MÔNICA DA SILVA NUNES

Fatores de risco, distribuição espacial e perspectivas de controle da malária: estudo longitudinal em uma comunidade rural da Amazônia (Granada, Acre)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Parasitologia).

São Paulo

2008

MÔNICA DA SILVA NUNES

Fatores de risco, distribuição espacial e perspectivas de controle da malária: estudo longitudinal em uma comunidade rural da Amazônia (Granada, Acre)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração:
Parasitologia

Orientador:
Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira

Co-orientador:
Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo

2008

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

© reprodução total

da Silva Nunes, Mônica.
Fatores de risco, distribuição espacial e perspectivas de controle da malária: estudo longitudinal em uma comunidade rural da Amazônia (Granada, Acre) / Mônica da Silva Nunes. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Marcelo Urbano Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Epidemiologia da Malária.

Versão do título para o inglês: Risk factors, spatial distribution and perspectives for malaria control: a longitudinal study in a rural community in the Amazon (Granada, Acre).

Descritores: 1. Malária 2. Amazônia 3. Distribuição espacial 4. Assentamento Rural 5. Fatores de risco 6. Pv MSP-1 I. Ferreira, Marcelo Urbano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB154/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mônica da Silva Nunes.

Título da Tese: Fatores de risco, distribuição espacial e perspectivas de controle da malária: estudo longitudinal em uma comunidade rural da Amazônia (Granada, Acre).

Orientador(a): Marcelo Urbano Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (11) 3091.7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@ icb.usp.br

São Paulo, 19 de julho de 2002

PARECER 318/CEP

Prezado Professor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com seres humanos do ICB*, em sua vigésima nona reunião, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*PLASMODIUM VIVAX*: ESTRUTURA POPULACIONAL, DINÂMICA DE TRANSMISSÃO E AQUISIÇÃO DE IMUNIDADE EM UM COMUNIDADE RURAL DA AMAZÔNIA BRASILEIRA".

Informo que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Cordialmente,

Prof. Dr. GERHARD MALNIC
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. **MARCELO URBANO FERREIRA**
Departamento de Parasitologia do ICB-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 38130900 - telefax: (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

Decl. CEPSH.015/2004

DECLARAÇÃO

Em adendo ao parecer 317/CEP, informo que a pesquisadora MÔNICA DA SILVA NUNES é a responsável pelo Projeto: "*Plasmodium vivax:* estrutura populacional, dinâmica de transmissão e aquisição de imunidade em uma comunidade rural da Amazônia Brasileira" sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

São Paulo, 07 de maio de 2004

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

A meu pai Accácio, pela orientação constante
em todos os momentos da vida.

À minha mãe Neuza, pelo amor e dedicação
de toda uma existência.

Agradeço a ambos por me fornecerem,
desde a mais tenra infância,
os elementos que me constituíram no que hoje sou.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Às minhas irmãs Alexandra e Marilda,

pelo apoio nos momentos difíceis da vida.

À minha avó Júlia,

pelo carinho e compreensão constantes.

Ao Muffy e Malhado, pelo amor incondicional

que me ofertaram em todos os momentos

de suas existências.

Ao Teteo, por tudo o que significou para mim

nos quatro anos de nossa convivência.

AGRADECIMENTOS

À população do Granada, que me recebeu com entusiasmo e calor humano ao longo de 14 meses, possibilitando a existência deste trabalho em toda sua extensão.

A Adamilson Luís de Souza, pela companhia inestimável durante todas as atividades de campo.

À equipe de campo do Ramal do Granada:
Fofão

Guimarães

José Natalício Rocha Neves

José Ribamar Duarte de Oliveira

Marcos Botelho Heringer

Marinalda Andreatto Rezende

Sebastião Gomes da Costa

Terezinha de Jesus Gularte

Valdecir Euclides da Silva

Valdenir de Freitas Bayão

Meus sinceros agradecimentos pela receptividade ao trabalho, por compartilhar do entusiasmo por este projeto, e pelo auxílio inestimável durante todo o trabalho de campo.

A Sebastião Bocalom Rodrigues, Damaris de Oliveira, Nésio Mendes de Carvalho e demais membros da Prefeitura Municipal de Acrelândia e Secretaria Municipal de Saúde de Acrelândia, pelo excelente apoio logístico ao trabalho de campo.

Aos dirigentes e demais membros do programa de controle da malária (SESACRE) de Acrelândia e de Rio Branco, que contribuíram em algum momento para o sucesso deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pascoal Torres Muniz e família, pelo auxílio pessoal e científico durante minha permanência no Acre.

A Erika Hoffman e Melissa Bastos, pela ajuda e principalmente pela amizade durante todo o período do Doutorado.

A Rosely Malafronte, Camila Juncasen, Kézia Scopel, Natal Santos da Silva e Carlos Cavasini, pela ajuda durante o trabalho de campo.

A Melissa Bastos, Rogério Láuria, Gerhard Wunderlich e Irene Soares, pela produção dos antígenos recombinantes.

Ao Estéfano de Souza, Carla Bertolino, Bruna Luz, Adrielli e Thiago Araújo, pela digitação dos questionários e formulários.

A Erika Hoffman, Natália Komatsu, Rosane D'Arcádia, Kézia Scopel, Érika Braga e Maria José Menezes, pela ajuda no diagnóstico molecular de malária.

A Irene Soares, Carlos Cavasini, Kézia Scopel e Erika Hoffman, pela ajuda com os ensaios de imunologia celular.

A Roberto Hiramoto e Dr. Heitor Franco de Andrade Jr., pelo empréstimo dos aparelhos usados nos ensaios celulares.

A Terezinha Schumaker, Henrique Krieger, Gerhard Wunderlich, Sirley Daffre e Sandra Moraes-Ávila, pelo valioso empréstimo das instalações e/ou aparelhos dos respectivos laboratórios.

A Edite Kanashiro, pela ajuda em diferentes momentos da tese.

Ao Sr. Francisco das Chagas O. Luz, pela revisão das gotas espessas.

A Luís Antônio Vieira Garcia, pela realização dos exames protoparasitológicos.
A Cláudia Codeço, pela paciência e dedicação em me ensinar tão complexa análise estatística.

A Marília Sá Carvalho, Oswaldo Gonçalves Cruz e demais membros do Programa de Computação Científica da FIOCRUZ, pelas dicas valiosas durante a análise estatística.

Ao XII Seminário Laveran e Deane, pela oportunidade de apresentar este trabalho em sua sessão científica, e pelos comentários que contribuíram para sua qualidade final.

A Cassiano Nunes, pelas ilustrações.

A Cleuza Terezinha Mistro do Amaral, pela revisão linguística.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a CAPES, pelo apoio financeiro na forma de Auxílios ao Pesquisador e Bolsa de Doutorado Direto.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento e ao Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT/SCTIS) do Ministério da Saúde, pelo apoio financeiro direto ou indireto ao projeto de Doutorado.

A Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, pelo auxílio para apresentação do trabalho em evento no Exterior.

Ao revisor anônimo da FAPESP, pelas críticas e elogios.

A todas as pessoas que ajudaram em alguma etapa deste trabalho e que ainda não tenham sido mencionadas.

E finalmente, a Marcelo Urbano Ferreira pela concepção e orientação deste longo, mas recompensador projeto de Doutorado, e pela amizade e convívio durante esses seis anos.

“ Há muito mais coisas entre o céu e a terra
do que imagina vossa vã filosofia. ”

Shakespeare

RESUMO

da Silva-Nunes M. Fatores de risco, distribuição espacial e perspectivas de controle da malária: estudo longitudinal em uma comunidade rural da Amazônia (Granada, Acre) [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Apresenta-se os resultados de estudo de coorte em um assentamento rural no Acre, Brasil, onde 509 indivíduos contribuíram com 489,7 pessoas-ano de seguimento. A incidência de malária por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* foi de 30,0/100 e 16,3/100 pessoas-ano, respectivamente. A morbidade por malária se associou fortemente ao desmatamento e agropecuária e diminuiu após 5 anos de residência no local; além disso ocorreram conglomerados espaciais significantes de casos de malária *vivax* e *falciparum* em áreas de ocupação recente. Não houve associação entre alótipos do receptor FcγRIIa, promotor Duffy ou anticorpos contra a PvMSP-1, e malária no seguimento. As respostas humorais e celulares foram mais freqüentes contra as porções C- e N-terminal da PvMSP-1 respectivamente, porém sem relação com as variantes de PvMSP-1 infectantes. O espectro clínico dos episódios de malária foi variado; enquanto cefaléia, febre e mialgia foram sintomas freqüentes, 29,4% dos episódios eram assintomáticos. Os resultados mostram que a aquisição de imunidade clínica é adquirida em áreas de baixa transmissão e que mudanças ambientais causadas nos assentamentos rurais perpetuam a transmissão de malária. Estes achados são de extrema importância para o controle da malária na Amazônia.

Palavras-chave: Malária. Fatores de risco. Distribuição espacial. Assentamento rural. Amazônia. PvMSP-1.

ABSTRACT

da Silva-Nunes M. Risk factors, spatial distribution and perspectives for malaria control: a longitudinal study in a rural community in the Amazon (Granada, Acre) [PhD thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Here a cohort study in a frontier settlement in Acre, Brazil, where 509 subjects contributed 489.7 person-years of follow-up, is described. Incidence rates for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria were 30.0/100 and 16.3/100 person-years at risk, respectively. Malaria morbidity was strongly associated with land clearing and farming, and decreased after 5 years of local residence. Besides, there was significant spatial clustering of *vivax* and *falciparum* malaria in areas of recent occupation. No significant association was found between FcγRIIa allotype, Duffy promoter type or presence of antibodies against PvMSP-1 and malaria in the follow-up. Humoral and cellular responses were more common against the C- and N-terminal portions of PvMSP-1 respectively, but did not match the PvMSP-1 variants found in infecting parasites. The clinical spectrum of malaria episodes varied widely; while headache, fever and myalgia were the most frequent symptoms, 29.4% of the episodes were asymptomatic. The results show that clinical immunity is acquired under low malaria transmission and environmental changes occurring in the settlements perpetuate malaria transmission. These findings are of utmost importance for malaria control in the Amazon.

Key-words: Malaria. Risk factors. Spatial distribution. Rural settlement. The Amazon. PvMSP-1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição global de *P. falciparum7* e *P. vivax* em 2005.....26
Figura 2. Mapa de endemicidade global de malária.....28
Figura 3. Distribuição global (projeção de Robinson) dos vetores dominantes ou predominantes de malária.....29
Figura 4. Casos de malária no Brasil por espécie entre 1970 e 2005.....31
Figura 5. Índice Parasitário Anual, Brasil, 2007.....32
Figura 6. Crescimento populacional da Amazônia Legal (1808 a 2000).....35
Figura 7. Evolução da área e do número de projetos de assentamentos de reforma agrária na Amazônia Legal entre 1995 e 2002.....36
Figura 8. Assentamentos de reforma agrária estabelecidos na Amazônia Legal até 2002.....36
Figura 9. Área total desmatada na Amazônia Legal, 2003.....40
Figura 10. Taxas anuais de desmatamento na Amazônia brasileira obtidas de dados do satélite LANDSAT.....40
Figura 11. Crescimento demográfico urbano e rural por estado na Amazônia Ocidental e Oriental (1970-000).....41
Figura 12. Modificações Paisagísticas e Saúde na Amazônia Brasileira.....43
Figura 13. Amazônia Legal - Povoamento e Macrorregiões.....44
Figura 14. Pressão Humana na Amazônia Brasileira - todos os indicadores.....45
Figura 15. Ciclo vital simplificado dos Plasmódios que infectam o homem.....51
Figura 16. Estrutura fundiária do Acre, 2006.....61
Figura 17. Imagem da região leste do Acre, mostrando padrões de uso da terra na região.....62
Figura 18. Mapa mostrando a localização do PAD Pedro Peixoto.....63
Figura 19. Mapas do PAD Pedro Peixoto mostrando a localização da Linha 14 Gleba Q e Reserva da Linha 14.....68
Figura 20. Mapa mostrando a área de estudo, com a localização de cada domicílio.....69
Figura 21. Polígonos de desmatamento do PC Peixoto.....90
Figura 22. Uso da terra no PAD Pedro Peixoto e em Theobroma, no momento da chegada à área, em 1993/94 e 1995/96.....91

Figura 23. Uso da terra no PAD Pedro Peixoto e em Theobroma, por tempo de existência do lote.....91
Figura 24. Mapa de uso e cobertura do solo da Região do Peixoto (AC) em 1990 e 1999.....93
Figura 25. Quantificação percentual das classes de uso e cobertura do solo no PAD Pedro Peixoto para os anos de 1990, 1997 e 1999.....94
Figura 26. Mapa da Amazônia Legal mostrando IPA em 1999, IPA em 2007, assentamentos rurais estabelecidos até 1999 e desmatamento cumulativo até 2003.....96
Figura 27. Mapa do Brasil mostrando municípios e assentamentos rurais com alta transmissão de malária em 1985, e áreas de mineração na Amazônia Legal.....97

