utilização dos robôs Hydra e Flexys.

À Dra. Emília Kimura, pelo anticorpo anti-eritrócitos humanos e à Dra. Silvia Reni Uliana, pela proteína Meta1-His.

Aos Drs. Camila Indiani de Oliveira, Gerhard Wunderlich e Carmem Fernandez Becerra, pela discussão no dia a dia para solução dos problemas.

Aos Drs. Myrna Garcia Serrano e João Marcelo Pereira Alves, e à Flávia Maia, Rogéria Ventura e Adriana Fuzato, pelo auxílio nos programas de análise de seqüências e pelo convívio diário sempre alegre.

Às minhas alunas, bolsistas da FUNDAP, Veruska Marques e Priscilla Avila, pela colaboração na triagem dos clones e no descongelamento e manutenção dos isolados em cultura.

Aos colegas que participaram de alguma forma deste trabalho, pela colaboração valiosa e aos demais colegas do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e do Laboratório de Malária da SUCEN, pela colaboração de todos os dias.

Este estudo contou com apoio financeiro INCO-DC Programme (IC18-CT98-0364) e Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN).

ÍNDICE

PREFÁCIO.....	I
ABREVIATURAS.....	II
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Ciclo de Vida do <i>Plasmodium</i>	2
1.2. Situação da Malária.....	4
1.2.1. No Mundo.....	4
1.2.2. No Brasil.....	5
1.2.3. No Estado de São Paulo.....	7
1.3. Aspectos Clínicos e Laboratoriais da Malária Grave.....	8
1.4. Aspectos Moleculares da Malária Grave.....	12
1.4.1. Seqüestramento e Citoaderência.....	12
1.4.1.1. Receptores do hospedeiro envolvidos em citoaderência.....	13
1.4.1.2. Ligantes do parasita envolvidos em citoaderência.....	18
1.4.2. Autoaglutinação e "Rosetting".....	20
1.4.2.1. Receptores do hospedeiro envolvidos em "rosetting".....	21
1.4.2.2. Ligantes do parasita envolvidos em "rosetting".....	24
1.4.3. Variação Antigênica.....	25
1.4.3.1. Proteína de Membrana do Eritrócito 1 (PfEMP1) e Reconhecimento Imune.....	27
1.4.4. Citocinas.....	35

2. OBJETIVOS.....	37
2.1. Objetivo Geral.....	38
2.2. Objetivos Específicos.....	38
 3. PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS.....	 40
3.1. Pacientes.....	41
3.1.1. Graves.....	41
3.1.2. Não Graves.....	42
3.2. Descongelamento, cultivo e purificação de parasitas maduros.....	42
3.3. Extração do DNA genômico.....	43
3.4. Extração de RNA.....	43
3.5. Tratamento com DNase e Síntese de cDNA.....	44
3.6. Amplificação de DNA.....	44
3.7. Gel de Agarose e Purificação dos Fragmentos.....	45
3.8. Clonagem.....	45
3.9. Análise das Seqüências.....	46
3.10. Southern Blot.....	47
3.10.1. Preparo de Sondas Radioativas.....	47
3.10.2. Preparo, Hibridação e Lavagem das Membranas.....	47
3.11. PCR Multiplex.....	48
3.12. Expressão de Proteínas.....	49
3.13. Imunofluorescência.....	50

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1. Análise do repertório de seqüências DBL1 α de genes <i>var</i> de isolados de campo de <i>P. falciparum</i> dos Estados de Mato Grosso e Rondônia, Brasil.....	52
4.2. Análise de seqüências DBL1 α de genes <i>var</i> expressos em isolados de campo de <i>P. falciparum</i> obtidos de pacientes com malária grave infectados na Região Amazônica Brasileira.....	60
5. CONCLUSÕES.....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
7. ANEXO 1.....	88
8. ANEXO 2.....	93
9. ANEXO 3.....	104
10. ANEXO 4.....	132

PREFÁCIO

"Esta tese foi elaborada de acordo com as Normas da CPG/ICB relativas a outras formas de elaboração de tese de doutorado que permitem a inclusão, como Anexos, de resultados já publicados em periódicos internacionais indexados em língua inglesa. Permite ainda, que detalhes metodológicos e resultados obtidos sejam aqueles contidos nos artigos anexados ao corpo da tese".

Artigos que compõe o corpo da tese:

Anexo 1 - "*Plasmodium falciparum*: DBL-1 *Var* Sequence Analysis in Field Isolates from Central Brazil". 2000. Kirchgatter, K.; Mosbach, R. & del Portillo, H.A. *Experimental Parasitology* 95: 154-7.

Anexo 2 – "Association of severe non-cerebral *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil with expressed PfEMP1 DBL1 α sequences lacking cysteine residues". Karin Kirchgatter e Hernando A. del Portillo. *Molecular Medicine*. Submetido.

Este trabalho foi desenvolvido segundo os aspectos éticos de pesquisas envolvendo seres humanos e foi aprovado em 08/07/1998 pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Parecer 013/CEP – Anexo 4).

ABREVIATURAS

aa - aminoácidos
amp - ampicilina
ATS – “acidic terminal segment”
CD – “cluster of differentiation”
CIDR – “cysteine-rich interdomain region”
CLAG - "cytoadherence-linked asexual gene"
CR1 - receptor de complemento 1
CSA - sulfato de condroitina A
CSP - Proteína Circumsporozoíta
dATP - desoxiadenosinatrifosfato
DBL – “Duffy-binding-like domain”
DMSO - dimetilsulfóxido
DNA - ácido desoxirribonucleico
DNase - desoxirribonuclease
DO - densidade óptica
DP - desvio padrão
EBA – “erythrocyte-binding antigens”
EDTA - ácido etileno-diamino-tetra-acético
GST - glutationa-s-transferase
HA - ácido hialurônico
HS - "heparan sulphate"
ICAM-1 - "intercellular adhesion molecule 1"
IFA - Ensaio de imunofluorescência indireta
IgG - Imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
IPTG - isopropil 2-D-tiogalactopiranosídeo
KAHRP - "knob-associated His-rich protein"
kb - kilobase
kDa - kiloDalton
LB - meio de cultura Lúria - Bertani
PCR - Reação de Polimerização em Cadeia
PECAM-1 - "platelet-endothelial cell adhesion molecule 1"
PfEMP1 – “*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1”
RNase - ribonuclease
SDS - dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TEMED - N,N,N',N' - tetrametil-etilenodiamina
tet - tetraciclina
Tris - Tris -(hidroximetil) - aminometano
TSP - trombospondina
UV - luz ultravioleta
VCAM-1 - "vascular cell adhesion molecule 1"

RESUMO

Os genes *var* de *Plasmodium falciparum* codificam a proteína PfEMP1 expressa na superfície de eritrócitos infectados e que medeia os fenômenos de citoaderência e “rosetting”. Ambos os fenômenos estão diretamente associados à malária grave, e seu domínio mais N-terminal, DBL1 α , media especificamente “rosetting”. Análise de seqüências DBL1 α de isolados brasileiros e de outros países revelou que a similaridade entre elas não pode prever origem geográfica. Com o objetivo de determinar se existem seqüências DBL1 α associadas à malária grave, analisamos as seqüências DBL1 α expressas em parasitas obtidos de pacientes brasileiros com esta manifestação clínica e encontramos que as seqüências predominantemente expressas apresentavam uma ou duas deleções de cisteínas. Significativamente, apesar de freqüentes no genoma de parasitas de pacientes com malária não grave, essas seqüências foram raramente expressas. Esses dados demonstram a primeira associação de seqüências PfEMP1 expressas e malária grave em pacientes da Amazônia Brasileira.

ABSTRACT

Plasmodium falciparum *var* genes code for PfEMP1, a protein expressed on the surface of infected erythrocytes, and which mediates cytoadherence and rosetting. Both phenomena are directly associated with severe malaria and the most N-terminal domain, DBL1 α , specifically mediates rosetting. DBL1 α sequence analysis from Brazilian and worldwide isolates revealed that sequence similarities cannot predict geographical origin. To determine whether there are DBL1 α sequences associated with severe malaria, we examined expressed *var* DBL1 α sequences in patients with severe malaria from the Brazilian Amazon and found that the predominantly expressed DBL1 α sequences from these parasites lacked 1-2 cysteine residues. Significantly, these sequences were amply found on the genomic repertoire of parasites from patients with mild malaria and yet they were rarely expressed. These data demonstrate the first association of particular PfEMP1 expressed sequences and severe malaria in patients from the Brazilian Amazon.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ciclo de Vida do *Plasmodium*

A malária é uma doença parasitária transmitida na natureza pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas por protozoários do gênero *Plasmodium*, e caracteriza-se por acessos de febre com intervalos determinados, dependendo da espécie de *Plasmodium* envolvida. Quatro espécies causam a doença no homem: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*. No Brasil, somente três espécies de *Plasmodium* são encontradas: *P. vivax* e *P. falciparum*, agentes da febre terçã, cujos acessos ocorrem a cada 48 horas e *P. malariae*, responsável pela febre quartã, com acessos a cada 72 horas (revisado em Bruce-Chwatt, 1985).

O ciclo de vida do *Plasmodium* inicia-se quando o mosquito ingere sangue de um hospedeiro humano contendo formas sexuadas maduras, denominadas gametócitos femininos e masculinos. No estômago do mosquito os gametócitos masculinos sofrem exflagelação, originando gametas masculinos (microgametas), enquanto que os gametócitos femininos sofrem maturação para gametas femininos (macrogametas). O microgameta então, fertiliza o macrogameta, e a fusão destes dois forma o zigoto, que após tornar-se móvel é chamado de oocineto. O oocineto fixa-se na parede do estômago, entre as células epiteliais, sendo denominado oocisto. Dentro do oocisto formam-se muitos esporozoítas, células alongadas e móveis, com um núcleo central, que após a liberação na cavidade corpórea do mosquito, alcançam as glândulas salivares tornando-o infectivo. Quando o mosquito alimenta-se novamente de sangue, os esporozoítas são injetados na corrente circulatória. Após um máximo de 30 minutos, os esporozoítas entram nos

hepatócitos e sofrem processo de desenvolvimento conhecido como esquizogonia pré-eritrocítica. Interessante notar que os esporozoítas podem entrar e sair de muitos hepatócitos, através de penetração direta na membrana plasmática, provavelmente buscando hepatócitos específicos que sejam suscetíveis à infecção (Mota e cols., 2001). Os esquizontes que se formam após a esquizogonia pré-eritrocítica rompem a célula e liberam merozoítas na circulação, que por sua vez invadem as células vermelhas do sangue e transformam-se em trofozoítas jovens ou anéis. Quando começam a crescer e seu citoplasma torna-se mais irregular, são denominados trofozoítas maduros, e após o processo de divisão assexual, são chamados de esquizontes, contendo vários merozoítas em seu interior. Após o término do processo de divisão os esquizontes rompem as hemácias e os merozoítas liberados na corrente circulatória invadem novas hemácias, iniciando novo ciclo eritrocítico. Esta liberação de parasitas na circulação é responsável pelo aparecimento dos sintomas e portanto, a duração do ciclo eritrocítico determina a

Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum* (modificado de www.malariatest.com).

periodicidade destes sintomas, variando entre as espécies de *Plasmodium*. Após algumas gerações de merozoítas, alguns se diferenciam em formas sexuais (gametócitos), sofrem maturação e são ingeridos por fêmeas de anofelinos durante o repasto sanguíneo, fechando o ciclo (Figura 1).

1.2. Situação da Malária

1.2.1. No Mundo

A malária é a doença parasitária tropical mais importante, causando a morte de mais pessoas que qualquer outra doença transmissível, exceto tuberculose. Ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que 40% da população mundial vive em áreas de risco. Anualmente, estima-se que ocorram 300 a 500 milhões de casos clínicos e 1,5 a 2,7 milhões de pessoas morrem devido a complicações decorrentes da malária, principalmente no continente africano (Figura 2), sendo 1 milhão de crianças menores de 5 anos de idade. Outros grupos de alto risco são mulheres durante a gestação e viajantes não imunes. Epidemias de malária relacionadas a dificuldades econômicas e problemas ambientais também contribuem para as taxas de mortalidade. *P. falciparum* é o responsável pela maioria das infecções e quase a totalidade dos óbitos, ocorrendo em muitos países, porém, principalmente no continente africano (revisado em Breman, 2001).

Figura 2.
Taxas de mortalidade da malária

(modificado de <http://mosquito.who.int/docs/whr99.htm>)

A Organização Mundial de Saúde listou 101 países ou territórios como endêmicos para a malária: 45 países africanos, 21 americanos, 4 europeus, 14 no

leste mediterrâneo, 8 no sudeste asiático e 9 na região oeste do Pacífico. Entretanto, mais de 90% de todos os casos de malária estão na África Sub-Saara. Fora do continente africano, 2/3 da malária se concentram em apenas 6 países. Por ordem crescente de incidência estes países são: Ilhas Salomão, Colômbia, Vietnã, Sri Lanka, Brasil e Índia (WHO, 1996).

1.2.2. No Brasil

O Brasil é responsável por 50,6% dos casos de malária registrados nas Américas, sendo que 99,7% concentram-se na Região Amazônica, principalmente no Pará, Amazonas e Rondônia, responsáveis por quase 80% dos casos (Figura 3). Em três anos consecutivos (1996, 1997 e 1998), o número de casos notificados no Brasil foi inferior a 500 mil. Entretanto, em 1999, o número oficial chegou a 632.813, registrando um aumento de 34%, com 15% de acréscimo nas infecções por *P.*

Figura 3. Exames positivos de malária, registrados nos estados da Amazônia Legal. Brasil, 1990 a 1999. Fonte: GT/Malária e Coordenações Regionais da FUNASA.

falciparum. Já em 2000, houve um pequeno decréscimo, sendo notificados 611.042 casos (www.funasa.gov.br/epi/pdfs/casos_conf_por_uf_1980_2000.pdf). O número de óbitos devido à malária varia de estado para estado, é impreciso e provavelmente subnotificado. Em 1998, 151 óbitos devido à malária foram registrados, contra 137 de 1997, o que significa 10% de aumento (www.funasa.gov.br/epi/malaria/pdfs/resumo_exec_pcm.pdf).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o risco de se adquirir malária na Amazônia Brasileira (incidência por 1000 habitantes) é de 30,3, o 3º índice do continente. Porém, os países endêmicos do continente africano têm uma média de 120, variando de 0,01 (Argélia) a 501 (Malawi). O Brasil também responde pela maioria das infecções causadas por *P. falciparum* no continente americano, mas possui um índice de risco de 10,3, menor que o observado para as Guianas (WHO, 1997).

No que diz respeito à espécie de plasmódio detectada, até 1983 o *P. vivax* teve maior frequência relativa. Entretanto, por motivos ainda pouco esclarecidos, de 1984 a 1988 o *P. falciparum* apresentou ligeiro predomínio, sendo detectado em mais de 50% das lâminas positivas. Então, desde 1988, quando ocorreu nova inversão da fórmula parasitária, o *P. vivax* tem sido a espécie predominante no Brasil. Em 1999 e 2000, somente 18,6% e 20,5% dos casos foram causados por *P. falciparum*, respectivamente (fontes SUCEN, Gerência Técnica de Malária e Coordenações Regionais da FUNASA).

Acredita-se que a expansão da rede de laboratórios, aliada ao uso da mefloquina e de testes imunocromatográficos nas áreas de difícil acesso, tenha contribuído para a diminuição do número de *P. falciparum* no Brasil. Em

contrapartida, o tratamento para *P. vivax* é de duração mais longa e a doença geralmente se manifesta de forma benigna, levando o paciente a não aderir por completo ao tratamento. A partir daí ocorrem as recaídas, aumentando as fontes de infecção e a quantidade de casos de malária por *P. vivax*.

Soma-se a esse quadro o aparecimento no Brasil de cepas de *P. vivax* mais virulentas, capazes de causar casos graves de malária (Kalmar e cols., 1998) e de cepas multi-resistentes aos antimaláricos tais como cloroquina e mefloquina (Alecrim e cols., 1999).

1.2.3. No Estado de São Paulo

O Estado de São Paulo não é considerado área com transmissão ativa de malária, sendo registrados poucos casos autóctones anualmente, em regiões de Mata Atlântica com plantas da família Bromeliaceae, que funcionam como criadouros de anofelinos do subgênero *Kerteszia*. A malária associada a estes vetores, sempre causada por *P. vivax* ou *P. malariae*, apresenta quadro bem específico com parasitemias baixas, sintomas moderados e transmissão isolada.

Os casos importados representam quase a totalidade de casos registrados no estado. Apesar do aumento de casos de malária no Brasil, a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), órgão responsável pelo diagnóstico, tratamento e controle do vetor da doença no estado, vem registrando decréscimo no número de casos. Em 1999, foram registrados 292 casos de malária, sendo 75,3% diagnosticados como *P. vivax*, 20,2% *P. falciparum* e 4,5% *P. vivax* associado a *P. falciparum* (fonte SUCEN).

Já na capital do estado, o Laboratório de Malária registrou 105 casos em 2000, sendo 65,7% *P. vivax*, 28,6% *P. falciparum*, 2,8% *P. malariae* e 2,8% *P. vivax* associado a *P. falciparum*. Muitos casos são importados de outros países endêmicos (21%), entretanto, os estados brasileiros de Pará e Rondônia foram responsáveis por quase a metade dos casos (fonte SUCEN).

Infelizmente, alguns profissionais de saúde do Estado de São Paulo, assim como de outras áreas não endêmicas para malária, não estão habituados a suspeitar, diagnosticar e tratar casos desta doença. O atraso na formulação da hipótese diagnóstica de malária e freqüentemente a suspeita de outras infecções, podem causar uma piora no quadro clínico, fazendo com que a porcentagem de casos graves seja mais elevada nessas regiões.

1.3. Aspectos Clínicos e Laboratoriais da Malária Grave

Malária grave designa uma infecção com manifestações e complicações que são potencialmente fatais no homem (Warrel, 1987), causando 15 a 20% de mortalidade apesar das drogas antimaláricas efetivas e da assistência médica correta (WHO, 1990). Anualmente, 5 a 10 milhões de indivíduos infectados desenvolvem complicações durante a infecção, manifestadas como coma (malária cerebral), acidose metabólica, hipoglicemia, anemia severa, insuficiência renal e edema pulmonar (White e Ho, 1992), cuja freqüência pode variar conforme o nível de transmissão de malária na área (Tabela 1).

Tabela 1. Principais manifestações de malária grave observadas e grupo etário mais atingido, em áreas de diferentes níveis de transmissão de malária.

TRANSMISSÃO	PRINCIPAL MANIFESTAÇÃO DE MALÁRIA GRAVE	GRUPO ETÁRIO
ALTA	ANEMIA	CRIANÇAS JOVENS
INTERMEDIÁRIA	MALÁRIA CEREBRAL E ACIDOSE METABÓLICA	CRIANÇAS DE TODAS AS IDADES
BAIXA	INSUFICIÊNCIA RENAL E EDEMA PULMONAR	ADULTOS
	ANEMIA E HIPOGLICEMIA	CRIANÇAS
	MALÁRIA CEREBRAL E ACIDOSE METABÓLICA	TODOS

(WHO, 1990; Luxemburger e cols., 1996; Snow e cols., 1997).

Em muitas partes do mundo, disfunção cerebral é a manifestação grave mais comum da malária falciparum e a principal causa de morte em adultos com malária grave. Devido à característica histopatológica comum de obstrução das veias e capilares do cérebro com eritrócitos contendo trofozoítas maduros e esquizontes, o coma desenvolve-se rapidamente após a convulsão generalizada conduzindo a uma letalidade de 4 a 50%. Na Tailândia e Vietnã, metade dos casos de malária falciparum grave têm malária cerebral (Tran e cols., 1996). Entretanto em outros locais, como Papua Nova Guiné, esse número cai para 17% (Lalloo e cols., 1996). Esse dado para o Brasil não está disponível, mas tendo em vista as publicações existentes, pode-se notar que a malária falciparum grave, neste país, apresenta quase que exclusivamente complicações renais e respiratórias (Corbett e cols., 1989; Duarte e cols., 1985; Boulous, 1992).

Edema pulmonar agudo também é uma complicação fatal comum, apresentando edema intersticial com células endoteliais aumentadas e monócitos estreitando o lumen capilar. O interstício edematoso também contém macrófagos com endócitos e pigmento malárico (Duarte e cols., 1985).

Outra complicação importante na malária grave é a insuficiência renal aguda, definida como um aumento na creatinina sérica acima de 3 mg/dL ou um aumento na uréia sangüínea acima de 40 mg%. Pacientes com insuficiência renal aguda sem envolvimento de múltiplos órgãos têm um bom prognóstico se a diálise peritoneal for realizada. No Vietnã, metade dos pacientes com malária grave apresentava evidência bioquímica de envolvimento renal (creatinina sérica >2 mg/dL), entretanto somente 30% preenchiem os critérios da WHO para insuficiência renal aguda e metade deles necessitaram de diálise. Edema pulmonar é comum em pacientes com insuficiência renal (50%), cuja mortalidade pode chegar a 45% (WHO, 2000).

Anemia é uma consequência inevitável da malária grave, sendo definida por Hb<7g/dL, Ht<20%. Icterícia (bilirrubina total no soro >3 mg/dL) é comum em pacientes com insuficiência renal aguda e em parasitemias acima de 100.000/mm³ (WHO, 2000).

Um aspecto laboratorial importante da malária grave é o grau de neutrófilos (mas não de monócitos) contendo pigmento malárico que, em áreas hipoendêmicas, tem sido utilizado para predizer a gravidade da infecção, com sensibilidade e especificidade maior que 73% (Nguyen e cols., 1995). Em áreas hiperendêmicas não há correlação entre neutrófilos ou mesmo monócitos com pigmento e malária grave (Metzger e cols., 1995).

Níveis séricos de procalcitonina (PCT) têm sido determinados em pacientes com malária (Davis e cols., 1994; Al-Nawas e Shah, 1997). Em pacientes graves, concentrações de PCT antes do tratamento foram encontradas diretamente proporcionais às parasitemias (Hollenstein e cols., 1998). Além das concentrações mais baixas encontradas em pacientes semi-imunes, em relação a não imunes, as

mais altas concentrações foram obtidas em pacientes com malária grave, sendo que 6 dos 7 pacientes com níveis de PCT $>25\text{ng/ml}$ morreram (Chiwakata e cols., 2001). A PCT já é conhecida como marcador de sepsis, onde são encontrados valores $>100\text{ng/ml}$ (Assicot e cols., 1993). Em indivíduos saudáveis a PCT é indetectável ($<0.1\text{ng/ml}$). Entretanto, além de infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias, outros estímulos são responsáveis pela elevação da PCT, como queimaduras, traumas e pancreatites (Nylen e cols., 1998). Tanto a origem como o papel da PCT na sepsis são desconhecidos, mas acredita-se que sua produção ocorra nas células do sistema monócito-macrófago (Oberhoffer e cols., 1999), mediando uma resposta secundária que aumenta a resposta inflamatória (Whang e cols., 1999).

Por fim, precisamos ter em mente que a malária é uma doença sistêmica, onde os diferentes sistemas afetados refletem a infecção dos eritrócitos.

Portanto, não se pode esperar que um único órgão ou sistema seja afetado, mas muitos, com os respectivos sinais e sintomas (Figura 4).

Figura 4. Inter-relações existentes entre os fenômenos da malária *falciparum* grave (modificado de Boullos, 1992).

A malária grave, portanto, é uma síndrome complexa, determinada por fatores tanto do hospedeiro como do parasita. Dentre os fatores do parasita que podem ser citados como fenótipos de virulência devemos ressaltar a capacidade de citoaderência, "rosetting" e variação antigênica, além da indução de diversas citocinas.

1.4. Aspectos Moleculares da Malária Grave

1.4.1. Seqüestramento e Citoaderência

O ciclo eritrocítico do *P. falciparum* apresenta uma particularidade em relação a outros plasmódios que parasitam o homem. Trofozoítas maduros e esquizontes são seqüestrados da circulação periférica (Bignami e Bastianelli, 1889), devido à adesão dos eritrócitos infectados a células endoteliais (Miller, 1969). Alterações na superfície dos eritrócitos infectados, denominadas "knobs", são os sítios de adesão ao endotélio e a outros eritrócitos (Luse e Miller, 1971)(Figura 5). Essa habilidade de adesão do parasita lhe permite escapar do clareamento pelo baço e fornece uma melhor maturação no ambiente venoso microaerofílico.

Entretanto, vale a pena ressaltar que eritrócitos infectados com trofozoítas maduros de *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* são capazes de passar pelo baço.

Figura 5. Ciclo eritrocítico do *Plasmodium falciparum* (modificado de Bolad e Berzins, 2000).

Apesar da maioria dos estudos focarem *P. falciparum*, seqüestramento também foi observado na malária de roedores e primatas (Jacobs e Warren, 1967; Smith e cols., 1982; Gilks e cols., 1990; Aikawa e cols., 1992; Fujioka e cols., 1994).

Interessante notar que, desafiando o conceito geral em relação à biologia dos estágios eritrocíticos de *P. falciparum*, a análise de sua distribuição nos capilares de cérebro de 50 pacientes revelou que todos os seus estágios de desenvolvimento são seqüestrados durante uma malária grave (Silamut e cols., 1999). Realmente, eritrócitos infectados com trofozoítas jovens, podem aderir especificamente às células endoteliais de cérebro e pulmão. Essa adesão ocorre através de duas proteínas do parasita recém identificadas (RSP-1 e RSP-2) que são exportadas para a superfície do eritrócito infectado e desaparecem rapidamente após o início da adesão por PfEMP1 (ver 1.4.3.1) (Pouvelle e cols., 2000).

A adesão ao endotélio, ou citoaderência, tem papel importante na patogenicidade da doença (Miller e cols., 1994), causando oclusão de pequenos vasos e contribuindo para falência de muitos órgãos (Howard e Gilladoga, 1989; Patnaik e cols., 1994). Citoaderência é um termo que pode também ser utilizado genericamente para designar, além de adesão ao endotélio, adesão de hemácias parasitadas a outras hemácias infectadas (autoaglutinação) ou mesmo a hemácias não infectadas ("rosetting").

1.4.1.1. Receptores do hospedeiro envolvidos em citoaderência

Várias moléculas já foram identificadas como receptores endoteliais por sua habilidade em aderir a eritrócitos parasitados em ensaios *in vitro* (Figura 6 e Tabela 2).

Figura 6. Representação esquemática das moléculas implicadas em citoaderência. Linhas pontilhadas significam interações ainda não confirmadas (modificado de Cooke e cols., 2000).

Trombospondina (TSP) foi a primeira molécula descrita como receptor de citoaderência (Roberts e cols., 1985), sendo posteriormente demonstrada se ligar a Proteína de Membrana do Eritrócito 1 (PfEMP1)(Baruch e cols., 1996), que será discutida no item 1.4.3.1. Entretanto, o domínio da PfEMP1 responsável por essa adesão ainda não foi precisamente mapeado.

CD36 foi a segunda molécula a ser implicada em citoaderência (Barnwell e cols., 1989), sendo encontrada em monócitos, células endoteliais, plaquetas e eritroblastos. A ligação à PfEMP1 é promovida pelo domínio CIDR (Baruch e cols., 1997; Smith e cols., 1998; Baruch e cols., 1999). Foi demonstrado que um subfragmento recombinante da CIDR, de 179 resíduos, que compreende a região de ligação a CD36, inibe e reverte a adesão dos eritrócitos infectados a esse receptor em 4 diferentes linhagens de parasitas (Cooke e cols., 1998). Interessantemente, macacos imunizados com esse subfragmento foram protegidos em desafios com parasitas homólogos (Duffy e cols., 2001).

Tabela 2. Combinações receptor-ligante implicadas em citoaderência.

Receptor do hospedeiro	Ligante do parasita	Observações	Referências
TSP	PfEMP1	Baixa afinidade de ligação em condições de fluxo	(Cooke e cols., 1994; Baruch e cols., 1996)
CD36	PfEMP1 (CIDR1)	O fenótipo de ligação mais comum dos parasitas	(Oquendo e cols., 1989; Baruch e cols., 1995, 1996, 1997 e 1999; Smith e cols., 1998)
CD54 (ICAM-1)	PfEMP1 (DBL2)	Receptor membro da superfamília das imunoglobulinas	(Berendt e cols., 1989 e 1992; Baruch e cols., 1996; Smith e cols., 2000a)
CD62E (E-selectina) (ELAM-1)	?	Alvo incomum de ligação	(Ockenhouse e cols., 1992)
P-selectina	PfEMP1 ?	Ligação dependente de Ca ²⁺	(Ho e cols., 1998)
CD106 (VCAM-1)	?	Receptor membro da superfamília das imunoglobulinas/ Alvo incomum de ligação	(Ockenhouse e cols., 1992; Newbold e cols., 1997a e 1997b)
CSA	PfEMP1 (DBL3) (CIDR1)	Ligação importante na malária durante a gestação	(Rogerson e cols., 1995; Fried e Duffy, 1996; Buffet e cols., 1999; Reeder e cols., 1999)
HA	?	Receptor que media adesão à placenta	(Beeson e cols., 2000)
CD31 (PECAM-1)	PfEMP1 (DBL2) (CIDR1)	Alvo incomum de ligação	(Treutiger e cols., 1997)
HS	PfEMP1 (DBL1)	Receptor presente nas células endoteliais e aorta	(Barragan e cols., 2000b)
CD36	Sequestrina	Interação ainda discutível	(Ockenhouse e cols., 1991)
CD36 e TSP	Pfalesina	Ligante são fragmentos de uma Banda 3 modificada	(Crandall e cols., 1993 e 1994; Eda e cols., 1999)

(modificado de Coppel e cols., 1998).

ICAM-1, "intercellular adhesion molecule 1", é uma molécula endotelial que também age como receptor para eritrócitos parasitados (Berendt e cols., 1989). Recentemente foi demonstrado que o domínio DBL2 β da PfEMP1 juntamente com o domínio C2, liga-se a ICAM1 (Smith e cols., 2000a).

E-selectina (ELAM-1, "endothelial leukocyte adhesion molecule 1") e VCAM-1 ("vascular cell adhesion molecule") já foram identificados como receptores

endoteliais que mediam citoaderência (Ockenhouse e cols., 1992). Ambos não são constitutivamente expressos nas células endoteliais mas podem ser induzidos por IL-1 e TNF- α . O ligante do parasita responsável por essa adesão ainda não foi identificado.

Interação de eritrócitos infectados com P-selectina ocorre pelo domínio lectina e é dependente de Ca^{2+} . O resíduo de ligação no eritrócito infectado é um ácido siálico, sensível à tripsina, sugerindo que parte da PfEMP1 que interage com CD36 e ICAM-1, e não CSA que é resistente à tripsina, pode estar atuando como ligante (Ho e cols., 1998).

Após a demonstração de que sulfato de condroitina (CSA), um glicosaminoglicano, media citoaderência (Rogerson e cols., 1995), essa molécula foi reconhecida como sendo a principal para ligação à placenta (Fried e Duffy, 1996). CSA pode se ligar ao domínio DBL3 da PfEMP1 (Buffet e cols., 1999) ou ao domínio CIDR (Reeder e cols., 1999).

Ácido hialurônico (HA) é um outro receptor, recentemente descoberto, que tal como CSA, media adesão de eritrócitos infectados à placenta, porém o ligante do parasita responsável por esta adesão ainda não foi identificado (Beeson e cols., 2000).

PECAM-1, "platelet-endothelial cell adhesion molecule 1", também tem uma função em citoaderência em isolados de campo, utilizando como ligante a PfEMP1 (Treutiger e cols., 1997).

HS ("heparan sulphate") tem sido confirmado como receptor do hospedeiro, mediando citoaderência às células endoteliais e aorta via PfEMP1 (Barragan e cols., 2000b).

O receptor alpha(v) beta3 é uma integrina e está envolvido em muitos processos patológicos e fisiológicos de aderência, mas sua função na citoaderência durante uma infecção malárica é pouco investigada. Entretanto, a habilidade de eritrócitos infectados com *P. falciparum* de aderir a alpha(v) beta3 em células endoteliais mostrou-se 7-270 vezes maior que para eritrócitos não infectados, sendo essa ligação inibida por anticorpos anti-alpha(v) (Siano e cols., 1998).