Figura 28. Precipitação cumulativa mensal e casos incidentes de malária na coorte.....165
Figura 29. Representação esquemática da resposta celular e humoral contra antígenos recombinantes da PvMSP-1 em 27 indivíduos expostos à malária.....230

Figura 30. Equipe de campo.....241
Figura 31. Coleta de material.....241
Figura 32. Equipe da SESACRE.....241
Figura 33. Visita às casas.....241
Figura 34. Linha 14 gleba Q.....241
Figura 35. Entrevista com agente de saúde.....241
Figura 36. Reserva da Linha 14.....242
Figura 37. Floresta parcialmente queimada.....242
Figura 38. Linha 14 gleba Q.....242
Figura 39. Moradia típica do local.....242
Figura 40. Coleção de água temporária.....242
Figura 41. Toras de madeira no local.....242

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração em ug/ml, ug/poço e tempo de cultura dos antígenos e mitógenos utilizados no estudo celular.....75
Tabela 2 - Tipo de estímulo, tipo de controle negativo, e cálculo do Índice de Estimulação celular (IEC).....75
Tabela 3 - Fração Prevenível Esperada de malária de qualquer tipo segundo diferentes cenários.....99
Tabela 4 - Distribuição da coorte por sexo e idade.....157
Tabela 5 - Prevalência de infecção sintomática e assintomática por diferentes espécies de *Plasmodium* em indivíduos acima de 5 anos de idade , Ramal do Granada, Março-Abril 2004.....163
Tabela 6 - Precipitação mensal acumulada (em mm) das estações puviométricas localizadas em Plácido de Castro e Rio Branco, Acre, 2004-2005.....165
Tabela 7 - Seguimento longitudinal dos indivíduos com malária assintomática detectados no 1° corte transversal, Granada, Acre, 2004-2005.....168
Tabela 8 - Seguimento longitudinal dos indivíduos com malária assintomática não-tratada detectados no 2° e 3° cortes transversais, Granada, Acre, 2004-2005.....170
Tabela 9 - Seguimento longitudinal dos indivíduos com malária sintomática não-tratada detectados no primeiro estudo transversal (linha de base).....174
Tabela 10 - Seguimento longitudinal dos indivíduos com malária sintomática não-tratada detectados no segundo e terceiro estudos transversais.....175
Tabela 11 - Evolução dos indivíduos com malária sintomática não-tratada detectados durante o seguimento longitudinal.....176
Tabela 12 - Associação entre sistema sangüíneo Duffy e malária.....195
Tabela 13 - Polimorfismo do receptor FcγRIIA e ocorrência de malária.....195
Tabela 14 - Medida de associação entre presença de anticorpos contra antígenos recombinantes da PvMSP-1 no ínicio do estudo e ocorrência de malária *vivax* no seguimento longitudinal.....219
Tabela 15 - Proporção de respondedores ao ensaio de proliferação, grupo exposto e controle.....220

Tabela 16 - Características clínicas de 27 indivíduos expostos ao *Plasmodium vivax* conforme tipo de resposta celular a antígenos recombinantes da PvMSP.....223
Tabela 17 - Freqüência de anticorpos do tipo IgG e IgM contra a PvMSP-1 no soro de indivíduos expostos à malária conforme a região, bloco e alelo testados.....225
Tabela 18 - Características clínicas de 27 indivíduos expostos ao *Plasmodium vivax* conforme tipo de resposta humoral (presença de IgG detectável) contra antígenos recombinantes da PvMSP-1.....227
Tabela 19 - Coeficiente de correlação entre características clínicas de 27 indivíduos expostos ao *Plasmodium vivax*, e níveis de anticorpos do tipo IgG e IgM, para diferentes regiões da PvMSP-1.....228
Tabela 20 - Comparação entre a proporção de resposta celular e humoral positiva em 27 doadores expostos para cada região, bloco e alelos testados.....229

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....23

2 REVISÃO DA LITERATURA.....25

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA.....25

2.1.1 Epidemiologia da malária no cenário internacional e critérios de endemicidade...25

2.1.2 Epidemiologia da Malária no Brasil e no Acre.....30

2.1.2.1. Epidemiologia da Malária no Brasil.....30

2.1.2.2. Epidemiologia da Malária no Acre 32

2.1.3 Pressão humana na Amazônia Brasileira, Malária e seus contextos epidemiológicos.....33

2.1.3.1 Aspectos físicos e humanos da Amazônia 33

2.1.3.2 Contextos epidemiológicos da Malária na Amazônia.....42

2.2 BIOLOGIA DO PLASMÓDIO E IMPLICAÇÕES PARA O ESTUDO DE AQUISIÇÃO DE IMUNIDADE 50

2.2.1 Interações entre o *Plasmodium* e o sistema imune humano……...…50

2.2.2 Imunidade contra o estágio eritrocitário.....52

2.2.2.1 A proteína de superfície do merozoíto-1 52

2.2.3 O quadro clínico da infecção plasmodial e sua relação com imunidade adquirida.....54

2.2.4 Mecanismos inatos de resistência ao *Plasmodium*.....55

2.2.4.1 Grupo sangüíneo Duffy.....55

2.2.4.2 Polimorfismo H/R^{131} em FcγRIIA.....55

2.2.5 Mecanismos de escape imunológico.....57

3 OBJETIVOS.....58

4 MATERIAIS E MÉTODOS.....59

4.1 CARACTERÍSTICAS DO PROJETO DE ASSENTAMENTO DIRIGIDO PEDRO PEIXOTO.....59

4.1.1 Aspectos históricos dos Projetos de Assentamento no Acre.....59

4.1.2 Aspectos físicos, econômicos e sociais do PAD Pedro Peixoto.....63

4.1.3 Estudos prévios na área e uso da terra.....65

4.2. POPULAÇÃO E ÁREA DE ESTUDO.....66

4.2.1 Descrição da área e população de estudo.....66

4.2.2 Dados pluviométricos da área.....70

4.3 DESENHO EPIDEMIOLÓGICO DO ESTUDO 70

4.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS EPISÓDIOS DE INFECÇÃO PLASMODIAL.....71

4.5. MÉTODOS LABORATORIAIS.....72

4.5.1 Processamento das amostras sangüínea 72

4.5.2 Diagnóstico laboratorial das infecções maláricas.....72

4.5.3 Antígenos de *Plasmodium vivax*.....73

4.5.4 Amplificação e seqüenciamento do gene da PvMSP-1.....73

4.5.5 Ensaios imunológicos.....73

4.5.6 Análise de fatores genéticos humanos 75

4.5.7 Diagnóstico laboratorial de outras infecções e de anemia.....76

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....76

4.7 ASPECTOS ÉTICOS.....77

5 RESULTADOS.....78

6 DISCUSSÃO.....79

6.1. EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA NA POPULAÇÃO ESTUDADA E EM OUTRAS POPULAÇÕES.....79

6.2. ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO PLASMODIAL.....82

6.3. ALTERAÇÕES AMBIENTAIS E SEU IMPACTO NA TRANSMISSÃO DO *Plasmodium*.....83

6.4. HETEROGENEIDADE ESPACIAL DA MALÁRIA E PERSPECTIVAS PARA O CONTROLE DA TRANSMISSÃO.....86

6.5. MALÁRIA E USO DA TERRA: QUESTÃO LOCAL, REGIONAL OU GLOBAL?....87

6.6. ALTERNATIVAS AO DESMATAMENTO: DA TEORIA AO CONTROLE DA MALÁRIA.....98

6.7 CONTROLE DA MALÁRIA NO RAMAL DO GRANADA E EM ÁREAS SEMELHANTES.....102

6.8 GRUPO SANGÜÍNEO DUFFY.....105
6.9 POLIMORFISMO FcγRIIA.....106
6.10 RECONHECIMENTO HUMORAL DA PvMSP-1.....108
6.11 RECONHECIMENTO CELULAR DA PvMSP-1.....110
7 CONCLUSÕES.....115
REFERÊNCIAS.....117
ANEXO A - CARACTERÍSTICAS DA MALÁRIA NA POPULAÇÃO ESTUDADA.....147
MATERIAL SUPLEMENTAR AO ANEXO A.....157
A.1 Características epidemiológicas da coorte.....157
Variáveis demográficas.....157
Características sócio-econômicas e ambientais.....158
Hábitos pessoais e ocupacionais 159
Morbidade pregressa.....160
Patologias concomitantes.....160
A.2 Características da transmissão do *Plasmodium* na população estudada.....161
Prevalência de infecção plasmodial sintomática e assintomática nos estudos transversais.....161
Incidência de malária no seguimento longitudinal.....164
Infecção assintomática pelo Plasmodium: seguimento longitudinal.....166
Infecção plasmodial sintomática não-tratada: seguimento longitudinal.....171
ANEXO B - FATORES DE RISCO PARA MALÁRIA NA COORTE.....177
MATERIAL SUPLEMENTAR AO ANEXO B.....190
B.1 Correções da prova gráfica e pareceres dos revisores do AJTMH.....190
B.2 Variáveis genéticas do hospedeiro humano e resistência inata ao *Plasmodium*.....*194*
Grupo sangüíneo Duffy……194
Polimorfismo H/R ^{131} em FcγRIIA 194
ANEXO C - RESPOSTA IMUNE E POLIMORFISMO ANTIGÊNICO DA PvMSP-1.....196
MATERIAL SUPLEMENTAR AO ANEXO C.....218
C.1 Associação entre a presença de anticorpos anti-PvMSP-1 na linha de base e ocorrência de malária no seguimento longitudinal.....218

C.2 Estudo imunológico celular.....220
Especificidade da resposta celular.....220
Características clínicas dos doadores expostos à malária classificados conforme o tipo de resposta celular.....221
*Resposta humoral contra a Pv*MSP-1 *nos doadores expostos submetidos à proliferação celular.....224*
Características clínicas dos doadores expostos à malária conforme tipo de resposta humoral.....225
*Comparação das repostas celular e humoral contra os antígenos recombinantes da Pv*MSP-1.....229
ANEXO D - ESPECTRO CLÍNICO DA MALÁRIA NÃO- COMPLICADA EM INDIVÍDUOS SEMI-IMUNES.....233
APÊNDICE - FOTOS DA ÁREA E POPULAÇÃO DE ESTUDO.....241

1 INTRODUÇÃO

O perfeito entendimento dos fatores de risco ou proteção contra a malária constitui-se em poderosa ferramenta não só para a criação de uma vacina eficaz, como também para a implementação de políticas alternativas de saúde pública. No entanto, estudos em populações e regiões geográficas distintas, apesar de contribuírem para o conhecimento genérico sobre a malária, não se aplicam necessariamente a populações localizadas em outras áreas do mundo, submetidas a espécies de *Plasmodium* com características genéticas diversas e condições de transmissão diferentes. Faz-se necessário, portanto, na busca de soluções para a malária no Brasil, a caracterização desses parâmetros na população brasileira.

A região amazônica concentra hoje cerca de 95% dos casos notificados de malária no Brasil, distribuídos de forma diferente em seu espaço físico. Além da heterogeneidade na transmissão de malária, a Amazônia é heterogênea também em seus aspectos físicos e humanos. Por outro lado, algumas de suas características ambientais e sociais podem contribuir para quadros epidemiológicos próprios da região, sendo que além da malária, a Amazônia concentra grande parte dos casos de tuberculose, hepatites fulminantes, arboviroses, leishmanioses e hanseníase notificados no país [Superintendência para o Desenvolvimento da Amazônia (SUDAM), 2000[1] *apud* Confalonieri, 2005], com um indíce de internação hospitalar por doenças infecciosas e parasitárias (12,7%) bem acima da média nacional (8,3%). Portanto, é importante levar em consideração alguns aspectos físicos e humanos da Amazônia para se compreender melhor a epidemiologia da malária na região.

Segundo Ab'Saber (2005), "[...] cada uma das células espaciais amazônicas tem de ser conhecida em sua realidade física, ecológica, urbana e social para a percepção de seus problemas e as expectativas das suas comunidades residentes [...]". Desde a década de 70 os assentamentos rurais criados e/ou apoiados pelo governo brasileiro vêm transformando a realidade amazônica. Portanto, para entender como a transmissão de malária é mantida nas comunidades mais estáveis originadas a partir desses assentamentos rurais, é necessário um conhecimento mais aprofundado das características da transmissão e dos fatores de risco associados do que há disponível até agora.

---

[1] Superintendência para o Desenvolvimento da Amazônia, Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. Diganóstico e cenarização macrossocial da Amazônia Legal: perfil da saúde na Amazônia legal e contexto brasileiro. Belém; SUDAM; 2000. 54 p.