Alguns receptores como CD36 e TSP parecem se ligar à maioria, senão todos, os parasitas de pacientes infectados (Hasler e cols., 1990). De fato, em estudos de campo, CD36 é o receptor quantitativamente mais importante, porém, 80% dos isolados aderem a ICAM-1 (rev. em Newbold, 1999). Para isolados que aderem a ambos os receptores, o grau de adesão a CD36 é no mínimo 10 vezes maior que a ICAM-1. Adesão mínima ou nenhuma foi encontrada para E-selectiva, VCAM-1 ou CSA, na maioria dos isolados. Resultados semelhantes foram obtidos nos ensaios de citoaderência *in vitro* utilizando isolados brasileiros (Nogueira, 2000). A citoaderência a TSP e CD36 é diretamente proporcional à parasitemia (Ho e cols., 1991), que por sua vez é utilizada como critério de gravidade. Apesar de CSA ter sido associado a complicações na malária de gestantes (Fried e Duffy, 1996) e ICAM-1 ter importante papel na malária cerebral (Berendt e cols., 1989; Fernandez-Reyes e cols., 1997), alguns autores falharam na tentativa de correlacionar ligação a um determinado receptor e síndromes específicas causadas pela malária (Marsh e cols., 1988; Ho e cols., 1991).

Interação dos eritrócitos infectados com diferentes receptores já foi demonstrada (Cooke e cols., 1994), onde CD36 conduz à imobilização e ICAM-1 promove o rolamento. Portanto, diferentes receptores podem agir sinergicamente

para determinar o padrão final de adesão (McCormick e cols., 1997). Da mesma forma porém, do lado do parasita, foi recentemente demonstrado que a PfEMP1 possui uma região considerada uma estrutura terminal semi-conservada mediando ligação a múltiplos e independentes receptores do hospedeiro (Su e cols., 1995; Chen e cols., 2000b).

1.4.1.2. Ligantes do parasita envolvidos em citoaderência

Além da PfEMP1, que será discutida no item 1.4.3.1, outras proteínas codificadas pelo parasita podem estar localizadas na superfície dos eritrócitos infectados, participando dos eventos de citoaderência (Figura 6 e Tabela 2).

Com a utilização de anticorpos que mimetizam a adesão a CD36, uma proteína de 270 kDa, denominada sequestrina, foi identificada (Ockenhouse e cols., 1991). A hipótese formulada pelos autores aponta CD36 como receptor e sequestrina como um ligante complementar envolvido na adesão dos eritrócitos infectados ao endotélio celular do hospedeiro. Infelizmente, até hoje essa interação ainda não foi confirmada.

Pfalesina, uma forma da proteína Banda 3 que foi modificada pelo parasita, também foi considerada como receptor do hospedeiro em fenômenos de citoaderência a CD36 e TSP. A ligação de eritrócitos infectados com *P. falciparum* a trombospondina ocorre pelo domínio T3, sendo mediado pela seqüência peptídica HPLQKTY da Banda 3, que está exposta na superfície do eritrócito infectado (Eda e cols., 1999).

Os genes *clag* ("cytoadherence-linked asexual gene") são uma família multigênica com 9 genes localizados em vários cromossomos (Holt e cols., 1999). *Clag9* tem aproximadamente 7 kb, supostamente 9 exons, localiza-se no cromossomo 9, é transcrito em parasitas maduros e traduzido para uma proteína de 220 kDa. A precisa localização celular desta proteína ainda não foi determinada, entretanto, através da predição de estrutura, quatro domínios transmembrana foram encontrados, sugerindo localização na membrana, podendo ser exposta em eritrócitos parasitados. Outras evidências como imunofluorescência, o fato de que a inativação do gene *clag9* inibe adesão de eritrócitos parasitados a CD36 (Trenholme e cols., 2000) e transfecção com a tecnologia "antisense" (Gardiner e cols., 2000), confirmam essa hipótese.

Pf60 é uma família multigênica (Carcy e cols., 1994), com estimados 140 genes, cujo primeiro gene foi caracterizado recentemente (Bischoff e cols., 2000). O 6.1 é um gene de cópia única, expresso constitutivamente por todos os parasitas maduros e codifica uma proteína localizada no núcleo. A única ligação com o fenômeno de citoaderência é que o exon 7, C-terminal, apresenta alta homologia com o exon II de genes *var* (Bonney e cols., 1997). Entretanto o domínio N-terminal não tem homologia com qualquer proteína descrita.

Anticorpos monoclonais contra Pf332 inibem citoaderência *in vitro* de uma maneira independente da cepa do parasita (Iqbal e cols., 1993). Entretanto anticorpos policlonais contra a Pf332 inibem crescimento do parasita mas não citoaderência, fazendo com que a participação da Pf332 neste fenômeno seja ainda obscura (Ahlborg e cols., 1995).

1.4.2. Autoaglutinação e "Rosetting"

A autoaglutinação de eritrócitos infectados é um fenômeno mediado por PfEMP1 (Fernandez e cols., 1998) mais comum em crianças africanas com doença grave (Roberts e cols., 2000), porém pouco estudado.

Figura 7. Representação esquemática de "rosetting" e citoaderência contribuindo para obstrução de vasos (Wahlgren e cols., 1992).

O termo "rosetting" designa a formação de rosetas devido a adesão de eritrócitos infectados com formas maduras assexuadas do parasita a hemácias não infectadas (David e cols., 1988). As rosetas normalmente aparecem com alguns eritrócitos não infectados ligados a um ou dois infectados, porém mais de 10 eritrócitos não infectados já foram encontrados aderidos a um único eritrócito infectado.

Embora "rosetting" tenha sido descrito em outras espécies de *Plasmodium* que sofrem seqüestramento, tais como *P. chabaudi*, *P. fragile* e *P. coatneyi* (Udomsangpetch e cols., 1991), foi também encontrado em outras, como *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, cujas formas maduras continuam seu desenvolvimento na circulação periférica e normalmente não causam doença grave (Udomsangpetch e cols., 1995; Angus e cols., 1996; Lowe e cols., 1998). Na malária causada por *P. falciparum* o fenótipo de "rosetting" parece aumentar a obstrução microvascular do fluxo sangüíneo (Kaul e cols., 1991) e, segundo a maioria dos estudos (MacPherson e cols., 1985; Aikawa, 1988; Carlson e cols., 1990 e 1994; Carlson, 1993; Pongponratn e cols., 1991; Treutiger e cols., 1992; Ringwald e cols., 1993; Reeder e

cols., 1994; Rowe e cols., 1995; Newbold e cols., 1997a, Kun e cols., 1998; Heddi e cols., 2001), mas não todos (al-Yaman e cols., 1995; Traore e cols., 2000), é comum em pacientes com malária grave ou complicada (Figura 7).

Possivelmente o "rosetting" permite que o parasita invada eritrócitos não infectados mais rapidamente (Wahlgren e cols., 1992), embora isso não tenha sido demonstrado (Clough e cols., 1998b). Além disso, o "rosetting" pode esconder a célula infectada e protegê-la da fagocitose, um dos principais mecanismos da imunidade anti-parasitária (Bouharoun-Tayoun e cols., 1995).

O fenômeno de "rosetting" tem ampla distribuição, existindo em todas as principais áreas de malária do mundo, com descrição em isolados de países endêmicos para malária na América Latina, Ásia e África (Wahlgren e cols., 1990). A estabilidade do fenótipo de "rosetting" durante cultivo *in vitro* varia de parasita para parasita, mas a taxa de "rosetting" frequentemente diminui após cultivo prolongado (Wahlgren e cols., 1994).

1.4.2.1. Receptores do hospedeiro envolvidos em "rosetting"

Existem várias combinações de ligação entre diferentes receptores do hospedeiro e ligantes do parasita capazes de levar à formação de rosetas (Tabela 3).

Oligossacarídeos do grupo sangüíneo ABO foram os primeiros receptores do hospedeiro identificados no processo em "rosetting", principalmente os antígenos do grupo sangüíneo A (Carlson e Wahlgren, 1992; Barragan e cols., 2000a). A ligação provavelmente acontece através da PfEMP1, entretanto esses antígenos parecem influenciar somente no tamanho das rosetas ao invés da freqüência de "rosetting".

Tabela 3. Combinações receptor-ligante implicadas em "rosetting".

Receptor do hospedeiro	Ligante do parasita	Observações	Referências
Antígenos ABO	PfEMP1 (DBL1)	(BgA)	(Carlson e Wahlgren, 1992; Chotivanich e cols., 1998; Barragan e cols., 2000a)
CD36	PfEMP1	Níveis de CD36 nos eritrócitos maduros é baixo	(Handunnetti e cols., 1992; Wahlgren e cols., 1992)
IgM	PfEMP1 (CIDR1)		(Scholander e cols., 1996; Clough e cols., 1998a; Treutiger e cols., 1999)
CD35 (CR1)	PfEMP1 (DBL1)	Polimorfismo de CD35 em africanos	(Rowe e cols., 1997 e 2000)
GAG	PfEMP1 (DBL-1)	Sugerido ser o HS nos eritrócitos	(Chen e cols., 1998a)
?	Rosetinas (Rifinas)	Pouco definidas	(Weber, 1988; Helmby e cols., 1993; Fernandez e cols., 1999)

(modificado de Coppel e cols., 1998).

Outro receptor que pode estar envolvido no mecanismo de "rosetting" utilizando como ligante a PfEMP1 é CD36 (Handunnetti e cols., 1992), entretanto, como está presente em níveis baixos nos eritrócitos maduros, somente raramente participa deste fenômeno (Wahlgren e cols., 1992).

Imunoglobulinas em soros normais, com destaque para IgM, também têm uma função no "rosetting" de algumas linhagens de parasitas via PfEMP1 (Scholander e cols., 1996; Clough e cols., 1998a; Treutiger e cols., 1999), possivelmente estabilizando a interação entre os eritrócitos infectados e os não infectados (Treutiger e cols., 1999).

Receptor de complemento (CR1 ou CD35 ou receptor de C3b/C4b) é uma molécula imunoregulatória que está expressa na superfície dos eritrócitos, em alguns leucócitos da circulação periférica, em podócitos glomerulares e em células dendríticas foliculares (Ahearn e Fearon, 1989). CR1 se liga aos componentes C3b e

C4b ativados por complemento e portanto participa de várias funções como clareamento de complexos imunes da circulação, aumento da fagocitose e regulação da ativação de complemento. CR1 é composto de vários domínios repetitivos denominados "short consensus repeats" (SCRs), de 60 aa com 4 cisteínas conservadas e vários outros resíduos conservados (Hourcade e cols., 1989). O domínio extracelular do variante alélico mais comum de CR1 é composto de 30 SCRs. Os primeiros 28 são arranjados em repetições em tandem em grupos homólogos de 7, onde cada grupo forma um "long homologous repeat" (LHR). Os sítios de ligação em CR1 para C3b e C4b foram mapeados, sendo que os SCRs 8-12 e SCRs 15-18 ligam-se preferencialmente a C3b, enquanto os SCRs 1-4 ligam-se preferencialmente a C4b (Figura 8)(Klickstein e cols., 1988; Krych e cols., 1991; Kalli e cols., 1991). Esse receptor é necessário para a formação de rosetas de eritrócitos não infectados com algumas cepas de parasitas adaptadas em laboratório e esta ligação ocorre por meio da PfEMP1 (Rowe e cols., 1997). Em isolados de campo, a região de CR1 necessária para o "rosetting" foi identificada onde também ocorre o sítio de ligação para C3b, que poderia ser um intermediário desta ligação (Rowe e cols., 2000). O único domínio da PfEMP1 até o momento envolvido no mecanismo de "rosetting" é o DBL1 α , que media adesão às hemácias não infectadas via receptor de complemento (CR1) (Rowe e cols., 1997 e 2000) ou via HS (Chen e cols., 1998a).

Figura 8. Diagrama do variante alélico de CR1 mais comum. Cada domínio SCR está representado por um círculo e o arranjo dos SCRs em grupos homólogos de sete para formar LHRs é mostrado. TM é a região transmembrana e CYT a cauda citoplasmática. Os sítios de ligação preferencial para C3b e C4b estão indicados.

Glicosaminoglicanos (GAG), como o HS dos eritrócitos, são receptores do hospedeiro que foram identificados na formação de rosetas (Chen e cols., 1998a). Em 2000, foi demonstrado que uma região da PfEMP1 solúvel (DBL1 α) necessita de um fragmento mínimo de heparina de 12-mer (aproximadamente 4 kDa) para a adesão. Este fragmento é capaz de separar rosetas formadas naturalmente (Barragan e cols., 2000b).

1.4.2.2. Ligantes do parasita envolvidos em "rosetting"

Outras moléculas, além da PfEMP1, poderiam contribuir para o "rosetting" de parasitas. Um exemplo são as proteínas polimórficas de 20 a 40 kDa, as rifinas ou rosetinas (Helmby e cols., 1993). Estas proteínas são também codificadas por uma família multigênica, composta de 200 membros, denominada *rif*, "repetitive interspersed family" (Weber, 1988). Os genes *rif* são compostos por 2 exons, sendo o primeiro curto e o segundo com ~1,3 kb. Esses genes estão associados com os genes *var* em regiões subteloméricas (Kyes e cols., 1999), são transcritos nos estágios assexuados do parasita e os produtos são exportados para a superfície do eritrócito infectado, onde podem ser detectados de 14 a 16 horas após a invasão. Muitas rifinas podem ser expressas na superfície de eritrócitos com apenas um parasita, conferindo grande variabilidade antigênica. Porém sua função em citoaderência ou "rosetting" ainda não foi bem estabelecida, bem como o receptor do hospedeiro que media a adesão.

Os genes *stevor* ("subtelomeric variant open reading frame"), anteriormente reportados como *7h8*, estão relacionados aos genes *rif* e pertencem também a uma

família multigênica, com 34 membros (Limpai boon e cols., 1990). Ambos os genes estão presentes próximos aos telômeros de todos os cromossomos. Os genes *stevor* têm 2 exons. O exon 1 é curto, codifica um codon de iniciação e um domínio transmembrana. O exon 2 (~1 kb) codifica 30 kDa da proteína e inclui dois segmentos transmembrana (Cheng e cols., 1998). Embora as seqüências *stevor* e *rif* sejam similares em tamanho e estrutura, os *stevor* formam uma família distinta, mais conservada e de menor número de cópias.

1.4.3. Variação Antigênica

A maior parte do ciclo de vida do *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado ocorre nos eritrócitos e é necessária para a infecção dos mosquitos e sobrevivência do parasita. Como os eritrócitos não se diferenciam, não apresentam mecanismo interno de síntese ou transporte de proteínas e não expressam moléculas MHC classe I ou II na sua superfície, seriam um ambiente ideal para o parasita, que ficaria escondido do sistema imune do hospedeiro. Entretanto, o parasita sintetiza proteínas que atravessam a sua membrana plasmática, a membrana do vacúolo parasitóforo e se estabelecem na superfície do eritrócito. No caso de *P. falciparum*, após 18 horas da invasão, esses antígenos mediam adesão a vários receptores do endotélio do hospedeiro, impedindo que as hemácias infectadas passem através do baço, onde seriam destruídas. Entretanto, essas proteínas tornam o parasita visível ao sistema imune do hospedeiro, que necessita variar as proteínas exportadas para a superfície da hemácia para evitar o reconhecimento pelo sistema imune, além de variar a especificidade de adesão, para que diferentes proteínas possam se ligar a

diferentes receptores (rev. em Newbold, 1999). Estudos *in vitro* com clones de *P. falciparum* verificaram que a taxa de troca antigênica de um determinado variante seria em torno de 2% por geração (Biggs e cols., 1991; Roberts e cols., 1992).

Muita divergência existe em relação à função primária dos antígenos variantes. Como muitos trabalhos sugerem que resposta de anticorpos a antígenos variantes são parte de uma resposta imune protetora contra a malária (Brown e Hills, 1974; Gilks e cols., 1990; Marsh e cols., 1989; Bull e cols., 1998), alguns autores acreditam que citoaderência é sua função primordial e variação antigênica, uma adaptação para evitar o ataque imune (Borst e cols., 1995). Inversamente, outros autores acreditam que a função principal das proteínas variantes é gerar uma resposta imune que regula o crescimento do parasita enquanto que a citoaderência evita que parasitas que falham neste objetivo, sejam destruídos pelo baço (Newbold, 1999; Saul, 1999). Como justificativa discute-se que uma única malária *falciparum* é suficiente para gerar anticorpos contra antígenos variantes de superfície, enquanto que a maioria das proteínas do parasita são pouco imunogênicas, e portanto, a função primária das proteínas de superfície seria a de antígenos. Além disso, a resposta imune contra os antígenos de superfície é capaz de destruir eritrócitos infectados e as modificações nas especificidades antigênicas ocorrem a uma taxa comparável a taxa pela qual a resposta imune é gerada.

A variação antigênica foi primeiro descrita em *P. knowlesi*, através da observação da resposta imune em infecções crônicas de primatas (Brown e Brown, 1965). Porém, esse fenômeno tem sido detectado em outras espécies de plasmódios de símios, como *P. fragile* (Handunnetti e cols., 1987), espécies que parasitam roedores, como *P. chabaudi* (McLean e cols., 1982) ou mesmo espécies que

parasitam o homem, como *P. vivax* (Mendis e cols., 1988; del Portillo e cols., 2001). *P. falciparum* também produz mudanças antigênicas na superfície do eritrócito infectado (Langreth e Reese, 1979) e anticorpos contra o parasita bloqueiam adesão de eritrócitos infectados a outras células de uma maneira cepa-específica (Udeinya e cols., 1983). Howard e cols. identificaram, em 1983, o antígeno variante de *P. knowlesi* que conduz à variação antigênica na superfície de eritrócitos infectados. Logo em seguida, o mesmo grupo identificou um antígeno homólogo para *P. falciparum*, cepa-específico, com ~280 KDa, posteriormente denominado "*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1" (PfEMP-1)(Leech e cols., 1984)(Figura 6).

1.4.3.1. Proteína de Membrana do Eritrócito 1 (PfEMP1) e Reconhecimento Imune

A PfEMP1 é codificada por genes *var* (Baruch e cols., 1995; Smith e cols., 1995; Su e cols 1995). Mudanças na expressão destes genes estão relacionadas com mudanças nos fenótipos antigênicos e de citoaderência. Esses genes se apresentam em múltiplas cópias formando uma família gênica com aproximadamente 50 membros, localizados nas regiões subteloméricas dos 14 cromossomos (no mínimo 1 em cada telômero), em grupos internos nos cromossomos 4, 7, 8 e 12 e em qualquer orientação (Rubio e cols., 1996; Thompson e cols., 1997; Fischer e cols., 1997). A localização telomérica não é um pré-requisito para a expressão dos genes *var*, mas é importante para a geração de diversidade, juntamente com eventos de mutação, inserção e deleção (Hernandez-Rivas e cols., 1997; Ward e cols., 1999;

Taylor e cols., 2000). Recombinação ectópica freqüente foi demonstrada em genes *var* e ocorre entre regiões subteloméricas de cromossomos heterólogos, facilitando a conversão gênica (Freitas-Junior e cols., 2000).

Apesar de somente um gene *var* ser expresso em parasitas maduros, diferentes genes são transcritos simultaneamente de muitos cromossomos em uma célula infectada por um trofozoíta jovem. Entretanto, neste estágio, são detectadas as extremidades 5' dos vários transcritos e apenas um transcrito completo. Portanto, aparentemente, uma transcrição incompleta ocorre em muitos genes *var* no estágio de anel (Rowe e cols., 1997; Scherf e cols., 1998; Chen e cols., 1998b), embora alguns autores levantem a possibilidade de transcrição completa de muitos genes e degradação seletiva e rápida, de 3' para 5', dos produtos não destinados para expressão (Borst e cols., 1995; Taylor e cols., 2000).

Além de transcrição relaxada com controle ao nível de início da transcrição, a expressão dos genes *var* pode ser regulada por mecanismos epigenéticos associados com modificações na estrutura do DNA ou metilação. Recentemente foi descrito o primeiro gene de histona desacetilase em *P. falciparum* (Joshi e cols., 1999), possibilitando a ocorrência deste último mecanismo.

Promotores de genes *var* são pouco estudados, mas a análise de regiões 5' que flanqueiam esses genes identificou duas seqüências conservadas, uma específica para as cópias internas dos cromossomos e uma distinta, específica para as cópias subteloméricas (Deitsch e cols., 1999; Voss e cols., 2000). Recentemente foi estudada a participação dos introns no controle da transcrição. Estes são conservados e contêm uma estrutura similar a origens de replicação anteriormente descritas em leveduras. Inclusão deste intron em plasmídeos com um promotor de

var levou ao silenciamento completo e específico do gene, estabelecido durante a fase de síntese de DNA (fase S) (Deitsch e cols., 2001).

Apesar de tanta polêmica nos mecanismos de regulação da expressão de genes *var*, é certo que eles são ativados *in situ*, onde cópias são desativadas/ativadas tanto em regiões subteloméricas como internas, e não precisam de um rearranjo de DNA programado, embora uma recombinação espontânea já tenha sido descrita (Deitsch e cols., 1999; rev. em Craig e Scherf, 2001).

Com o objetivo de desafiar a hipótese de que somente um transcrito completo pode ser detectado por parasita, análise de parasitas selecionados para um determinado receptor demonstrou que múltiplos genes *var* podem ser expressos em uma população fenotipicamente homogênea. Diferentemente de outros trabalhos, vários transcritos inteiros de genes *var* foram detectados na população de trofozoítas maduros (Noviyanti e cols., 2001). Da mesma forma, anticorpo monoclonal contra a região ATS foi capaz de detectar várias bandas em extratos destes parasitas, sugerindo que diferentes PfEMP1, mediando o mesmo fenótipo de adesão, foram expressas em diferentes células ou ainda, que diferentes PfEMP1 foram expressas na mesma célula. Infelizmente, para confirmar esta última hipótese seria necessária a análise de células individuais. Uma PfEMP1 dominante sempre foi observada nos extratos, provavelmente determinando o fenótipo de adesão. Assim, o aumento da expressão de um gene não dominante pode levar a uma mudança do fenótipo de adesão e conseqüente alteração da patogenia da doença.

Os genes *var* são organizados em dois exons (Su e cols., 1995; rev. em Smith e cols., 2001), com um tamanho total de 6 a 13 kb, separados por um intron de 1

kb. O Exon 2 (1,6 kb) codifica um segmento terminal ácido (ATS), intracelular, envolvido no ancoramento da PfEMP1 a proteínas do hospedeiro (espectrina e actina do citoesqueleto do eritrócito) ou do parasita (KAHRP, "knob-associated histidine-rich protein"), situadas no "knob" (Oh e cols., 2000)(Figura 6). O Exon 1 (4-10 kb) codifica a região da molécula que fica exposta na superfície do eritrócito infectado e uma região transmembrana. A região extracelular apresenta de 2 a 7 domínios polimórficos, denominados DBLs ("duffy binding like domains"), e uma ou duas regiões polimórficas ricas em cisteínas (CIDR, "cysteine rich interdomain region"), exclusivas para *P. falciparum* (Figura 9). Já os DBLs são similares a elementos descritos em antígenos (EBAs, "erythrocyte binding antigens") envolvidos na invasão do eritrócito e ligação às suas proteínas, tais como Duffy e glicoforina A (Adams e cols., 1992; Sim e cols., 1994). Os DBLs tanto na PfEMP1 quanto em EBA apresentam 10 cisteínas conservadas que são distribuídas em 10 blocos. Os DBLs e CIDRs são identificados pela posição do domínio no gene (DBL1-7; CIDR1 ou 2) e a letra grega indica os grupos de homologia (DBLs α , β , γ , δ e ϵ ; CIDRs α , β e γ)(Figura 10).

Figura 9. Representação esquemática da estrutura da PfEMP1 mostrando os receptores do hospedeiro e respectivos domínios que promovem ligação a estes receptores (<http://sites.huji.ac.il/malaria/maps/PfEMP1.html>).

Figura 10. Organização dos domínios de 3 genes *var* (<http://sites.huji.ac.il/malaria/maps/PfEMP1.html>).

Os domínios DBL2 ou CIDR podem se ligar a PECAM-1 em isolados de campo (Treutiger e cols., 1997). A região DBL1-CIDR da PfEMP1 tem sido considerada uma estrutura terminal semi-conservada mediando ligação a múltiplos e independentes receptores do hospedeiro (Su e cols., 1995; Chen e cols., 2000b). DBL-1 liga-se especificamente a HS ("heparan sulphate") das células endoteliais e aorta (Barragan e cols., 2000b).

Recentemente, foram analisadas 20 seqüências de genes *var* disponíveis no GenBank (Smith e cols., 2000b). A estrutura e organização de domínios das 20 PfEMP1 foram determinadas. Os autores foram capazes de verificar associações de domínios como DBL α CIDR α , DBL β C2, DBL δ CIDR β , podendo conferir funções de modelagem, transporte ou atividade de adesão. Foram também identificadas duas novas regiões conservadas com características de domínios, localizadas na parte extracelular da molécula. A primeira é um segmento N-terminal (NTS), teoricamente globular, que, a partir do resíduo metionina iniciador, pode ter de 75 a 107 aa. Essa região não apresenta homologia com qualquer seqüência nos bancos de dados, mas tem provavelmente uma α -hélice central. A segunda, de 140 a 217 aa, foi designada como C2 e não está presente em todas as seqüências analisadas mas, como a região

NTS, é supostamente globular, tem uma estrutura de α -hélice e uma seqüência singular (Figura 11).

Figura 11. Representação esquemática da organização dos domínios extracelulares de 20 PfEMP1 (Smith e cols., 2000b). A letra P designa seqüências incompletas.

Anticorpos contra PfEMP1 podem fornecer proteção contra malária através da interferência em um ou mais processos de citoaderência controlados por esta

proteína (David e cols., 1983). A presença de anticorpos anti-PfEMP1 está significativamente relacionada ao aparecimento de imunidade clínica, apontando a PfEMP1 como uma possível candidata ao desenvolvimento de uma vacina contra a malária (Reeder e Brown, 1996; Bull e cols., 1998; Barragan e cols., 1998; Giha e cols., 1999; Bull e cols., 1999; Giha e cols., 2000). Como a resposta imune é variante-específica, indivíduos com baixa exposição a *P. falciparum* mostram um reconhecimento limitado da superfície do eritrócito parasitado (Marsh e Howard, 1986; Bull e cols., 1998). Entretanto, soros de adultos residentes em área endêmica podem aglutinar eritrócitos parasitados com diferentes cepas e isolados (Aguiar e cols., 1992; Reeder e cols., 1994).

O reconhecimento de cada variante por um grupo diferente de anticorpos do soro, indica que a PfEMP1 não apresenta epítomos antigênicos que reagem cruzado, mostrando epítomos imunodominantes variante-específicos (Newbold e cols., 1992). Apesar do domínio CIDR1 ser relativamente conservado, ele não induz altos títulos de anticorpos durante a infecção (Baruch e cols., 1996; Baruch e cols., 1997). Porém, anticorpos monoclonais produzidos contra diferentes regiões da CIDR1 da PfEMP1 reagiram com várias cepas de *P. falciparum*, que estavam expressando diferentes variantes de PfEMP1, mostrando a presença de epítomos que reagem cruzado na superfície de eritrócitos infectados (Gamain e cols., 2001), como havia sido sugerido anteriormente (Marsh e Howard, 1986). De fato, um anticorpo monoclonal foi capaz de reconhecer 90% das cepas testadas, somente falhando em reagir com aquelas que não se ligam a CD36.

Níveis de anticorpos contra três peptídeos sintéticos derivados de regiões da PfEMP1 altamente conservadas (dois do DBL1 α e um do Exon 2), que representam

5 seqüências de duas cepas (FCR3 e Malayan Camp), foram medidos em população residente de área endêmica para malária (Staalso e cols., 1998). A resposta de anticorpos contra estes peptídeos aumentou com a idade e foi maior em indivíduos assintomáticos. O peptídeo mais conservado do DBL1 α foi reconhecido por 70% dos positivos. Esse mesmo peptídeo foi reconhecido por anticorpos IgG de 50% das crianças residentes de área hiperendêmica com transmissão sazonal, porém não foi encontrada correlação com proteção e dados do mesmo grupo ainda não publicados indicam que essa região do DBL1 não fica acessível para os anticorpos (Dodoo e cols., 2001).

Estudos clínicos têm sugerido que os indivíduos tornam-se rapidamente imunes à malária grave não-cerebral, mas não à malária leve ou assintomática (Gupta e cols., 1999). Além disso, eritrócitos infectados provenientes de isolados que causam infecção grave são mais freqüentemente reconhecidos que aqueles que causam doença leve (Bull e cols., 1999). Se isso ocorre porque o repertório variante destes isolados é restrito ou se eles têm características comuns que permitem o desenvolvimento de anticorpos que reagem cruzado, ainda não foi determinado.

Algumas estratégias vêm sendo utilizadas para desenvolvimento de vacinas baseadas em PfEMP1, com o objetivo de reduzir a mortalidade. Dentre elas estão uma vacina para malária em gestantes, baseada no DBL γ e uma vacina geral para a malária, baseada no DBL1 α ou no CIDR1 α . As duas vacinas seriam complementadas com uma vacina que incluiria epítomos de células T para elevar a resposta de anticorpos contra novos variantes do parasita (rev. em Duffy e cols., 2001).

1.4.4. Citocinas

Muitos autores têm apontado para a importância das citocinas, principalmente TNF- α ("tumor necrosis factor alpha") e IFN- γ ("gamma interferon"), na malária grave (Miller e cols., 1994; Jakobsen e cols., 1995; Hommel, 1996; rev. em Chen e cols., 2000a). Após infecção por *P. falciparum*, TNF- α é produzido por muitas linhas celulares, como monócitos e macrófagos (a principal fonte de TNF- α), linfócitos, granulócitos, plaquetas e células endoteliais (Wahlgren e cols., 1995). Produtos do parasita estimulam as células do hospedeiro, causando uma excessiva produção de citocinas, que por sua vez, causam efeitos adversos na progressão da doença. Essas toxinas são moléculas derivadas do parasita que são secretadas ou liberadas nos estágios de trofozoítas e esquizontes e são contidas entre proteínas ancoradas por GPI ("glycosylphosphatidylinositol") (Pichyangkul e cols., 1997). A MSP1 ("merozoite surface protein") é ancorada por GPI e induz a produção de TNF- α e IL-1 (interleucina 1), provavelmente devido aos fragmentos N-terminais que são liberados durante o processo de invasão (Schofield e Hackett, 1993). Produtos do metabolismo do parasita, como a hemozoína, também são tóxicos e induzem a produção de IL-1 (Pichyangkul e cols., 1994). Quantidades moderadas de citocinas tais como TNF- α , IFN- γ e IL-1 são necessárias para o hospedeiro reagir contra organismos invasores, mas uma superprodução pode ser prejudicial. Níveis altos de TNF- α e IFN- γ são encontrados com mais frequência em pacientes com malária grave (Kwiatkowski, 1990). Pacientes que morreram de malária cerebral além de apresentarem grandes quantidades de TNF- α , IFN- γ e IL-1 no cérebro, apresentam expressão elevada de mRNAs de citocinas relevantes em vários órgãos afetados

(Udomsangpetch e cols., 1997). Desconhece-se a razão para esse acúmulo de citocinas, mas acredita-se que elas não sejam protetoras, e sim contribuam para a patogênese da doença. Desse modo, as citocinas aumentam e redistribuem a expressão de receptores endoteliais (ICAM-1 e PECAM-1), causam distúrbios físicos no hospedeiro (febre alta) e aumentam a produção de óxido nítrico com conseqüente dano no local do seqüestramento (Green e cols., 1994; Anstey e cols., 1996). TNF- α tem papel importante no desenvolvimento de anemia, através da indução de mecanismos de deseritropoese e eritrofagocitose (Roodman e cols., 1987; Clark e Chaudhri, 1988). TNF- α está também envolvido no desenvolvimento de malária cerebral, acidose láctica, hipoglicemia, insuficiência renal e edema pulmonar (rev. em Odeh, 2001). A razão entre os níveis séricos de IL-10 e TNF- α menor que 1 é um fator de risco para malária cerebral e anemia grave (May e cols., 2000). Apesar de parecer crucial a reversão dos efeitos desta citocina para conter a malária grave, administração de anticorpos anti TNF- α em crianças em coma não afetou o resultado da doença, embora a febre tenha sido eliminada (Kwiatkowski e cols., 1993). Possivelmente, anticorpos anti TNF- α agem retendo esta citocina na circulação, o que prolonga seu efeito no endotélio vascular (van Hensbroek e cols., 1996). A modulação da resposta de TNF- α , juntamente com a administração de drogas antimaláricas representa uma nova abordagem para o tratamento da malária grave.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

A variação na seqüência primária da PfEMP1 é responsável por diferenças nas características de adesão do parasita e pode afetar o tropismo dos eritrócitos infectados pelos tecidos e, conseqüentemente, o efeito da malária e o prognóstico da doença. Este estudo visou, portanto, estudar o repertório do domínio DBL1 α dos genes *var* de isolados de *Plasmodium falciparum* obtidos de pacientes infectados na Região Amazônica Brasileira e determinar se existe alguma associação de seqüências DBL1 α expressas e malária grave no Brasil. Vale a pena ressaltar, que o domínio DBL1 α é o único até o momento envolvido no mecanismo de “rosetting”, fenômeno diretamente relacionado à malária grave.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Estudar o repertório genômico de um segmento de aproximadamente 200 bp localizado no domínio DBL1 α dos genes *var* de isolados de *Plasmodium falciparum* obtidos de pacientes sem malária grave infectados nos Estados de Mato Grosso e Rondônia.

2.2.2. Estudar o repertório expresso de um segmento de aproximadamente 400 bp do domínio DBL1 α dos genes *var* de isolados de *Plasmodium falciparum* obtidos de pacientes com e sem malária grave, infectados nos Estados de Mato Grosso, Rondônia e Pará e amadurecidos em cultivo contínuo.

2.2.3. Analisar a presença de seqüências de transcritos *var* DBL1 α de pacientes graves no repertório genômico de isolados obtidos de pacientes sem malária grave infectados nos Estados de Mato Grosso, Rondônia, Pará e Acre.

2.2.4. Analisar, através de imunofluorescência, o padrão de ligação a eritrócitos de uma proteína DBL1 α -His, cuja seqüência é preferencialmente expressa em paciente com malária grave.

3. PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pacientes

3.1.1. Graves

Neste estudo foram utilizadas 6 amostras de sangue infectado por *P. falciparum*, provenientes de pacientes com malária grave, internados em diferentes hospitais da cidade de São Paulo (Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Hospital da Polícia Militar, Hospital Universitário da Universidade de São Paulo e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). Os pacientes foram diagnosticados no Laboratório de Malária da SUCEN entre 1987 e 1993 e todos apresentavam parasitemia >2% de anéis de *P. falciparum* na circulação periférica (*Tabela 1 do Anexo 2*). Os dados laboratoriais e epidemiológicos dos pacientes foram fornecidos pela SUCEN e encontram-se no Anexo 3 (**G33**=913/87, **G23**=481/87, **G34**=511/89, **G2**=019/93, **G29**=665/88, **G3**=072/92). Os dados laboratoriais e bioquímicos dos pacientes foram fornecidos pelos hospitais e resumidos na *Tabela 2 do Anexo 2*. Todos os pacientes foram considerados graves de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000).

Antes da administração do tratamento e mediante o consentimento pós-informado do paciente, o sangue foi coletado por punção venosa em tubo heparinizado e uma alíquota da papa de hemácias foi imediatamente dispensada em tubo com glycerolyte para congelamento em Nitrogênio líquido (Diggs e cols., 1975).

3.1.2. Não Graves

Neste estudo foram utilizadas 80 amostras de sangue infectado por *P. falciparum* provenientes de pacientes sem qualquer indício de gravidade. As amostras procedentes do Mato Grosso (Peixoto de Azevedo) foram coletadas em 1997, as do Pará (Itaituba e Redenção) entre 1987 e 1997, as de Rondônia (Porto Velho) em 1997 e as do Acre (Plácido de Castro, Senador Guiomar e Rio Branco) em 1999.

Para os estudos de genes expressos em parasitas amadurecidos em cultura foram utilizados 4 isolados (*Tabela 1 do Anexo 2*). Os dados laboratoriais e epidemiológicos foram fornecidos pela SUCEN e encontram-se no Anexo 3 (**NG1**=161/88, **NG2**=72/92, **NG3**=291/90 e **NG4**=343/90).

O sangue foi coletado por punção venosa em tubo heparinizado, logo após a realização do diagnóstico, mediante consentimento pós-informado do paciente. Uma alíquota de sangue total ou papa de hemácias foi imediatamente dispensada em tubo com glycerolyte (Diggs e cols., 1975) e congelada em Nitrogênio líquido. Algumas amostras utilizadas na extração de DNA foram estocadas a -20°C, sem adição de criopreservativo.

3.2. Descongelamento, cultivo e purificação de parasitas maduros

Para os estudos de expressão dos genes *var* em parasitas maduros, as hemácias infectadas com anéis obtidas dos pacientes foram descongeladas (Diggs e cols., 1975) e instaladas em cultura (Trager e Jensen, 1976). O crescimento dos parasitas foi monitorado por esfregaços e gotas espessas coradas por Giemsa. Os

parasitas de pacientes graves foram amadurecidos em cultivo apenas até alcançarem o estágio de trofozoítas maduros e esquizontes. Os parasitas de pacientes não graves, que normalmente apresentavam baixas parasitemias, foram mantidos em cultivo por 3 ciclos. Os estágios maduros apresentando "knobs" foram purificados como descrito (Pasvol e cols., 1978) e utilizados imediatamente para extração de RNA.

3.3. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico das amostras provenientes de pacientes sem malária grave foi realizada como descrito (Ferreira e cols., 1998). Uma alíquota de 300 µl da amostra de sangue foi tratada com 30 µl de uma solução de saponina a 1,5% em PBS, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Um ml de PBS foi adicionado para lavagem por centrifugação a 12.500 x g por 15 minutos a 4°C. A lavagem foi repetida até a completa remoção da hemoglobina. O precipitado foi ressuspenso em 200 µl de tampão de extração de DNA (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,5% SDS, 200 µg/ml Proteinase K) e incubado durante a noite a 50°C. No dia seguinte, o material foi extraído com fenol, fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após obtenção da fase aquosa, a amostra foi precipitada durante a noite com 20 µl de 3M acetato de sódio (pH 5,2) e 500 µl de etanol absoluto gelado. O precipitado, obtido por centrifugação como acima, foi lavado com etanol 75%, seco a 37°C, ressuspenso em 30 µl de TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,4) e estocado a 4°C.

3.4. Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada como descrito (Kyes e cols., 2000). As células infectadas com parasitas maduros foram ressuspendidas em 250 µl meio RPMI, rapidamente lisadas em 750 µl de TRIZOL LS (Life Technologies) pré-aquecido

(37°C), incubadas por 5 min a 37°C e congeladas. Para completar a extração de RNA, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e 200 µl de clorofórmio foram adicionados. Após forte homogeneização, as amostras foram incubadas por 10 min. a temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 x g, a 4°C, por 15 min. A fase aquosa foi transferida a outro tubo e 500 µl de isopropanol foram adicionados. As amostras foram centrifugadas após incubação a 4°C durante a noite. O sobrenadante foi removido e o precipitado de RNA foi lavado em etanol 75%, seco, ressuspendido em 15 µl de formamida, doseado em GeneQuant (Pharmacia) e estocado a -70°C.

3.5. Tratamento com DNase e Síntese de cDNA

Um µg de RNA foi tratado 3x com DNase I (Life Technologies) por 15 min. a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com adição de EDTA (concentração final 2,5 mM) e inativada a 65°C por 10 min. A fita de cDNA foi sintetizada ("First-Strand cDNA Synthesis Kit", Amersham Pharmacia Biotech), utilizando hexadeoxinucleotídeos aleatórios. Como controle de contaminação com DNA, amostras foram processadas sem adição de transcriptase reversa. Após inativação a 90°C por 5 min., as amostras foram submetidas a PCR.

3.6. Amplificação de DNA

Dois protocolos para amplificação de seqüências da região N-terminal do DBL-1 de genes *var* foram utilizados. O primeiro (Kyes e cols., 1997) foi utilizado para amplificar um fragmento de ~200 bp (Anexo 1), enquanto o segundo (Taylor e cols., 2000) foi utilizado para amplificar um fragmento de ~400 bp (Anexo 2). O primeiro protocolo foi realizado exatamente como descrito. Para o segundo protocolo, foram utilizados tubos de 0,5 ml, volume de 25 µl e as seguintes concentrações finais: 10 mM Tris pH 8,3, 50 mM KCl, 1 a 2 mM MgCl₂, 200 µM

dNTPs, 1 μ M dos oligonucleotídeos α AF [5' GCACG(A/C)AGTTTTGC 3'] e α BR [5' GCCCATTC(G/C)TCGAACCA 3'] e 0.5 U Platinum™ *Taq* Polymerase (Gibco BRL). Uma alíquota de 2 μ l de DNA genômico ou cDNA foi utilizada nas reações que foram realizadas em aparelho GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: um ciclo inicial de 95°C/5 min., 42°C/1 min., 60°C/1 min., seguido por 29 ciclos de 95°C/1 min., 42°C/1 min., 60°C/1 min. e mais um ciclo de extensão a 72°C por 10 min. No momento de preparo das reações, controles negativos (sem presença de DNA) foram adicionados entre as amostras positivas para monitorar eventuais contaminações durante a manipulação das reações.

3.7. Gel de Agarose e Purificação dos Fragmentos

Os produtos amplificados por PCR ou RT-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose tipo II a 1% e tampão TAE na presença de brometo de etídeo (Sambrook e cols., 1989). O gel foi fotografado e os fragmentos foram purificados com sílica conforme descrito (Boyle e Lew, 1995).

3.8. Clonagem

Os fragmentos purificados foram ligados ao vetor pGEM-T Easy de 2,7 kb (Promega). A ligação foi realizada por 1 hora à temperatura ambiente e em seguida mantida a 4°C durante a noite, conforme orientações do fabricante, para aumentar a eficiência de ligação. Células competentes (*E. coli* cepa sure), obtidas como descrito (Sambrook e cols., 1989), foram transformadas por eletroporação (200 ohms, 25 μ F e 2,5 kV em cubetas de 0,2 cm) com 1 μ l da ligação. Para seleção dos transformantes, as células foram plaqueadas em placas LB-ágar-amp-tet, suplementadas com 80 μ g/ml de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) e 0,5 mM de IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside), e incubadas a 37°C por 16 horas. As colônias transformantes (brancas) foram crescidas por 16 horas a 37°C em LB-

amp-tet, para extração do DNA plasmidial (Sambrook e cols., 1989). Uma alíquota de 3 µl de cada extração foi digerida por uma hora a 37°C com 1 U de Eco RI (Gibco) (que flanqueia os sítios de clonagem) utilizando Tampão React 3 (Gibco) em um volume final de 15 µl. O volume total da digestão foi analisado em gel de agarose tipo II a 1% em tampão TAE, na presença de brometo de etídio. Os plasmídeos que continham inserto do tamanho previsto foram selecionados para preparo das membranas. Os fragmentos clonados utilizados como sonda foram digeridos dos plasmídeos como descrito acima e purificados em gel de agarose e sílica.

Para sequenciamento dos clones, os plasmídeos foram extraídos com "Wisard Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega) e sequenciados por GATC GmbH.

3.9. Análise das Seqüências

As seqüências obtidas no Anexo 1 foram traduzidas a aminoácidos através do programa EditSeq do pacote DNASTar e submetidas a BLASTP versão 2.1.3 (Altschul e cols., 1997). Alinhamentos foram realizados utilizando ClustalW versão 1.8 (Higgins e cols., 1996). Árvores filogenéticas foram criadas com ClustalX excluindo os "gaps" para 1000 "bootstraps" utilizando o método NJ (Neighbour Joining) (Saitou and Nei, 1987). Análise filogenética foi realizada do domínio DBL-1 de 146 *var* genes obtidos no GenBank. As árvores foram geradas de todas as seqüências utilizando o pacote Phylip (Felsenstein, J. 1993. PHYLIP, Phylogeny Inference Package, versão 3.5c, distribuído pelo autor: Departamento de Genética, Universidade de Washington, Seattle). Análise de bootstrap de 100 réplicas foi realizada com o programa Seqboot deste pacote. Árvores sem raiz foram construídas pelo método de Máxima Parsimônia do Protdist e finalmente calculando a melhor árvore destes dados.

As seqüências obtidas no Anexo 2 foram traduzidas a aminoácidos através do programa EditSeq do pacote DNASTar e submetidas a BLASTP versão 2.1.3 (Altschul e cols., 1997). Alinhamentos foram realizados utilizando ClustalX versão 1.81 (Thompson e cols., 1997). Árvore de máxima verossimilhança foi construída utilizando o modelo GTR+I+G, selecionado pelo programa Modeltest versão 3.06 (Posada e Crandall, 1998). O método de "Quartet puzzling" foi utilizado para escolher a melhor árvore de verossimilhança (Strimmer e von Haeseler, 1996). Todas as análises foram realizadas com a versão 4.06 do PAUP* (Swofford, 1998).

3.10. Southern Blot

3.10.1. Preparo de Sondas Radioativas

A marcação de fragmentos de RT-PCR foi realizada por "random primer" com $\alpha^{33}\text{P}$ dCTP utilizando "Multiprime DNA Labelling System" (Amersham Pharmacia Biotech), conforme instruções do fabricante, sendo o precipitado ressuspendido em 97 μl de TE e 3 μl de 10N NaOH.

A marcação do oligonucleotídeo T7 foi realizada com T4 polinucleotídeo quinase (PNK) (New England, Biolabs). Uma alíquota de 2 μl do oligo na concentração de 100 μM foi marcada com 3 μl de $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP, 2 μl do tampão da enzima 10x e 1 μl PNK, em volume final de 20 μl , por 1 hora a 37°C. A amostra foi precipitada com 2 μl de 0,5 M EDTA pH 8,0, 37 μl TE, 40 μl de DNA transportador e 300 μl de etanol/acetato de amônio por 1 hora a -20°C. A amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 6 minutos a temperatura ambiente e ressuspendida em 100 μl de água.

3.10.2. Preparo, Hibridação e Lavagem das Membranas

DNA plasmidial dos clones obtidos no item 3.8 foi adicionado em duplicatas a membranas Hybond N+ (Amersham) com a ajuda de um robô Flexys (Genomic Solutions, USA) utilizando uma cabeça de 96 pinos. As membranas foram denaturadas durante 3 min. com 1,5 M NaCl e 0,5 N NaOH, neutralizadas 2 x por 3 min. com 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris HCl pH 7,2, 1 mM EDTA pH 8,0, lavadas em 2 x SSC (0,3 M cloreto de sódio, 0,03 M citrato de sódio pH 7,0) por 5 minutos, secas a temperatura ambiente sobre papel de filtro e fixadas em UV Stratalinker 2400 (Stratagene).

Para hibridação com o oligo T7, as membranas foram lavadas em 2 x SSC e pré-hibridizadas em 6 x SSC, 5 x Denhardt's, 0,5% SDS, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão por 2 horas a 37°C em forno PersonalHyb (Stratagene). A solução foi então trocada e a membrana foi hibridada por 16 horas a 37°C, com a sonda radioativa. As lavagens das membranas foram realizadas em 0,5% SDS, 6 x SSC a 37°C por 15 min. e então com a mesma solução a 42°C por 5 minutos.

Para hibridação com fragmentos de RT-PCR, as membranas foram lavadas em 2 x SSC por 5 min. e pré-hibridizadas em 0,5 M fosfato de sódio (pH 7,2), 7% SDS (Smith e cols., 1995), com 1 mM EDTA e 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão a 50°C por 2 horas em forno PersonalHyb (Stratagene). A solução foi então trocada e as membranas foram hibridadas por 16 horas a 37°C, com a sonda radioativa. As lavagens das membranas foram realizadas em 2 x SSC a temperatura ambiente por 10 minutos e em 0,1 x SSC/0,1% SDS a 65°C por 30 minutos. As membranas foram expostas a -70°C em filme Kodak Diagnostic Film X-OMAT-AR XK-1.

3.11. PCR Multiplex

Amostras de DNA genômico foram obtidas dos parasitas de 5 pacientes com malária grave antes do amadurecimento, como descrito no item 3.3. Análise por PCR Multiplex foi realizada com oligonucleotídeos para os genes CSP, MSP1 e MSP2 (Wooden e cols., 1992). Como controle de infecção com diferentes cepas de *P.*

falciparum foi utilizado um DNA genômico de isolado da Tanzânia que apresentava múltiplos alelos de MSP1 e MSP2. Os produtos foram resolvidos em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. O gel foi fotografado, transferido a membrana Hybond N+, que foi hibridada com oligonucleotídeos específicos marcados com [γ 32 P] ATP. As lavagens foram realizadas em 0,5% SDS, 6 x SSC a 37°C por 15 min. E então com a mesma solução a 50°C por 5 minutos.

3.12. Expressão de Proteínas

Para expressão da proteína referente ao fragmento de ~400 bp da região N-terminal do DBL1 α da PfEMP1, o fragmento Eco RI purificado do vetor pGEM-T foi clonado em vetor pRSET-C (Invitrogen) em sítio de Eco RI, que mantém a fase de leitura e adiciona uma cauda com 7 histidinas à proteína. Após confirmação por seqüenciamento, o plasmídeo recombinante foi utilizado para transformação de células competentes (*E. coli* cepa BL21). A expressão da proteína foi induzida com 0,1 mM de IPTG por 2 horas a 37°C. As células foram rompidas por 10 ciclos de sonicação a 40 watts por 10 segundos, com intervalos de 10 segundos. Após centrifugação (10.000 g), uma alíquota do precipitado e uma alíquota do sobrenadante foram submetidas a SDS-PAGE para verificação da presença da proteína. O precipitado foi ressuspendido em "Start Buffer" (Amersham Pharmacia Biotech) (10 mM de Imidazol, 20 mM de fosfato de sódio, 0,5 M de NaCl) gelado com 8 M Uréia. A amostra foi mantida em agitador por 1 hora a temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado, filtrado em filtro 0,45 μ m para remover debris celulares e o pH foi checado para 7,5. A proteína foi purificada com kit HisTrap conforme instruções do fabricante, utilizando o protocolo básico de purificação (Amersham Pharmacia Biotech).

3.13. Imunofluorescência

Esfregaço foi preparado com hemácias A+ lavadas 3x em PBS. As hemácias foram fixadas com acetona e uma alíquota de 15 µl de DBL1 α -His (0,08 mg/ml) foi adicionada ao pocinho. Como controle negativo foi utilizada uma proteína não relacionada (Meta1-His de *Leishmania* 0,45 mg/ml). Como controle positivo foi utilizado anticorpo policlonal anti hemácias (diluição 1:100), produzido em camundongo. Para detecção das proteínas com cauda de histidina foi utilizado anticorpo monoclonal IgG₂ Anti-His (diluição 1:100), produzido em camundongo, capaz de detectar seis resíduos de histidina (Amersham Pharmacia Biotech). Anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado à fluoresceína foi utilizado na diluição de 1:100. A lâmina foi observada em objetiva de imersão com aumento de 1000x.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do repertório de seqüências DBL1 α de genes *var* de isolados de campo de *P. falciparum* dos Estados de Mato Grosso e Rondônia, Brasil

ANEXO 1: *Plasmodium falciparum*: DBL-1 *Var* Sequence Analysis in Field Isolates from Central Brazil

A malária grave na Região Amazônica Brasileira, apesar de rara, conduz principalmente a casos de insuficiência renal e respiratória e raramente à malária cerebral (Boulos, 1992; Duarte e cols., 1985). A expressão de genes *var* (Su e cols., 1995; Baruch e cols., 1995; Smith e cols., 1995) na superfície de eritrócitos infectados está diretamente associada aos fenômenos de variação antigênica e citoaderência, principais responsáveis pela patologia da malária falciparum (rev. em Newbold, 1999). O domínio "Duffy Binding Like" mais N-terminal (DBL-1) dos genes *var* tornou-se alvo de muitos estudos epidemiológicos e moleculares desde que oligonucleotídeos degenerados foram capazes de amplificar diferentes seqüências de clones de laboratório e isolados de campo (Kyes e cols., 1997; Ward e cols., 1999, Taylor e cols., 2000). Portanto, iniciamos estudos para gerar um banco de seqüências DBL-1 α *var* de isolados de *P. falciparum* da Amazônia Brasileira para futuros estudos de expressão.

Iniciamos o estudo com isolados oriundos de Peixoto de Azevedo, no Estado do Mato Grosso (MT), onde parasitas foram coletados de 20 pacientes (MT01-20). Em paralelo foram utilizados também 24 isolados de Porto Velho, no Estado de Rondônia (RO01-25). Após extração de DNA genômico (Ferreira e cols., 1998), a região N-terminal do DBL-1 α de genes *var* de *P. falciparum* foi amplificada por PCR

(Kyes e cols., 1997). Fragmentos de ~200 bp foram obtidos em cada isolado, clonados e seqüenciados. Duzentas seqüências (10 de cada isolado), correspondentes aos 70 aminoácidos mais N-terminais do domínio DBL-1 α da seqüência *var-1* (Su e cols., 1995), foram geradas e confirmadas por BLAST (Altschul e cols., 1997) representar seqüências *var*. Quarenta e quatro diferentes seqüências de aminoácidos foram obtidas (GenBank AF172771-172814) mostrando a mesma estrutura de DBL-1 α descrita em outros isolados (*Figura 1A do Anexo 1*). Cinquenta seqüências foram obtidas dos isolados de Rondônia, representando 15 diferentes seqüências de aminoácidos. Porém, somente 3 seqüências não haviam sido encontradas nas amostras de Mato Grosso (*Figura 12*). Após alinhamento das 44 seqüências e a maioria das seqüências disponíveis no GenBank, 8 resíduos e várias cisteínas foram altamente conservados (*Figura 13*).

Figura 13. Alinhamento das 102 seqüências *var* encontradas no GenBank e 44 seqüências *var* de *P. falciparum* obtido diretamente de 20 pacientes de Mato Grosso, Região Amazônica Brasileira. O alinhamento foi realizado utilizando clustalw (versão 1.8)(Higgins e cols., 1996) e algumas edições manuais. DNASTar foi utilizado para a visualização gráfica.

Análise da porcentagem de identidade revelou que algumas seqüências brasileiras foram mais similares a seqüências de isolados de origem geográfica distinta. Além disso, dendogramas gerados de todas as seqüências demonstraram que as seqüências DBL-1 *var* do Mato Grosso não agruparam mais freqüentemente com seqüências obtidas de isolados da mesma região geográfica (Figura 14 e 15). Portanto, esses resultados confirmam e expandem as observações de outros autores (Kyes e cols., 1997; Ward e cols., 1999), ou seja, similaridade de seqüências DBL-1 α *var* não pode prever origem geográfica.

Figura 14. Cálculo filogenético com clustalw excluindo "gaps" e correção para múltiplas substituições (Higgins e cols., 1996) para 1000 réplicas de bootstrap utilizando o método de NJ (Neighbour Joining) (Saitou e Nei, 1987). As seqüências brasileiras estão indicadas (★).

Figura 15. Análise filogenética do domínio DBL-1 de 146 genes *var*. Árvores foram geradas de todas as seqüências com pacote Phylip (Felsenstein, J. 1993. PHYLIP, Phylogeny Inference Package, versão 3.5c, distribuído pelo autor: Departamento de Genética, Universidade de Washington, Seattle). Análise de bootstrap de 100 réplicas foi realizada com o programa seqboot deste pacote. Árvores sem raiz foram construídas pelo método de máxima parsimônia do protdist e finalmente a melhor árvore consenso foi calculada destes dados. As seqüências brasileiras estão indicadas (★).

De 3 a 9 diferentes seqüências foram detectadas por paciente e nenhum dos pacientes abrigava parasitas apresentando todas as mesmas seqüências de parasitas de outro paciente (*Figura 1B do Anexo 1*). Em contraste ao observado no Sudão (Ward e cols., 1999), onde 37 diferentes seqüências de aminoácidos foram amplificadas de 5 pacientes (média de 7,4 seqüências diferentes/paciente), em 20 pacientes brasileiros foram obtidas apenas 44 diferentes seqüências de aminoácidos (média de 2,2 seqüências diferentes/paciente). Mesmo que o número de cepas circulantes por paciente fosse 1, o que é improvável em isolados de campo (Druilhe e cols., 1998), esperaríamos encontrar mais seqüências DBL-1 α . Estes resultados claramente indicam que este par de oligonucleotídeos tem especificidade limitada e sugere que um número menor de clones circulantes está presente em cada paciente do Mato Grosso em relação ao Sudão. Um novo par de oligonucleotídeos, capaz de amplificar por PCR a maioria dos genes *var* de clones de laboratório (Taylor e cols., 2000), será utilizado nos mesmos isolados em estudos futuros.

Este é o primeiro trabalho de seqüências DBL-1 *var* de *P. falciparum* de isolados brasileiros obtidos diretamente de pacientes. Vários estudos têm sido realizados para demonstrar que os domínios DBL das proteínas PfEMP1 são capazes de se ligar a diferentes receptores endoteliais (Rowe e cols., 1997; Chen e cols., 1998a; Buffet e cols., 1999; Smith e cols., 2000). Esta especificidade diferencial de adesão conduz ao seqüestramento em vários órgãos. Informação mundial de seqüências DBL-1 α de DNA genômico está rapidamente sendo acumulada (Kyes e cols., 1997; Ward e cols., 1999; Taylor *et al*, 2000) na tentativa de determinar se existem seqüências particulares de DBL-1 α preferencialmente expressas nas diferentes patologias da malária falciparum grave.

4.2. Análise de seqüências DBL1 α de genes *var* expressos em isolados de campo de *P. falciparum* obtidos de pacientes com malária grave infectados na Região Amazônica Brasileira

ANEXO 2: Association of severe non-cerebral *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil with expressed PfEMP1 DBL1 α sequences lacking cysteine residues

Infecções por *P. falciparum* são caracterizadas por remoção da circulação periférica de eritrócitos infectados com parasitas maduros. Este seqüestramento ocorre por adesão dos eritrócitos infectados aos receptores endoteliais do hospedeiro na microvasculatura de muitos órgãos. Este fenótipo, denominado citoaderência, causa retenção e acúmulo de eritrócitos infectados conduzindo à oclusão de microvasos e alterações patológicas associadas à malária grave (Miller e cols., 1994). A citoaderência é conferida por PfEMP1, uma proteína codificada por genes *var* (Su e cols., 1995), que apresenta na sua região N-terminal, altamente polimórfica, muitos ligantes para diferentes receptores endoteliais (rev. em Cooke e cols., 2000). A adesão de eritrócitos infectados a não infectados, um fenômeno denominado "rosetting" (Handunnetti e cols., 1989), também contribui para a patologia associada a infecções por *P. falciparum* (MacPherson e cols., 1985; Aikawa, 1988; Carlson e cols., 1990; Pongponratn e cols., 1991; Treutiger e cols., 1992; Rowe e cols., 1995; Newbold e cols., 1997a) e muitas linhas de evidência têm demonstrado que o DBL1 α da PfEMP1 media "rosetting" (Rowe e cols., 1997; Chen e cols., 1998a e 2000b; Barragan e cols., 2000b).

O entendimento dos mecanismos moleculares implicados na malária falciparum grave pode conduzir a novas e adequadas estratégias de controle. Trabalho recente associou malária grave de pacientes da Guiana Francesa a determinadas seqüências DBL δ de genes *var*, indicando que isolados de indivíduos com diferentes manifestações clínicas podem ser caracterizados por repertórios PfEMP1 específicos (Ariey e cols., 2001). Nós, portanto, analisamos as seqüências DBL1 α de genes *var* expressos em parasitas obtidos de pacientes com malária grave da Região Amazônica Brasileira, para determinar se existem seqüências DBL1 α específicas predominantemente expressas nesses parasitas.

Foram utilizadas para o estudo, 6 amostras de pacientes com malária grave,

Figura 16. PCR multiplex.

cuja maioria (amostras 1 a 5) aparentemente apresentava infecção clonal (Figura 16), diferentemente de um isolado da Tanzânia (amostra 6). Entretanto, cinquenta e sete seqüências DBL1 α foram obtidas por

RT-PCR de parasitas maduros (Figura 17 e Tabela 4), representando 25 diferentes seqüências de aminoácidos, sendo 2 já descritas (GenBank AF221773 e AJ133811) e 23 novas (GenBank AF368922 a AF368944). Alinhamento de todas as 25 seqüências mostrou que 8 podiam ser agrupadas devido a deleções de 1-2 cisteínas (Figura 18 e *Figura 1 do Anexo 2*). Significativamente, esse grupo compreendeu todas as seqüências mais abundantemente expressas em cada paciente, como demonstrado pela porcentagem de clones idênticos sequenciados em cada amostra.

Figura 17. *P. falciparum* obtido do paciente G3, amadurecido *in vitro* por 40 horas e concentrado com a técnica de gelatina.

Tabela 4. Parasitemias e estágios dos parasitas em cada isolado utilizado.

	G33	G23	G34	G2	G29	G3	NG1	NG2	NG3	NG4
Após cultivo *	5,4% 89T 11A	0,8% 75T 25A	0,3% 33E, 67T	2,3% 44E, 39T 17A	1,2% 42E, 33T 25A	ND	ND	ND	3,8% 50E, 47T 3A	7% 13E, 70T 17A
Após Plasmagel #	53% 98T 2A	66% 99T 1A	NR	55% 56E, 43T 1A	45% 53E, 45T 2A	65% 83T, 15E 2A	27% 81T, 19E	58% 81T, 18E 1A	NR	52% 80T, 18E 2A

*Parasitemia em 1000 hemácias, #Parasitemia em 300 hemácias,
A= anel, T= trofozoíta maduro, E= esquizonte,
NR= não realizado, ND= não determinado

Figura 18. A. Alinhamento das diferentes seqüências de aminoácidos do domínio DBL1 α , obtidas dos parasitas de pacientes graves. Dentro do retângulo vermelho estão representadas as seqüências preferencialmente expressas de cada isolado. **B.** Diferentes árvores sem raiz construídas após deleções de diferentes regiões do alinhamento (A. 1 a 6) e as posições das seqüências preferencialmente expressas (). A deleção da região 6 do alinhamento foi a única responsável pelo desagrupamento dessas seqüências.

Nós então investigamos se essas seqüências também eram expressas em parasitas de pacientes com malária não grave. Cinquenta e quatro seqüências DBL1 α *var* foram obtidas de parasitas de 4 pacientes (*Tabela 1 do Anexo 2*), representando 21 diferentes seqüências de aminoácidos. Apenas uma já havia sido descrita (GenBank AF275864). As outras 20 seqüências foram depositadas no GenBank (AF368945 a AF368950 e AF416572 a AF416585). Importante notar que nesta análise foi incluída uma amostra de um paciente com malária não grave que trata-se de uma recrudescência proveniente de uma infecção grave.

Em análise filogenética do domínio DBL1 α de diferentes genes *var* expressos no Brasil (25 de grave e 21 de malária não grave) juntamente com 21 seqüências do Sudão obtidas do GenBank, as mesmas seqüências de parasitas de pacientes graves que haviam sido agrupadas permaneceram juntas (*Figura 1 do Anexo 2*).

Nós então investigamos se as seqüências DBL1 α *var* mais predominantemente expressas em parasitas de pacientes com malária grave estavam amplamente presentes no repertório de genes *var* de pacientes com malária não grave da Amazônia Brasileira. Filtros de alta densidade foram preparados com 320 clones representando seqüências DBL1 α *var* de DNA genômico de parasitas obtidos de 80 pacientes sem malária grave de 4 diferentes estados da Amazônia Brasileira. Os resultados de hibridização com seqüências preferencialmente expressas em parasitas de diferentes pacientes com malária grave demonstraram que, apesar destas seqüências serem raramente expressas nos parasitas de pacientes sem malária grave, são abundantes no genoma destes parasitas (*Figura 2 do Anexo 2*).

Como "rosetting" tem sido associado a malária grave e é mediado por DBL1 α , nós investigamos se um domínio DBL1 α da seqüência mais abundante de um

paciente com malária grave pode se ligar a eritrócitos. Portanto, uma proteína (AF368922) foi expressa com uma cauda de histidina e utilizada em análise por imunofluorescência (IFA), similarmente ao que já havia sido feito para demonstrar que a PfEMP1 é um ligante de “rosetting” (Chen e cols., 1998a). Essa seqüência foi escolhida por apresentar 72% de identidade com a seqüência (2182041) do clone ItR29, identificada como ligante de “rosetting” para o receptor CR1 dos eritrócitos (Rowe e cols., 1997). A IFA com a proteína DBL1 α -His apresentou uma coloração de superfície em todos os eritrócitos não infectados. Este resultado mostrou-se específico para DBL1 α , visto

Contraste de Fase

Anti RBC

PBS

DBL1 α /His

Anti A

Meta1/His

Anti B

Figura 19. Imunofluorescência utilizando monocamadas de eritrócitos A+ e diferentes anticorpos/proteínas.

que uma proteína não relacionada também com cauda de histidina não apresentou qualquer sinal (Figura 19 e *Figura 3 do Anexo 2*).

Este é o primeiro trabalho reportando associação de malária grave em pacientes brasileiros e determinadas seqüências DBL1 α . Os resultados e conclusões obtidos deste estudo foram baseados em material de parasitas de 6 pacientes diagnosticados com malária grave. Para identificar estes pacientes, nós examinamos a história clínica de 1599 pacientes com malária falciparum, atendidos no Laboratório de Malária da SUCEN, de 1987 a 2000. Porém, fomos capazes de identificar somente seis pacientes com malária grave, segundos os critérios da WHO (WHO, 2000). Além disso, nós também demonstramos níveis séricos de PCT mais elevados nestes pacientes (Figura 20). Este novo parâmetro foi mostrado se correlacionar com a severidade da doença e o risco de mortalidade (Chiwakata e cols., 2001).