Este projeto de doutorado avalia fatores de risco para malária em uma população de assentamento rural da Amazônia brasileira, através da caracterização clínico-epidemiológica, imunológica e genética de indivíduos de uma coorte rural localizada no Acre, seguidos ao longo de 15 meses, complementada pela caracterização genética de isolados de parasitas circulantes na área.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

2.1.1 Epidemiologia da malária no cenário internacional e critérios de endemicidade

A malária é uma das principais doenças parasitárias da atualidade, sendo causada por parasitas do gênero *Plasmodium*. Há quatro agentes etiológicos reconhecidos como causadores de infecção em seres humanos (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*), embora discuta-se o papel de outras espécies geneticamente semelhantes a *P. malariae* e *P. vivax* como potenciais parasitas humanos. (Marrelli *et al.,* 1998; Carter; Mendis, 2002; Cox-Singh; Singh, 2008). Todos os vetores de *Plasmodium* são insetos da ordem Díptera, família Culicidae e gênero *Anopheles*. Este gênero compreende cerca de 300 espécies, destacando-se *Anopheles gambiae* e *Anopheles darlingi* como principais vetores.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde [World Health Organization (WHO), 2000a], aproximadamente 3 bilhões de pessoas estão expostas ao *Plasmodium* em todo mundo, sendo que a prevalência anual da malária é estimada em 350-500 milhões de casos, e a mortalidade em mais de um milhão de óbitos anuais (Korenkomp, 2005). Estimativas recentes a partir de dados de sistemas de informação geográfica indicam que a população exposta ao risco de malária (PERM) pode ser ainda maior, atingindo a cifra de 3,6 bilhões de pessoas (48% da população mundial; Guerra; Snow; Hay, 2006), distribuída em apenas 27% da superfície terrestre (Hay *et al*., 2004). A maior parte da PERM localiza-se na África subsaariana (85,7%) e em menor proporção no Sudeste asiático (8,4%) e Mediterrâneo oriental (4,9%), o que mostra a importância do problema e sua concentração em áreas desfavorecidas do globo terrestre (Hay *et al.,* 2004).

Tanto a distribuição de pessoas expostas ao risco de malária quanto a de casos de malária por espécie de *Plasmodium* são bastante heterogêneas. Embora a população mundial estimada exposta a *P. falciparum* e *P. vivax* seja aproximadamente igual (2,6 bilhões), há diferenças regionais importantes (Guerra; Snow; Hay, 2006), como mostra a Figura 1.

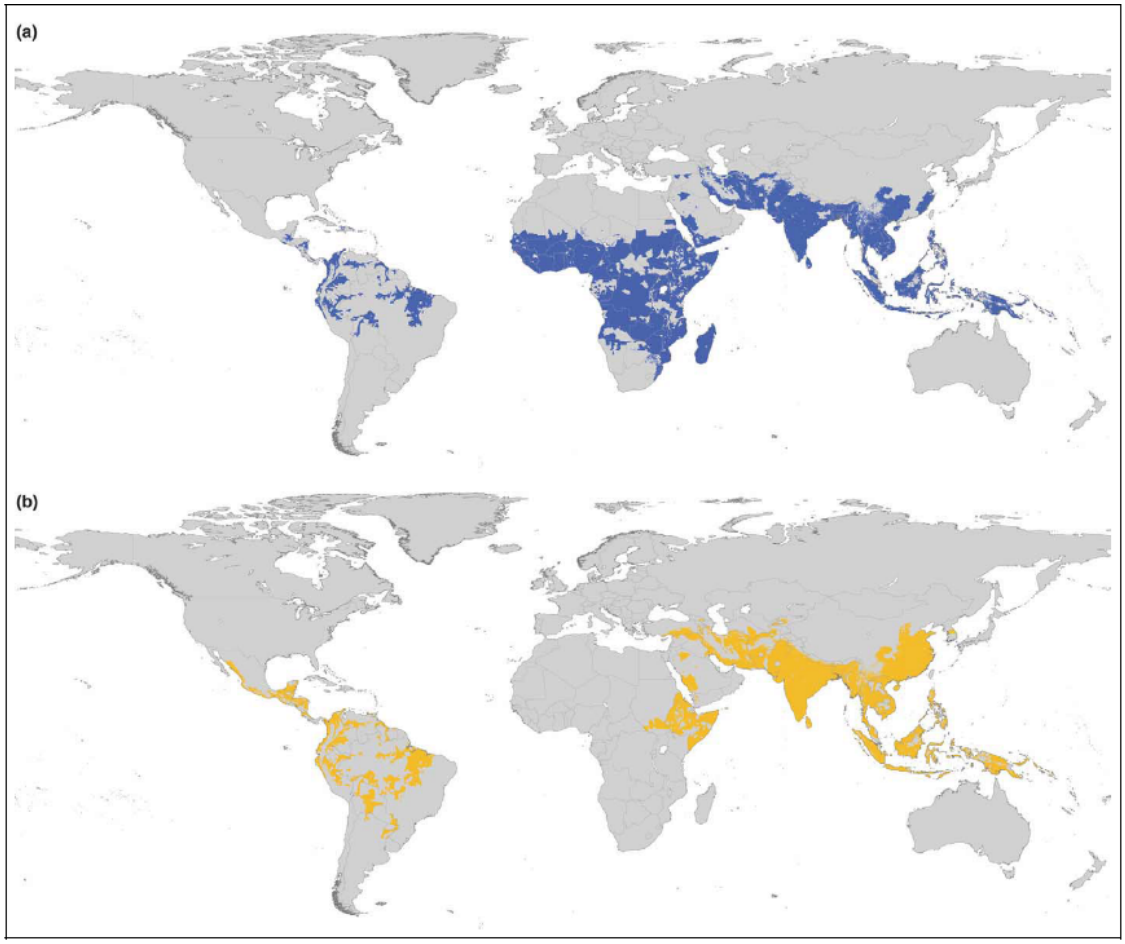


Figura 1 - Distribuição global de *P. falciparum* (a) e *P. vivax* (b) em 2005 (Guerra; Snow; Hay, 2006, com permissão de Elsevier).

Segundo Guerra, Snow e Hay (2006), o maior contingente de pessoas expostas ao risco de malária encontra-se no Sudeste asiático (1,252 bilhões de pessoas expostas a *P. falciparum* e 1,347 bilhões de pessoas expostas a *P. vivax*) e na região oeste do Pacífico (438 e 890 milhões de pessoas expostas a *P. falciparum* e *P. vivax*, respectivamente). Na África, há cerca de 525 milhões de pessoas expostas a *P. falciparum*, mas apenas 50 milhões expostas a *P. vivax*; e no continente americano a proporção de pessoas expostas a *P. falciparum* (50 milhões) e *P. vivax* (78 milhões) é muito similar e bem abaixo das outras áreas endêmicas.

Quanto à distribuição de casos por espécie (Carter; Mendis, 2002), na África predomina *P. falciparum*, sendo *P. vivax* raro na África Ocidental e infreqüente na África Oriental; no Oriente Médio, Ásia Central e América Central e do Sul, predomina *P. vivax*; já no Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental tanto *P. falciparum* como *P. vivax* são abundantes. *Plasmodium malariae* é comum na África sub-saariana e no sudoeste do Pacífico, sendo pouco freqüente na Ásia, América Central e do Sul e Oriente Médio (Mueller; Zimmerman;

Reeder, 2007). Finalmente, *P. ovale* é encontrado em áreas da África e de forma limitada na Nova Guiné, Indonésia, Filipinas, Oriente Médio, Índia e Sudeste Asiático (Mueller; Zimmerman; Reeder, 2007).

Alguns conceitos básicos são importantes para se entender a epidemiologia da malária, como a classificação da endemicidade e dos níveis de transmissão. A endemicidade da malária é classificada segundo MacDonald (1957) em: estável (população exposta continuamente a uma taxa de inoculação constante); instável (população exposta contínua ou intermitentemente a taxas de inoculação flutuante) e epidêmica (forma extrema de malária instável onde uma população experimenta um aumento importante nas taxas de transmissão). A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1950[2] *apud* Coura; Suárez-Mutis; Ladeia-Andrade, 2006) classifica a endemicidade da malária de acordo com a presença de baço palpável (Índice Esplênico ou IE) em crianças de 2 a 9 anos de idade, da seguinte forma: malária hipoendêmica (IE < 10%, comum em áreas com transmissão baixa e irregular), mesoendêmica (IE entre 10 e 50%, intensidade variável de transmissão dependendo das condições locais), hiperendêmica (IE entre 50 e 75%, transmissão intensa mas sazonal, imunidade insuficiente para prevenir efeitos da malária em todos os grupos etários) e holoendêmica (IE > 75%, transmissão perene e intensa resultando em alto grau de resposta imune em todos os grupos etários, mas principalmente em adultos). Embora esta última classificação seja válida para áreas de transmissão contínua e sem acesso a diagnóstico e tratamento (como a África), há problemas em aplicá-la a outros locais como América Latina e Caribe, onde a acessibilidade ao pronto diagnóstico e tratamento pode impedir o desenvolvimento de esplenomegalia. (Coura; Suárez-Mutis; Ladeia-Andrade, 2006).

A população mundial aumentou de um para seis bilhões de pessoas durante o século XX. Já a PERM caiu de 77% em 1900 para 48% em 2002, com uma redução percentual significativa. Entretanto, essa redução não foi homogênea (Hay *et al.,* 2004), sendo maior em condições epidêmicas e hipoendêmicas, e praticamente inexistente em condições de endemicidade meso, hiper (16%) e holoendêmicas (0%) (Tabela 3). Dados recentes indicam que cerca de 25% da população exposta ao risco está localizada em áreas hipoendêmicas para malária, 31% e 32% em áreas meso e hiperendêmicas, respectivamente; e 5% em áreas holoendêmicas (Hay *et al.,* 2004).

---

[2] World Health Organization. Expert Committee on Malaria, report on the Third Session. Geneva: WHO; 1950. (Technical Report Series no. 8).

Devido à dificuldade de se coletar dados fidedignos em escala global, o único mapa de endemicidade baseado em casos de malária disponível atualmente é o mapa de Lysenko e Semashko (1968) modificado por Hay *et al.* (2004), representado na Figura 2. A endemicidade neste mapa é definida por Lysenko *et al.* (1968)[3] *apud* Hay *et al. (* 2004) como o índice parasitário em coortes de crianças entre 2-10 anos (hipoendêmica < 0,1; mesoendêmica 0,11-0,5; hiperendêmica 0,51-0,75) exceto a classe holoendêmica (0,75), onde o índice parasitário se refere ao grupo etário de 1 ano de idade (Metselaar; Van Thiel, 1959[4] *apud* Hay *et al. (* 2004). A linha negra representa o limite de risco para malária em 2002 (WHO, 2003[5] *apud* Hay *et al. (* 2004). Notar que a classe epidêmica é restrita às regiõe s temperadas neste mapa e que este termo é usado de forma diferente hoje em dia.

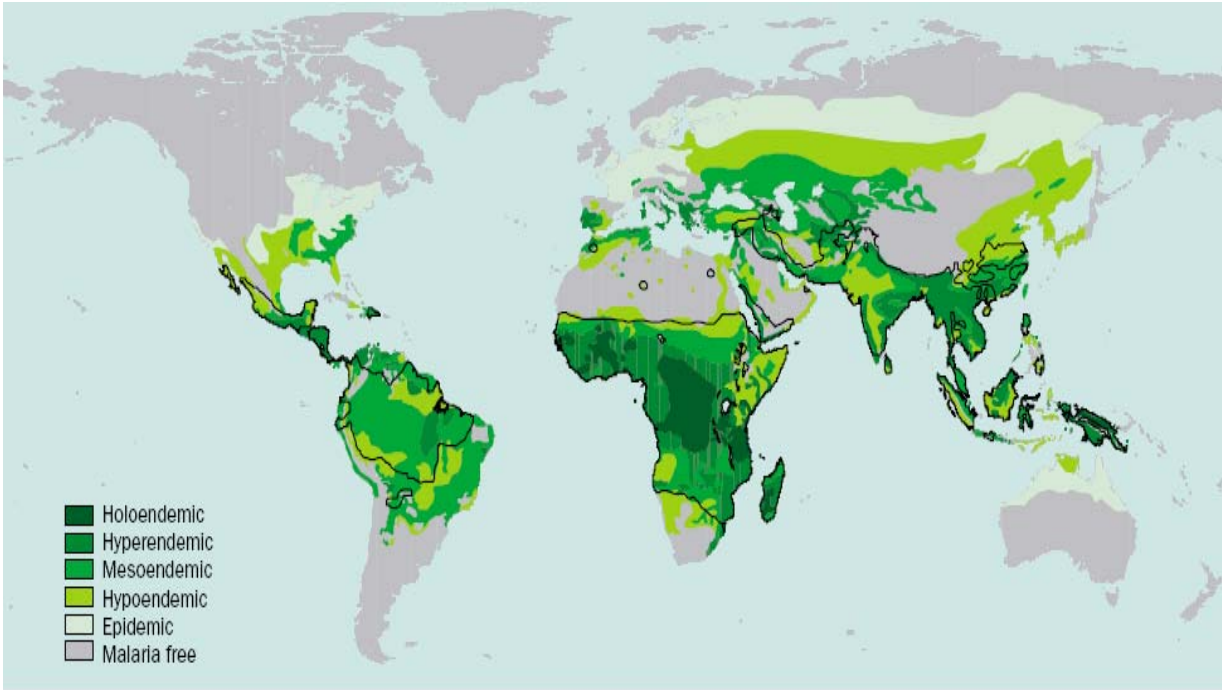


Figura 2 - Mapa de endemicidade global de malária (Hay et al., 2004, com permissão de Elsevier).

A Figura 3 mostra a distribuição mundial dos vetores de malária predominantes em cada região do mundo, baseada em 104 publicações compiladas por Kiszewski *et al.* (2004); notamos claramente o predomínio de *Anopheles darlingi* na América do Sul e *Anopheles gambiae* na África subsaariana.

---

[3] Lysenko AJ, Semashko IN. Geography of malaria. A medico-geographic profile of an ancient disease. In: Lebedew AW. Itogi Nauki: Medicinskaja Geografija. Moscow: Academy of Sciences, USSR; 1968. p. 25–146.

[4] Metselaar D, Van Thiel PH. Classification of malaria. Trop Geogr Med. 1959;11:157-61.

[5] World Health Organization, Public Health Mapping Group. Worldwide malaria distribution in 2002. Geneva: WHO; 2003.

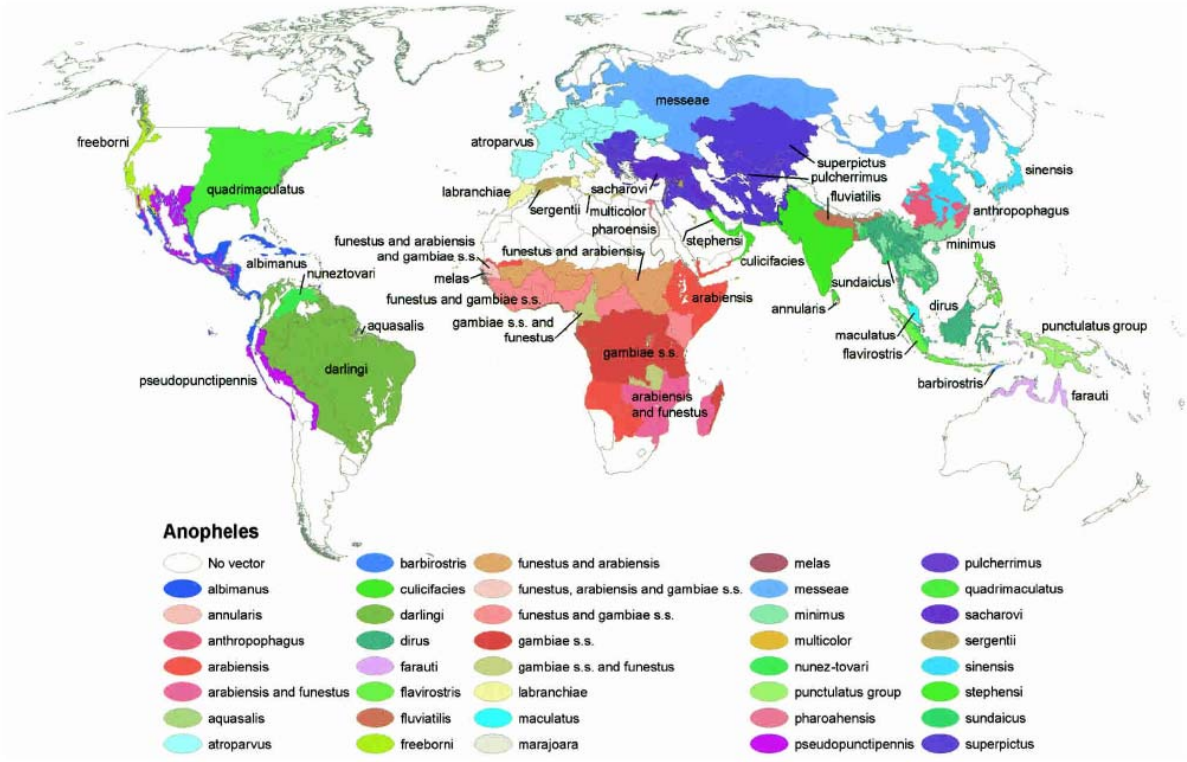


Figura 3 - Distribuição global (projeção de Robinson) dos vetores dominantes ou predominantes de malária (Kiszewski *et al*., 2004).

Ambas as classificações de endemicidade da malária contêm conceitos implícitos sobre imunidade adquirida. Em áreas de malária estável acredita-se que a população exposta desenvolva alto grau de imunidade adquirida devido à inoculação constante do parasita pelo vetor, o que evitaria formas graves de malária e até mesmo a presença de sintomas a partir de 4-5 anos de idade, resultando num padrão de imunidade dependente da idade. Esse padrão clínico é freqüentemente encontrado na África subsaariana (Carter; Mendis, 2002), onde a maior parte das infecções casos é causada por *P. falciparum*. Nessa áreas, grande parte da morbidade ocorre em crianças, com níveis altos de parasitemia que levam a manifestações clínicas muitas vezes graves. Já em adultos a doença é menos grave, sendo que as manifestações clínicas diminuem de intensidade e se tornam raras (Marsh, 1993).

Diferentemente, em áreas de malária instável a imunidade adquirida ao longo dos anos parece ser rapidamente perdida após meses sem transmissão. Situações onde a imunidade é capaz de impedir a infecção pelo *Plasmodium* dificilmente ocorrem em áreas de transmissão instável, sendo que os indivíduos em todas as faixas etárias permanecem vulneráveis ao

Plasmodium, podendo ocorrer formas graves da doença mesmo em adultos (Mishra *et al.,* 2007). Em geral, áreas de transmissão de *P. vivax* (como a América Latina, Índia e Tailândia) apresentam essas características clínico-epidemiológicas, tais como acometimentos de todas as faixas etárias e ocorrência de 10 a 30 episódios de malária durante toda a vida (Mendis *et al.,* 2001). Entretanto, há relatos mostrando que mesmo em áreas de transmissão instável a prevalência de malária pode diminuir após 5-10 anos de idade (Luxemburger *et al.,* 1996), e estados de portadores assintomáticos do *Plasmodium* também podem ocorrer (Gamage-Mendis *et al.,* 1991a; Luxemburger; Nosten; White*,* 1999; Roshanravan *et al.,* 2003).

2.1.2 Epidemiologia da Malária no Brasil e no Acre

2.1.2.1 Epidemiologia da Malária no Brasil

O Brasil é o país que contribui com o maior número de casos no continente americano. No início da década de quarenta, o número estimado de casos era de aproximadamente 6 milhões, distribuídos por todo o território, com exceção do Rio Grande do Sul (Tauil, 2002). Como resultado de campanhas de combate à malária, em 1961 o número de casos registrados no Brasil foi de apenas 36.912, e a incidência da malária nos estados extra-amazônicos diminuiu, sendo que em 1979 as regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul foram consideradas livres de transmissão autóctone de malária (Loiola; Mangabeira; Tauil, 2002). A partir dessa época, a malária tornou-se um problema quase que exclusivamente da Amazônia, onde atualmente incidem cerca de 95% dos casos notificados no Brasil.

Em 1980 foram registrados quase 170.000 casos de malária, chegando a 559.000 notificações em 1988, sendo que a proporção de casos por *P. falciparum* oscilou entre 38,4% e 54,3% nessa década (Figura 4). Certo controle foi obtido durante a década de 90, reduzindo-se o número de casos para 405.000 em 1997. Entre 1998 e 1999 houve um recrudescimento espantoso da malária, atingindo-se o recorde histórico de 637.474 notificações em 1999 (com mais de 80% dos casos correspondendo a *Plasmodium vivax*), o que levou o governo brasileiro a implantar um plano emergencial de combate à malária (Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária) em 2000, abrangendo 254 municípios da Amazônia Legal [Fundação Nacional da Saúde, Ministério da Saúde (FNS/MS), 2000]. O plano conseguiu

reduzir o número de casos de malária nos municípios responsáveis por 80% dos casos na Amazônia Legal em 47,6% entre 2000 e 2002 (Ladislau; Leal; Tauil, 2006), mas a redução não foi permanente, pois em 2005 a cifra de notificações foi de 607.789 [Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (SVS/MS), 2006]. Embora o número de casos tenha diminuído recentemente (547.991 casos em 2006 e 462.810 casos em 2007 (SVS/MS, 2008), essa trajetória mostra que ao mesmo tempo em que a malária é passível de controle, ela persiste e merece intervenções constantes.

Figura 4 - Casos de malária no Brasil por espécie entre 1970 e 2005 (Coura; Suárez-Mutis; Ladeia-Andrade , 2006).

A Figura 5 mostra o Índice Parasitário Anual (IPA) para o Brasil em 2007. Observamos no mapa abaixo que a região Amazônica é heterogênea quanto à transmissão de malária, sendo que há áreas de baixa, média e alta transmissão dentro da Amazônia Legal. Enquanto no Maranhão, Tocantins e Mato Grosso predominam atualmente áreas com IPA baixo ou transmissão inexistente, os estados do Amazonas, Pará e Rondônia notificaram grande parte dos casos de malária nos últimos anos (SVS/MS, 2007).

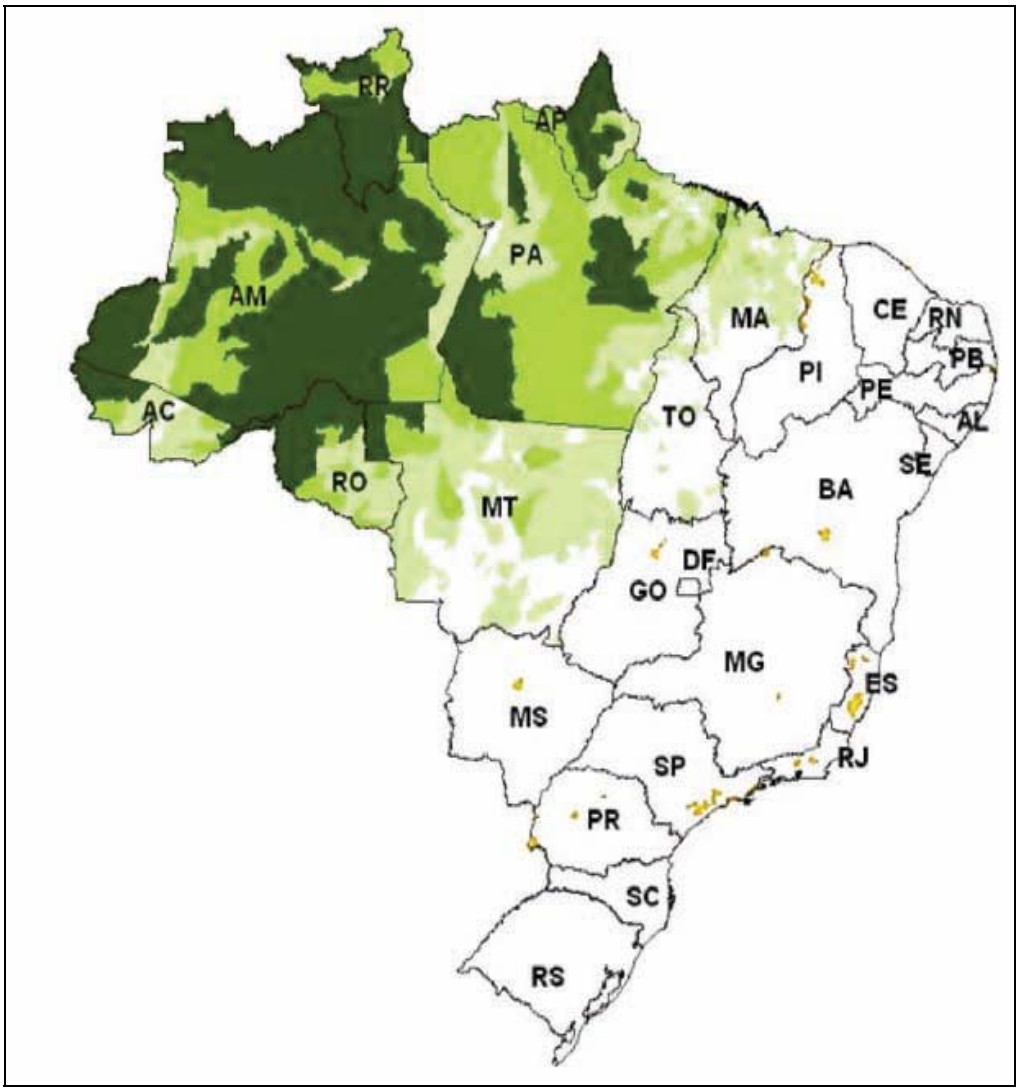


Figura 5 - Índice Parasitário Anual, Brasil, 2007 (SVS/MS, 2007).