Figura 20. Teste imunocromatográfico para dosagem de procalcitonina (PCT) em soro humano. **A.** Teste negativo (realizado com o paciente NG2). **B.** Teste positivo (realizado com o paciente G3).

Infecções maláricas não são clonais, mesmo em regiões de baixa endemicidade. Portanto, não foi surpreendente encontrar diferentes seqüências DBL1 α *var* expressas nos parasitas obtidos de todos os pacientes (Figura 21A e 21B) . Notavelmente, entretanto, houve seqüências DBL1 α predominantemente expressas nos parasitas obtidos de todos os 6 pacientes com malária grave. Além disso, estas seqüências mostraram uma região com deleções de 1-2 cisteínas. Porém, as seqüências predominantemente expressas em parasitas de pacientes sem malária grave não apresentaram essas deleções. De fato o mesmo paciente no momento de sua infecção grave apresentava parasitas expressando principalmente seqüências DBL1 α com deleção de 2 cisteínas e 20 dias depois, durante uma recrudescência, causando infecção não grave, as seqüências DBL1 α predominantemente expressas apresentavam todas as 4 cisteínas. Este resultado nos leva a especular que um dobramento diferente destes domínios confere às populações de parasitas que os expressam, diferentes graus de virulência e reforçam a importância da conformação da PfEMP1 na patologia associada a malária.

Aqui nós demonstramos que o domínio DBL1 α representando a seqüência mais abundantemente expressa de um dos pacientes com malária grave, quando expresso em bactéria, se liga a eritrócitos. Este resultado, portanto, sugere uma associação de "rosetting" com malária grave não cerebral, presente nos pacientes brasileiros. Infelizmente, não existem dados de "rosetting" no Brasil e claramente mais estudos são necessários para validar esta associação.

Os resultados aqui descritos, juntamente com aqueles encontrados na Guiana Francesa (Ariey e cols., 2001), indicam que existem realmente associações de malária grave com seqüências PfEMP1 específicas. Entretanto, além da família multigênica *var*, existem várias outras famílias multigênicas, tais como *rif*, *stevor*, *clag* e *pf60*, envolvidas em virulência (rev. em Kyes e cols., 2001). Atualmente, metodologias em larga escala podem ser desenvolvidas para comparar o repertório genômico e expresso dos genes de virulência daqueles parasitas que causam manifestações clínicas específicas. Esses dados ajudariam a elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nas diferentes apresentações da malária grave e possibilitariam a criação de alternativas às estratégias de erradicação e controle da malária atualmente utilizadas.

5. CONCLUSÕES

5.1. Os isolados brasileiros apresentam domínios DBL1 α de genes *var* com estrutura muito semelhante àquela obtida em isolados de outros países, com várias cisteínas e outros resíduos conservados.

5.2. Existem isolados brasileiros com domínios DBL1 α de genes *var* idênticos aos encontrados em isolados de países muito distantes e sem qualquer fluxo de parasitas com o Brasil.

5.3. Alguns domínios DBL1 α de genes *var* de isolados brasileiros apresentaram maior similaridade com isolados de origem geográfica distinta e portanto, similaridade entre essas seqüências não pode predizer origem geográfica.

5.4. O repertório genômico do domínio DBL1 α dos genes *var* de isolados de *Plasmodium falciparum* de Mato Grosso e Rondônia é muito semelhante, porém, os oligonucleotídeos $\alpha 5$ e αAR também apresentam especificidade limitada para os isolados brasileiros.

5.5. Resultados preliminares sugerem que pacientes brasileiros com malária grave também apresentam níveis elevados de procalcitonina, apesar de mais baixos que os encontrados em regiões de alta endemicidade.

5.6. Várias seqüências do domínio DBL1 α dos genes *var* são expressas em parasitas maduros de isolados brasileiros de *Plasmodium falciparum*.

5.7. Seqüências expressas em alguns isolados brasileiros também apresentam 100% de identidade com seqüências de isolados de países longínquos.

5.8. As seqüências preferencialmente expressas em parasitas de pacientes com malária grave do Brasil apresentam deleções de uma ou duas cisteínas. Parasitas de pacientes com malária não grave também apresentaram essas seqüências, porém elas foram raramente expressas, apesar de freqüentes no genoma desses parasitas.

5.9. Uma seqüência com deleção de duas cisteínas, preferencialmente expressa em parasitas de um dos pacientes com malária grave do Brasil se liga a eritrócitos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J. H., Sim, B. K., Dolan, S. A., Fang, X., Kaslow, D. C. & Miller, L. H. (1992). "A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(15), 7085-9.
- Aguiar, J. C., Albrecht, G. R., Cegielski, P., Greenwood, B. M., Jensen, J. B., Lallinger, G., Martinez, A., McGregor, I. A., Minjas, J. N., Neequaye, J. e cols. (1992). "Agglutination of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from east and west African isolates by human sera from distant geographic regions." *Am J Trop Med Hyg*, 47(5), 621-32.
- Ahearn, J. M. & Fearon, D. T. (1989). "Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21)." *Adv Immunol*, 46, 183-219.
- Ahlborg, N., Iqbal, J., Hansson, M., Uhlen, M., Mattei, D., Perlmann, P., Stahl, S. & Berzins, K. (1995). "Immunogens containing sequences from antigen Pf332 induce *Plasmodium falciparum*-reactive antibodies which inhibit parasite growth but not cytoadherence." *Parasite Immunol*, 17(7), 341-52.
- Aikawa, M. (1988). "Human cerebral malaria." *Am J Trop Med Hyg*, 39(1), 3-10.
- Aikawa, M., Brown, A., Smith, C.D., Tegoshi, T., Howard, R.J., Hasler, T.H., Ito, Y., Perry, G., Collins, W.E. & Webster, K. (1992). "A primate model for human cerebral malaria: *Plasmodium coatneyi*-infected rhesus monkeys". *Am J Trop Med Hyg*, 46(4), 391-7.
- Alecrim, M.G., Alecrim, W. & Macedo, V. (1999). "*Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region." *Rev Soc Bras Med Trop*, 32(1), 67-8.
- Al-Nawas, B. & Shah, P. (1997). "Procalcitonin in acute malaria." *Eur J Med Res*, 2(5), 206-8.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res*, 25(17), 3389-402.
- al-Yaman, F., Genton, B., Mokela, D., Raiko, A., Kati, S., Rogerson, S., Reeder, J. & Alpers, M. (1995). "Human cerebral malaria: lack of significant association between erythrocyte rosetting and disease severity." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89(1), 55-8.
- Angus, B. J., Thanikkul, K., Silamut, K., White, N. J. & Udomsangpetch, R. (1996). "Short report: Rosette formation in *Plasmodium ovale* infection." *Am J Trop Med Hyg*, 55(5), 560-1.
- Anstey, N. M., Weinberg, J. B., Hassanali, M. Y., Mwaikambo, E. D., Manyenga, D., Misukonis, M. A., Arnette, D. R., Hollis, D., McDonald, M. I. & Granger, D. L. (1996). "Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression." *J Exp Med*, 184(2), 557-67.
- Ariey, F., Hommel, D., Le Scanf, C., Duchemin, J. B., Peneau, C., Hulin, A., Sarthou, J. L., Reynes, J. M., Fandeur, T. & Mercereau-Puijalon, O. (2001). "Association of severe malaria with a specific *Plasmodium falciparum* genotype in French Guiana." *J Infect Dis*, 184(2), 237-41.
- Assicot, M., Gendrel, D., Carsin, H., Raymond, J., Guilbaud, J. & Bohuon, C. (1993). "High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection." *Lancet*, 341(8844), 515-8.
- Barnwell, J. W., Asch, A. S., Nachman, R. L., Yamaya, M., Aikawa, M. & Ingravallo, P. (1989). "A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions *in vitro* as a receptor for a cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." *J Clin Invest*, 84(3), 765-72.
- Barragan, A., Fernandez, V., Chen, Q., von Euler, A., Wahlgren, M. & Spillmann, D. (2000b). "The duffy-binding-like domain 1 of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) is a heparan sulfate ligand that requires 12 mers for binding." *Blood*, 95(11), 3594-9.
- Barragan, A., Kremsner, P. G., Wahlgren, M. & Carlson, J. (2000a). "Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* rosetting." *Infect Immun*, 68(5), 2971-5.
- Barragan, A., Kremsner, P. G., Weiss, W., Wahlgren, M. & Carlson, J. (1998). "Age-related buildup of humoral immunity against epitopes for rosette formation and agglutination in African areas of malaria endemicity." *Infect Immun*, 66(10), 4783-7.
- Baruch, D. I., Gormely, J. A., Ma, C., Howard, R. J. & Pasloske, B. L. (1996). "*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36,

thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(8), 3497-502.

Baruch, D. I., Ma, X. C., Pasloske, B., Howard, R. J. & Miller, L. H. (1999). "CD36 peptides that block cytoadherence define the CD36 binding region for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." *Blood*, 94(6), 2121-7.

Baruch, D. I., Ma, X. C., Singh, H. B., Bi, X., Pasloske, B. L. & Howard, R. J. (1997). "Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence." *Blood*, 90(9), 3766-75.

Baruch, D. I., Pasloske, B. L., Singh, H. B., Bi, X., Ma, X. C., Feldman, M., Taraschi, T. F. & Howard, R. J. (1995). "Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes." *Cell*, 82(1), 77-87.

Beeson, J. G., Rogerson, S. J., Cooke, B. M., Reeder, J. C., Chai, W., Lawson, A. M., Molyneux, M. E. & Brown, G. V. (2000). "Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria." *Nat Med*, 6(1), 86-90.

Berendt, A. R., McDowall, A., Craig, A. G., Bates, P. A., Sternberg, M. J., Marsh, K., Newbold, C. I. & Hogg, N. (1992). "The binding site on ICAM-1 for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site." *Cell*, 68(1), 71-81.

Berendt, A. R., Simmons, D. L., Tansey, J., Newbold, C. I. & Marsh, K. (1989). "Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*." *Nature*, 341(6237), 57-9.

Biggs, B. A., Gooze, L., Wycherley, K., Wollish, W., Southwell, B., Leech, J. H. & Brown, G. V. (1991). "Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(20), 9171-4.

Bignami, A. & Bastianelli, A. (1889). "Observation of estivo-autumnal malaria." *Riforma Medica*, 6, 1334-5.

Bischoff, E., Guillotte, M., Mercereau-Puijalon, O. & Bonnefoy, S. (2000). "A member of the *Plasmodium falciparum* Pf60 multigene family codes for a nuclear protein expressed by readthrough of an internal stop codon." *Mol Microbiol*, 35(5), 1005-16.

Bolad, A. & Berzins, K. (2000). "Antigenic diversity of *Plasmodium falciparum* and antibody-mediated parasite neutralization." *Scand J Immunol*, 52(3), 233-9.

Bonnefoy, S., Bischoff, E., Guillotte, M. & Mercereau-Puijalon, O. (1997). "Evidence for distinct prototype sequences within the *Plasmodium falciparum* Pf60 multigene family." *Mol Biochem Parasitol*, 87(1), 1-11.

Borst, P., Bitter, W., McCulloch, R., Van Leeuwen, F. & Rudenko, G. (1995). "Antigenic variation in malaria." *Cell*, 82(1), 1-4.

Bouharoun-Tayoun, H., Oeuvray, C., Lunel, F. & Druilhe, P. (1995). "Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages." *J Exp Med*, 182(2), 409-18.

Boulos, M. (1992). "Clinical picture of severe malaria." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 34 Suppl 9, S41-2.

Boyle, J. S. & Lew, A. M. (1995). "An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification." *Trends Genet*, 11(1), 8.

Breman, J. G. (2001). "The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden." *Am J Trop Med Hyg*, 64(1-2 Suppl), 1-11.

Brown, K. N. & Brown, I. N. (1965). "Immunity to malaria: antigenic variation in chronic infections of *Plasmodium knowlesi*." *Nature*, 208(17), 1286-8.

Brown, K. N. & Hills, L. A. (1974). "Antigenic variation and immunity to *Plasmodium knowlesi*: antibodies which induce antigenic variation and antibodies which destroy parasites." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 68(2), 139-42.

Bruce-Chwatt, L. J. (1985). *Essential malariology*, Wiley, New York.

- Buffet, P. A., Gamain, B., Scheidig, C., Baruch, D., Smith, J. D., Hernandez-Rivas, R., Pouvelle, B., Oishi, S., Fujii, N., Fusai, T., Parzy, D., Miller, L. H., Gysin, J. & Scherf, A. (1999). "*Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22), 12743-8.
- Bull, P. C., Lowe, B. S., Kortok, M. & Marsh, K. (1999). "Antibody recognition of *Plasmodium falciparum* erythrocyte surface antigens in Kenya: evidence for rare and prevalent variants." *Infect Immun*, 67(2), 733-9.
- Bull, P. C., Lowe, B. S., Kortok, M., Molyneux, C. S., Newbold, C. I. & Marsh, K. (1998). "Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria." *Nat Med*, 4(3), 358-60.
- Carcy, B., Bonnefoy, S., Guillotte, M., Le Scanf, C., Grellier, P., Schrevel, J., Fandeur, T. & Mercereau-Puijalon, O. (1994). "A large multigene family expressed during the erythrocytic schizogony of *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol*, 68(2), 221-33.
- Carlson, J. & Wahlgren, M. (1992). "*Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions." *J Exp Med*, 176(5), 1311-7.
- Carlson, J. (1993). "Erythrocyte rosetting in *Plasmodium falciparum* malaria--with special reference to the pathogenesis of cerebral malaria." *Scand J Infect Dis Suppl*, 86, 1-79.
- Carlson, J., Helmby, H., Hill, A. V., Brewster, D., Greenwood, B. M. & Wahlgren, M. (1990). "Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies." *Lancet*, 336(8729), 1457-60.
- Carlson, J., Nash, G. B., Gabutti, V., al-Yaman, F. & Wahlgren, M. (1994). "Natural protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria due to impaired rosette formation." *Blood*, 84(11), 3909-14.
- Chen, Q., Barragan, A., Fernandez, V., Sundstrom, A., Schlichtherle, M., Sahlen, A., Carlson, J., Datta, S. & Wahlgren, M. (1998a). "Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*." *J Exp Med*, 187(1), 15-23.
- Chen, Q., Fernandez, V., Sundstrom, A., Schlichtherle, M., Datta, S., Hagblom, P. & Wahlgren, M. (1998b). "Developmental selection of *var* gene expression in *Plasmodium falciparum*." *Nature*, 394(6691), 392-5.
- Chen, Q., Heddini, A., Barragan, A., Fernandez, V., Pearce, S. F. & Wahlgren, M. (2000b). "The semiconserved head structure of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors." *J Exp Med*, 192(1), 1-10.
- Chen, Q., Schlichtherle, M. & Wahlgren, M. (2000a). "Molecular aspects of severe malaria." *Clin Microbiol Rev*, 13(3), 439-50.
- Cheng, Q., Cloonan, N., Fischer, K., Thompson, J., Waine, G., Lanzer, M. & Saul, A. (1998). "*stevor* and *rif* are *Plasmodium falciparum* multicopy gene families which potentially encode variant antigens." *Mol Biochem Parasitol*, 97(1-2), 161-76.
- Chiwakata, C. B., Manegold, C., Bonicke, L., Waase, I., Julch, C. & Dietrich, M. (2001). "Procalcitonin as a parameter of disease severity and risk of mortality in patients with *Plasmodium falciparum* malaria." *J Infect Dis*, 183(7), 1161-4.
- Chotivanich, K. T., Udomsangpetch, R., Pipitaporn, B., Angus, B., Suputtamongkol, Y., Pukrittayakamee, S. & White, N. J. (1998). "Rosetting characteristics of uninfected erythrocytes from healthy individuals and malaria patients." *Ann Trop Med Parasitol*, 92(1), 45-56.
- Clark, I. A. & Chaudhri, G. (1988). "Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis." *Br J Haematol*, 70(1), 99-103.
- Clough, B., Atilola, F. A. & Pasvol, G. (1998b). "The role of rosetting in the multiplication of *Plasmodium falciparum*: rosette formation neither enhances nor targets parasite invasion into uninfected red cells." *Br J Haematol*, 100(1), 99-104.
- Clough, B., Atilola, F. A., Black, J. & Pasvol, G. (1998a). "*Plasmodium falciparum*: the importance of IgM in the rosetting of parasite-infected erythrocytes." *Exp Parasitol*, 89(1), 129-32.

- Cooke, B. M., Berendt, A. R., Craig, A. G., MacGregor, J., Newbold, C. I. & Nash, G. B. (1994). "Rolling and stationary cytoadhesion of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*: separate roles for ICAM-1, CD36 and thrombospondin." *Br J Haematol*, 87(1), 162-70.
- Cooke, B. M., Nicoll, C. L., Baruch, D. I. & Coppel, R. L. (1998). "A recombinant peptide based on PfEMP-1 blocks and reverses adhesion of malaria-infected red blood cells to CD36 under flow." *Mol Microbiol*, 30(1), 83-90.
- Cooke, B., Coppel, R. & Wahlgren, M. (2000). "*Falciparum* malaria: sticking up, standing out and out-standing." *Parasitol Today*, 16(10), 416-20.
- Coppel, R. L., Brown, G. V. & Nussenzweig, V. (1998). "Adhesive proteins of the malaria parasite." *Curr Opin Microbiol*, 1(4), 472-81.
- Corbett, C. E., Duarte, M. I., Lancellotti, C. L., Silva, M. A. & Andrade Junior, H. F. (1989). "Cytoadherence in human *falciparum* malaria as a cause of respiratory distress." *J Trop Med Hyg*, 92(2), 112-20.
- Craig, A. & Scherf, A. (2001). "Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion." *Mol Biochem Parasitol*, 115(2), 129-43.
- Crandall, I., Collins, W. E., Gysin, J. & Sherman, I. W. (1993). "Synthetic peptides based on motifs present in human band 3 protein inhibit cytoadherence/sequestration of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(10), 4703-7.
- Crandall, I., Guthrie, N., Demers, D. & Sherman, I. W. (1994). "*Plasmodium falciparum*: CD36 dependent cytoadherence or rosetting of infected erythrocytes is modulated by knobs." *Cell Adhes Commun*, 2(6), 503-10.
- David, P. H., Handunnetti, S. M., Leech, J. H., Gamage, P. & Mendis, K. N. (1988). "Rosetting: a new cytoadherence property of malaria-infected erythrocytes." *Am J Trop Med Hyg*, 38(2), 289-97.
- David, P. H., Hommel, M., Miller, L. H., Udeinya, I. J. & Oligino, L. D. (1983). "Parasite sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(16), 5075-9.
- Davis, T. M., Assicot, M., Bohuon, C., St John, A., Li, G. Q. & Anh, T. K. (1994). "Serum procalcitonin concentrations in acute malaria." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88(6), 670-1.
- Deitsch, K. W., Calderwood, M. S. & Wellems, T. E. (2001). "Malaria. Cooperative silencing elements in *var* genes." *Nature*, 412(6850), 875-6.
- Deitsch, K. W., del Pinal, A. & Wellems, T. E. (1999). "Intra-cluster recombination and *var* transcription switches in the antigenic variation of *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol*, 101(1-2), 107-16.
- del Portillo, H. A., Fernandez-Becerra, C., Bowman, S., Oliver, K., Preuss, M., Sanchez, C. P., Schneider, N. K., Villalobos, J. M., Rajandream, M. A., Harris, D., Pereira da Silva, L. H., Barrell, B. & Lanzer, M. (2001). "A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*." *Nature*, 410(6830), 839-42.
- Diggs, C., Joseph, K., Flemmings, B., Snodgrass, R. & Hines, F. (1975). "Protein synthesis *in vitro* by cryopreserved *Plasmodium falciparum*." *Am J Trop Med Hyg*, 24(5), 760-3.
- Dodoo, D., Staalsoe, T., Giha, H., Kurtzhals, J. A., Akanmori, B. D., Koram, K., Dunyo, S., Nkrumah, F. K., Hviid, L. & Theander, T. G. (2001). "Antibodies to variant antigens on the surfaces of infected erythrocytes are associated with protection from malaria in Ghanaian children." *Infect Immun*, 69(6), 3713-8.
- Druilhe, P., Daubersies, P., Patarapotikul, J., Gentil, C., Chene, L., Chongsuphajaisiddhi, T., Mellouk, S. & Langsley, G. (1998). "A primary malarial infection is composed of a very wide range of genetically diverse but related parasites." *J Clin Invest*, 101(9), 2008-16.
- Duarte, M. I., Corbett, C. E., Boulos, M. & Amato Neto, V. (1985). "Ultrastructure of the lung in *falciparum* malaria." *Am J Trop Med Hyg*, 34(1), 31-5.

- Duffy, P. E., Craig, A. G. & Baruch, D. I. (2001). "Variant proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes--developing vaccines." *Trends Parasitol*, 17(8), 354-6.
- Eda, S., Lawler, J. & Sherman, I. W. (1999). "*Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adhesion to the type 3 repeat domain of thrombospondin-1 is mediated by a modified band 3 protein." *Mol Biochem Parasitol*, 100(2), 195-205.
- Fernandez, V., Hommel, M., Chen, Q., Hagblom, P. & Wahlgren, M. (1999). "Small, clonally variant antigens expressed on the surface of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte are encoded by the *rif* gene family and are the target of human immune responses." *J Exp Med*, 190(10), 1393-404.
- Fernandez, V., Treutiger, C. J., Nash, G. B. & Wahlgren, M. (1998). "Multiple adhesive phenotypes linked to rosetting binding of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria." *Infect Immun*, 66(6), 2969-75.
- Fernandez-Reyes, D., Craig, A. G., Kyes, S. A., Peshu, N., Snow, R. W., Berendt, A. R., Marsh, K. & Newbold, C. I. (1997). "A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya." *Hum Mol Genet*, 6(8), 1357-60.
- Ferreira, M. U., Liu, Q., Kaneko, O., Kimura, M., Tanabe, K., Kimura, E. A., Katzin, A. M., Isomura, S. & Kawamoto, F. (1998). "Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the southwestern Brazilian Amazon." *Am J Trop Med Hyg*, 59(3), 474-80.
- Fischer, K., Horrocks, P., Preuss, M., Wiesner, J., Wunsch, S., Camargo, A. A. & Lanzer, M. (1997). "Expression of *var* genes located within polymorphic subtelomeric domains of *Plasmodium falciparum* chromosomes." *Mol Cell Biol*, 17(7), 3679-86.
- Freitas-Junior, L. H., Bottius, E., Pirrit, L. A., Deitsch, K. W., Scheidig, C., Guinet, F., Nehrbass, U., Wellems, T. E. & Scherf, A. (2000). "Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*." *Nature*, 407(6807), 1018-22.
- Fried, M. & Duffy, P. E. (1996). "Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta." *Science*, 272(5267), 1502-4.
- Fujioka, H., Millet, P., Maeno, Y., Nakazawa, S., Ito, Y., Howard, R.J., Collins, W.E. & Aikawa, M. (1994). "A nonhuman primate model for human cerebral malaria: rhesus monkeys experimentally infected with *Plasmodium fragile*." *Exp Parasitol*, 78(4), 371-6.
- Gamain, B., Miller, L. H. & Baruch, D. I. (2001). "The surface variant antigens of *Plasmodium falciparum* contain cross-reactive epitopes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5), 2664-9.
- Gardiner, D. L., Holt, D. C., Thomas, E. A., Kemp, D. J. & Trenholme, K. R. (2000). "Inhibition of *Plasmodium falciparum* clag9 gene function by antisense RNA." *Mol Biochem Parasitol*, 110(1), 33-41.
- Giha, H. A., Staalsoe, T., Dodoo, D., Elhassan, I. M., Roper, C., Satti, G. M., Arnot, D. E., Theander, T. G. & Hviid, L. (1999). "Nine-year longitudinal study of antibodies to variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." *Infect Immun*, 67(8), 4092-8.
- Giha, H. A., Staalsoe, T., Dodoo, D., Roper, C., Satti, G. M., Arnot, D. E., Hviid, L. & Theander, T. G. (2000). "Antibodies to variable *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte surface antigens are associated with protection from novel malaria infections." *Immunol Lett*, 71(2), 117-26.
- Gilks, C. F., Walliker, D. & Newbold, C. I. (1990). "Relationships between sequestration, antigenic variation and chronic parasitism in *Plasmodium chabaudi chabaudi*--a rodent malaria model." *Parasite Immunol*, 12(1), 45-64.
- Green, S. J., Scheller, L. F., Marletta, M. A., Seguin, M. C., Klotz, F. W., Slayter, M., Nelson, B. J. & Nacy, C. A. (1994). "Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens." *Immunol Lett*, 43(1-2), 87-94.
- Gupta, S., Snow, R. W., Donnelly, C. A., Marsh, K. & Newbold, C. (1999). "Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections." *Nat Med*, 5(3), 340-3.
- Handunnetti, S. M., Mendis, K. N. & David, P. H. (1987). "Antigenic variation of cloned *Plasmodium fragile* in its natural host *Macaca sinica*. Sequential appearance of successive variant antigenic types."

J Exp Med, 165(5), 1269-83.

Handunnetti, S. M., van Schravendijk, M. R., Hasler, T., Barnwell, J. W., Greenwalt, D. E. & Howard, R. J. (1992). "Involvement of CD36 on erythrocytes as a rosetting receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." *Blood*, 80(8), 2097-104.

Handunnetti, S.M., David, P.H., Perera, K.L. & Mendis, K.N. (1989) "Uninfected erythrocytes form rosettes around *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes". *Am J Trop Med Hyg*, 40(2), 115-8.

Hasler, T., Handunnetti, S. M., Aguiar, J. C., van Schravendijk, M. R., Greenwood, B. M., Lallinger, G., Cegielski, P. & Howard, R. J. (1990). "In vitro rosetting, cytoadherence, and microagglutination properties of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from Gambian and Tanzanian patients." *Blood*, 76(9), 1845-52.

Heddini, A., Pettersson, F., Kai, O., Shafi, J., Obiero, J., Chen, Q., Barragan, A., Wahlgren, M. & Marsh, K. (2001). "Fresh isolates from children with severe *Plasmodium falciparum* malaria bind to multiple receptors." *Infect Immun*, 69(9), 5849-56.

Helmby, H., Cavelier, L., Pettersson, U. & Wahlgren, M. (1993). "Rosetting *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes express unique strain-specific antigens on their surface." *Infect Immun*, 61(1), 284-8.

Hernandez-Rivas, R., Mattei, D., Sterkers, Y., Peterson, D. S., Wellems, T. E. & Scherf, A. (1997). "Expressed *var* genes are found in *Plasmodium falciparum* subtelomeric regions." *Mol Cell Biol*, 17(2), 604-11.

Higgins, D. G., Thompson, J. D. & Gibson, T. J. (1996). "Using CLUSTAL for multiple sequence alignments." *Methods Enzymol*, 266, 383-402.

Ho, M., Schollaardt, T., Niu, X., Looareesuwan, S., Patel, K. D. & Kubes, P. (1998). "Characterization of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte and P- selectin interaction under flow conditions." *Blood*, 91(12), 4803-9.

Ho, M., Singh, B., Looareesuwan, S., Davis, T. M., Bunnag, D. & White, N. J. (1991). "Clinical correlates of *in vitro Plasmodium falciparum* cytoadherence." *Infect Immun*, 59(3), 873-8.

Hollenstein, U., Looareesuwan, S., Aichelburg, A., Thalhammer, F., Stoiser, B., Amradee, S., Chullawichit, S., El Menyawi, I. & Burgmann, H. (1998). "Serum procalcitonin levels in severe *Plasmodium falciparum* malaria." *Am J Trop Med Hyg*, 59(6), 860-3.

Holt, D. C., Gardiner, D. L., Thomas, E. A., Mayo, M., Bourke, P. F., Sutherland, C. J., Carter, R., Myers, G., Kemp, D. J. & Trenholme, K. R. (1999). "The cytoadherence linked asexual gene family of *Plasmodium falciparum*: are there roles other than cytoadherence?" *Int J Parasitol*, 29(6), 939-44.

Hommel, M. (1996). "[Physiopathology of symptoms of malaria. Role of cytokines, cytoadherence and premunition]." *Presse Med*, 25(2), 70-6.

Hourcade, D., Holers, V. M. & Atkinson, J. P. (1989). "The regulators of complement activation (RCA) gene cluster." *Adv Immunol*, 45, 381-416.

Howard, R. J. & Gilladoga, A. D. (1989). "Molecular studies related to the pathogenesis of cerebral malaria." *Blood*, 74(8), 2603-18.

Howard, R. J., Barnwell, J. W. & Kao, V. (1983). "Antigenic variation of *Plasmodium knowlesi* malaria: identification of the variant antigen on infected erythrocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(13), 4129-33.

Iqbal, J., Perlmann, P. & Berzins, K. (1993). "*Plasmodium falciparum*: analysis of the cytoadherence inhibition of the human monoclonal antibody 33G2 and of antibodies reactive with antigen Pf332." *Exp Parasitol*, 77(1), 79-87.

Jacobs, R. & Warren, M. (1967) "Sequestration of schizonts in the deep tissues of mice infected with chloroquine-resistant *Plasmodium berghei*". *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 61(2), 273-5.

Jakobsen, P. H., Bate, C. A., Taverne, J. & Playfair, J. H. (1995). "Malaria: toxins, cytokines and disease." *Parasite Immunol*, 17(5), 223-31.

- Joshi, M. B., Lin, D. T., Chiang, P. H., Goldman, N. D., Fujioka, H., Aikawa, M. & Syin, C. (1999). "Molecular cloning and nuclear localization of a histone deacetylase homologue in *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol*, 99(1), 11-9.
- Kalli, K. R., Hsu, P. H., Bartow, T. J., Ahearn, J. M., Matsumoto, A. K., Klickstein, L. B. & Fearon, D. T. (1991). "Mapping of the C3b-binding site of CR1 and construction of a (CR1)₂-F(ab')₂ chimeric complement inhibitor." *J Exp Med*, 174(6), 1451-60.
- Kalmar, E. M. N., Cassetari, V., Machado, F. R., Alencar, F. E. C., Kirchgatter, K., Boulos, M. & Tapajós, R. (1998). "Malária grave em paciente com infecção por *Plasmodium vivax*: relato de caso." *Rev Soc Bras Med Trop*, 31(supl I), 56.
- Kaul, D. K., Roth, E. F., Jr., Nagel, R. L., Howard, R. J. & Handunnetti, S. M. (1991). "Rosetting of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells with uninfected red blood cells enhances microvascular obstruction under flow conditions." *Blood*, 78(3), 812-9.
- Klickstein, L. B., Bartow, T. J., Miletic, V., Rabson, L. D., Smith, J. A. & Fearon, D. T. (1988). "Identification of distinct C3b and C4b recognition sites in the human C3b/C4b receptor (CR1, CD35) by deletion mutagenesis." *J Exp Med*, 168(5), 1699-717.
- Krych, M., Hourcade, D. & Atkinson, J. P. (1991). "Sites within the complement C3b/C4b receptor important for the specificity of ligand binding." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(10), 4353-7.
- Kun, J. F., Schmidt-Ott, R. J., Lehman, L. G., Lell, B., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P. & Kremsner, P. G. (1998). "Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambarene, Gabon." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92(1), 110-4.
- Kwiatkowski, D. (1990). "Tumour necrosis factor, fever and fatality in *falciparum* malaria." *Immunol Lett*, 25(1-3), 213-6.
- Kwiatkowski, D., Molyneux, M. E., Stephens, S., Curtis, N., Klein, N., Pointaire, P., Smit, M., Allan, R., Brewster, D. R., Grau, G. E. e cols. (1993). "Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria." *Q J Med*, 86(2), 91-8.
- Kyes, S. A., Rowe, J. A., Kriek, N. & Newbold, C. I. (1999). "Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16), 9333-8.
- Kyes, S., Horrocks, P. & Newbold, C. (2001). "Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria." *Annu Rev Microbiol*, 55, 673-707.
- Kyes, S., Pinches, R. & Newbold, C. (2000). "A simple RNA analysis method shows *var* and *rif* multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol*, 105(2), 311-5.
- Kyes, S., Taylor, H., Craig, A., Marsh, K. & Newbold, C. (1997). "Genomic representation of *var* gene sequences in *Plasmodium falciparum* field isolates from different geographic regions." *Mol Biochem Parasitol*, 87(2), 235-8.
- Lalloo, D. G., Trevett, A. J., Paul, M., Korinhona, A., Laurenson, I. F., Mapao, J., Nwokolo, N., Danga-Christian, B., Black, J., Saweri, A., Naraqi, S. & Warrell, D. A. (1996). "Severe and complicated *falciparum* malaria in Melanesian adults in Papua New Guinea." *Am J Trop Med Hyg*, 55(2), 119-24.
- Langreth, S. G. & Reese, R. T. (1979). "Antigenicity of the infected-erythrocyte and merozoite surfaces in *falciparum* malaria." *J Exp Med*, 150(5), 1241-54.
- Leech, J. H., Barnwell, J. W., Miller, L. H. & Howard, R. J. (1984). "Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." *J Exp Med*, 159(6), 1567-75.
- Limpaiboon, T., Taylor, D. W., Jones, G., Geysen, H. M. & Saul, A. (1990). "Characterization of a *Plasmodium falciparum* epitope recognized by a monoclonal antibody with broad isolate and species specificity." *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 21(3), 388-96.
- Lowe, B. S., Mosobo, M. & Bull, P. C. (1998). "All four species of human malaria parasites form

rosettes." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92(5), 526.