2.1.2.2 Epidemiologia da Malária no Acre

Em 1980, o número de lâminas positivas no estado do Acre foi cerca de 6.000, chegando a 36.063 no ano de 1995, e retornando a 6.125 em 1997. Semelhantemente ao que ocorreu no resto da Amazônia, houve espantoso recrudescimento em 1999, com mais de 23.000 casos (FNS/MS, 2000), representando um aumento de quase 300% no número de notificações. *Plasmodium vivax* foi responsável por 70 % desses casos, enquanto *P. falciparum* foi responsável por 29%, sendo as demais infecções (1%) mistas ou por *P.*

malariae. Em 2001, 55% dos casos de malária do Acre ocorreram em áreas de assentamento rural (FNS/MS, 2002[6] *apud* Costa, 2003).

O Plano de Intensificação de Ações de Combate à Malária (FNS/MS, 2000), implantado pelo governo brasileiro em 1999, teve grande impacto no Acre, com uma queda da incidência de malária de 75% entre janeiro e setembro de 2000 (17.600 casos). No entanto, Acrelândia, município localizado no extremo leste do estado (região do Baixo Acre) manteve-se em 2001 como o único município acreano de alto risco. Entre janeiro e setembro de 2001, cerca de 1.100 casos de malária (82% por *P. vivax*) foram registrados no município, observando-se uma queda de 52% em relação a igual período do ano anterior, bem abaixo da redução média no estado (Costa, 2003). Acrelândia, município com 1% da área do estado e menos de 2% da população acreana total, contribuiu com quase 20% dos casos de malária notificados no Acre nos nove primeiros meses de 2001. Cerca de 80% desses casos localizaram-se na zona rural de Acrelândia, onde há vários projetos de assentamento do Instituto Nacional de Reforma Agrária (INCRA). Em 2002, o IPA de Acrelândia foi de 104,3 (Costa; Leal; Leal, 2004).

Em relação ao número de casos autóctones, o município de Acrelândia registrou 4.135 casos de malária em 1999, dos quais 1.997 (48,3%) eram autóctones. Em 2000 foram registrados 2.995 casos, sendo 1.750 (58,4%) autóctones. Em 2001, 2002 e 2003 o número de casos autóctones foi de 613 (45,6%), 383 (51,1%) e 591 (64,1%), respectivamente, predominando sempre as infecções por *P. vivax*. Esses dados mostram o grande percentual de casos autóctones notificados em Acrelândia, o que favorece um estudo de base populacional para identificação de fatores de risco para malária.

2.1.3 Pressão humana na Amazônia Brasileira, Malária e seus contextos epidemiológicos

2.1.3.1 Aspectos físicos e humanos da Amazônia

Fisicamente, o bioma Amazônia estende-se do oceano Atlântico às encostas da Cordilheira dos Andes, espalhando-se por nove países da América do Sul, sendo que 69%

[6] Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Sistema de informação do programa de controle da malária (SISMAL). Relatório resumo epidemiológico, 2001. Brasília:FNS/MS; 2002.

desse bioma localiza-se no Brasil (Ferreira; Venticinque; Almeida, 2005). A Amazônia brasileira ocupa cerca de 50% do território brasileiro, com aproximadamente 4.200.000 km^2 [Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2004]. O termo Amazônia Legal refere-se ao conjunto composto pelos estados da região Norte, além de Mato Grosso, Tocantins e parte do Maranhão. A Amazônia brasileira possui cerca de 104 sistemas de paisagens naturais e 224 subsistemas, onde podemos encontrar, entre outros, as florestas ombrófilas densa e aberta, as florestas estacionais decidual e semidecidual, as áreas de savana, restinga e campinarana (IBGE, 1995[7] *apud* Ferreira; Salati, 2005). Os ambientes aquáticos da Amazônia chegam a 300.000 km^2, e sendo o clima quente e úmido com pouca variação de temperatura, há o favorecimento da proliferação de vetores de várias doenças infecciosas, como malária e arboviroses, entre outras (Confalonieri, 2005).

Por causa de suas extensas reservas minerais (maior província mineral mundial), vegetais (maior biodiversidade do planeta) e hídricas (maior bacia hidrográfica da Terra contabilizando 1/5 da reserva hídrica mundial), a Amazônia brasileira tem sido submetida a pressões humanas intensas nos últimos séculos. Entre os séculos XVII e XVIII ocorreu o primeiro fluxo migratório para a Amazônia , impulsionado pela busca de "drogas do sertão" e pela expansão do território português, dando início aos povoamentos locais não-indígenas, e a introdução de doenças como sarampo, varíola e influenza (Singer; Castro, 2001). Em 1877 inicia-se o segundo grande fluxo de migrantes, desta vez para trabalhar na extração da borracha, o que levou a uma grande epidemia de malária nessa época. Durante a Segunda Guerra Mundial houve nova onda de migração por parte de nordestinos convidados a trabalhar na extração da borracha, o que contribuiu para manter a transmissão de malária na região amazônica (Coura; Suárez-Mutis; Ladeia-Andrade, 2006).

A colonização da Amazônia, até a década de sessenta, fazia-se ao longo dos principais rios da região. A partir da segunda metade dessa década o governo brasileiro adotou uma política de integração da Amazônia ao resto do país com a construção de estradas (como a rodovia Belém-Brasília e a rodovia Porto Velho-Rio Branco), a implementação de projetos de assentamento rural e o estabelecimento da Zona Franca de Manaus. Isso resultou em grande fluxo migratório para a região (Figura 6), e a população amazônica passou de 4 milhões em

[7] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diagnóstico ambiental da Amazônia Legal. Rio de Janeiro: IBGE; 1995. 286 p.

1960 para mais de 20 milhões em 2001 [IBGE, 2002[8] *apud* Barreto *et al*., 2005]. Esse intenso crescimento demográfico (cerca de 500%) foi impulsionado pela expansão das fronteiras agrícolas e extrativistas incentivadas pelo governo brasileiro. Esses eixos continuam até hoje, funcionando como vetores de colonização e avanço das fronteiras (Lorena, 2003).

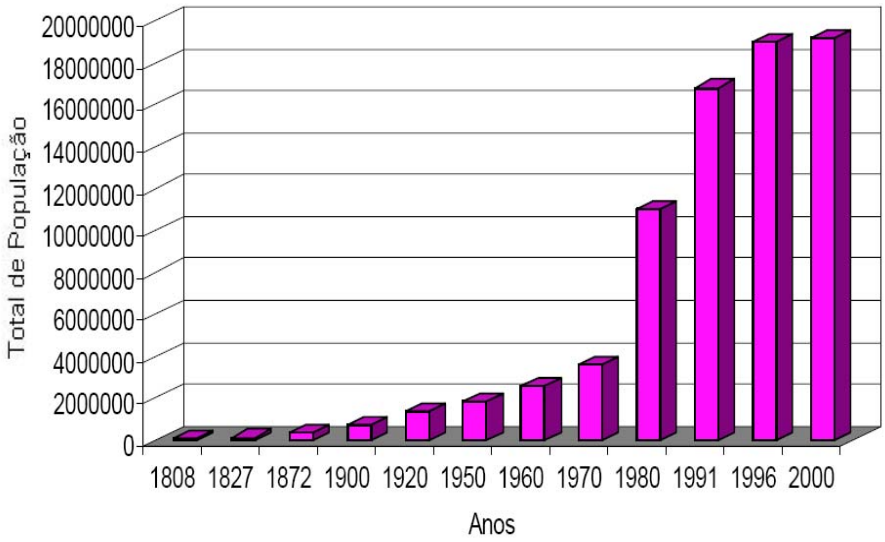


Figura 6 - Crescimento populacional da Amazônia Legal, 1808 a 2000 (Ferreira; Salati, 2005).

Desde 1970, o Instituto Nacional de Colonização Agrícola vem criando projetos de assentamentos rurais na Amazônia; entre 1970 e 1974 foram assentados cerca de quatrocentos mil colonos (Instituto Brasileiro de Análises Sociais e Econômicas, 1985[9] *apud* Ferreira; Salati, 2005); em 1994 encontravam-se assentadas 161.500 famílias, e em 2002 já havia um total de 528.571 famílias. Na Figura 7 podemos observar que o número de assentamentos de reforma agrária passou de 200 em 1995 para 1.600 em 2002, sendo que a área disponibilizada pelo INCRA aumentou de 2 milhões para 14 milhões de hectares (ha) nesse período (Barreto *et al*., 2005). Os projetos de colonização oficial espalharam-se por toda Amazônia Oriental e parte da Amazônia Ocidental (Rondônia e Acre), correspondendo a 73,4% das terras ocupadas para esse fim (Figura 8). Alguns projetos de colonização particular ocorreram no Mato Grosso, ocupando 26,6% do total dos assentamentos. A migração para a Amazônia Ocidental originou-se principalmente da região Centro-Oeste, Sudeste e Sul, enquanto os

[8] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico. Rio de Janeiro: IBGE; 2002. Disponível em: http://www.ibge.gov.br. [2005 mar. 10].

[9] Instituto Brasileiro de Análises Sociais e Econômicas. A Amazônia Legal: políticas de desenvolvimento e seus efeitos econômico-sociais. Rio de Janeiro: IBASE; 1985.

colonos do Pará vieram predominantemente do Nordeste, principalmente do Maranhão (Marques, 1987).

Figura 7 - Evolução da área e do número de projetos de assentamentos de reforma agrária na Amazônia Legal entre 1995 e 2002 (INCRA, 2002[10] *apud* Barreto *et al*., 2005).

Figura 8 - Assentamentos de reforma agrária estabelecidos na Amazônia Legal até 2002 (INCRA, 2002[10] *apud* Barreto *et al*., 2005).

[10] Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária. Divisão de Ordernamento Territorial - Cartografia/Geoprocessamento. Brasília: INCRA; 2002.

A política de expansão de fronteiras agrícolas na Amazônia levou a importantes mudanças ambientais e econômicas (além do aumento populacional), sendo que os incentivos fiscais para essa região entre 1980 e 2001 direcionaram o emprego dos recursos ora para a pecuária ora para culturas permanentes (Becker, 2005). Em 1995, cerca de 70% da área total desmatada era destinada à agricultura e pecuária; o rebanho bovino da Amazônia brasileira cresceu de 27 milhões de cabeças em 1990 para 64 milhões em 2003, sendo que em algumas áreas da Amazônia esse crescimento chegou a ser de 780% em apenas 7 anos (Escada *et al.,* 2005). As áreas de culturas anuais passaram de 5 milhões de hectares em 1990 para 8 milhões em 2002 (IBGE, 2003[11] *apud* Barreto *et al*., 2005). Embora a legislação brasileira em 2001 tenha aumentado de 50% para 80% a área de reserva legal das propriedades localizadas na Amazônia, entre 60 e 71% dos proprietários não cumpre o Código Florestal, o que indica uma intensa atividade de desmatamento na região (Firestone; Souza, 2002; Souza; Barreto, 2001). Estima-se que cerca de 50 a 60% dos lotes de reforma agrária no sul do Pará foram ilegalmente vendidos, uma vez que após o desmatamento inicial (que gera renda com a venda da madeira) as famílias assentadas não conseguem se sustentar, procurando novos lotes ou migrando para os centros urbanos (Agência Estado, 2004[12] *apud* Barreto *et al*., 2005).

Além dos assentamentos rurais, áreas de mineração legal e mineradores informais também representam uma fonte de modificação do ambiente (Barbieri; Sawyer, 2007). Em 1974 o governo federal criou o Programa de Pólos Agropecuários e Agrominerais da Amazônia, com enfoque na produção mineral (Monteiro, 2005). No início dos anos noventa, havia cerca de um milhão de garimpeiros em cerca de 2000 garimpos na Amazônia (Pinto, 1993[13] *apud* Barreto *et al*., 2005); o garimpo levou a modificações ambientais em virtude do (a) desmatamento para a construção da mina e do campo de mineração e devido à demanda por madeira e energia hidráulica para seu funcionamento; (b) impactos indiretos como a

---

[11] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal (PAM). Rio de Janeiro; IBGE; 2003. Disponível em: http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo2.asp?e=v&p=PA&z=t&o=11. [2005 mar 11].

[12] Agência Estado. 2004. É Ilegal, mas 40 Por cento dos Lotes da Reforma Agrária Foram Vendidos. Agência Estado. 18 abril 2004. Disponível em: http://www.estadao.com.br/agestado/noticias/2004/abr/18/49.htm. [2005 mar. 15].

[13] Pinto JA. Garimpagem: contribuição ao desbravamento e à ocupação da Amazônia. In: Conseqüências da garimpagem no âmbito social e ambiental da Amazônia. Mathis A, Rehaag R, editores. Belém: CEJUP; 1993. Disponível em: http://www.gpa21.org/equipe/armin/Pdf/consequencias_garimpagem.pdf [2005 mar 10].

erosão do solo e contaminação ambiental com mercúrio (Mathis; Rehaag, 1993[14] *apud* Barreto *et al*., 2005; Barbieri; Sawyer, 2007); e (c) fluxos migratórios. Além disso, o garimpo serviu como acúmulo de capital que propiciou a abertura de novas fronteiras de ocupação.