Luse, S. A. & Miller, L. H. (1971). "*Plasmodium falciparum* malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels." *Am J Trop Med Hyg*, 20(5), 655-60.

Luxemburger, C., Thwai, K. L., White, N. J., Webster, H. K., Kyle, D. E., Maelankirri, L., Chongsuphajaisiddhi, T. & Nosten, F. (1996). "The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90(2), 105-11.

MacPherson, G. G., Warrell, M. J., White, N. J., Looareesuwan, S. & Warrell, D. A. (1985). "Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration." *Am J Pathol*, 119(3), 385-401.

Marsh, K. & Howard, R. J. (1986). "Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: expression of diverse and conserved determinants." *Science*, 231(4734), 150-3.

Marsh, K., Marsh, V. M., Brown, J., Whittle, H. C. & Greenwood, B. M. (1988). "*Plasmodium falciparum*: the behavior of clinical isolates in an *in vitro* model of infected red blood cell sequestration." *Exp Parasitol*, 65(2), 202-8.

Marsh, K., Otoo, L., Hayes, R. J., Carson, D. C. & Greenwood, B. M. (1989). "Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 83(3), 293-303.

May, J., Lell, B., Luty, A. J., Meyer, C. G. & Kremsner, P. G. (2000). "Plasma interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications." *J Infect Dis*, 182(5), 1570-3.

McCormick, C. J., Craig, A., Roberts, D., Newbold, C. I. & Berendt, A. R. (1997). "Intercellular adhesion molecule-1 and CD36 synergize to mediate adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to cultured human microvascular endothelial cells." *J Clin Invest*, 100(10), 2521-9.

McLean, S. A., Pearson, C. D. & Phillips, R. S. (1982). "*Plasmodium chabaudi*: antigenic variation during recrudescence parasitaemias in mice." *Exp Parasitol*, 54(3), 296-302.

Mendis, K. N., Ihalamulla, R. I. & David, P. H. (1988). "Diversity of *Plasmodium vivax*-induced antigens on the surface of infected human erythrocytes." *Am J Trop Med Hyg*, 38(1), 42-6.

Metzger, W. G., Mordmuller, B. G. & Kremsner, P. G. (1995). "Malaria pigment in leucocytes." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89(6), 637-8.

Miller, L. H. (1969). "Distribution of mature trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum* in the organs of *Aotus trivirgatus*, the night monkey." *Am J Trop Med Hyg*, 18(6), 860-5.

Miller, L. H., Good, M. F. & Milon, G. (1994). "Malaria pathogenesis." *Science*, 264(5167), 1878-83.

Mota, M. M., Pradel, G., Vanderberg, J. P., Hafalla, J. C., Frevert, U., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V. & Rodriguez, A. (2001). "Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection." *Science*, 291(5501), 141-4.

Newbold, C. I. (1999). "Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: mechanisms and consequences." *Curr Opin Microbiol*, 2(4), 420-5.

Newbold, C. I., Craig, A. G., Kyes, S., Berendt, A. R., Snow, R. W., Peshu, N. & Marsh, K. (1997a). "PfEMP1, polymorphism and pathogenesis." *Ann Trop Med Parasitol*, 91(5), 551-7.

Newbold, C. I., Pinches, R., Roberts, D. J. & Marsh, K. (1992). "*Plasmodium falciparum*: the human agglutinating antibody response to the infected red cell surface is predominantly variant specific." *Exp Parasitol*, 75(3), 281-92.

Newbold, C., Warn, P., Black, G., Berendt, A., Craig, A., Snow, B., Msobo, M., Peshu, N. & Marsh, K. (1997b). "Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*." *Am J Trop Med Hyg*, 57(4), 389-98.

Nguyen, P. H., Day, N., Pram, T. D., Ferguson, D. J. & White, N. J. (1995). "Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89(2), 200-4.

Nogueira, P. A. (2000). "Repertório de genes *var* expressos e propriedades de citoaderência aos

receptores de células endoteliais de isolados de "*Plasmodium falciparum*" da região de Rondônia," Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Noviyanti, R., Brown, G. V., Wickham, M. E., Duffy, M. F., Cowman, A. F. & Reeder, J. C. (2001). "Multiple *var* gene transcripts are expressed in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes selected for adhesion." *Mol Biochem Parasitol*, 114(2), 227-37.

Nylen, E. S., Whang, K. T., Snider, R. H., Jr., Steinwald, P. M., White, J. C. & Becker, K. L. (1998). "Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis." *Crit Care Med*, 26(6), 1001-6.

Oberhoffer, M., Stonans, I., Russwurm, S., Stonane, E., Vogelsang, H., Junker, U., Jager, L. & Reinhart, K. (1999). "Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines *in vitro*." *J Lab Clin Med*, 134(1), 49-55.

Ockenhouse, C. F., Klotz, F. W., Tandon, N. N. & Jamieson, G. A. (1991). "Sequestrin, a CD36 recognition protein on *Plasmodium falciparum* malaria- infected erythrocytes identified by anti-idiotypic antibodies." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(8), 3175-9.

Ockenhouse, C. F., Tegoshi, T., Maeno, Y., Benjamin, C., Ho, M., Kan, K. E., Thway, Y., Win, K., Aikawa, M. & Lobb, R. R. (1992). "Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1." *J Exp Med*, 176(4), 1183-9.

Odeh, M. (2001). "The role of tumour necrosis factor-alpha in the pathogenesis of complicated *falciparum* malaria." *Cytokine*, 14(1), 11-8.

Oh, S. S., Voigt, S., Fisher, D., Yi, S. J., LeRoy, P. J., Derick, L. H., Liu, S. & Chishti, A. H. (2000). "*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is anchored to the actin-spectrin junction and knob-associated histidine-rich protein in the erythrocyte skeleton." *Mol Biochem Parasitol*, 108(2), 237-47.

Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J. & Seed, B. (1989). "CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes." *Cell*, 58(1), 95-101.

Pasvol, G., Wilson, R. J., Smalley, M. E. & Brown, J. (1978). "Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood." *Ann Trop Med Parasitol*, 72(1), 87-8.

Patnaik, J. K., Das, B. S., Mishra, S. K., Mohanty, S., Satpathy, S. K. & Mohanty, D. (1994). "Vascular clogging, mononuclear cell margination, and enhanced vascular permeability in the pathogenesis of human cerebral malaria." *Am J Trop Med Hyg*, 51(5), 642-7.

Pichyangkul, S., Saengkrai, P. & Webster, H. K. (1994). "*Plasmodium falciparum* pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta." *Am J Trop Med Hyg*, 51(4), 430-5.

Pichyangkul, S., Saengkrai, P., Yongvanitchit, K., Stewart, A. & Heppner, D. G. (1997). "Activation of gamma delta T cells in malaria: interaction of cytokines and a schizont-associated *Plasmodium falciparum* antigen." *J Infect Dis*, 176(1), 233-41.

Pongponratn, E., Riganti, M., Punpoowong, B. & Aikawa, M. (1991). "Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human *falciparum* malaria: a pathological study." *Am J Trop Med Hyg*, 44(2), 168-75.

Posada, D. & Crandall, K. A. (1998). "MODELTEST: testing the model of DNA substitution." *Bioinformatics*, 14(9), 817-8.

Pouvelle, B., Buffet, P. A., Lepolard, C., Scherf, A. & Gysin, J. (2000). "Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum* ring-stage-infected erythrocytes." *Nat Med*, 6(11), 1264-8.

Reeder, J. C. & Brown, G. V. (1996). "Antigenic variation and immune evasion in *Plasmodium falciparum* malaria." *Immunol Cell Biol*, 74(6), 546-54.

Reeder, J. C., Cowman, A. F., Davern, K. M., Beeson, J. G., Thompson, J. K., Rogerson, S. J. & Brown, G. V. (1999). "The adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is

- mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(9), 5198-202.
- Reeder, J. C., Rogerson, S. J., al-Yaman, F., Anders, R. F., Coppel, R. L., Novakovic, S., Alpers, M. P. & Brown, G. V. (1994). "Diversity of agglutinating phenotype, cytoadherence, and rosette-forming characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates from Papua New Guinean children." *Am J Trop Med Hyg*, 51(1), 45-55.
- Ringwald, P., Peyron, F., Lepers, J. P., Rabarison, P., Rakotomalala, C., Razanamparany, M., Rabodonirina, M., Roux, J. & Le Bras, J. (1993). "Parasite virulence factors during *falciparum* malaria: rosetting, cytoadherence, and modulation of cytoadherence by cytokines." *Infect Immun*, 61(12), 5198-204.
- Roberts, D. D., Sherwood, J. A., Spitalnik, S. L., Panton, L. J., Howard, R. J., Dixit, V. M., Frazier, W. A., Miller, L. H. & Ginsburg, V. (1985). "Thrombospondin binds *falciparum* malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence." *Nature*, 318(6041), 64-6.
- Roberts, D. J., Craig, A. G., Berendt, A. R., Pinches, R., Nash, G., Marsh, K. & Newbold, C. I. (1992). "Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria." *Nature*, 357(6380), 689-92.
- Roberts, D. J., Pain, A., Kai, O., Kortok, M. & Marsh, K. (2000). "Autoagglutination of malaria-infected red blood cells and malaria severity." *Lancet*, 355(9213), 1427-8.
- Rogerson, S. J., Chaiyaroj, S. C., Ng, K., Reeder, J. C. & Brown, G. V. (1995). "Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." *J Exp Med*, 182(1), 15-20.
- Roodman, G. D., Bird, A., Hutzler, D. & Montgomery, W. (1987). "Tumor necrosis factor-alpha and hematopoietic progenitors: effects of tumor necrosis factor on the growth of erythroid progenitors CFU-E and BFU-E and the hematopoietic cell lines K562, HL60, and HEL cells." *Exp Hematol*, 15(9), 928-35.
- Rowe, A., Obeiro, J., Newbold, C. I. & Marsh, K. (1995). "*Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya." *Infect Immun*, 63(6), 2323-6.
- Rowe, J. A., Moulds, J. M., Newbold, C. I. & Miller, L. H. (1997). "*P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1." *Nature*, 388(6639), 292-5.
- Rowe, J. A., Rogerson, S. J., Raza, A., Moulds, J. M., Kazatchkine, M. D., Marsh, K., Newbold, C. I., Atkinson, J. P. & Miller, L. H. (2000). "Mapping of the Region of Complement Receptor (CR) 1 Required for *Plasmodium falciparum* Rosetting and Demonstration of the Importance of CR1 in Rosetting in Field Isolates." *J Immunol*, 165(11), 6341-6346.
- Rubio, J. P., Thompson, J. K. & Cowman, A. F. (1996). "The *var* genes of *Plasmodium falciparum* are located in the subtelomeric region of most chromosomes." *Embo J*, 15(15), 4069-77.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Mol Biol Evol*, 4(4), 406-25.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Saul, A. (1999). "The role of variant surface antigens on malaria-infected red blood cells." *Parasitol Today*, 15(11), 455-7.
- Scherf, A., Hernandez-Rivas, R., Buffet, P., Bottius, E., Benatar, C., Pouvelle, B., Gysin, J. & Lanzer, M. (1998). "Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of *var* genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*." *Embo J*, 17(18), 5418-26.
- Schofield, L. & Hackett, F. (1993). "Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites." *J Exp Med*, 177(1), 145-53.
- Scholander, C., Treutiger, C. J., Hultenby, K. & Wahlgren, M. (1996). "Novel fibrillar structure confers adhesive property to malaria-infected erythrocytes." *Nat Med*, 2(2), 204-8.

- Siano, J. P., Grady, K. K., Millet, P. & Wick, T. M. (1998). "Short report: *Plasmodium falciparum*: cytoadherence to alpha(v)beta3 on human microvascular endothelial cells." *Am J Trop Med Hyg*, 59(1), 77-9.
- Silamut, K., Phu, N. H., Whitty, C., Turner, G. D., Louwrier, K., Mai, N. T., Simpson, J. A., Hien, T. T. & White, N. J. (1999). "A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain." *Am J Pathol*, 155(2), 395-410.
- Sim, B. K., Chitnis, C. E., Wasniowska, K., Hadley, T. J. & Miller, L. H. (1994). "Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*." *Science*, 264(5167), 1941-4.
- Smith, J. D., Chitnis, C. E., Craig, A. G., Roberts, D. J., Hudson-Taylor, D. E., Peterson, D. S., Pinches, R., Newbold, C. I. & Miller, L. H. (1995). "Switches in expression of *Plasmodium falciparum var* genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes." *Cell*, 82(1), 101-10.
- Smith, J. D., Craig, A. G., Kriek, N., Hudson-Taylor, D., Kyes, S., Fagen, T., Pinches, R., Baruch, D. I., Newbold, C. I. & Miller, L. H. (2000a). "Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4), 1766-71.
- Smith, J. D., Gamain, B., Baruch, D. I. & Kyes, S. (2001). "Decoding the language of *var* genes and *Plasmodium falciparum* sequestration." *Trends in Parasitology*, 17(11), 538-45.
- Smith, J. D., Kyes, S., Craig, A. G., Fagan, T., Hudson-Taylor, D., Miller, L. H., Baruch, D. I. & Newbold, C. I. (1998). "Analysis of adhesive domains from the A4VAR *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 identifies a CD36 binding domain." *Mol Biochem Parasitol*, 97(1-2), 133-48.
- Smith, J. D., Subramanian, G., Gamain, B., Baruch, D. I. & Miller, L. H. (2000b). "Classification of adhesive domains in the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family." *Mol Biochem Parasitol*, 110(2), 293-310.
- Smith, L.P., Hunter, K.W., Oldfield, E.C. & Strickland, G.T. (1982) "Murine malaria: blood clearance and organ sequestration of *Plasmodium yoelii*-infected erythrocytes". *Infect Immun*, 38(1), 162-7.
- Snow, R. W., Omumbo, J. A., Lowe, B., Molyneux, C. S., Obiero, J. O., Palmer, A., Weber, M. W., Pinder, M., Nahlen, B., Obonyo, C., Newbold, C., Gupta, S. & Marsh, K. (1997). "Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa." *Lancet*, 349(9066), 1650-4.
- Staalso, T., Khalil, E. A., Elhassan, I. M., Zijlstra, E. E., Elhassan, A. M., Giha, H. A., Theander, T. G. & Jakobsen, P. H. (1998). "Antibody reactivity to conserved linear epitopes of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1)." *Immunol Lett*, 60(2-3), 121-6.
- Strimmer, K. & von Haeseler, A. (1996). "Quartet Puzzling: A Quartet Maximum-Likelihood Method for Reconstructing Tree Topologies." *Mol Biol Evol*, 13(7), 964-9.
- Su, X. Z., Heatwole, V. M., Wertheimer, S. P., Guinet, F., Herrfeldt, J. A., Peterson, D. S., Ravetch, J. A. & Wellems, T. E. (1995). "The large diverse gene family *var* encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." *Cell*, 82(1), 89-100.
- Swofford, D. L. (1998). "PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)." , Sunderland, Massachusetts.
- Taylor, H. M., Kyes, S. A., Harris, D., Kriek, N. & Newbold, C. I. (2000). "A study of *var* gene transcription *in vitro* using universal *var* gene primers." *Mol Biochem Parasitol*, 105(1), 13-23.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Res*, 25(24), 4876-82.
- Thompson, J. K., Rubio, J. P., Caruana, S., Brockman, A., Wickham, M. E. & Cowman, A. F. (1997). "The chromosomal organization of the *Plasmodium falciparum var* gene family is conserved." *Mol Biochem Parasitol*, 87(1), 49-60.

- Trager, W. & Jensen, J. B. (1976). "Human malaria parasites in continuous culture." *Science*, 193(4254), 673-5.
- Tran, T. H., Day, N. P., Nguyen, H. P., Nguyen, T. H., Pham, P. L., Dinh, X. S., Ly, V. C., Ha, V., Waller, D., Peto, T. E. & White, N. J. (1996). "A controlled trial of artemether or quinine in Vietnamese adults with severe *falciparum* malaria." *N Engl J Med*, 335(2), 76-83.
- Traore, B., Muanza, K., Looareesuwan, S., Supavej, S., Khusmith, S., Danis, M., Viriyavejakul, P. & Gay, F. (2000). "Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates in Thailand using an *in vitro* human lung endothelial cells model." *Am J Trop Med Hyg*, 62(1), 38-44.
- Trenholme, K. R., Gardiner, D. L., Holt, D. C., Thomas, E. A., Cowman, A. F. & Kemp, D. J. (2000). "clag9: A cytoadherence gene in *Plasmodium falciparum* essential for binding of parasitized erythrocytes to CD36." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8), 4029-33.
- Treutiger, C. J., Heddini, A., Fernandez, V., Muller, W. A. & Wahlgren, M. (1997). "PECAM-1/CD31, an endothelial receptor for binding *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." *Nat Med*, 3(12), 1405-8.
- Treutiger, C. J., Hedlund, I., Helmbj, H., Carlson, J., Jepson, A., Twumasi, P., Kwiatkowski, D., Greenwood, B. M. & Wahlgren, M. (1992). "Rosette formation in *Plasmodium falciparum* isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria." *Am J Trop Med Hyg*, 46(5), 503-10.
- Treutiger, C. J., Scholander, C., Carlson, J., McAdam, K. P., Raynes, J. G., Falksveden, L. & Wahlgren, M. (1999). "Rouleaux-forming serum proteins are involved in the rosetting of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." *Exp Parasitol*, 93(4), 215-24.
- Udeinya, I. J., Miller, L. H., McGregor, I. A. & Jensen, J. B. (1983). "*Plasmodium falciparum* strain-specific antibody blocks binding of infected erythrocytes to amelanotic melanoma cells." *Nature*, 303(5916), 429-31.
- Udomsangpetch, R., Brown, A. E., Smith, C. D. & Webster, H. K. (1991). "Rosette formation by *Plasmodium coatneyi*-infected red blood cells." *Am J Trop Med Hyg*, 44(4), 399-401.
- Udomsangpetch, R., Chivapat, S., Viriyavejakul, P., Riganti, M., Wilairatana, P., Pongponratin, E. & Looareesuwan, S. (1997). "Involvement of cytokines in the histopathology of cerebral malaria." *Am J Trop Med Hyg*, 57(5), 501-6.
- Udomsangpetch, R., Thanikkul, K., Pukrittayakamee, S. & White, N. J. (1995). "Rosette formation by *Plasmodium vivax*." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89(6), 635-7.
- van Hensbroek, M. B., Palmer, A., Onyiorah, E., Schneider, G., Jaffar, S., Dolan, G., Memming, H., Frenkel, J., Enwere, G., Bennett, S., Kwiatkowski, D. & Greenwood, B. (1996). "The effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor on survival from childhood cerebral malaria." *J Infect Dis*, 174(5), 1091-7.
- Voss, T. S., Thompson, J. K., Waterkeyn, J., Felger, I., Weiss, N., Cowman, A. F. & Beck, H. P. (2000). "Genomic distribution and functional characterisation of two distinct and conserved *Plasmodium falciparum* var gene 5' flanking sequences." *Mol Biochem Parasitol*, 107(1), 103-15.
- Wahlgren, M., Abrams, J. S., Fernandez, V., Bejarano, M. T., Azuma, M., Torii, M., Aikawa, M. & Howard, R. J. (1995). "Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells and secretion of cytokines (IL-1-beta, IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-10, TGF beta, TNF alpha, G-CSF, GM-CSF." *Scand J Immunol*, 42(6), 626-36.
- Wahlgren, M., Carlson, J., Helmbj, H., Hedlund, I. & Treutiger, C. J. (1992). "Molecular mechanisms and biological importance of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting." *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87(Suppl 3), 323-9.
- Wahlgren, M., Carlson, J., Ruangjirachuporn, W., Conway, D., Helmbj, H., Martinez, A., Patarroyo, M. E. & Riley, E. (1990). "Geographical distribution of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting and frequency of rosetting antibodies in human sera." *Am J Trop Med Hyg*, 43(4), 333-8.
- Wahlgren, M., Fernandez, V., Scholander, C. & Carlson, J. (1994). "Rosetting." *Parasitology Today*, 10(2), 73-9.

- Ward, C. P., Clotey, G. T., Dorris, M., Ji, D. D. & Arnot, D. E. (1999). "Analysis of *Plasmodium falciparum* PfEMP-1/*var* genes suggests that recombination rearranges constrained sequences." *Mol Biochem Parasitol*, 102(1), 167-77.
- Warrell, D. A. (1987). "Pathophysiology of severe *falciparum* malaria in man." *Parasitology*, 94(Suppl), S53-76.
- Weber, J. L. (1988). "Interspersed repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol*, 29(2-3), 117-24.
- Whang, K. T., Vath, S. D., Becker, K. L., Snider, R. H., Nylen, E. S., Muller, B., Li, Q., Tamarkin, L. & White, J. C. (1999). "Procalcitonin and proinflammatory cytokine in interactions in sepsis." *Shock*, 12(4), 268-73.
- White, N. J. & Ho, M. (1992). "The pathophysiology of malaria." *Adv Parasitol*, 31, 83-173.
- WHO. (1990). "Severe and complicated malaria. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84(Suppl 2), 1-65.
- WHO. (1996). "World malaria situation in 1993." *Wkly Epidemiol Rec*, 71(3), 17-22.
- WHO. (1997). "World malaria situation in 1994. Part I-III." *Wkly Epidemiol Rec*, 72(36-38), 269-90.
- WHO. (2000). "Severe *falciparum* malaria." *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94(supplement 1), 1-90.
- Wooden, J., Gould, E. E., Paull, A. T. & Sibley, C. H. (1992). "*Plasmodium falciparum*: a simple polymerase chain reaction method for differentiating strains." *Exp Parasitol*, 75(2), 207-12.

RESEARCH BRIEF

Plasmodium falciparum: DBL-1 Var Sequence Analysis in Field Isolates from Central Brazil¹

Karin Kirchgatter,*† Raphael Mosbach,‡ and Hernando A. del Portillo*,²

*Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Prof. Lineu Prestes 1374, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil; †Laboratório de Malária, Divisão de Programas Especiais, Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), Cardeal Arcoverde 2878, São Paulo, SP, 05408-003, Brazil; and ‡Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg, D-69120 Heidelberg, INF 282, Germany

Kirchgatter, K., Mosbach, R., and del Portillo, H. A. 2000. *Plasmodium falciparum*: DBL-1 Var sequence analysis in field isolates from Central Brazil. *Experimental Parasitology* 95, 154–157. © 2000 Academic Press

The Brazilian Amazon region is responsible for approximately 99% of all malaria cases in Brazil which last year accounted for ca. 400,000, of which 23% were due to *Plasmodium falciparum* (Brasil, 1999). Significantly, aside from a very few isolated cases, severe malaria in this endemic region rarely leads to cerebral malaria as opposed to other complications such as renal failure and lung edema (Boulos 1992; Duarte *et al.* 1985).

The *P. falciparum* var gene family encodes predicted 200- to 300-kDa proteins with two different exons: a conserved transmembrane C-terminus and a highly polymorphic N-terminus displaying variant numbers of Duffy binding-like (DBL) domains (Su *et al.* 1995; Baruch *et al.* 1995; Smith *et al.* 1995). Expression of var genes on the surface of infected erythrocytes is directly associated with the phenomena of antigenic variation and cytoadherence to postcapillary venules and both phenomena are responsible for much of the pathophysiology of falciparum malaria (rev. in Newbold 1999). The most N-terminal DBL

domain (DBL-1) is becoming the target of several molecular epidemiological studies since degenerate primers are capable of amplifying different sequences from laboratory clones and wild isolates (Kyes *et al.* 1997; Ward *et al.* 1999; Taylor *et al.* 2000). Accordingly we have initiated studies to generate a DBL-1 var sequence bank from *P. falciparum* isolates of the Brazilian Amazon region for future expression studies.

Our first study site is a municipality of the State of Mato Grosso (MT) in the southern part of the Amazon region called Peixoto de Azevedo. In the past few years this region has witnessed a significant decrease in human population mainly due to the migration of gold miners to neighboring states. Currently, there are approximately 27,000 people and 400 diagnosed malaria cases yearly of which 35% are due to *P. falciparum* (Brasil 1999). Although epidemiological data on infected bites/person from this particular Amazon region are not available, it can clearly be considered a hypoendemic area.

Blood stage parasites were obtained, after informed consent, from 20 adult infected males (≥ 18 years) (MT01-20) before treatment administration. Total genomic DNA was extracted as described elsewhere (Ferreira *et al.* 1998) and used as a template in PCR reactions to amplify the 5'-end of the *P. falciparum* var DBL-1. Primers and conditions were as in Kyes *et al.* (1997). As expected, a fragment of around 200 bp was amplified from each isolate and the possibility of this result being due to carrying-over contamination was excluded by performing negative controls from each isolate in parallel (not shown). The PCR fragments were cloned and miniprepations of plasmid DNA were sequenced using the ALFexpress AutoRead sequencing kit in an ALF Express DNA sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Two hundred sequences (10 from each isolate) corresponding to the N-terminal 70 amino acids of the DBL-1 domain from the var-1 type

¹The sequence data reported herein have been submitted to GenBank and assigned the Accession Numbers AF172771–AF172814.

²To whom correspondence should be addressed. Fax: (55-11) 3818.7417. E-mail: hesporti@lineu.ich.usp.br.

sequence (Su *et al.* 1995) were generated and confirmed to represent *var* sequences by BLAST tool version 2.0 (Altschul *et al.* 1997).

The deduced amino acid sequences revealed 44 different sequences (GenBank Accession Numbers AF172771–AF172814) displaying the same conserved structural framework of the DBL-1 domain described in other isolates and clones (Fig. 1A). Thus, the cysteine residues were conserved in all isolates with the exception of isolates MT11C06 and

MT12C04 in which two other residues were observed (C27→F and C27→S), respectively. Moreover, eight other residues were totally conserved among the 44 sequences: L22, L23, V26, A29, A30, E33, T61, and L63, and these same amino acids, including the cysteine residues, were highly conserved when an alignment with most available sequences in GenBank was performed (<http://www.zmbh.uni-heidelberg.de/edv/h.delporillo>). Percentage of identity analysis revealed that

FIG. 1. A. Comparison of 44 *var* DBL-1 amino acid sequences from the Brazilian Amazon state of Mato Grosso (MT). Alignments were made using Clustalw version 1.8 with blosum matrices and some editing manually (Higgins *et al.* 1996). The residues that match the consensus exactly are shaded with solid black. B. Schematic distribution of sequences recorded in each patient is represented by dark bars.

there are Brazilian sequences with closer similarities among isolates from other geographical regions than among them. In fact, one particular sequence, MT12C04, was identical at the amino acid and nucleotide levels to the sequence van4b (GenBank Z94733) from Vanuatu whereas two Brazilian *var* sequences, MT01C10 and MT01C14, were only 34% identical (not shown).

Dendograms generated from all sequences demonstrated that the DBL-1 *var* sequences from the Mato Grosso state did not cluster to each other more frequently than they did with sequences obtained from isolates of other geographical regions or laboratory clones (<http://www.zmbh.uni-heidelberg.de/edv/h.delporillo>). Similar results were recorded upon generation of other dendograms using various algorithms and regions of DBL-1 in searching for sequence similarities that could indicate their Brazilian geographical origin (not shown). Together, these results further confirm and expand the observations of Kyes *et al.* (1997) and Ward *et al.* (1999), that is, DBL-1 *var* sequences are not more closely related to any particular sequence than they are to any other and therefore *var* gene sequence similarity cannot predict geographical origin.

The genomic DNA used for amplification in this study was obtained from frozen peripheral blood samples and never underwent *in vitro* selection. Three to nine different sequences were detected from each individual patient and none of the patients examined harbored all of the same sequences (Fig. 1B). Yet, even if the number of circulating clones/isolate were 1, it would have been expected to find more DBL-1 sequences than observed. Indeed, of 10 sequences from each of 20 MT isolates, we were only able to determine 44 different amino acid sequences. This is in contrast to 37 different sequences amplified from this same domain from five Sudanese patients (Ward *et al.* 1999); this gives an average of 7.4 different sequences/patient in Sudan as opposed to 2.2/patient in Brazil. These results clearly indicate that this set of primers is of limited specificity and suggest that lower numbers of circulating clones per individual patient are present in Mato Grosso as opposed to Sudan. A new set of PCR primers capable of amplifying the majority of *var* genes in laboratory clones (Taylor *et al.* 2000) is now being tested in these same isolates to establish new DBL-1 sequences from this Amazon region.

This is the first report on DBL-1 *var* sequences of *P. falciparum* from Brazilian field isolates obtained directly from patients. DBL domains were originally described in other malarial proteins such as the Duffy binding protein of *P. vivax* and shown to bind the Duffy blood-group determinant in heterologous transfection assays (Chitnis and Miller 1994). Similar assays are now being used to demonstrate that the DBL domains from the PfEMP1 proteins are also capable of binding to different endothelial receptors (Rowe *et al.* 1997; Chen *et al.* 1998; Buffet *et al.* 1999; Smith *et al.* 2000). In turn, this differential binding specificity leads to sequestration in various organs. Worldwide DBL-1 genomic DNA sequence information is rapidly being accumulated (GenBank, Kyes *et al.* 1997; Ward *et al.* 1999; Taylor *et al.* 2000, these data) to determine whether there are particular DBL-1 sequences preferentially expressed in the different pathologies of severe falciparum malaria.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all of the malaria patients who participated in this study, to the anonymous reviewers of the manuscript for helpful

comments, and to Alister Craig for scientific discussions throughout this project. This project was Supported by the INCO-DC Programme (IC 18CT980364).

REFERENCES

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389–3402.
- Baruch, D. I., Pasloske, B. L., Singh, H. B., Bi, X., Ma, X. C., Feldman, M., Taraschi, T. F., and Howard, R. J. 1995. Cloning of the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 82, 77–87.
- Boulos, M. 1992. Tratamento da malária grave. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 25, S41–S42.
- Brasil. 1999. Dados Epidemiológicos de Malária. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Gerência Técnica de Malária, Brasília.
- Buffet, P. A., Gansain, B., Scheidig, C., Baruch, D., Smith, J. D., Hernandez-Rivas, R., Pouvelle, B., Oishi, S., Fujii, N., Fusai, T., Parzy, D., Miller, L. H., Gysin, J., and Scherf, A. 1999. *Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: A receptor for human placental infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96, 12743–12748.
- Chen, Q., Fernandez, V., Sundström, A., Schlichtherle, M., Datta, S., Hagblom, P., and Wahlgren, M. 1998. Developmental selection of *var* gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 394, 392–395.
- Chitnis, C. E., and Miller, L. H. 1994. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *Journal of Experimental Medicine* 180, 497–506.
- Duarte, M. I. S., Corbett, C. E. P., Boulos, M., and Amato Neto, V. 1985. Ultrastructure of the lung in falciparum malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34, 31–35.
- Ferreira, M. U., Liu, Q., Kaneko, O., Kimura, M., Tanabe, K., Kimura, E. A. S., Katzin, A. M., Isomura, S., and Kawamoto, F. 1998. Allelic diversity at the merozoite surface protein 1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the southwestern Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59, 474–480.
- Higgins, D. G., Thompson, J. D., and Gibson, T. J. 1996. Using CLUSTAL for multiple sequence alignment. *Methods in Enzymology* 266, 383–402.
- Kyes, S., Taylor, H., Craig, A., Marsh, K., and Newbold, C. 1997. Genomic representation of *var* gene sequences in *Plasmodium falciparum* field isolates from different geographic regions. *Molecular and Biochemical Parasitology* 87, 235–238.
- Newbold, C. I. 1999. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: Mechanisms and consequences. *Current Opinion in Microbiology* 2, 420–425.