Embora contando com grandes regiões metropolitanas, como Belém (1,8 milhões de habitantes) e Manaus (1,4 milhões de habitantes), cerca de 7 milhões de pessoas (1/3 da população amazônica) moram atualmente em pequenas cidades e vilarejos com menos de 10.000 habitantes, que correspondem a 41,6% dos municípios da região. Esses pequenos núcleos urbanos originaram-se em sua maioria de áreas de garimpo, projetos de colonização e entrepostos comerciais ao longo de estradas oficiais e não-oficiais.

Os estados amazônicos adotaram diferentes estratégias de desenvolvimento: uso extensivo da terra no Mato Grosso e Pará; estratégia pontual industrial no Amazonas; modernização do extrativismo no Acre e Amapá, e expansão da pecuária e soja em Rondônia e soja em Roraima. Essas diferentes políticas econômicas empregadas nas últimas décadas resultaram em três macrorregiões físicas, descritas por Becker (2005). A primeira constitui-se no arco de povoamento consolidado e portanto mais degradado ambientalmente, onde se localizam as áreas urbanas, as maiores densidades demográficas, as estradas e o cerne da economia, correspondendo hoje à região mais desmatada da Amazônia. A segunda região é a Amazônia central, correspondente a área central do Pará cortada pelos eixos econômicos de escoamento da produção. E por último, a Amazônia ocidental, área mais preservada ambientalmente. Algumas dessas estratégias de desenvolvimento têm aumentado a taxa de desmatamento da região devido à abertura de novas estradas, crescimento das cidades, exploração de madeira, agricultura familiar e mecanizada, entre outros (Barreto *et al*., 2005).

Segundo dados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, 2004[15] *apud* Ferreira; Venticinque; Almeida, 2005), a área cumulativa desmatada da Amazônia Legal brasileira era de 653 mil km^2 em 2003 (16,3%), concentrados ao longo de um arco cujos limites se estendem do sudoeste do Maranhão ao norte de Tocantins, sul do Pará, norte de

---

[14] Mathis A, Rehaag R, editores. Conseqüências da Garimpagem no Âmbito Social e Ambiental da Amazônia. Belém: CEJUP; 1993. Disponível em: http://www.gpa21.org/equipe/armin/Pdf/consequencias_garimpagem.pdf [2005 mar 10].

[15] Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Monitoramento da Floresta Amazônica Brasileira por Satélite: Projeto PRODES. São José dos Campos: INPE; 2004. Disponível em : http://www.obt.inpe.br/prodes [2004 out 15]

Mato Grosso, Rondônia, sul do Amazonas e sudoeste do Acre (Figura 9). A taxa de desmatamento anual tem aumentado nos últimos dez anos (Figura 10), sendo que entre 2002 e 2003 registrou-se a segunda maior taxa de desmatamento na Amazônia (23.750 km^2), só menor do que a registrada em 1995 (Ferreira; Venticinque; Almeida, 2005). Os estados do Mato Grosso, Pará e Rondônia tiveram as maiores taxas de desmatamento entre 1991 e 2003, enquanto os estados do Amazonas, Mato Grosso, Rondônia e Acre apresentaram processo crescente de urbanização da população (Figura 11A e 11B). Esses dados indicam que as atividades econômicas são responsáveis pelo avanço do desmatamento (Ferreira; Salati, 2005), embora a pressão demográfica direta também pareça desempenhar um papel importante.

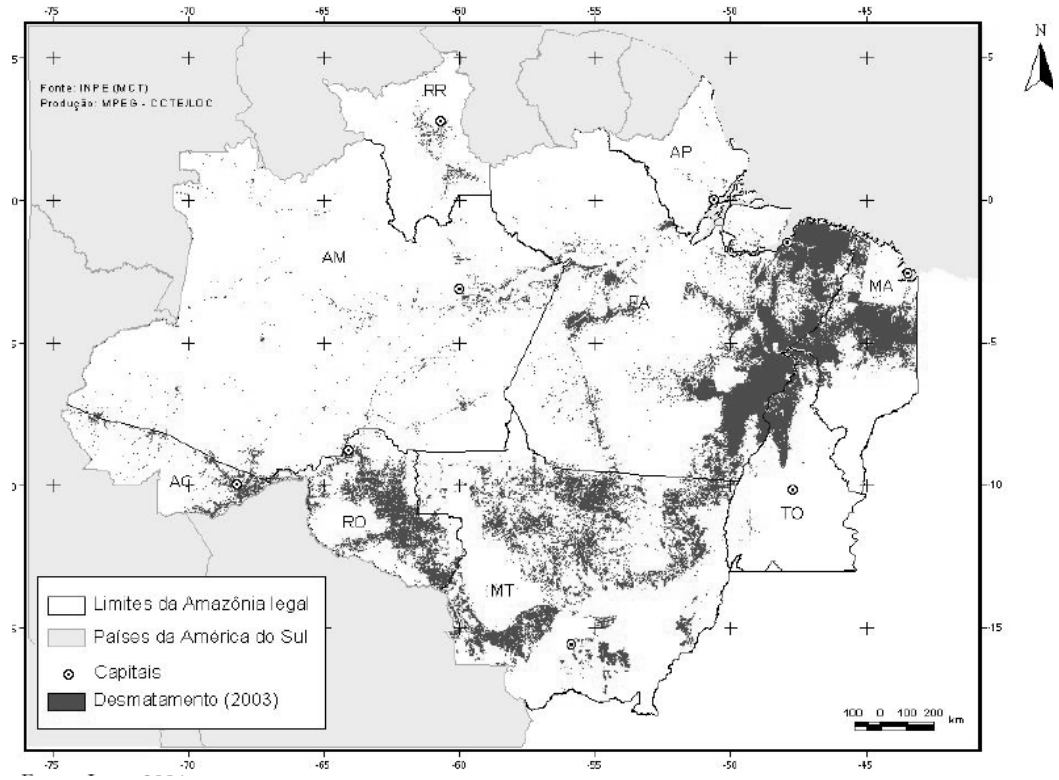


Figura 9 - Área total desma tada na Amazônia Legal (INPE, 2004[15] *apud* Ferreira; Venticinque; Almeida, 2005).

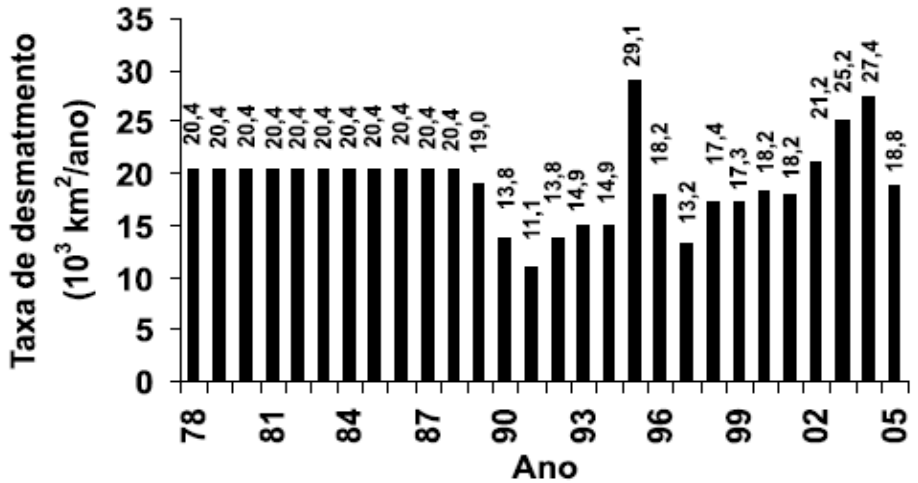


Figura 10 - Taxas anuais de desmatamento na Amazônia brasileira obtidas de dados do satélite LANDSAT (Fearnside, 1993[16] e INPE, 2006[17] *apud* Fernside, 2006).

---

[16] Fearnside, P.M. Desmatamento na Amazônia: Quem tem razão nos cálculos - o INPE ou a NASA? Ciência Hoje. 1993; 16: 6-8.

[17] Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Estimativas anuais desde 1988: taxa de desmatamento anual (km^2/ano). São José dos Campos: INPE; 2006.
Disponível em: http://www.obt.inpe.br/prodes/prodes_1988_2005.htm.

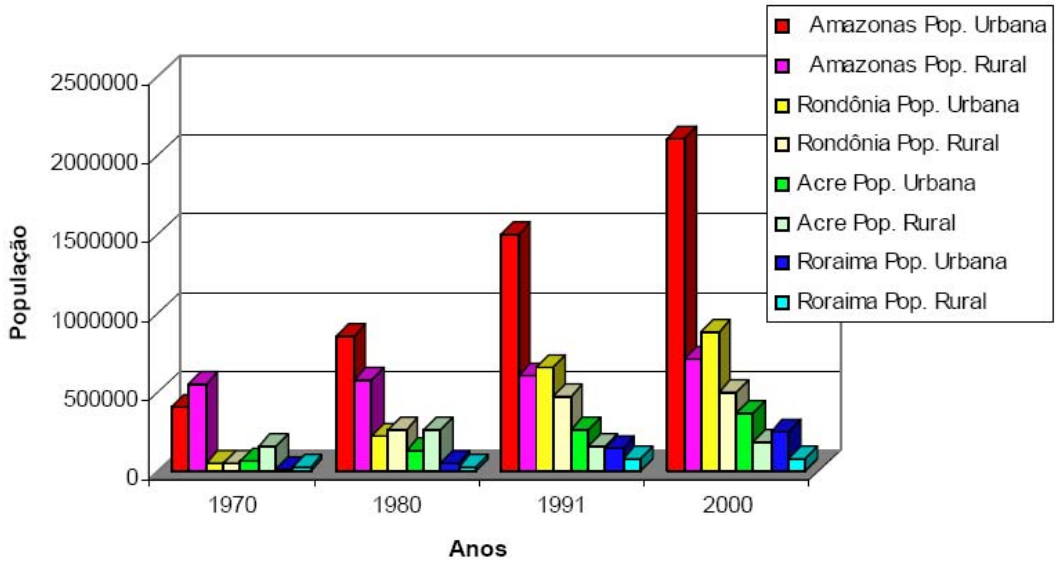


Figura 11A- Crescimento demográfico urbano e rural por estado na Amazônia Ocidental (1970-2000) (Ferreira; Salati, 2005).

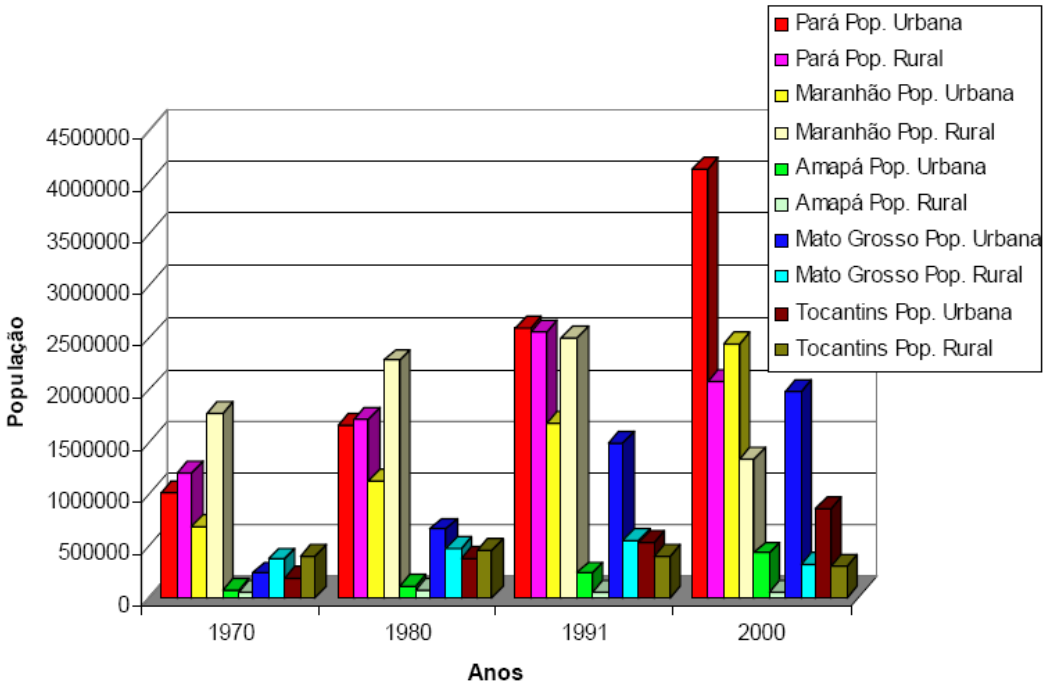


Figura 11B- Crescimento demográfico urbano e rural por estado na Amazônia Oriental (1970-2000) (Ferreira; Salati, 2005).