- Rowe, J. A., Moulds, J. M., Newbold, C. I., and Miller, L. H. 1997. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature* **388**, 292–295.
- Smith, J. D., Chitnis, C. E., Craig, A. G., Roberts, D. J., Hudson-Taylor, D. E., Peterson, D. S., Pinches, R., Newbold, C. I., and Miller, L. H. 1995. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* **82**, 101–110.
- Smith, J. D., Craig, A. G., Krick, N., Hudson-Taylor, D., Kyes, S., Fagen, T., Pinches, R., Baruch, D. I., Newbold, C. I., and Miller, L. H. 2000. Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: A parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 1766–1771.
- Su, X., Heatwole, V. M., Wertheimer, S. P., Guinet, F., Herrfeldt, J. A., Peterson, D. S., Ravetch, J. A., and Wellems, T. E. 1995. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* **82**, 89–100.
- Taylor, H. M., Kyes, S. A., Harris, D., Krick, N., and Newbold, C. I. 2000. A study of var gene transcription *in vitro* using universal var gene primers. *Molecular and Biochemical Parasitology* **105**, 13–23.
- Ward, C. P., Clotey, G. T., Dorris, M., Ji, D., and Arnot, D. E. 1999. Analysis of *Plasmodium falciparum* PfEMP-1/var genes suggests that recombination rearranges constrained sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* **102**, 167–177.

Received 27 December 1999; accepted with revision 18 April 2000

Association of severe non-cerebral *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil with expressed PfEMP1 DBL1α sequences lacking cysteine residues

Karin Kirchgatter^{1,2} and Hernando A. del Portillo¹

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo and ²Núcleo de Estudos em Malária, Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), São Paulo-SP, Brazil

Abstract

Background: Cytoadherence and rosetting contribute to the development of severe *Plasmodium falciparum* malaria. In Brazil, severe falciparum malaria is mostly associated with renal or pulmonary complications and very rarely with cerebral malaria. The most N-terminal DBL1α domain of PfEMP1, a protein encoded by the *var* multigene family mediates rosetting. We analyzed parasites of Brazilian patients with severe malaria to determine whether there were particular DBL1α *var* sequences predominantly expressed in such patients.

Materials and Methods: DBL1α *var* sequences were obtained from parasites of Brazilian patients with severe and mild malaria and analyzed through standard bioinformatic programs. 320 *var* DBL1α sequences obtained from 80 Brazilian patients with mild malaria were spotted in high-density filters and hybridized to probes representing

predominantly expressed sequences in parasites from patients with severe malaria. A DBL1α domain was expressed in bacteria and used to demonstrate its binding capacity to erythrocytes by immunofluorescence.

Results: Forty-three different and unreported DBL1α amino acid sequences were obtained. Sequences predominantly expressed in patients with severe malaria could be sub-grouped due to deletions of 1-2-cysteine residues. These sequences were commonly found in the *var* gene repertoire of parasites from patients with mild malaria and yet they were rarely expressed in these patients. A recombinant protein representing the most abundantly expressed sequence detected in one patient with severe malaria bound directly to uninfected erythrocytes.

Conclusion: This is the first report showing an association of severe non-cerebral malaria from Brazil with particular DBL1α sequences.

Introduction

Plasmodium falciparum is the most virulent and devastating human malarial parasite and responsible for approximately 300 million annual clinical cases and 1 million deaths mostly in children below five years old. Falciparum infections are characterized by removal from the peripheral circulation of red blood cells infected with mature parasites. This sequestration occurs by adhesion of infected erythrocytes to host receptors in the microvasculature of several organs. This phenotype, termed cytoadherence, cause retention and accumulation of infected erythrocytes leading to occlusion of microvessels and acute pathologic changes associated with severe malaria (1).

Cytoadherence is conferred by the *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), encoded by a multigene family termed *var* which has a two exon structure: a conserved acidic cytoplasmic tail (ATS) and a highly polymorphic N-terminus displaying variant numbers of Duffy binding like (DBL) domains (2). It is within the highly polymorphic N-terminus that several ligands for different endothelial receptors have been mapped (rev. in 3).

In addition to cytoadherence, it is now widely accepted that the adhesion of infected erythrocytes to uninfected erythrocytes, a phenomenon called rosetting, further contributes to the pathology associated with falciparum infections (4). Indeed, rosetting has been associated with severe malaria since it is common in parasites from patients with malaria complications in many field studies (5,6,7,8,9,10,11). Moreover, several lines of

Address correspondence and reprint requests to: H.A. del Portillo, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes 1374, São Paulo-SP, 05508-900 Brazil. Phone: +55-11-3818-7209; Fax: +55-11-3818-7417; E-mail: hernando@icb.usp.br

evidence have demonstrated that the most N-terminal DBL1 α of PfEMP1 mediates rosetting (12,13,14,15). Thus, PfEMP1 plays a major role in cytoadherence and rosetting and both phenomena are directly associated to severe falciparum malaria.

Severe falciparum malaria is a complex of different clinical manifestations leading mainly to cerebral, renal and pulmonary dysfunction. In many parts of the world, cerebral dysfunction is the more common severe manifestation causing death in 4-50% of the adults with severe malaria (16). In other regions such as Brazil however, severe falciparum malaria is mostly associated with renal and pulmonary complications and very rarely with cerebral malaria (17,18,19). Interestingly, a recent report has associated severe malaria in patients from French Guyana and particular *var* DBL δ sequences indicating that isolates from individuals with different clinical syndromes could be characterized by particular PfEMP1 repertoires (20). Only one study is presently available on DBL1 α genomic sequences from Brazilian isolates (21). Here, we analyzed expressed *var* DBL1 α sequences of parasites obtained from patients with severe malaria in the Brazilian Amazon to determine whether there were particular DBL1 α sequences predominantly expressed in such patients.

Materials and Methods

Patients with Severe Malaria and P. falciparum samples

We investigated six patients diagnosed and treated between 1987 and 2000 in different Hospitals in the capital city of São Paulo, Brazil (Table 1).

All these patients were classified with severe falciparum malaria according to WHO parameters (16). Procalcitonin (PCT) serum levels, recently implicated as a new parameter to diagnose malaria severity (22), were determined using an immunochromatographic test (Brahms PCT-Q kit). After informed consent from all of them, blood samples were obtained and stored in liquid nitrogen. All patients had parasitemias >2% of *P. falciparum* ring forms in the peripheral circulation and half presented peripheral schizonts further supporting the severity of their infections. Other laboratory data from these patients are reported in Table 2.

Patients with Mild Malaria and P. falciparum samples

Eighty patients (20 from each different region as below) with mild malaria were also included in this study. Samples were collected through different years and from different regions of the Brazilian Amazon: Mato Grosso (1997), Pará (1987-1997), Rondônia (1997) and Acre (1999). In addition, isolates NG1 to NG4 obtained from four patients were used to determine expressed *var* DBL1 α sequences (Table 1). Blood samples were collected and stored as above.

In vitro culture and purification of mature parasites

Parasites were cultured *in vitro* (23) and parasite growth monitored by Giemsa staining of thin and thick blood films. Parasites obtained from blood of patients with severe malaria were matured for one cycle to trophozoites and schizonts whereas those from patients with mild malaria, with lower parasitemias (Table 1), were maintained in culture for up to three cycles. Mature parasites

Table 1. Isolates from severe and mild falciparum malaria, epidemiological data, parasitaemia and PCT concentrations.

	Isolate	Brazilian State of Origin	Previous Malaria Attacks	Days between symptoms and treatment	Parasitaemia	Serum Concentration Range of PCT (ng/ml)
severe	G33	Rondônia	0	5	>2%**	≥ 2
	G23	Rondônia	0	5	>2%	≥ 0.5
	G34	Pará	1	10	>2%**	Not determined
	G2	Mato Grosso	0	14	>2%	≥ 2
	G29	Rondônia	0	9	>2%**	Not determined
	G3	Mato Grosso	3	3	>2%	≥ 2
mild	NG1	Rondônia	1	4	0.9%	< 0.5
	NG2*	Mato Grosso	4	Not determined	0.5%	< 0.5
	NG3	Mato Grosso	4	Not determined	0.4%	< 0.5
	NG4	Mato Grosso	2	6	1%	≥ 2

*Recrudescence of G3; ** With peripheral schizontaemia; PCT, procalcitonin

Table 2. Laboratory data of the severe malaria patients upon Hospital admission.

Isolate / Age (yrs) / Sex	G33 / 20 / ♂	G23 / 18 / ♀	G34 / 45 / ♂	G2 / 37 / ♀*	G29 / 41 / ♂	G3 / 18 / ♂
Admitted - discharged (dd/mm/yy)	03 - 10/11/87	22 - 29/06/87	17 - 25/08/89	13/01/93 - 03/02/93	20 - 28/09/88	20 - 27/02/92
pH (7.35-7.45)	7.361				7.343	7.360
pO ₂ (80 mm Hg)	71.5				89.5 [#]	74.6
pCO ₂ (40 mm Hg)	25.9				24.6	34.8
HCO ₃ (24 mEq/l)	15.0				13.4	19.5
Base Excess (-2 to +2 mEq/l)	- 8.4				- 10	- 4.7
Sat O ₂ (>96%)					96	94.5
Creatinine (0.4-1.4 mg/dl)	1.0	0.7	0.8	11.1	0.9	0.9
Urea (10 - 50 mg/dl)	42	24	23	234	60	56
Leukocytes (3,5-12,000/mm ³)	6,300	9,600	6,900	6,600	5,200	6,600
Erythrocytes (4,5-5,500,000/mm ³)		2,800,000	3,800,000	3,100,000	2,800,000	
Hemoglobin ♂ (>14g/dl); ♀ (>12g/dl)	12.8	8.8	11.2	8.1	8.7	10.3
Hematocrit (40 - 54%)	41	25	35	25	25	33
Platelets (100-500,000/mm ³)	22,500	56,000			64,000	29,000
Total serum bilirubin (< 1.5 mg/dl)			2.7	3.6		2.8
Direct serum bilirubin (< 0.5 mg/dl)			0.4	2.6		1.1

*Patient under peritoneal dialysis procedure; #With O₂;

obtained from all patients were purified as described elsewhere (24).

DNA/RNA extractions and cDNA synthesis

Genomic DNA was obtained as described in Ferreira et al. (25) and stored at 4°C. Total RNA from mature parasites was extracted according to Kyes et al. (26) and stored at -70°C. As needed, one microgram aliquots of total RNA were treated in three consecutive 15 min steps at room temperature with DNase I (Life Technologies) reaching a final volume of 20 μ l. The reaction was stopped by adding EDTA to a final concentration of 2.5 mM and incubation at 65°C for 10-min. One microliter aliquots were used in PCR reactions using *var* DBL1 α -oligonucleotides (27); only samples that did not amplify were subsequently used in reverse transcription. cDNAs were prepared using the First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech), and random hexadeoxynucleotides. Samples without reverse transcriptase were used in all reactions as yet another control of DNA contamination.

PCR, cloning and sequencing

Samples were amplified by PCR as previously described (27). PCR or RT-PCR fragments were resolved in 1-% agarose gel, purified (28) and cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega). Sequence was contracted and obtained from GATC GmbH (Germany).

Sequence analysis

Sequences were translated to aminoacids by EditSeq Programme (DNASTar package) and submitted to BLASTP version 2.1.3 (29). Alignments were done using ClustalX version 1.81 (30). Maximum likelihood tree was constructed utilizing the GTR+I+G model, selected by Modeltest Program version 3.06 (31). The value of the gamma distribution with shape parameter α was 1.6315. Quartet puzzling method was used to choose the better likelihood tree (32). All these analyses were undertaken with 4.06 version of PAUP* (33).

Expression of a var DBL1 α domain as a His-tagged bacterial protein

The *var* gene segment coding for the DBL1 α N-terminal domain from the *P. falciparum*

isolate G2 (clone 1) was subcloned into the pRSET-C Vector (Invitrogen). Authenticity of the recombinant plasmid was confirmed by DNA sequencing. After IPTG induction, the protein was expressed in *E. coli* strain BL21 at 37°C for 2 hours and purified using the basic protocol of the HisTrap Kit using 8 M Urea and according to the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech).

Immunofluorescence

After washing three times in PBS, thin blood smears were prepared with 0.5% blood group A Rh⁺ erythrocytes. Erythrocytes were fixed with acetone and 15 μ l aliquots of two His-tagged bacterial proteins, DBL1 α -His and Meta1-His (an antigen from *Leishmania* used as a negative control) both at 80 μ g/ml in PBS were dropped separately onto the smears and incubated for 30 min at room temperature. As a positive control, 15 μ l of an anti-human erythrocyte polyclonal mouse antibody were used. Slides were washed three times with PBS and binding was detected using an IgG2 monoclonal antibody against the His tag (Amersham Pharmacia Biotech) and ImmunoPure FITC conjugate goat anti-mouse IgG (Pierce).

High-density filters and Southern hybridizations

Plasmid DNA from 320 individual clones was spotted in duplicates onto 12 X 8 cm nylon Hybond N+ membranes (Amersham) by a robotic system (Flexys, Genomic Solutions, USA) using a 96 pins head. Griding density was 2 identical sets of (4 x 4) x 96. RT-PCR fragments were labelled using random primer with [α ³³P] CTP using the Multiprime DNA Labelling System (Amersham Pharmacia Biotech) and T7 oligonucleotide was labelled with [γ ³³P] ATP using T4 polynucleotide kinase. Membranes hybridized with T7 were washed in 6XSSC/0.5%SDS at 37°C for 15 min followed by another wash in the same solution at 5°C below T_m for 10 min. Membranes hybridized with *var* probes were washed at 2XSSC for 10 min at room temperature followed by two washes at 0.1XSSC/0.1%SDS at 65°C for 15 minutes each.

Results

P. falciparum DBL1 α var sequences expressed in patients with severe malaria revealed predominantly expressed sequences lacking 1-2 cysteine residues

57 DBL1 α var RT-PCR fragments amplified from total RNA of mature parasites obtained from six patients with severe malaria were cloned and sequenced. A total of 25 different deduced amino acid sequences were obtained and compared in blast analysis to available sequences at GenBank. Two sequences had 100% identity with sequences already deposited: G29-7 with a var gene from a Vanuatu isolate (AF221773) and G3-R1 with a var gene from FCR3 strain (AJ133811). The other 23 sequences were unreported (GenBank accession numbers AF368922 to AF368944). Alignment of all 25 sequences showed that 8 sequences could be sub-grouped due to deletions of 1-2 cysteine residues at their C-termini (Fig. 1). These 8 sequences represent 3 sequences from patient G2 and one sequence from each severe patient (G3, G23, G29, G33 and G34). Significantly, these sequences were the most abundantly expressed in each patient as reflected by the large percentage (>33%) of identical clones sequences from each sample. These data demonstrate that there are *P. falciparum* DBL1 α sequences lacking 1-2 cysteine residues that are predominantly expressed in the parasites obtained from all patients with severe malaria included in this study.

DBL1 α var sequences predominantly expressed in parasites obtained from severe malaria patients are rarely expressed in parasites from mild malaria patients

Having identified DBL1 α var sequences lacking 1-2 cysteine residues predominantly expressed in all patients with severe malaria from the Brazilian Amazon, we next examined DBL1 α var sequences expressed in parasites obtained from patients with mild malaria. 54 DBL1 α var sequences were obtained from parasites of four patients with mild malaria (Table 1). Twenty one different amino acids sequences were obtained from these patients. Sequence NG4-3 had 100% identity with varH sequence obtained from the Brazilian ItG2 isolate (AF275864). The others 20 sequences

were unreported and submitted to GenBank (accession numbers AF368945 to AF368950 and AF416572 to AF416585). It is important to recall that we included the same patient at the moment of having severe malaria (G3) and 20 days later at the moment of a recrudescence diagnosed as mild malaria (NG2).

Phylogenetic Analysis of DBL1 α sequences

Phylogenetic analysis of the DBL1 α domain from 46 different expressed var genes from Brazil (25 from severe and 21 from mild malaria) and 21 sequences from this same domain from Sudan obtained from GenBank was performed. Remarkably, the same sequences that had been sub-grouped in the analysis of DBL1 α sequences from patients with severe malaria remained sub-grouped. Two sequences expressed in parasites from patients with mild malaria and one sequence from Sudan also sub-grouped in this branch of the tree (Fig. 1).

DBL1 α var sequences expressed in parasites obtained from patients with severe malaria are frequently present in the var repertoire of parasites obtained from patients with mild malaria

We then investigated whether the most predominantly expressed DBL1 α var sequences from patients with severe malaria were amply present in the var gene repertoire of patients with mild malaria in the Brazilian Amazon. To address this, high-density filters were spotted with 320 clones representing DBL1 α var sequences of parasites obtained from 80 patients with mild malaria and screened with different probes. First, we used a plasmid specific probe (T7) to verify if all the samples were spotted in approximately the same quantity (Fig. 2A). Second, we used single probes representing the most frequently expressed sequences from three individual patients and demonstrated that they are present in the genomic repertoire of many isolates from patients with mild malaria (Fig. 2B, 2C and 2D). Sequence analysis of several randomly chosen positive clones confirmed that they were identical to the sequence of the probe with which they reacted (not shown).

Fig. 2. DBL1 α var sequences expressed in severe malaria parasites are frequently present in the var gene repertoire of mild malaria parasites. High-density filters containing 320 DBL1 α var sequences obtained from parasites of patients with mild malaria were spotted in duplicates and hybridized with a plasmid-specific probe, T7 (A) or probes obtained from severe malaria parasites: (B) G29-7, (C) G33-6 or (D) G34-7. All spaces with no signal hybridization in A correspond to negative controls (water).

Similar results were obtained when filters were hybridized with complex RT-PCR probes from individual patients with severe malaria (not shown). These data demonstrated that the sequences preferentially expressed in parasites from patients with severe malaria are amply present in the genomes of parasites from patients with mild malaria; yet, they are rarely expressed in the latter.

A DBL1 α domain expressed in bacteria binds directly to erythrocytes

Rosetting have been associated with severe malaria and is unequivocally mediated by particular sequences of the PfEMP1 DBL1 α domain (12,13,14,15). We thus investigated whether a DBL1 α domain from the most

abundantly expressed sequence of a patient with severe malaria could bind to erythrocytes. To do so, the DBL1 α N-terminal domain from the *P. falciparum* isolate G2 (clone 1) (AF368922) was expressed with a 6x-histidine tail in *E. coli* and used in IFA analysis. Worth mentioning, a similar methodology had been previously used to demonstrate PfEMP1 as the rosetting ligand of *P. falciparum* (13). As positive and negative controls, a polyclonal mouse anti-human erythrocyte antibody and a non-related His-tagged protein from *Leishmania* were used, respectively. Similar to the positive control, the DBL1 α -His gave a distinct surface staining with all uninfected erythrocytes (Fig. 3 A-B). In contrast, no staining was detected with an unrelated *Leishmania* Meta1-His protein (Fig. 3C).

Fig. 3. A DBL1 α domain expressed in bacteria binds directly to erythrocytes. IFA analysis of uninfected erythrocytes using a polyclonal mouse anti-human erythrocyte antibody (A), recombinant protein DBL1 α (G2-1)-His (B) or a non-related His-tagged protein from *Leishmania* (C).

Discussion

An understanding of the molecular mechanisms underlying severe non-cerebral falciparum malaria should lead to rationale and novel control strategies. Towards this end, we analyzed expressed *P. falciparum* DBL1 α *var* sequences from patients with severe non-cerebral malaria from the Brazilian Amazon.

Twenty-three different and previously unreported deduced amino acid sequences were obtained from parasites obtained of these patients. Significantly, all the patients with severe malaria harbored predominantly expressed PfEMP1 DBL1 α sequences displaying a region lacking 1-2 cysteine residues that sub-grouped them in clustal alignments. This sub-group was maintained when a similar analysis was performed using expressed sequences obtained from parasites of patients with mild malaria and sequences from this same *var* gene segment of isolates from Sudan available at GenBank. High-density filters representing genomic *var* DBL1 α sequences of parasites obtained from 80 patients with mild malaria from four different regions in the Brazilian Amazon, revealed that these sequences are widely distributed; yet, they are predominantly expressed in patients with severe non-cerebral malaria. This is the first report demonstrating an association of severe non-cerebral malaria in patients from Brazil and particular PfEMP1 DBL1 α sequences.

The results and conclusions withdraw from this study were based on parasite material obtained from six patients diagnosed with severe non-cerebral falciparum malaria. To identify these patients, we surveyed the clinical histories of 1599 patients with falciparum malaria kept at the Núcleo de Estudos em Malária da Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo, Brasil (SUCEN) from 1987-2000. This laboratory is responsible for the diagnosis and treatment of all reported malaria cases in the city of São Paulo, a Brazilian non-endemic region. Most telling, it holds the highest number of clinical records of patients with severe malaria in Brazil. In spite of this logistics, we were able to identify only six patients with the criteria determined by WHO to diagnose severe malaria. In addition to these criteria, we also demonstrated higher than normal PCT serum

levels in four of these patients; this new parameter has been recently proposed to correlate with disease severity and risk of mortality in malaria (22). These numbers thus accurately reflect the scarcity of patients with severe malaria in Brazil and reinforce the biological value of the data obtained in this study.

It is now well established that there is relaxed transcription of most if not all *var* genes during ring stages. Thus, even with highly purified samples containing mostly trophozoite and schizonts used in the RNA extractions, we cannot exclude the possibility of minor contaminations with ring stages. Moreover, malarial infections are not clonal even in regions of low endemicity. Therefore it was not surprising to identify different *var* DBL1 α transcripts in parasites obtained from all the patients that participated of this study. Remarkably however, there were predominantly expressed PfEMP1 DBL1 α sequences in all parasites obtained from the six patients with severe malaria. Moreover, these sequences displayed a common region lacking 1-2 cysteine residues towards their C-termini that allowed them to be sub-grouped in dendrogram analysis. To validate this result, we performed a similar analysis including expressed DBL1 α sequences of parasites from patients with mild malaria and DBL1 α sequences from this same gene segment from isolates of Sudan available at GenBank. Although the sequences of two clones from two patients with mild malaria lacked these cysteine residues, they represented only one out of 14 clones sequenced from each patient. Similarly, one sequence from Sudan also sub-grouped in this analysis; unfortunately, we have no idea on the clinical status of this patient or whether this sequence is expressed. Regardless, these data demonstrate that patients with mild malaria predominantly expressed DBL1 α domains having all 4 cysteine residues in this region of the domain. In contrast, patients with severe non-cerebral malaria harbor parasite populations predominantly expressing DBL1 α domains lacking 1-2 cysteine residues. In fact, patient G3 at the moment of having severe malaria had predominant DBL1 α sequences lacking 2 cysteine residues whereas 20 days later at a recrudescence with mild malaria the

predominant DBL1 α sequences displayed 4 cysteine residues. It is thus tempting to speculate that a different folding of these domains confer the parasite populations expressing them different degrees of virulence and reinforce the importance of PfEMP1 domain folding in the pathology associated with malaria.

Two main phenomena have been associated with severe malaria: cytoadherence and rosetting. Of them, rosetting has been unequivocally demonstrated to be associated with particular sequences of the PfEMP1 DBL1 α domain (12,13,14,15). Here, we demonstrated that a DBL1 α domain representing the most abundantly expressed PfEMP1 DBL1 α sequence from one of the patients with severe falciparum malaria expressed in bacteria, bind to erythrocytes. This result, thus, suggest an association of rosetting with severe non-cerebral falciparum malaria reported in these Brazilian patients. Unfortunately, there are no reports of rosetting from Brazil and clearly more studies are required to validate this association

A recent study has demonstrated the association of severe malaria with a particular *var* DBL δ sequences in patients from French Guiana (20). Together with the studies reported here, these data indicate that there are indeed associations of severe malaria with particular PfEMP1 sequences. However, in addition to the *var* multigene family, many other multigene families such as *rif*, *stevor*, *clag* and *pf60*, likely involved in virulence, have been discovered in *P. falciparum* (rev. in 34). High throughput methodologies can now be envisioned to discover and compare the repertoire of genomic and expressed virulent genes circulating in endemic regions with particular clinical syndromes of severe malaria. These data in turn should help in elucidating the molecular mechanisms underlying the different clinical manifestations to develop rationale alternative eradication control strategies.

Acknowledgements

We thank Dr. Alex Fiorini Carvalho and Dr. Luiz Fernando Lima Reis (Institute Ludwig) for facilitating the use of robotics to spot the filters. We thank Drs. Marcelo Urbano Ferreira

and Crispim Cerutti Jr for some samples from patients with mild malaria, Dr. Emilia Kimura for the anti-human erythrocyte polyclonal mouse antibody and Dr. Silvia Reni Uliana for the Metal-His protein. This work received support from the INCO-DC Programme (IC18-CT98-0364).

References

1. Miller LH, Good MF, Milon G. (1994) Malaria pathogenesis. *Science* **264**: 1878-1883.
2. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, et al. (1995) The large diverse gene family *var* encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* **82**: 89-100.
3. Cooke B, Coppel R, Wahlgren M. (2000) Falciparum malaria: sticking up, standing out and out-standing. *Parasitol. Today* **16**: 416-420.
4. Handunnetti SM, David PH, Perera KL, Mendis KN. (1989) Uninfected erythrocytes form "rosettes" around *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**: 115-118.
5. MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrell DA. (1985) Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am. J. Pathol.* **119**: 385-401.
6. Aikawa M. (1988) Human cerebral malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39**: 3-10.
7. Carlson J, Helmby H, Hill AV, Brewster D, Greenwood BM, Wahlgren M. (1990) Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet* **336**: 1457-1460.
8. Pongponratn E, Riganti M, Punpoowong B, Aikawa M. (1991) Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**: 168-175.
9. Treutiger CJ, Hedlund I, Helmby H, et al. (1992) Rosette formation in *Plasmodium falciparum* isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46**: 503-510.
10. Rowe A, Obeiro J, Newbold CI, Marsh K. (1995) *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect. Immun.* **63**: 2323-2326.
11. Newbold C, Warn P, Black G, et al. (1997) Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med.*

- Hyg. **57**: 389-398.
12. Rowe JA, Moulds JM, Newbold CI, Miller LH. (1997) *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature* **388**: 292-295.
 13. Chen Q, Barragan A, Fernandez V, et al. (1998) Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*. *J. Exp. Med.* **187**: 15-23.
 14. Chen Q, Heddi A, Barragan A, Fernandez V, Pearce SF, Wahlgren M. (2000) The semiconserved head structure of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors. *J. Exp. Med.* **192**: 1-10.
 15. Barragan A, Fernandez V, Chen Q, von Euler A, Wahlgren M, Spillmann D. (2000) The duffy-binding-like domain 1 of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) is a heparan sulfate ligand that requires 12 mers for binding. *Blood* **95**: 3594-3599.
 16. WHO. (2000) Severe falciparum malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94 Suppl 1**: S1-S90.
 17. Duarte MI, Corbett CE, Boulos M, Amato Neto V. (1985) Ultrastructure of the lung in falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 31-35.
 18. Corbett CE, Duarte MI, Lancellotti CL, Silva MA, Andrade Junior HF. (1989) Cytoadherence in human falciparum malaria as a cause of respiratory distress. *J. Trop. Med. Hyg.* **92**: 112-120.
 19. Boulos M. (1992) Clinical picture of severe malaria. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **34 Suppl 9**: S41-S42.
 20. Arie F, Hommel D, Le Scanf C, et al. (2001) Association of severe malaria with a specific *Plasmodium falciparum* genotype in French Guiana. *J. Infect. Dis.* **184**: 237-241.
 21. Kirchgatter K, Mosbach R, del Portillo HA. (2000) *Plasmodium falciparum*: DBL-1 var sequence analysis in field isolates from central Brazil. *Exp. Parasitol.* **95**: 154-157.
 22. Chiwakata CB, Manegold C, Bonicke L, Waase I, Julch C, Dietrich M. (2001) Procalcitonin as a parameter of disease severity and risk of mortality in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* **183**: 1161-1164.
 23. Trager W, Jensen JB. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**: 673-675.
 24. Pasvol G, Wilson RJ, Smalley ME, Brown J. (1978) Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72**: 87-88.
 25. Ferreira MU, Liu Q, Kaneko O, et al. (1998) Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the southwestern Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**: 474-480.
 26. Kyes S, Pinches R, Newbold C. (2000) A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **105**: 311-315.
 27. Taylor HM, Kyes SA, Harris D, Kriek N, Newbold CI. (2000) A study of var gene transcription in vitro using universal var gene primers. *Mol. Biochem. Parasitol.* **105**: 13-23.
 28. Boyle JS, Lew AM. (1995) An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet.* **11**: 8.
 29. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
 30. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
 31. Posada D, Crandall KA. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817-818.
 32. Strimmer K, von Haeseler A. (1996) Quartet Puzzling: A Quartet Maximum-Likelihood Method for Reconstructing Tree Topologies. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 964-969.
 33. Swofford DL. (1998) PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4, Sunderland, Massachusetts.
 34. Kyes S, Horrocks P, Newbold C. (2001) Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 673-707.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS
SUCEN

FICHA Nº 913-87

DIRETORIA DE COMBATE A VETORES

NOME Claudinei de Oliveira Castro IDADE 20 SEXO M

RESPONSÁVEL _____ INV. EPID. Nº _____

RESIDÊNCIA _____ BAIRRO _____

MUNICÍPIO _____ CEP _____ TELEFONE _____

EXAME DE SANGUE

PESQUISA E CONTAGEM DE PLASMÓDIOS

[illegible]

ESQUEMA DE TRATAMENTO

[illegible]

LEGENDA

ARALEM

CAMOQUIM

FANSIDAR

PRIMAQUINA

SULF. QUININO

TETRACICLINA

OUTROS

AR

CA

FS

— PI

— QQ

— TT

OBS.:

OBS.: internado no H.E.R.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUCEN
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS

FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE MALÁRIA

S.R. 1 N.º da Investigação 913/87 Data da Notificação 08, 11, 87
Notificante SUCEN Município S. Paulo

1. IDENTIFICAÇÃO
Nome do Paciente: Claudinei de Oliveira Castro
Sexo M Idade 20 Natural de S. Sebastião da Amoreira Estado PR
Ocupação: Camioneiro Nome e endereço da Empresa onde Trabalha: Antônio
Nome do Pai ou Responsável: Aparecida Peres Castro

2. RESIDÊNCIA ATUAL (EM TRÂNSITO ☐ SIM ☒ NÃO ☒)
Endereço R. Ruyton, 03 Bairro Ariston
Município Carapicuíba Telefone — Tempo de residência: desde — / — / 80

3. SINTOMAS APRESENTADOS NESTE ATAQUE
Febre Sim ☒ Não ☐ data do início 30, 10, 87 Dor de Cabeça Sim ☒ Não ☐ data do início 30, 10, 87
Outros Sintomas náuseas, vômitos, dor nas costas, diarreia data do início 30, 10, 87

4. ANTECEDENTES
Teve Malária Anteriormente? Sim ☐ Não ☒ Quando? — / — / — Espécie —
Foi Medicado na Oportunidade? Sim ☐ Não ☒ nome(s) do(s) medicamento(s) —
Faz uso de Medicação Profilática? Sim ☐ Não ☒ Quais? —

5. TRANSFUSÕES DE SANGUE NOS ÚLTIMOS 6 MESES?
Recebeu? Sim ☐ Não ☒ Local — Data — / — / —
Doou? Sim ☐ Não ☒ Local — Data — / — / —

6. MOVIMENTAÇÃO DO DOENTE (NO MÍNIMO NOS ÚLTIMOS 12 MESES, PERNOITANDO OU NÃO FORA DA LOCALIDADE ONDE RESIDE)

OBSERVAR O SEQUENTE ROTEIRO DE PERGUNTAS, AO PACIENTE: 1. DATA(S) DE SAÍDA; 2. MOTIVO DA VIAGEM; 3. MUNICÍPIOS E LOCALIDADES PARA ONDE SE DIRIGIU; 4. TEMPO DE PERMANÊNCIA EM CADA LOCALIDADE; 5. NO MOMENTO E APÓS O REINGRESSO NO ESTADO DE SÃO PAULO, QUE MEIOS DE TRANSPORTE E VIAS DE ACESSO UTILIZOU; 6. DATA DE CHEGADA NO ESTADO; 7. MUNICÍPIOS EM QUE PERNOITOU APÓS O REINGRESSO NO ESTADO E ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO; 8. DATA DE CHEGADA AO MUNICÍPIO EM QUE RESIDE OU ESTÁ HOSPEDADO; 9. DESLOCAMENTOS APÓS A CHEGADA NO LOCAL DE RESIDÊNCIA ATÉ O INÍCIO DO TRATAMENTO.

Dia 11/10/87 viagem para Rio Branco (AC)
para transportar carga de caminhão. Chegou em Rio Branco dia 19/10/87, tendo pernoitado em postos de gasolina ao longo da BR 364. Ficou em Rio Branco (apenas no centro) até 21/10/87. Nesta data retornou para S. Paulo chegando na capital no dia 30/10/87. Na viagem de retorno também pernoitava em postos de gasolina ao longo da BR 364. Após o retorno não esteve em áreas com possibilidade de

7. CONTATOS COM CASOS DE MALÁRIA OU SUSPEITOS NOS ÚLTIMOS 6 MESES? Sim ☒ Não ☐

Estado de São Paulo ☐ Em Outros Estados ☒ Acompanhantes ☐

nome	endereço	município	estado
nome	endereço	município	estado
nome	endereço	município	estado

8. ATENDIMENTOS MÉDICOS

Procurou algum serviço de saúde no Estado de São Paulo? Sim ☐ Não ☐

Qual? 1. PS Municipal da Catapimiba Data 02/11/87

2. _____ Data 1/1/

3. _____ Data 1/1/

Como soube da SUCEN? Informado pelo pai

9. INFORMAÇÕES LABORATORIAIS

Laboratório SR-1 Tipo de Busca BP

Município S. Paulo Data da Coleta 02/11/87 Data do Exame 03/11/87

Responsável pelo Diagnóstico Elianna

Resultado (espécie de plasmodio) falciparum

Contagem (P. falciparum) formas assexuadas incontáveis formas sexuadas _____

Densidade (demais espécies) _____

10. DESTINO DO PACIENTE

Ambulatório Sim ☒ Não ☐ Qual? SM

Hospitalização Sim ☐ Não ☒ Qual? H.E.

Motivo da Internação alta parasitêmica

11. TRATAMENTO

Data do início _____

medicação _____ doses _____

12. APECIAÇÃO DO CASO

Local provável da infecção: Estado RO Município Ind.

Qualidade Ind. Fase A

Classificação do Caso: Autóctone ☐ Introduzido ☐ Importado ☒ Induzido ☐ Recaida ☐

OBSERVAÇÕES

1ª malária

Pac. refere que em Porto Velho e Ji-Paraná (RO) havia muitos mosquitos, à noite nos locais onde pernoita.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS
SUCEN

FICHA Nº 481-87

DIRETORIA DE COMBATE A VETORES

NOME Bumice Silva de Oliveira IDADE 18 SEXO F
RESPONSÁVEL _____ INV. EPID. Nº _____
RESIDÊNCIA _____ BAIRRO _____
MUNICÍPIO _____ CEP _____ TELEFONE _____

EXAME DE SANGUE

PESQUISA E CONTAGEM DE PLASMÓDIOS

DATA	FORMAS POR mm ³						MICROSCOPISTA
	P. VIVAX		P. FALCIPARUM		P. MALARIAE		
	F. ASSEXUADOS	GAMETOCITOS	F. ASSEXUADOS	GAMETOCITOS	F. ASSEXUADOS	GAMETOCITOS	
22.06.87			Incontáveis				Olana
23.06.87			26.880				Olana
26.97			neg	480			Olana
29.06.87			neg	360			Olana

ESQUEMA DE TRATAMENTO

[illegible]

LEGENDA

ARALEM	—	AR
CAMOQUIM	—	CA
FANSIDAR	—	FS
PRIMAQUINA	—	PI
SULF. QUININO	—	QQ
TETRACICLINA	—	TT
OUTROS		

OBS.: Encomendada para
internação no HER.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUCEN
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS

FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE MALÁRIA

R. _____ Nº da Investigação 491-87 Data da Notificação 22/06/87
 Notificante Casa de Saúde de V. Monte Município S.P.

1. IDENTIFICAÇÃO
 Nome do Paciente: Bernice Silveira de Oliveira
 Sexo F Idade 19 Natural de S. Paulo Estado SP
 Ocupação: Dona de Casa Nome e endereço da Empresa onde Trabalha: _____
 Nome do Pai ou Responsável: Judith Antunes de Oliveira

2. RESIDÊNCIA ATUAL (EM TRÂNSITO ☐ SIM ☐ NÃO ☒)
 Endereço R. Black Taylor, 205 Bairro Ja. Coimbra
 Município S. Paulo Telefone 944.66.82 Tempo de residência: desde - / - / 68

3. SINTOMAS APRESENTADOS NESTE ATAQUE
 Febre Sim ☒ Não ☐ data do início 18/06/87 Dor de Cabeça Sim ☒ Não ☐ data do início 18/06/87
 Outros Sintomas Dor no corpo, ind. geral, náuseas data do início 18/06/87

4. ANTECEDENTES
 Teve Malária Anteriormente? Sim ☐ Não ☒ Quando? - / - / - Espécie -
 Foi Medicada na Oportunidade? Sim ☐ Não ☒ nome(s) do(s) medicamento(s) -
 Faz uso de Medicação Profilática? Sim ☐ Não ☒ Quais? -

5. TRANSUSÕES DE SANGUE NOS ÚLTIMOS 6 MESES?
 Recebeu? Sim ☐ Não ☒ Local _____ Data / /
 Doou? Sim ☐ Não ☒ Local _____ Data / /

6. MOVIMENTAÇÃO DO DOENTE NO MÍNIMO NOS ÚLTIMOS 12 MESES, PERNOITANDO OU NÃO FORA DA LOCALIDADE ONDE RESIDE

OBSERVAR O SEGUINTE ROTEIRO DE PERGUNTAS, AO PACIENTE: 1. DATA DE SAÍDA; 2. MOTIVO DA VIAGEM; 3. MUNICÍPIOS E LOCALIDADES PARA ONDE SE DIRIGIU; 4. TEMPO DE PERMANÊNCIA EM CADA LOCALIDADE; 5. NO MOMENTO E APÓS O REINGRESSO NO ESTADO DE SÃO PAULO, QUE MEIOS DE TRANSPORTE E VIAS DE ACESSO UTILIZOU; 6. DATA DE CHEGADA NO ESTADO; 7. MUNICÍPIOS EM QUE PERNOITOU APÓS O REINGRESSO NO ESTADO E ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO; 8. DATA DE CHEGADA AO MUNICÍPIO EM QUE RESIDE OU ESTÁ HOSPEDADO; 9. DESLOCAMENTOS APÓS A CHEGADA NO LOCAL DE RESIDÊNCIA ATÉ O INÍCIO DO TRATAMENTO.

Reside em S. Paulo desde 1968 e em 08.04.87 viajou para Porto Velho (RO), no km 620 da BR-364, para visitar o marido e o filho que lá residem, chegando dia 11.04.87.

Permaneceu naquela localidade até dia 06.06.87 quando retornou para S. Paulo, direto de ônibus, porque aqui reside, chegando dia 09.06.87.

Desde que chegou não teve deslocamentos por áreas com possibilidade de transmissão.

7. CONTATOS COM CASOS DE MALARIA OU SUSPEITOS NOS ÚLTIMOS 6 MESES? Sim ☒ Não ☐

Não Estado de São Paulo ☐ Em Outros Estados ☒ Acompanhantes ☐ Porto Velho RO

Nome Endereço Município Estado

Nome Endereço Município Estado

Nome Endereço Município Estado

8. ATENDIMENTOS MÉDICOS

Procurou algum serviço de saúde no Estado de São Paulo? Sim ☒ Não ☐

Local? 1. Casa de Saúde de V. Matilde Data 20/06/87

2. Data

3. Data

Como soube da SUCEN? através da C.S. de V. Matilde

9. INFORMAÇÕES LABORATORIAIS

Laboratório SR-1 Tipo de Busca BP

Município SP Data da Coleta 22/06/87 Data do Exame 22/06/87

Responsável pelo Diagnóstico Olíana

Resultado (espécie de plasmódio) P. falciparum

Contagem (P. falciparum) formas assexuadas incontáveis formas sexuadas -

Densidade (demais espécies) -

10. DESTINO DO PACIENTE

Ambulatório Sim ☐ Não ☒ Hospitalização Sim ☒ Não ☐

12. Apreciação do caso

Local provável da infecção Estado RO Município Porto Velho

Localidade Km 620 da BR-364 Fase A

Classificação do Caso: Autóctone ☐ Introduzida ☐ Importada ☒ Induzida ☐ Recaida ☐

13. OBSERVAÇÕES

- 1ª malária

- FA Vacinou em abril/87 em Villena (RO)

Olíana Schneider - Tec. Lab

Luiz C. Barata

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS
SUCEN

FICHA Nº 511-89

DIRETORIA DE COMBATE A VETORES

NOME Oto Trigueiro de Souza IDADE 45 SEXO M.
 RESPONSÁVEL _____ INV. EPID. Nº _____
 RESIDÊNCIA _____ BAIRRO _____
 MUNICÍPIO _____ CEP _____ TELEFONE _____

EXAME DE SANGUE
PESQUISA E CONTAGEM DE PLASMÓDIOS

DATA	FORMAS POR mm ³						MICROSCOPISTA
	P. VIVAX		P. FALCIPARUM		P. MALARIAE		
	F. ASSEXUADOS	GAMETOCITOS	F. ASSEXUADOS	GAMETOCITOS	F. ASSEXUADOS	GAMETOCITOS	
18/8/89	+++	+++					Sandra
21.8.89	neg	neg	Immunis (esquistoz)				Olivia
24.8.89	neg	neg	42.720	480			CHRISTINA
26.08.89	neg	neg	3120	120			Olivia
28.08.89	neg	neg	480	120			Olivia
11-9-89	neg	neg	neg	neg			CHRISTINA
25.09.89	neg	-	neg	-			Olivia
25.10-89	neg	-	neg	-			CHRISTINA

ESQUEMA DE TRATAMIENTO

DIAS DE MEDICAÇÃO	
MÊS	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	Q Q
27	3 3 3
28	T T
29	6 6 6
30	P F
31	1 1 1 1

LEGENDA

ARALEM	—	AR
CAMOQUIM	—	CA
FANSIDAR	—	FS
PRIMAQUINA	—	PI
SULF. QUININO	—	QQ
TETRACICLINA	—	TT
OUTROS		

OBS.

OBS.: Citend. no H. Militar
28/8 -> REINICIADO fto pois o paciente
NÃO FEZ SEQUEMA CORRETO.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

SUCEN

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS

FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE MALÁRIA**I-IDENTIFICAÇÃO DA FICHA**

1-SR: 01 2-Nº DA INVESTIGAÇÃO: 0511189 3-DATA DA NOTIFICAÇÃO: 18.08.89
 4-SEMANA EPIDEMIOLÓGICA: 033
 5-ÓRGÃO NOTIFICANTE: ☐ 1 CS / Posto de Saúde ☒ 2 Pronto Socorro/Hospital
☐ 3 Médico Particular ☐ 4 SUCEN
☐ 5 Outros Ambulatórios
 6-TIPO DE BUSCA: ☒ 1 BP ☐ 2 BA Rotina ☐ 3 BA Foco

II-IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome: OTIO TRIGUEIRO DE SOUZA
 7-SEXO: ☒ 1 Masculino ☐ 2 Feminino ☐ 3 Grávida
 8-IDADE: ☒ 4 15 (Maiores de 1 Ano) ☐ 5 1 (Menores de 1 Ano)
 Nome da Mãe: AMÁLIA FERREIRA DE SOUZA
 Endereço: RUA TRACÓPIO DA SALIM N.º 33 ZD JUSSARA
 Telefone: - Município: SÃO PAULO Estado: 15
 9-CÓDIGO DO MUNICÍPIO: 11111 10-CÓDIGO DO ESTADO: 00 SUS-R: 001
 (Se em Trânsito) Endereço: _____
 Telefone: _____ Município: _____ SUS-R: 1

III-INFORMAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS

11-SINTOMAS: ☒ 1 Febre ☒ 2 Dor Lombar ☒ 3 Diarréia 12-DATA DO INÍCIO DO(S) SINTOMA: 18.08.89
☒ 4 Calafrio ☐ 5 Dor Articular ☐ 6 Mal Estar
☐ 7 Sudorese ☒ 8 Dor Abdominal ☐ 9 Outros 13-DATA DA COLETA DA LÂMINA: 18.08.89
☒ 10 Dor de Cabeça ☐ 11 Náuseas ☐ 12 Assintomático
☐ 13 Dor na Nuca ☐ 14 Vômito ☐ 15 Sem Resposta 14-DATA DO EXAME: 18.08.89
☒ 16 Dor Muscular ☐ 17 Falta de Apetite
 15-ESPÉCIE DE PLASMÓDIO: ☐ 1 vivax ☐ 2 falciparum ☐ 3 malariae ☐ 4 ovale ☒ 5 Associado
 16-DENSIDADE: ☐ 1 +/2 ☐ 2 + ☐ 3 ++ ☒ 4 +++ ☐ 5 Não se Aplica
 17-FORMAS SEXUADAS: 0.0.0.0.0
 18-FORMAS ASSEXUADAS: 1.1.1.1.1.1.1.1
 19-DATA DO INÍCIO DO TRATAMENTO: 18.08.89
 20-MEDICAÇÃO INDICADA: ☐ 1 Cloroquina (Aralen) ☒ 2 Tetraciclina (Tetrex)
☐ 3 Amodiaquina (Camaquin) ☐ 4 Doxiciclina (Vibramicina)
☒ 5 Primaquina ☐ 6 Clindamicina (Dalacin-C)
☐ 7 Sulfato de Quinina ☐ 8 Mefloquina (Lariamar)
☒ 9 Cloridrato de Quinina ☐ 10 Sem Resposta / Medicação Ignorada
 21-DESTINO DO PACIENTE: ☐ 1 Ambulatório ☒ 2 Hospital
 Qual? HOSPITAL MULAR TROMPA Tempo de Internação: 0.4 D.
 22-EVOLUÇÃO DO CASO: Óbito? ☐ 1 Sim ☒ 2 Não

IV-INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

23-MALÁRIA ANTERIOR - Espécie de Plasmódio: ☐ 1 vivax ☐ 2 falciparum ☐ 3 malariae ☐ 4 ovale
☐ 5 Associado ☒ 6 Não Sabe ☐ 7 Não Tem

26-MEDIDAS PROFILÁTICAS UTILIZADAS DURANTE O PERÍODO DE EXPOSIÇÃO

Quais? _____

27-RECEBEU TRANSUSÃO DE SANGUE NOS ÚLTIMOS 6 MESES?

☐ Sim ☒ Não

Onde? _____ Data: _____

" _____ Data: _____

28-DODU SANGUE NOS ÚLTIMOS 6 MESES?

☐ Sim ☒ Não

Onde? _____ Data: _____

29-É USUÁRIO DE DROGA INJETÁVEL?

☐ Sim ☒ Não

30-MOTIVO DO DESLOCAMENTO PARA A ÁREA DE EXPOSIÇÃO À DOENÇA:

- ☒ A Serviço ☐ 4) Lazer
☐ 2) A Procura de Trabalho ☐ 5) Não se Aplica (Não se Deslocou)
☐ 3) Fixar Residência ☐ 6) Outro Motivo: _____

31-MOTIVO DO DESLOCAMENTO PARA O ESTADO DE SÃO PAULO:

- ☒ 1) Retorno à Residência ☐ 6) Outro Tratamento de Saúde
☐ 2) Fixar Residência ☐ 7) Lazer
☐ 3) A Serviço ☐ 8) Não se Aplica (Não se Deslocou)
☐ 4) A Procura de Trabalho ☐ 9) Outro Motivo: _____
☐ 5) Tratamento de Moléstia

32-SETOR OU SUB-SETOR DE ATIVIDADE ECONÔMICA ONDE ESTÁ INSERIDA A OCUPAÇÃO DESEMPENHADA PELO PAO ENTE DURANTE O PERÍODO EM QUE CONTRAIU A DOENÇA (Anotar o nº de código que consta no Manual de Instruções de Preenchimento).

Ocupação: MERQUEADOR Código do Setor ou Sub-setor: 9

33-POSIÇÃO NA OCUPAÇÃO:

- ☐ 1) Trabalhador por Conta Própria ☐ 4) Proprietário
☒ 2) Empregado Temporário ☐ 5) Não se Aplica (Não Trabalha)
☐ 3) Empregado Permanente

34-MANTEVE CONTATO COM SUSPEITOS DE MALÁRIA NO ESTADO DE SÃO PAULO?

☒ 1) Sim
 nome e endereço _____
 nome e endereço _____
 nome e endereço _____

☐ 2) Não ☒ 3) Não Sabe

35-SERVIÇOS DE SAÚDE PROCURADOS NO ESTADO (Anteriores a Notificação do Caso)

014 Unidade de Saúde da Família - UBS / 15/08/03
 Código _____ Nome do Serviço _____ Data _____
 do _____ Nome do Serviço _____ Data _____
 Serviço _____ Nome do Serviço _____ Data _____

36-LOCAL PROVÁVEL DE INFECÇÃO: Município: Francisco Localidade: Francisco37-CÓDIGO DO MUNICÍPIO: 0936 38-CÓDIGO DO ESTADO: 03 39-OUTRO PAÍS: _____40-CLASSIFICAÇÃO DO CASO: ☐ 1) Autóctone ☐ 2) Introduzido ☐ 3) Induzido ☒ 4) Importado ☐ 5) Recaído

TEXTO: (Consultar o Manual de Instruções de Preenchimento)

Paciente é residente em São Paulo, com 218
 Anos, nascido em (mãe) nascida em São Paulo
 orubor para o do País, nasceu em 189 de
 município de São Paulo, nasceu em 189 de
 ônibus não mais
 (viagem 21 resg. São Paulo no País 113)

FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE MALARIA.

- IDENTIFICAÇÃO DA FICHA
 1-SR: 01 SETOR DPE 2-Nº DA INVESTIGAÇÃO: 001.919.3
 3-DATA DA NOTIFICAÇÃO: 1.4.10.19.3 4- SEMANA EPIDEMIOLÓGICA: 002
 5-ÓRGÃO NOTIFICANTE: ☐ 1 CS/POSTO DE SAÚDE ☒ 2 PRONTO SOCORRO/HOSPITAL
☐ 3 MÉDICO PARTICULAR ☐ 4 SUCEN
☐ 5 OUTROS AMBULATÓRIOS
 6-TIPO DE BUSCA: ☒ 1 BP ☐ 2 BA PREVENTIVA ☐ 3 BA CONTROLE DE FOCO

I- IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE
 NOME: HELENI TEREZINHA DOS SANTOS
 7-SEXO: ☐ 1 MASCULINO ☒ 2 FEMININO
 8-GRAVIDEZ: ☐ 1 SIM ☒ 2 NÃO ☐ 3 NÃO SE APLICA
 9-IDADE: ☐ 1 37 (MAIORES DE 1 ANO) ☐ 2 99 (MENORES DE 1 ANO)
 ENDEREÇO: R. CACILDA CASTANHO DE ANDRADE - 103 - BUTANTÁ
 TELEFONE: 819-1082 MUNICÍPIO: SP ESTADO: SP
 10-CÓDIGO DO ESTADO E MUNICÍPIO: 001503 SUS-R: 001
 (SE EM TRÂNSITO NO EST. DE SÃO PAULO) ENDEREÇO: _____
 TELEFONE: _____ MUNICÍPIO: _____ SUS-R: 999
 NOME DA MÃE: MARIA ALCIDES RIBEIRO DOS SANTOS

II- INFORMAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS
 11-SINTOMAS: ☒ 1 FEBRE ☐ 2 DIARRÉIA ☐ 3 DOR DE CABEÇA ☐ 4 FALTA DE APETITE ☐ 5 SEM RESPOSTA
☐ 6 NÁUSEAS ☐ 7 CALAFRIO ☐ 8 DOR MUSCULAR ☐ 9 MAL ESTAR
☐ 10 VÔMITO ☒ 11 DOR LOMBAR ☐ 12 DOR ARTICULAR ☐ 13 OUTROS
☐ 14 SUDORESE ☒ 15 DOR NA NUCA ☐ 16 DOR ABDOMINAL ☐ 17 ASSINTOMÁTICO
 12-DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: 10.1.9.3
 13-DATA DA COLETA: 1.4.10.19.3 14-DATA DO EXAME: 1.4.10.19.3
 15-ESPÉCIE DE PLASMÓDIO: ☐ 1 vivax ☒ 2 falciparum ☐ 3 malariae ☐ 4 ovale ☐ 5 associado
 16-DENSIDADE: ☐ 1 +/2 ☐ 2 + ☐ 3 ++ ☐ 4 +++ ☒ 5 NÃO SE APLICA
 17-FORMAS ASSEXUADAS: 7.7.7.7.7.7 18-FORMAS SEXUADAS: 0.0.2.4.0
 19-DATA DO INÍCIO DO TRATAMENTO: 1.4.10.19.3
 20-MEDICAÇÃO UTILIZADA:
☐ 1 CLOROQUINA (ARALEN) ☐ 2 SULFATO DE QUININO ☐ 3 DOXICICLINA (VIBRAMICINA)
☐ 4 AMODIAQUINA (CAMOQUIN) ☐ 5 CLORIDRATO DE QUININO ☒ 6 MEfloQUINA (LARIAMAR)
☐ 7 PRIMAQUINA ☐ 8 TETRACICLINA ☐ 9 SEM RESPOSTA
☐ 10 CLINDAMICINA (DALACIN-C) ☒ 11 OUTROS ANTIMALÁRICOS: ARTESUNATO
 21-DESTINO DO PACIENTE: ☐ 1 AMBULATÓRIO ☒ 2 HOSPITAL
 QUAL? H. UNIVERSITÁRIO TEMPO DE INTERNAÇÃO: 24 DIAS
 22-EVOLUÇÃO DO CASO: ÓBITO? ☒ 1 NÃO ☐ 2 SIM DATA: 9.9.9.9.9.9

IV- INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS
 23-MALÁRIA ANTERIOR - ESPÉCIE DE PLASMÓDIO: ☐ 1 vivax ☐ 2 falciparum ☐ 3 malariae ☐ 4 ovale
☐ 5 ASSOCIADO ☐ 6 NÃO SABE ☒ 7 NÃO TEVE
 24-HÁ QUANTO TEMPO? 0.0 MESES MEDICAMENTOS UTILIZADOS: _____
 25-DIAGNÓSTICO: ☐ 1 SUCEN ☐ 2 SUCAM ☐ 3 OUTROS ☐ 4 NÃO FEZ EXAME
 SE ☐ 1 Nº DA FICHA: 99.99.99.9
 26-Nº DE MALÁRIAS ANTERIORES: 0.0
 27-MEDIDAS PROFILÁTICAS UTILIZADAS DURANTE O PERÍODO DE EXPOSIÇÃO: ☐ 1 SIM ☒ 2 NÃO
 QUAIS? _____
 28-RECEBEU TRANSFUSÃO DE SANGUE NOS ÚLTIMOS 6 MESES? ☐ 1 SIM ☒ 2 NÃO
 ONDE? _____ DATA: 9.9.9.9.9.9
 ONDE? _____ DATA: 9.9.9.9.9.9
 29-DOOU SANGUE NOS ÚLTIMOS 6 MESES? ☐ 1 SIM ☒ 2 NÃO
 ONDE? _____ DATA: 9.9.9.9.9.9
 30-É USUÁRIO DE DROGA INJETÁVEL? ☐ 1 SIM ☒ 2 NÃO

MOTIVO DO DESLOCAMENTO PARA A ÁREA DE EXPOSIÇÃO À DOENÇA.

(1) A SERVIÇO ☒ LAZER
 (2) A PROCURA DE TRABALHO ☒ NÃO SE APLICA (NÃO SE DESLOCOU)
 (3) OUTRO MOTIVO: ()

SECTOR OU SUB-SECTOR DE ATIVIDADE ECONÔMICA ONDE ESTÁ INSERIDA A OCUPAÇÃO DESEMPENHADA PELO PACIENTE DURANTE O PERÍODO EM QUE CONTRAIU A DOENÇA (ANOTAR O Nº DE CÓDIGO QUE CONSTA NO MANUAL DE INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO).

OCUPAÇÃO LAZER CÉDULA DO SETOR OU SUB-SECTOR 000

POSICÃO NA OCUPAÇÃO: (1) TRABALHADOR POR CONTA PRÓPRIA (4) PROFISSIONÁRIO
 (2) EMPREGADO TEMPORÁRIO ☒ NÃO SE APLICA
 (3) EMPREGADO PERMANENTE

4-MOTIVO DO DESLOCAMENTO PARA O ESTADO DE SÃO PAULO:

(1) RETORNO A RESIDÊNCIA (6) OUTRO TRATAMENTO DE SAÚDE
 (2) FIXAR RESIDÊNCIA (7) LAZER
 (3) A SERVIÇO (8) NÃO SE APLICA (NÃO SE DESLOCOU)
 (4) A PROCURA DE TRABALHO (9) OUTRO MOTIVO: ()
 (5) TRATAMENTO DE MALÁRIA

35-MANTEVE CONTATO COM SUSPEITOS DE MALÁRIA NO ESTADO DE SÃO PAULO?

(1) SIM ()
 (2) NÃO (3) NÃO SABE

36-SERVIÇO DE SAÚDE PROCURADOS NO ESTADO (ANTERIORES A NOTIFICAÇÃO DO CASO)

CÓDIGO DO SERVIÇO: 04 4. UNIVERSITÁRIO 109101193
99 9.9 9999999
99 9.9 9999999

37-LOCAL PROVÁVEL DE INFECÇÃO. LOCALIDADE: ALTA FLORESTA / MT
 MUNICÍPIO O MESMO 38-CÓDIGO DO ESTADO E MUNICÍPIO: 06003

39-OUTRO PAÍS: ()

40-CLASSIFICAÇÃO DO CASO: (1) AUTÓCTONE (2) INTRODUZIDO (3) INDUZIDO ☒ IMPORTADO (5) RECALDA

TEXTO: (CONSULTAR O MANUAL DE INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO).

Reside em SP, em 16/12/92 viajou para o município de Alta Floresta (MT) a passeio, em casa de parentes.

Durante o período em que lá esteve, foi visitar duas fazendas de gado. Uma próxima ao rio Banha na ± perto de Apiacas "Estância Overnei" e a outra em Alta Floresta "Estância Angélica".

Permaneceu até o dia 04/01/93 retornando p/ São Paulo.

Internou no Hosp. Universitário dia 09/01/93. (!?) -> NOTIFICAÇÃO DIA 16/01/93

Investigado 28/01

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS
SUCEN

FICHA Nº 665-88

DIRETORIA DE COMBATE A VETORES

NOME UBIRAJARA RIBEIRO DA SILVA IDADE 41 SEXO MASC.

RESPONSÁVEL _____ INV. EPID. Nº _____

RESIDÊNCIA _____ BAIRRO _____

MUNICIPIO _____ CEP _____ TELEFONE _____

EXAME DE SANGUE

PESQUISA E CONTAGEM DE PLASMÓDIOS

DATA	FORMAS POR mm ³						MICROSCOPISTA
	P. VIVAX		P. FALCIPARUM		P. MALARIAE		
	F. ASSEXUADOS	GAMETOCITOS	F. ASSEXUADOS	GAMETOCITOS	F. ASSEXUADOS	GAMETOCITOS	
20-9-88			MC CONTAVEIS (ESQUIZANTES)				CHRISTINA.
20-10-88			MC CONTAVEIS				Sandra
26-10-88			neg.	1.440			Sandra
28.09.11			neg.	2.880			Olana
12-10-88			neg.	neg.			CHRISTINA.
26-10-88			neg.	—			Sandra
13.01.89			neg.	—			Olana

ESQUEMA DE TRATAMENTO

DIAS DE MEDICAÇÃO	
MÊS	
9	1
	2
	3
	4
	5
	6
	7
	8
	9
	10
	11
	12
	13
	14
	15
	16
	17
	18
	19
	20
	21
	22
	23
	24
	25
	26
	27
	28
	29
	30
	31

LEGENDA

ARALEM	—	AR
CAMOQUIM	—	CA
FANSIDAR	—	FS
PRIMAQUINA	—	PI
SULF. QUININO	—	QQ
TETRACICLINA	—	TT
OUTROS		

OBS.: Intenda no HER p/ tempo hi

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUCEN
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS

FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE MALÁRIA

S.R. 1 N.º da Investigação 665/88 Data da Notificação 20, 9, 88
 Notificante SUCEN Município S. Paulo

1. IDENTIFICAÇÃO
 Nome do Paciente: UBIRACARIBEIRO da SILVA
 Sexo M Idade 41 Natural de GOIACABA Estado GP
 Ocupação: grunheiro Nome e endereço da Empresa onde Trabalha: _____
 Nome do Pai ou Responsável: DARIA GALVÃO da SILVA

2. RESIDÊNCIA ATUAL (EM TRÂNSITO ☐ SIM ☒ NÃO)
 Endereço: R. Vitorino Justino, 390 Bairro Butantan
 Município S. Paulo Telefone 211 41 43 Tempo de residência: desde 1-1-73

3. SINTOMAS APRESENTADOS DESTA DOENÇA
 Febre ☒ Não ☐ data de início 12, 9, 88 Dor de Cabeça ☐ SIM ☒ data de início 12, 9, 88
 Outros Sintomas: fraqueza, lombalgia data de início 12, 9, 88

4. PRECEDENTES
 Teve Malária Anteriormente? ☐ SIM ☒ NÃO Quando? ____/____/____ Espécie _____
 Foi medicado na Oportunidade? ☐ SIM ☒ NÃO nome(s) do(s) medicamento(s) _____
 Em uso de Medicação Profilática? ☐ SIM ☒ NÃO Quais? _____

5. TRANSFERÊNCIAS DE SANGUE NOS ÚLTIMOS 6 MESES
 Recebido? ☐ SIM ☒ NÃO Local: _____ Data: ____/____/____
 Doou? ☐ SIM ☒ NÃO Local: _____ Data: ____/____/____

6. DESLOCAMENTO DO DOENTE NO MOMENTO NOS ÚLTIMOS 12 MESES, PERIODANDO OU NÃO FORA DA LOCALIDADE ONDE RESIDE

OBSERVAÇÃO SEQUENTE ROTEIRO DE PERGUNTAS, AO PACIENTE: 1. DATAS DE SÍMPTOMAS; 2. MOTIVO DA VIAGEM; 3. MUNICÍPIOS E LOCALIDADES PARA ONDE SE DESLOCOU; 4. TEMPO DE PERMANÊNCIA EM CADA LOCALIDADE; 5. NO MOMENTO E ANOS DE REINGRESSO NO ESTADO DE SÃO PAULO, QUE MEIOS DE TRANSPORTE E VIAS DE ACESSO UTILIZOU; 6. DATA DE CHEGADA AO ESTADO; 7. MUNICÍPIOS EM QUE PERNOITOU APÓS O REINGRESSO NO ESTADO E ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO; 8. DATA DE CHEGADA AO MUNICÍPIO EM QUE RESIDE OU ESTÁ APOSENTADO; 9. DESLOCAMENTOS APÓS A CHEGADA NO LOCAL DE RESIDÊNCIA ATÉ O INÍCIO DO TRATAMENTO.

Saiu de S. Paulo em 14/8/88 c/ destino a Guarani Mirim - RO no grupo do Michael p/ grunheiro. Em 12/9/88 iniciou c/ sintomas de malária e foi p/ a localidade de Mutum - RO e diagnosticado e medicado p/ malária por P. vivax, s/ melhora dos sintomas. Deslocou-se p/ Ponto Velho - RO e em 16/9/88 veio p/ S. Paulo, de ônibus, direto, c/ finalidade de tratamento. Não teve, teve desdobramentos da capital.

7. CONTATOS COM CASOS DE MALARIA OU SUSPEITOS NOS ÚLTIMOS 6 MESES? Sim ☒ Não ☐

No Estado de São Paulo ☐ Em Outros Estados ☐ Acompanhantes ☐

nome Machado (Guayma Mirim - RO) município Guayma estado RO

nome Guayma município Guayma estado RO

nome Guayma município Guayma estado RO

8. ATENDIMENTOS MÉDICOS

Procurou algum serviço de saúde no Estado de São Paulo? Sim ☒ Não ☐

Qual? 1. _____ Data ____/____/____

2. _____ Data ____/____/____

3. _____ Data ____/____/____

Como soube da SUCEN? Médico Amigo da família

9. INFORMAÇÕES LABORATORIAIS

Laboratório SRL Tipo de Busca _____

Município S. Paulo Data da Coleta 20.9.88 Data do Exame 20.9.88

Responsável pelo Diagnóstico Christina

Resultado (espécie de plasmodio) P. falciparum

Contagem (P. falciparum) formas assexuadas incontáveis formas sexuais _____

Densidade (demais espécies) _____

10. GESTÃO DO PACIENTE

Ambulatório Sim ☐ Não ☒ Qual? _____

Hospitalização Sim ☒ Não ☐ Qual? HER

Motivo da internação Alta Parasitemia

11. TRATAMENTO

Data do início 20.9.88

medicação _____ doses _____

12. APERECIÇÃO DO CASO

Local provável da infecção: Estado RO Município Guayma

Localidade garimpo do Machado Fase Alta

Classificação do Caso Autóctone ☐ Introduzido ☐ Importado ☒ Induzido ☐ Recado ☐

OBSERVAÇÕES

Isolado FA (+)

fo m/h'ia

STABAL/PIN (nome e função)

Cm 54002

REVISADO POR (nome e função)

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

O SUCEN - Superintendência de
Controle de endemias

Ubirajara Ribeiro da Silva

Ptá deu entrada neste hospital,
dia 26/05 com diagnóstico de forma
grave de malária - *P. falciparum*.