2.1.3.2 Contextos epidemiológicos da Malária na Amazônia

Frente a essa heterogeneidade sócio-econômica e ambiental da região Amazônica, com diferentes graus de antropização em seu território, podemos identificar pelo menos cinco tipos de população com características epidemiológicas diversas: (a) a população dos grandes núcleos urbanos, (b) a população de ribeirinhos, (c) a população nativa ou indígena, (d) a população de assentamentos rurais e de comunidades oriundas de assentamentos rurais e (e) a população transiente de garimpos e/ou grandes projetos econômicos, como os projetos de mineração. Essas populações distribuem-se em três tipos de paisagem: a paisagem natural (que concentra as populações tradicionais como os ribeirinhos e indígenas), a paisagem antropizada (assentamentos rurais, garimpos e núcleos residenciais ao longo de estradas) e a paisagem construída ou urbanizada (contendo os grandes núcleos urbanos; Confalonieri, 2005). Devido aos diferentes fatores biológicos, comportamentais e geográficos a que essas populações estão expostas, ocorre maior ou menor incidência de malária, com maior ou menor estabilidade de transmissão.

A Figura 12 mostra esquematicamente as modificações paisagísticas da Amazônia e seus reflexos na saúde da população residente. A distribuição de algumas dessas populações podem ser inferidas através do mapa que mostra o povoamento e macroregiões da Amazônia Legal (Figura 13) e os indicadores de pressão humana na Amazônia brasileira para o período de 1996-2002 (Figura 14). Esses indicadores são classificados em pressão humana consolidada (áreas de desflorestamento, zonas urbanas e assentamentos rurais) e pressão humana incipiente (focos de calor e áreas de mineração).

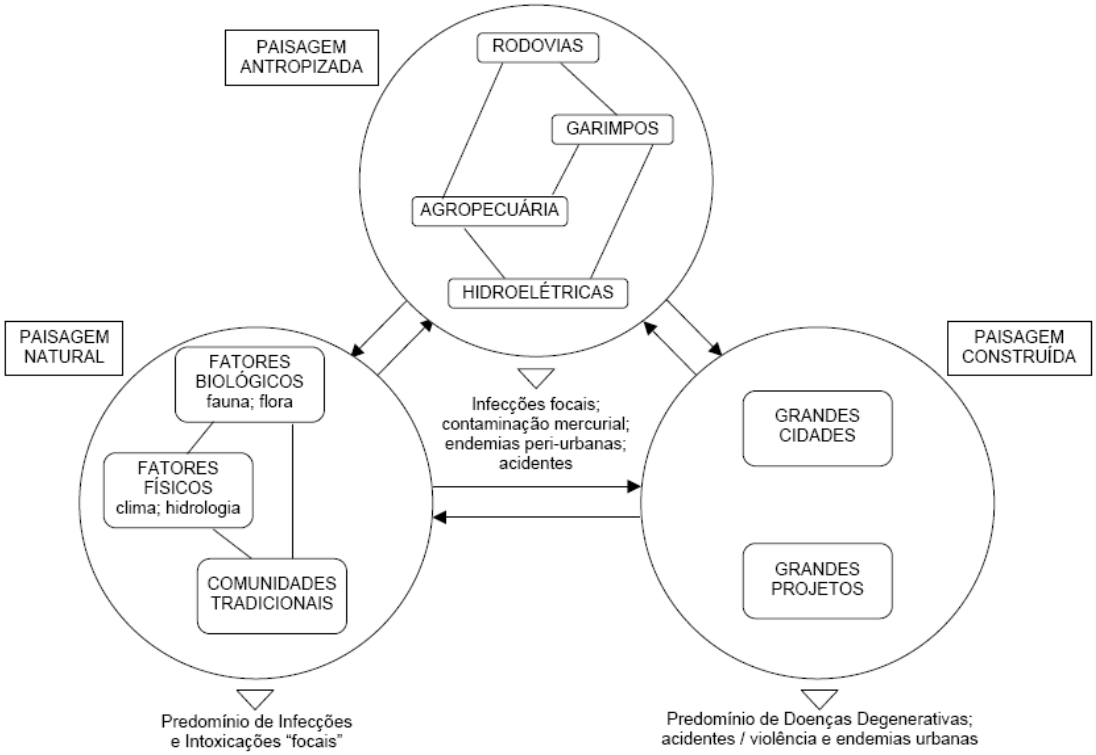


Figura 12 - Modificações paisagísticas e saúde na Amazônia brasileira (Confalonieri, 2005).

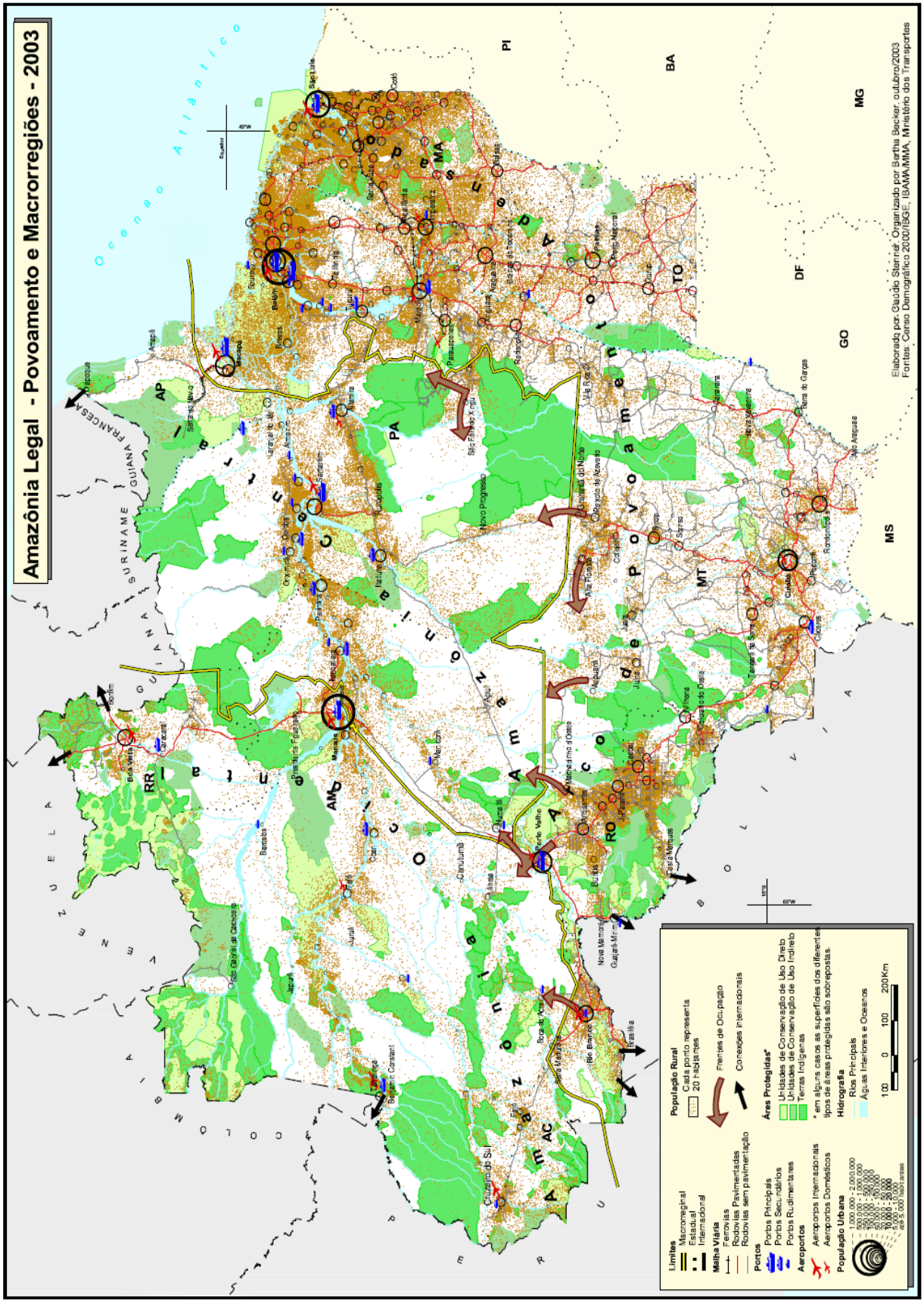


Figura 13 - Amazônia Legal - Povoamento e Marcorregiões (Brasil, Governo Federal, Plano Amazônia Sustentável, 2003).

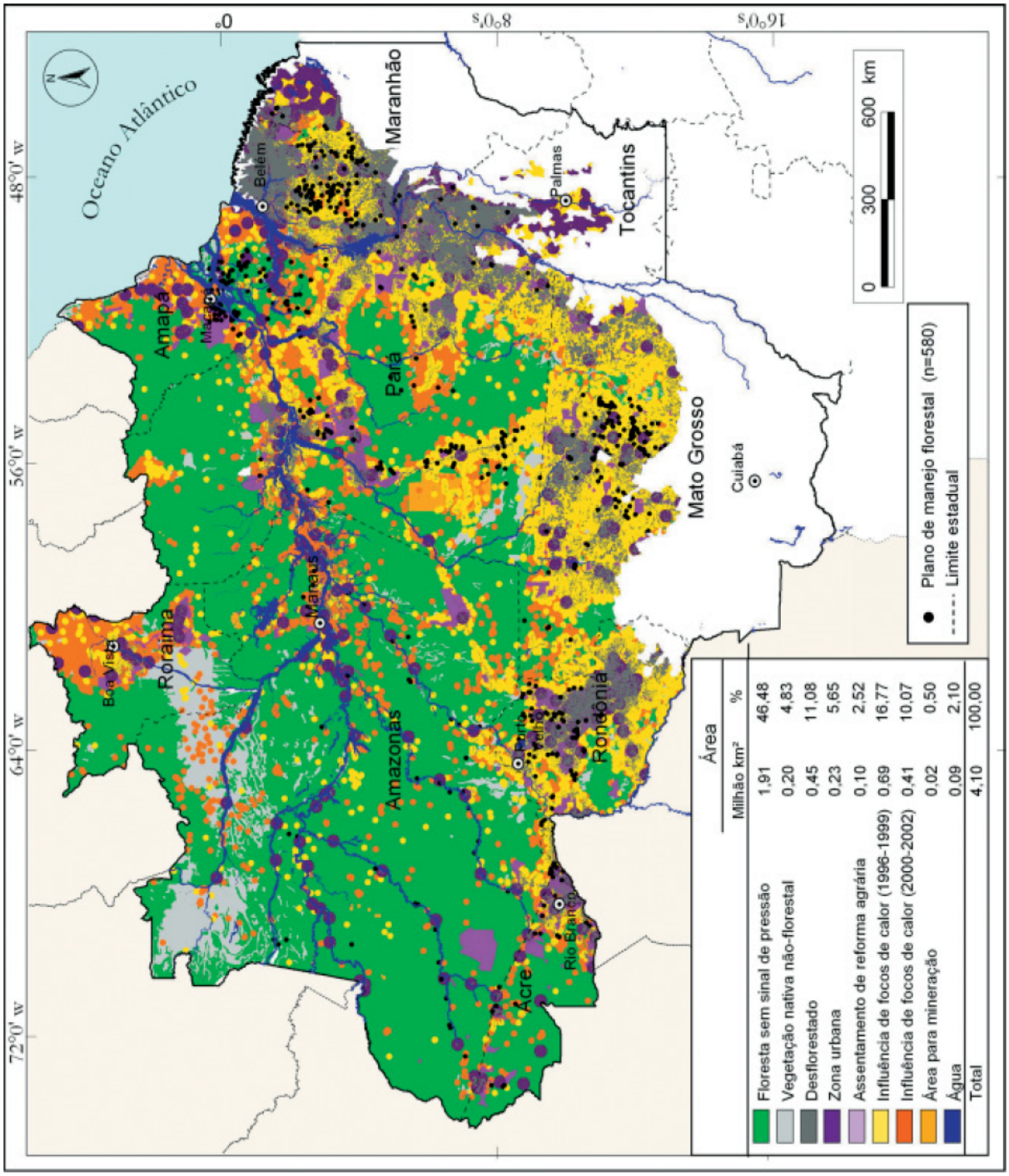


Figura 14 - Pressão Humana na Amazônia Brasileira - todos os indicadores (Barreto *et al.,* 2005).

Diferentes grupos de pesquisadores analisaram as características da transmissão de malária em um ou mais dos tipos de população amazônica descritos anteriormente. Esses dados são importantes para se conhecer melhor a epidemiologia da malária na Amazônia, com o intuito de identificar os fatores de risco para cada tipo de população e possibilitar a elaboração de estratégias de prevenção e controle que sejam aplicáveis tanto no âmbito específico como no âmbito geral. Alguns estudos serão comentados a seguir, para demonstrar a heterogeneidade da malária dentro da Amazônia Legal e seus respectivos fatores de risco.