Introdução: impulsão diagnóstico de
queimado (EU) 500 mg, 8/8 h) + tetrazol
cino (V) 500 mg, 8/8 h). No 1º lôman,
apresentou invertebrados anéis de *P. falciparum*.

Evolution com piore do quadro clínico
e laboratório e dia 25/05 foi transfundo
para UTI (os os quadro clínico,
aquele de plasma - 86.000 e temo 57 e
crescimento = 2,0). Permanece na UTI até 25/05,
quando veio de cloridato de queimado +
clindamicina. Evolution bem, com normalização
do quadro hemodinâmico e renal. Dia 27/05
→ Vem no 1440 apresenta gemetização e anem
e 100 de anéis. Supremo clindamicina e permanece

IMPRESSA OFICIAL DO ESTADO

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

com suspeita queimado, 20, até compê
to ent pr maquim, 30 ps, 20, de de unice.

Permanece no o paciente, lôman
realização de lôman de controle e em
de de invertebrados.

Obs: inome, De Berle

Quintana
28/05/61

IMPRESSA OFICIAL DO ESTADO

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

SUCEN

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS

HEMOSCOPIA DE MALÁRIAS.R.: 01Setor: D.P.E.Laboratório de: MaláriaFicha nº: 72 92NOME: ANDERSON DOMINGOS RINALDIIDADE: 18aSEXO: Masc.

RESPONSÁVEL: _____

INV. EPID. Nº: _____

RESIDÊNCIA: _____

BAIRRO: _____

MUNICÍPIO: _____

CEP: _____

TELEFONE: _____

PESQUISA E CONTAGEM DE PLASMÓDIOS

DATA	FORMAS POR mm ³						REALIZADO POR
	P. VIVAX		P. FALCIPARUM		OUTROS		
	F. ASSEXUADAS	GAMETÓCITOS	F. ASSEXUADAS	GAMETÓCITOS	F. ASSEXUADAS	GAMETÓCITOS	
20.02.92			INCONTÁVEIS	-			ALARIPE
24-2-92			neg.	-			CHRISTINA
05-3-92			neg.	-			SAMARA
12-3-92			24.720	-	(Reinvasculose)		CHRISTINA
19-3-92			neg.	-			CHRISTINA
20-3-92			neg.	-			SAMARA
21-5-92			neg.	-			CHRISTINA
01.02.93	+	+	neg.	-			CHRISTINA
15-02-93	neg.	neg.	-	-			CHRISTINA

ESQUEMA DE TRATAMENTO

1992 MÊS	DIAS DE MEDICAÇÃO																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
03										MF 4																					
04	4	3	3																												
05	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

AMODIAQUINA-AM CLORIDRATO DE QUININO - CQ

OBS: Encaminhado ao HC

CLOROQUINA-CL SULFATO DE QUININO - QQ

PRIMAQUINA-PI TETRACICLINA-TT

MEFLOQUINA-MQ DOXICICLINA-DX

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

SUCEN

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS

FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE MALÁRIA.**I-IDENTIFICAÇÃO DA FICHA**1-SR: 101 SETOR: DPE 2-Nº DA INVESTIGAÇÃO: 100.7219.213-DATA DA NOTIFICAÇÃO: 12.01.02.19.21 4- SEMANA EPIDEMIOLÓGICA: 10085-ÓRGÃO NOTIFICANTE: ☐ 1 CS/POSTO DE SAÚDE ☒ 2 MÉDICO PARTICULAR ☒ 3 OUTROS AMBULATÓRIOS
SUCEN6-TIPO DE BUSCA: ☒ 1 BP ☐ 2 BA PREVENTIVA ☐ 3 BA CONTROLE DE FOCO**II-IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE**NOME: Anderson Domingos Rinaldi7-SEXO: ☒ 1 MASCULINO ☐ 2 FEMININO8-GRAVIDEZ: ☐ 1 SIM ☐ 2 NÃO ☒ 3 NÃO SE APLICA9-IDADE: ☐ 1 1.8 (MAIORES DE 1 ANO) ☐ 2 99 (MENORES DE 1 ANO)ENDERÇO: Rua Carmen Miranda, 427 Jd. Sonia MariaTELEFONE: 4133401 MUNICÍPIO: maua ESTADO: SP10-CÓDIGO DO ESTADO E MUNICÍPIO: 00296 SUS-R: 010(SE EM TRÂNSITO NO EST. DE SÃO PAULO) ENDERÇO: /TELEFONE: / MUNICÍPIO: / SUS-R: 999NOME DA MÃE: Aprouda Elisabeth Rinaldi**III-INFORMAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS**11-SINTOMAS: ☒ 1 FEBRE ☐ 2 DIARRÉIA ☒ 3 DOR DE CABEÇA ☒ 4 FALTA DE APETITE ☐ 5 SEM RESPOSTA
☒ 6 NÁUSEAS ☒ 7 CALAFRIO ☐ 8 DOR MUSCULAR ☒ 9 MAL ESTAR
☒ 10 VÔMITO ☒ 11 DOR LOMBAR ☐ 12 DOR ARTICULAR ☐ 13 OUTROS
☒ 14 SUDORESE ☐ 15 DOR NA NUCA ☐ 16 DOR ABDOMINAL ☐ 17 ASSINTOMÁTICO12-DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: 11.8.10.219.2113-DATA DA COLETA: 12.01.02.19.21 14-DATA DO EXAME: 12.01.02.19.2115-ESPÉCIE DE PLASMÓDIO: ☐ 1 vivax ☒ 2 falciparum ☐ 3 malariae ☐ 4 ovale ☐ 5 associado16-DENSIDADE: ☐ 1 +/2 ☐ 2 + ☐ 3 ++ ☐ 4 +++ ☒ 5 NÃO SE APLICA17-FORMAS ASSEXUADAS: 1.7.7.7.7.7 18-FORMAS SEXUADAS: 0.0.0.0.019-DATA DO INÍCIO DO TRATAMENTO: 12.01.02.19.21

20-MEDICAÇÃO UTILIZADA:

☐ 1 CLOROQUINA (ARALEN) ☐ 2 AMODIAQUINA (CAMOQUIN) ☐ 3 PRIMAQUINA ☐ 4 SULFATO DE QUININO ☐ 5 CLORIDRATO DE QUININO ☐ 6 TETRACICLINA ☐ 7 DOXICICLINA (VIBRAMICINA) ☐ 8 MEFLOROQUINA (LARIAMAR) ☐ 9 SEM RESPOSTA23-MALÁRIA ANTERIOR - ESPÉCIE DE PLASMÓDIO: ☐ 1 vivax ☐ 2 falciparum ☐ 3 malariae ☐ 4 ovale☒ 5 ASSOCIADO ☐ 6 NÃO SABE ☐ 7 NÃO TEVE24-HÁ QUANTO TEMPO? 0.2 MESES MEDICAMENTOS UTILIZADOS: Primaquina + Palasana + Cloroquina25-DIAGNÓSTICO: ☐ 1 SUCEN ☐ 2 SUCAM ☒ 3 OUTROS ☐ 4 NÃO FEZ EXAMESE ☐ 1 Nº DA FICHA: 99.9.9.9.926-Nº DE MALÁRIAS ANTERIORES: 0.327-MEDIDAS PROFILÁTICAS UTILIZADAS DURANTE O PERÍODO DE EXPOSIÇÃO: ☐ 1 SIM ☒ 2 NÃO

QUAIS?

28-RECEBEU TRANSFUSÃO DE SANGUE NOS ÚLTIMOS 6 MESES? ☐ 1 SIM ☒ 2 NÃO

31-MOTIVO DO DESLOCAMENTO PARA A ÁREA DE EXPOSIÇÃO À DOENÇA.

☐ 1) A SERVIÇO ☐ 4) LAZER

☐ 2) A PROCURA DE TRABALHO ☐ 5) NÃO SE APLICA (NÃO SE DESLOCOU)

☒ 3) FIXAR RESIDÊNCIA ☐ 6) OUTRO MOTIVO: _____

32- SETOR OU SUB-SETOR DE ATIVIDADE ECONÔMICA ONDE ESTÁ INSERIDA A OCUPAÇÃO DESEMPENHADA PELO PACIENTE DURANTE O PERÍODO EM QUE CONTRAIU A DOENÇA. (ANOTAR O Nº DE CÓDIGO QUE CONSTA NO MANUAL DE INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO).

OCUPAÇÃO: Garimpeiro CÓDIGO DO SETOR OU SUB-SETOR: 02

33- POSIÇÃO NA OCUPAÇÃO: ☒ TRABALHADOR POR CONTA PRÓPRIA ☐ 4) PROPRIETÁRIO

☐ EMPREGADO TEMPORÁRIO ☐ 5) NÃO SE APLICA

☐ 3) EMPREGADO PERMANENTE

34-MOTIVO DO DESLOCAMENTO PARA O ESTADO DE SÃO PAULO:

☐ 1) RETORNO A RESIDÊNCIA ☐ 6) OUTRO TRATAMENTO DE SAÚDE

☐ 2) FIXAR RESIDÊNCIA ☐ 7) LAZER

☐ 3) A SERVIÇO ☐ 8) NÃO SE APLICA (NÃO SE DESLOCOU)

☒ 4) A PROCURA DE TRABALHO ☐ 9) OUTRO MOTIVO: Muitos casos de malária

☐ 5) TRATAMENTO DE MALÁRIA

35-MANTEVE CONTATO COM SUSPEITOS DE MALÁRIA NO ESTADO DE SÃO PAULO?

☒ SIM (FIE 73/92 (IRMÃ))

(NOME/ENDEREÇO) _____

(NOME/ENDEREÇO) PAI E IRMÃO JÁ TRIADOS

(NOME/ENDEREÇO) _____

NÃO ☐ 3) NÃO SABE

36-SERVIÇO DE SAÚDE PROCURADOS NO ESTADO (ANTERIORES A NOTIFICAÇÃO DO CASO)

CÓDIGO DO SERVIÇO: 04 Ponto Socorro de Nave 1.1.9.0.2.6.4

99 99 99 99 99 99 99 99 99 99

37-LOCAL PROVÁVEL DE INFECÇÃO: LOCALIDADE: Pto de Areia (Garimpo)

MUNICÍPIO: Paranaita MT 38-CÓDIGO DO ESTADO E MUNICÍPIO: 060.62

39-OUTRO PAÍS: _____

40-CLASSIFICAÇÃO DO CASO: ☐ 1) AUTÓCTONE ☐ 2) INTRODUZIDO ☐ 3) INDUZIDO ☒ 4) IMPORTADO ☐ 5) RE-ATUA

TEXTO: (CONSULTAR O MANUAL DE INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO).

Paciente relata estar no Pto Grosso desde 1988 tendo vindo em agricultura, sendo que depois (paciente relata 4 anos) iniciou trabalho na área de garimpo no cípio de Paranaita. Relata ter vindo embora da época pois existia muitos casos de malária e muito mau.

Modificação H. Associado
em 01.02.93 (Priva)
Início dos sintomas
em 28/01/93.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS
SUCEN

FICHA Nº 161-88

DIRETORIA DE COMBATE A VETORES

NOME Luciene Pinheiro Gouveia IDADE 25 SEXO M
RESPONSÁVEL _____ INV. EPID. Nº _____
RESIDÊNCIA _____ BAIRRO _____
MUNICÍPIO _____ CEP _____ TELEFONE _____

EXAME DE SANGUE
PESQUISA E CONTAGEM DE PLASMÓDIOS

[illegible]

ADD. ME - 34

ESQUEMA DE TRATAMENTO

[illegible]

LEGENDA

ARALEM	—	AR
CAMOQUIM	—	CA
FANSIDAR	—	FS
PRIMAQUINA	—	PI
SULF. QUININO	—	QQ
TETRACICLINA	—	TT
OUTROS		

OBS : _____

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUCENFICHA DE
INVESTIGAÇÃO DE MALÁRIA

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS

SR. 01 N.º da Investigação 161/88 Data da Notificação 02 / 02 / 88
Notificante SUCEN Município _____

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome do Paciente: Luciene Pinheiro Gouveia
Sexo M Idade 25 Natural de Bela Vista do Paraíso Estado Paraná
Ocupação: _____ Nome e endereço da Empresa onde Trabalha: _____Nome do Pai ou Responsável: João Rodrigues Gouveia - Maria de Lourdes Pinheiro Gouveia2. RESIDÊNCIA ATUAL (EM TRANSITO SIM ☐ NÃO ☒)Endereço Rua melina 33 Bairro Fátima Gonzaga
Município Fátima Telefone _____ Tempo de residência desde 1 / 1 / 82

3. SINTOMAS APRESENTADOS NESTE ATAQUE

Febre Sim ☒ Não ☐ data do início 30 / 01 / 88 Dor de Cabeça Sim ☒ Não ☐ data do início 30 / 01 / 88
Outros Sintomas Dor no corpo data do início 30 / 01 / 88

4. ANTECEDENTES

Teve Malária Anteriormente? Sim ☒ Não ☐ Quando? 30 / 01 / 88 Espécie P. falciparum (SUCEN)
Foi Medicado na Oportunidade? Sim ☒ Não ☐ nome(s) dos medicamentos não recorda
Faz uso de Medicação Profilática? Sim ☐ Não ☒ Quais? _____

5. TRANSFUSÕES DE SANGUE NOS ÚLTIMOS 6 MESES?

Recebeu? Sim ☐ Não ☒ Local _____ Data _____
Doou? Sim ☐ Não ☒ Local _____ Data _____

6. MOVIMENTAÇÃO DO DOENTE (NO MÍNIMO NOS ÚLTIMOS 12 MESES, PERMITINDO OU NÃO FORA DA LOCALIDADE ONDE RESIDE)

OBSERVAR O SEQUINTE ROTEIRO DE PERGUNTAS, AO PACIENTE: 1. DATA DE SAÍDA; 2. MOTIVO DA VIAGEM; 3. MUNICÍPIOS E LOCALIDADES PARA ONDE SE DIRIGIU; 4. TEMPO DE PERMANÊNCIA EM CADA LOCALIDADE; 5. NO MOMENTO E APÓS O REINGRESSO NO ESTADO DE SÃO PAULO, QUE MEIOS DE TRANSPORTE E VIAS DE ACESSO UTILIZOU; 6. DATA DE CHEGADA NO ESTADO; 7. MUNICÍPIOS EM QUE PERNOITOU APÓS O REINGRESSO NO ESTADO E ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO; 8. DATA DE CHEGADA AO MUNICÍPIO EM QUE RESIDE OU ESTÁ HOSPEDADO; 9. DESLOCAMENTOS APÓS A CHEGADA NO LOCAL DE RESIDÊNCIA ATÉ O INÍCIO DO TRATAMENTO.

- Saiu de Fátima dia 17/12/87, com destino a Aniquemes (sitio localizado a 4km da cidade BR 21) para visitar parentes e conhecer o local para trabalhar.
- Sua 16/03/88 foi até a cidade Aniquemes onde foi diagnosticado e tratado pela SUCEN.
- Saiu de lá com destino a São Paulo no dia 15/01/88 chegando no estado dia 18/01/88 de ônibus por Presidente Prudente.
- Permaneceu no município de residência até _____ data.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

SUCEN

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS

FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE MALÁRIA.

I-IDENTIFICAÇÃO DA FICHA

1-SR: 01 SETOR: SUCEN 2-Nº DA INVESTIGAÇÃO: 0291190
 3-DATA DA NOTIFICAÇÃO: 04105190 4- SEMANA EPIDEMIOLÓGICA: 183
 5-ÓRGÃO NOTIFICANTE: ☒ CS/POSTO DE SAÚDE ☐ PRONTO SOCORRO/HOSPITAL
☐ MÉDICO PARTICULAR ☒ SUCEN
☐ OUTROS AMBULATÓRIOS
 6-TIPO DE BUSCA: ☒ BP ☐ BA PREVENTIVA ☐ BA CONTROLE DE FOCO

II-IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

NOME: JOSE ARIMATEIA OLIVEIRA
 7-SEXO: ☒ MASCULINO ☐ FEMININO
 8-GRAVIDEZ: ☐ SIM ☐ NÃO ☒ NÃO SE APLICA
 9-IDADE: 12,0 (MAIORES DE 1 ANO) 9,9 (MENORES DE 1 ANO)
 ENDEREÇO: R. FRANCISCO ZANZINI N: 55 CASA 12
 TELEFONE: 9400066 MUNICÍPIO: GUARULHOS ESTADO: S.P.
 10-CÓDIGO DO ESTADO E MUNICÍPIO: 00190 SUS-R: 015
 (SE EM TRÂNSITO NO EST. DE SÃO PAULO) ENDEREÇO: mesmo
 TELEFONE: mesmo MUNICÍPIO: mesmo SUS-R: 999
 NOME DA MÃE: RAIMUNDO LOPEZ DO OLIVEIRA

III-INFORMAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS

11-SINTOMAS: ☒ FEBRE ☐ DIARREIA ☒ DOR DE CABEÇA ☐ FALTA DE APETITE ☐ SEM RESPOSTA
☐ NÁUSEAS ☒ CALAFRIO ☒ DOR MUSCULAR ☐ MAL ESTAR
☐ VÔMITO ☐ DOR LOMBAR ☐ DOR ARTICULAR ☐ OUTROS
☒ SUDORESE ☒ DOR NA NUCA ☒ DOR ABDOMINAL ☐ ASSINTOMÁTICO

12-DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: 0210419013-DATA DA COLETA: 0410519014-DATA DO EXAME: 0410519015-ESPÉCIE DE PLASMÓDIO: ☒ vivax ☐ falciparum ☐ malariae ☐ ovale ☐ associado16-DENSIDADE: ☐ 1+/2 ☒ + ☐ 3++ ☐ 4+++ ☐ NÃO SE APLICA17-FORMAS ASSEXUADAS: 999999918-FORMAS SEXUADAS: 999999919-DATA DO INÍCIO DO TRATAMENTO: 04105190

20-MEDICAÇÃO UTILIZADA:

☒ CLOROQUINA (ARALEN) ☐ SULFATO DE QUININO ☐ DOXIGICLINA (VIBRAMICINA)
☐ AMODIAQUINA (CAMOQUIN) ☐ CLORIDRATO DE QUININO ☐ MEFLOROQUINA (LARIAMAR)
☒ PRIMAQUINA ☐ TETRACICLINA ☐ SEM RESPOSTA
☐ CLINDAMICINA (DALACIN-C) ☐ OUTROS ANTIMALÁRICOS: _____

21-DESTINO DO PACIENTE: ☐ AMBULATÓRIO ☒ HOSPITALQUAL? Emílio RibasTEMPO DE INTERNAÇÃO 1 DIAS22-EVOLUÇÃO DO CASO: ÓBITO? ☒ NÃO ☐ SIM DATA: 999999

IV-INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

23-MALÁRIA ANTERIOR - ESPÉCIE DE PLASMÓDIO: ☐ vivax ☒ falciparum ☐ malariae ☐ ovale
☐ ASSOCIADO ☐ NÃO SABE ☐ NÃO TEVE

24-HÁ QUANTO TEMPO? 0,2 MESES MEDICAMENTOS UTILIZADOS: PRIMAQUINA + OUTRO25-DIAGNÓSTICO: ☐ SUCEN ☒ SUCAM ☐ OUTROS ☐ NÃO FEZ EXAMESE ☐ Nº DA FICHA: 99999926-Nº DE MALÁRIAS ANTERIORES: 0,327-MEDIDAS PROFILÁTICAS UTILIZADAS DURANTE O PERÍODO DE EXPOSIÇÃO: ☐ SIM ☒ NÃO

QUAIS? _____

28-RECEBEU TRANSFUSÃO DE SANGUE NOS ÚLTIMOS 6 MESES? ☐ SIM ☒ NÃO

ONDE? _____

DATA: 999999

ONDE? _____

DATA: 000000

01-MOTIVO DO DESLOCAAMENTO PARA A ÁREA DE EXPOSIÇÃO À DOENÇA:

[] A) LAZER [] OUTRO MOTIVO: _____

☒ B) EXERCÍCIO DE TRABALHO [] NÃO SE APLICA (NÃO SE DESLOCOU)

[] TERCEIRA RESIDÊNCIA [] OUTRO MOTIVO: _____

32-CLASSE OU SUB-SETOR DE ATIVIDADE ECONÔMICA ONDE ESTÁ INSCRITA A OCUPAÇÃO DESEMPENHADA PEL
YE EM CASO O TRABALHADOR QUE CONTRAIU A DOENÇA (ANOTAR O GRUPO QUE CONSTA NO MANUAL
DE CLASSIFICAÇÃO DE PROFISSIONISTAS).

Ocupação: 6810100 CÓDIGO DO SETOR OU SUB-SETOR: 02

33-POSICÃO NA OCUPAÇÃO: ☒ RAPALHADOR POR CONTA PRÓPRIA [] PROPRIETÁRIO

[] EMPREGADO TEMPORÁRIO [] NÃO SE APLICA

[] EMPREGADO PERMANENTE

34-MOTIVO DO DESLOCAIMENTO PARA O ESTADO DE SÃO PAULO:

☒ RETORNAR À RESIDÊNCIA [] OUTRO TRATAMENTO DE SAÚDE

[] FIXAR RESIDÊNCIA [] LAZER

[] À SERVIÇO [] NÃO SE APLICA (NÃO SE DESLOCOU)

[] À PROCURA DE TRABALHO [] OUTRO MOTIVO: _____

[] TRATAMENTO DE MALÁRIA

35-MANTEVE CONTATO COM SUJEITOS DE MALÁRIA NO ESTADO DE SÃO PAULO?

[] SIM (_____) _____

(_____) _____

(_____) _____

☒ NÃO [] NÃO SABE

36-SERVIÇO DE SAÚDE PROCURADO NO ESTADO (ANTERIORES A NOTIFICAÇÃO DO CASO)

CÓDIGO DO SERVIÇO: 01 Posto Saúde URMED 15 600m 1- 999999

99 NOME DO SERVIÇO 999999

99 NOME DO SERVIÇO 999999

NOME DO SERVIÇO 999999

37-LOCAL PROVÁVEL DE INFECÇÃO: LOCALIDADE: AIA FAZENDA CACHIMBO

MUNICÍPIO: MATUPA - MT 38-CÓDIGO DO ESTADO E MUNICÍPIO: 061050

39-OUTRO PAÍS: _____

40-CLASSIFICAÇÃO DO CASO: [] SUSCETO [] INTERMEDIÁRIO [] INEQUÍVOCO ☒ IMPORTADO [] RECALDA

Paciente foi em janeiro /90 p/ Sta floresta (MT).
 onde ficou 1 dia indo p/ MATUPI onde
 permaneceu trabalhando até final março quando
 veio p/ S.P. Neste período refez
 Ter Tido 3 molárias
 MOTUPI → Trabalho fazendo cachimbo

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS
SUCEN

FICHA Nº 343-90

DIRETORIA DE COMBATE A VETORES

DIRETORIA DE COMBATE A VEICULOS

NOME José Luiz Pinheiro Mendes IDADE 37 SEXO M.

RESPONSÁVEL _____ INV. EPID. Nº _____

RESIDÊNCIA _____ BAIRRO _____

MUNICÍPIO _____ CEP _____ TELEFONE _____

EXAME DE SANGUE
PESQUISA E CONTAGEM DE PLASMÓDIOS

[illegible]

ESQUEMA DE TRATAMENTO

[illegible]

LEGENDA

ARALEM	—	AR
CAMOQUIM	—	CA
FANSIDAR	—	FS
PRIMAQUINA	—	PI
SULF. QUININO	—	QQ
TETRACICLINA	—	TT

OBS.: _____

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUCEN

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS

FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE MALÁRIA.

I-IDENTIFICAÇÃO DA FICHA

1-SR: 01 SETOR: São Paulo 2-Nº DA INVESTIGAÇÃO: 03.4390
3-DATA DA NOTIFICAÇÃO: 12.06.90 4- SEMANA EPIDEMIOLÓGICA: 024
5-ÓRGÃO NOTIFICANTE: ☐ CS/POSTO DE SAÚDE ☐ PRONTO SOCORRO/HOSPITAL
☒ MÉDICO PARTICULAR ☐ SUCEN
☒ OUTROS AMBULATÓRIOS
6-TIPO DE BUSCA: ☒ ABP ☐ BA PREVENTIVA ☐ BA CONTROLE DE FOCO

II-IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

NOME: Jose Luiz Inacio Mendes
7-SEXO: ☒ MASCULINO ☐ FEMININO
8-GRAVIDEZ: ☐ SIM ☒ NÃO ☒ NÃO SE APLICA
9-IDADE: ☐ 37 (MAIORES DE 1 ANO) ☒ 99 (MENORES DE 1 ANO)
ENDEREÇO: Rua Visconde de Pauaiba n.º 1316 Bras
TELEFONE: 2921022 MUNICÍPIO: São Paulo ESTADO: SP
10-CÓDIGO DO ESTADO E MUNICÍPIO: 0.050.3 SUS-R: 001
(SE EM TRÂNSITO NO EST. DE SÃO PAULO) ENDEREÇO: _____
TELEFONE: _____ MUNICÍPIO: _____ SUS-R: 999
NOME DA MÃE: Elisa da Silva Mendes

III-INFORMAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS

11-SINTOMAS: ☒ FEBRE ☒ DIARREIA ☒ DOR DE CABEÇA ☒ FALTA DE APETITE ☐ SEM RESPOSTA
☒ NÁUSEAS ☒ CALAFRIO ☒ DOR MUSCULAR ☐ MAL ESTAR
☒ VÔMITO ☒ DOR LOMBAR ☒ DOR ARTICULAR ☐ OUTROS
☒ SUDORESE ☒ DOR NA NUCA ☒ DOR ABDOMINAL ☐ ASSINTOMÁTICO

12-DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: 07.06.90

13-DATA DA COLETA: 12.06.90

14-DATA DO EXAME: 12.06.90

15-ESPÉCIE DE PLASMÓDIO: ☐ vivax ☒ falciparum ☐ malariae ☐ ovale ☐ associado

16-DENSIDADE: ☐ 1+/2 ☐ 2+ ☐ 3++ ☐ 4+++ ☒ NÃO SE APLICA

17-FORMAS ASSEXUADAS: 051.600

18-FORMAS SEXUADAS: 000.00

19-DATA DO INÍCIO DO TRATAMENTO: 12.06.90

20-MEDICAÇÃO UTILIZADA:

☐ CLOROQUINA (ARALEN) ☐ SULFATO DE QUININO ☐ DOXIGICLINA (VIBRAMICINA)
☐ AMODIAQUINA (CAMOQUIN) ☐ CLORIDRATO DE QUININO ☒ MEfloQUINA (LARIAMAR)
☐ PRIMAQUINA ☐ TETRACICLINA ☐ SEM RESPOSTA
☐ CLINDAMICINA (DALACIN-C) ☐ OUTROS ANTIMALÁRICOS: _____

21-DESTINO DO PACIENTE: ☒ AMBULATÓRIO ☐ HOSPITAL

QUAL? se 35

TEMPO DE INTERNAÇÃO 99 DIAS

22-EVOLUÇÃO DO CASO: ÓBITO? ☒ NÃO ☐ SIM DATA: 9.9.99.99

IV-INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

23-MALÁRIA ANTERIOR - ESPÉCIE DE PLASMÓDIO: ☐ vivax ☒ falciparum ☐ malariae ☐ ovale
☐ ASSOCIADO ☐ NÃO SABE ☐ NÃO TEVE

24-HÁ QUANTO TEMPO? 01 MESES MEDICAMENTOS UTILIZADOS: pp + tt

25-DIAGNÓSTICO: ☐ SUCEN ☒ SUCAM ☐ OUTROS ☐ NÃO FEZ EXAME

SE ☐ Nº DA FICHA: 99.99.99.99

26-Nº DE MALÁRIAS ANTERIORES: 0.2

27-MEDIDAS PROFILÁTICAS UTILIZADAS DURANTE O PERÍODO DE EXPOSIÇÃO: ☐ SIM ☒ NÃO
QUAIS? _____

28-RECEBEU TRANSFUSÃO DE SANGUE NOS ÚLTIMOS 6 MESES? ☐ SIM ☒ NÃO

ONDE? _____

DATA: 9.9.99.99

31- MOTIVO DO DESLOCAMENTO PARA A ÁREA DE EXPOSIÇÃO À DOENÇA:

☒ [1] A SERVIÇO ☐ [4] LAZER

☒ [2] A PROCURA DE TRABALHO ☐ [5] NÃO SE APLICA (NÃO SE DESLOCOU)

☐ [3] FIXAR RESIDÊNCIA ☐ [6] OUTRO MOTIVO: (_____)

32- SETOR OU SUB-SETOR DE ATIVIDADE ECONÔMICA ONDE ESTÁ INSCRITA A OCUPAÇÃO DESSEMPENHADA PELO PACIENTE DURANTE O PERÍODO EM QUE CONTRAIU A DOENÇA. (ANOTAR O Nº DE CUNHO QUE CONSTA NO MANUAL DE INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO).

Ocupação: fazendeiro CÓDIGO DO SETOR (OU SUB-SETOR): 02

33- POSIÇÃO NA OCUPAÇÃO: ☐ [1] TRABALHADOR POR CONTA PRÓPRIA ☐ [3] PROPRIETÁRIO

☒ [2] EMPREGADO TEMPORÁRIO ☐ [5] NÃO SE APLICA

☐ [4] EMPREGADO PERMANENTE

34- MOTIVO DO DESLOCAMENTO PARA O ESTADO DE SÃO PAULO:

☐ [1] RETORNO A RESIDÊNCIA ☐ [6] OUTRO TRATAMENTO DE SAÚDE

☐ [2] FIXAR RESIDÊNCIA ☐ [7] LAZER

☐ [3] A SERVIÇO ☐ [8] NÃO SE APLICA (NÃO SE DESLOCOU)

☐ [4] A PROCURA DE TRABALHO ☐ [9] OUTRO MOTIVO: (_____)

☒ [5] TRATAMENTO DE MALÁRIA

35- MANTEVE CONTATO COM SUSPEITOS DE MALÁRIA NO ESTADO DE SÃO PAULO?

☐ [1] SIM (_____) (NOME/ENDEREÇO _____)

(NOME/ENDEREÇO _____)

(NOME/ENDEREÇO _____)

☒ [2] NÃO ☐ [3] NÃO SABE

36- SERVIÇO DE SAÚDE PROCURADOS NO ESTADO (ANTERIORES A NOTIFICAÇÃO DO CASO)

CÓDIGO DO SERVIÇO: 03 ambulatorio de Dr. Romero foz D 1.240.619.0

99 nome do serviço 9999999

99 nome do serviço 9999999

37- LOCAL PROVÁVEL DE INFECÇÃO: LOCALIDADE: Fazenda de São do Carmo

MUNICÍPIO: Petropolis de Araras 38- CÓDIGO DO ESTADO E MUNICÍPIO: 06 065

39- OUTRO PAÍS: _____

40- CLASSIFICAÇÃO DO CASO ☐ [1] AUTÓCTONE ☐ [2] INTRODUZIDO ☐ [3] INDUZIDO ☒ [4] IMPORTADO ☐ [5] RECAÍDA

TEXTO: (CONSULTAR O MANUAL DE INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO).

Residência no Rio de Janeiro em 19
de março/90 veio por Mato Grosso
município de Petropolis de Araras
onde permaneceu até 04/06/90
trabalhando no fazendeiro de São
do Carmo no município de São Paulo
de Araras

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 8130900 - telefax : (55) (011) 818 7438

Comissão de Ética

São Paulo, 22 de julho de 1998.

REF.: PARECER 013/CEP

Prezado Professor,

Em sua quarta reunião, realizada no dia 08 de julho p.p., a Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas, atendendo sua solicitação, analisou o projeto sob sua responsabilidade intitulado "**PLASMODIUM FACIPARUM : ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES VAR EM ISOLADOS DE CAMPO BRASILEIROS.**"

Após análise e discussão, a Comissão de Ética **APROVOU** o citado projeto, solicitando que seja reformulado o *termo de anuência*, o qual deve conter informações sobre o processo em linguagem simples, facilitando o entendimento por não especialistas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. GERHARD MALNIC
Presidente em Exercício da Comissão de Ética
em Pesquisas com Seres Humanos - ICB

Ilmo Sr.
Prof. Dr. HERNANDO A. DEL PORTILLO
Departamento de Parasitologia - ICB USP