A malária em populações ribeirinhas nativas da Amazônia já foi bem caracterizada por vários grupos brasileiros. Camargo *et al.* (1999) avaliaram a população ribeirinha de Portuchuelo, onde 94,5% dos indivíduos haviam nascido na Amazônia e o tempo médio de residência no local era de 15,7 anos. A incidência de malária foi sazonal, predominando no período da seca e em indivíduos jovens abaixo dos 16 anos, sendo que houve poucos casos de malária entre os indivíduos mais velhos. Já Alves *et al.* (2002) mostraram a presença de infecção sintomática e assintomática tanto por *P. vivax* como por *P. falciparum* em duas populações ribeirinhas de Rondônia. Nesse estudo, enquanto infecções sintomáticas foram mais freqüentes em indivíduos jovens e naqueles com pouco tempo de residência na Amazônia, indivíduos mais velhos ou com maior tempo de residência em área endêmica apresentavam mais freqüentemente infecções assintomáticas tanto por *P. vivax* como por *P. falciparum*.

Ambos os estudos descritos acima a presença de imunidade adquirida contra o *Plasmodium* em populações nativas da Amazônia, e sugerem que a aquisição de imunidade ocorre devido à exposição cumulativa ao agente infeccioso (medida pela idade) nessas comunidades estáveis. Mais recentemente, Ladeia-Andrade (2005) mostrou que populações ribeirinhas tradicionais do Amazonas expostas ao parasita desde o nascimento, apresentam imunidade clínica (ausência ou diminuição dos sintomas na vigência de infecção) e anti-parasitária (ausência de infecção), evidenciada pela alta prevalência de casos sintomáticos somente em crianças e alta prevalência de anticorpos anti-*Plasmodium* em todas as faixas etárias, além da presença de infecções subclínicas com parasitemia subpatente em cerca de 10% dos indivíduos examinados. Outras comunidades ribeirinhas da Amazônia apresentaram características semelhantes (Suárez-Mutis *et al.,* 2007).

Em relação à população de mineradores, Duarte e Fontes (2002) demonstraram que quanto maior a produção de ouro no estado do Mato Grosso entre 1985 e 1996, maior o IPA

da região, indicando a importância dessa atividade econômica na transmissão de malária. Barbieri e Sawyer (2007) encontraram malária em 31,3% de mineradores do norte do Mato Grosso em 1993, identificando como fatores de risco o local do garimpo e da residência do minerador, intensidade da exposição ocupacional e estado de origem; esses dados sugerem que indivíduos com chegada recente na área teriam maior risco do que mineradores antigos, já acostumados com métodos de prevenção. De Andrade *et al.* (1995) identificaram infecções assintomáticas (70% dos examinados) pela primeira vez em mineradores no Brasil; Fontes (2001) mostrou novamente a ocorrência de infecções assintomáticas em mineradores do Mato Grosso em 1996, que foram mais tarde confirmadas por Scopel *et al.* (2004), através da detecção por métodos moleculares de infecções por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P.malariae* em mineradores de Apiacás (MT). Neste último estudo, 63% dos infectados detectados eram assintomáticos, embora o tempo de seguimento tenha sido de apenas 72 horas.

A população indígena também já foi bastante estudada, tanto na Amazônia brasileira como nos países vizinhos. Marcano *et al.* (2004) avaliaram a morbidade por malária em duas comunidades de índios Yanomamis do Brasil e Venezuela. Os autores relatam que nos índios da região isolada do Orinoco (Venezuela), a malária era hiperendêmica e de transmissão estável, com grande proporção de infecções assintomáticas e poucos casos de malária severa, enquanto nas vilas indígenas do lado brasileiro (que se situavam próximas a locais de garimpo), ocorria padrão de transmissão mesoendêmico, com poucos casos assintomáticos e maior proporção de casos graves. Os autores concluem que nessas comunidades indígenas de difícil acesso, com circulação restrita de isolados de parasitas, a ativação contínua do sistema imune (indicada pela presença de anticorpos contra o *Plasmodium*) leva à redução da prevalência e morbidade da malária. Outros estudos mostraram maior incidência de malária em crianças indígenas (Arruda *et al.,* 1996), aumento da prevalência de anticorpos contra o parasita conforme a idade (Sá *et al.,* 2005, Spindel *et al.,* 2001), e presença de infecções assintomáticas em outras comunidades indígenas da Amazônia colombiana (Suárez-Mutis; Bonilla; Blandón, 2000[18] *apud* Coura; Suárez-Mutis; Ladeia-Andrade, 2005).

A malária urbana tem recebido atenção redobrada devido ao recente aumento no número de casos nos grandes centros urbanos amazônicos como Belém, Porto Velho e

[18] Suárez-Mutis MC, Bonilla MP, Blandón ME 2000a. Diagnosis of the health situation of the Yujup-Maku, a seminomadic indigenous group of the Colombian Amazonas. In: XVth International Congress for Tropical Medicine and Hygiene and Malaria; Cartagena; 2000. Abstracts. Cartagena: International Federation for tropical Medicine; 2000. p. 192.

Manaus. Recentemente, Tada *et al.* (2007) mostraram que na área periurbana de Porto Velho próxima ao rio Madeira, cuja população originou-se a partir da construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré, no início do século XX, ainda ocorre alta incidência de *P. vivax* e *P. falciparum* (IPA entre 100 e 300), atingindo preferencialmente crianças e adolescentes, com padrão mesoendêmico de transmissão e epidemias no ápice da estação chuvosa. A população estudada é uma população urbana já estável (86% dos adultos com mais de 15 anos de residência em área endêmica) e que apresentou alta prevalência de portadores assintomáticos (> 10%); além disso, a área ribeirinha avaliada apresentava-se bastante modificada pela ação humana, com criadouros permanentes para *A. darlingi*, resultando em altas densidades vetoriais (Gil *et al.,* 2007).

Embora os critérios de endemicidade propostos por MacDonald (1957) e pela WHO (1950) sugiram que em situações de baixa endemicidade (como a que existe no Brasil) não ocorra aquisição de imunidade clínica, os estudos descritos acima demonstram que essa aquisição de imunidade ocorre ativamente em populações nativas da Amazônia, como a população ribeirinha e a população indígena, e em menor grau em algumas populações de garimpeiros. Entretanto, populações migrantes e menos estáveis, ou com menor tempo de residência na Amazônia (como as populações de assentamento rural), ainda são pouco estudadas. Marques (1987) e Sawyer (1988[19] *apud* de Castro *et al*., 2006) caracterizaram a epidemiologia da malária em assentamentos rurais incipientes da Amazônia na década de 80, mas poucos estudos se sucederam nas décadas seguintes, durante as quais grandes transformações sociais e ambientais ocorreram (de Castro *et al*., 2006). Essas transformações deram origem a pequenas comunidades de caráter mais estável, mas ainda em expansão.

Camargo *et al.* (1996) avaliaram as características da malária em uma pequena comunidade urbana de Rondônia, cuja população era na maioria nativa do estado, mas que se deslocava freqüentemente a trabalho. Houve transmissão sazonal com pico na época seca, com predomínio de *P. vivax* sobre *P. falciparum*, prevalência baixa em menores de 10 anos de idade e grupo de risco relacionado a atividade profissional e local de trabalho, indicativo de transmissão extra-domiciliar. Nessa comunidade só foram indentificadas infecções sintomáticas. Embora a comunidade seja classificada como urbana, na verdade apresenta características mistas de população periurbana e trabalhadores de garimpo com padrão de

[19] Sawyer DR. Frontier malaria in the Amazon region of Brazil: types of malaria situations and some implications for control. Brasília: Pan American Health Organization/WHO/Special Programme for Research Training in Tropical Diseases; 1988.

transmissão hipoendêmico. Em estudo anterior com população de assentamento agro-industrial envolvida na extração de madeira, Camargo *et al.* (1994) encontraram padrão de transmissão hipoendêmico, também com predomínio de *P. vivax* sobre *P. falciparum* e epidemias no final da estação chuvosa e início da estação seca, sendo que o principal grupo de risco era constituído de indivíduos do sexo masculino com atividades profissionais predominantemente vespertinas e/ou extra-domiciliares.

Duarte *et al.* (2004) conduziram um estudo de coorte em área de assentamento rural no Mato Grosso, originado a partir de garimpos locais desativados. Cerca de 521 indivíduos residentes em dois ramais diferentes (dos quais 33% eram migrantes de áreas não-endêmicas), foram acompanhados por 8 meses através de três estudos transversais. A taxa de incidência de malária na população foi de 4,49 por 100 pessoas-ano, com predomínio de malária *vivax*. Não foram detectados portadores assintomáticos pela microscopia, que foi o único método diagnóstico empregado no estudo. Exceto pelo efeito protetor da presença de malária no início do estudo, os autores não conseguiram identificar nenhum outro fator de risco significativo para malária, provavelmente por problemas de coleta de dados e/ou tempo curto de seguimento.

Além de várias publicações de Sawyer e colaboradores (Sawyer, 1985[20]; Sawyer, 1988[19]; Sawyer, 1992[21] *apud* de Castro *et al.,* 2006) sobre malária em áreas rurais (que infelizmente são de difícil acesso por serem publicações técnicas e/ou livros publicados no exterior há mais de duas décadas atrás), Castro e colaboradores efetuaram vários estudos (de Castro *et al.,* 2006; de Castro *et al.,* 2007, Singer; Castro*,* 2001) sobre as características epidmiológicas da malária nesse tipo de população. Esses autores redefinem a malária de assentamento rural (ou malária de fronteira) como um fenômeno que contém três níveis espaciais: o nível individual (densidades vetoriais altas e exposição humana intensa, alta morbidade e baixa imunidade entre migrantes, condições precárias de moradia e pouco acesso a serviços de saúde); o nível comunitário (instituições fracas, pouca coesão da comunidade, altas taxas de imigração e emigração), e o nível estadual e/ou nacional (desenvolvimento não-planejado de novos assentamentos, estimulado por fracassos agrícolas em assentamentos prévios). Entretanto, em várias publicações sucessivas sobre o tema, os autores abordam

[20] Sawyer DR. Research design and feasibility in the Machadinho settlement project. Centro de Desenvolvimento e Planejamento Regional, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte: CEDEPLAR; 1985.

[21] Sawyer DR. Malaria and the environment. Brasília: Instituto SPN; 1992.

extensivamente a questão espacial da transmissão de malária, nem sempre levando em conta outros fatores de risco como variáveis individuais, sócio-econômicas, genéticas e imunológicas. O estudo mais recente sobre o tema (de Castro *et. al,* 2006), que envolve dez anos de seguimento (1985-1995) na mesma localidade, não caracteriza claramente as variáveis sócio-econômicas, comportamentais e mesmo espaciais na população-alvo. Não se descreve, por exemplo, quantos indivíduos inicialmente avaliados em 1985 ainda continuavam residindo na área em 1995, ou qual o número de malárias confirmadas durante o período de estudo, o que mostra que, embora o componente espacial da malária tenha sido extensivamente analisado, ainda há lacunas de conhecimento no que diz respeito a fatores de risco para populações de assentamentos rurais.

2.2 BIOLOGIA DO *PLASMODIUM* E IMPLICAÇÕES PARA O ESTUDO DE AQUISIÇÃO DE IMUNIDADE

2.2.1 Interações entre o *Plasmodium* e o sistema imune humano

O hospedeiro humano entra em contato com quatro estágios do parasita (Figura 15): esporozoítas (ciclo assexuado pré-eritrocitário), merozoítas e trofozoítas (ciclo assexuado eritrocitário), e gametócitos (ciclo sexuado). O estágio pré-eritrocitário representa o primeiro encontro do hospedeiro com o parasita; o estágio eritrocitário é responsável pelas manifestações clínicas, e o estágio sexuado é o responsável pela transmissão vetorial (Good; Doolan, 1999).

Em *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos dão origem a formas dormentes conhecidas como hipnozoítos ao invadir os hepatócitos; estas formas podem reativar-se semanas ou meses após a infecção inicial e dar continuidade ao ciclo do parasita, resultando nas recaídas típicas da infecção humana por *P. vivax* e *P. ovale*.

Diferentes antígenos são expressos pelo parasita em cada estágio, que por sua vez estimulam diferentes componentes do sistema imune do hospedeiro humano. Esse complexo processo de aquisição de imunidade em malária é, ainda hoje, pouco compreendido, sendo que inúmeros fatores o influenciam. Condições inerentes ao hospedeiro, como a maturidade do sistema imunológico relacionada à idade, e mecanismos inatos de resistência que diferem

de um indivíduo ao outro, podem facilitar ou dificultar a aquisição de imunidade, além obviamente das condições de transmissão a que esse indivíduo é exposto, como já discutido anteriormente. Por outro lado, o próprio parasita apresenta mecanismos de evasão imunológica que dificultam a aquisição de imunidade, tais como indução de imunossupressão e a variação clonal de antígenos de superfície (Marsh, 1993).

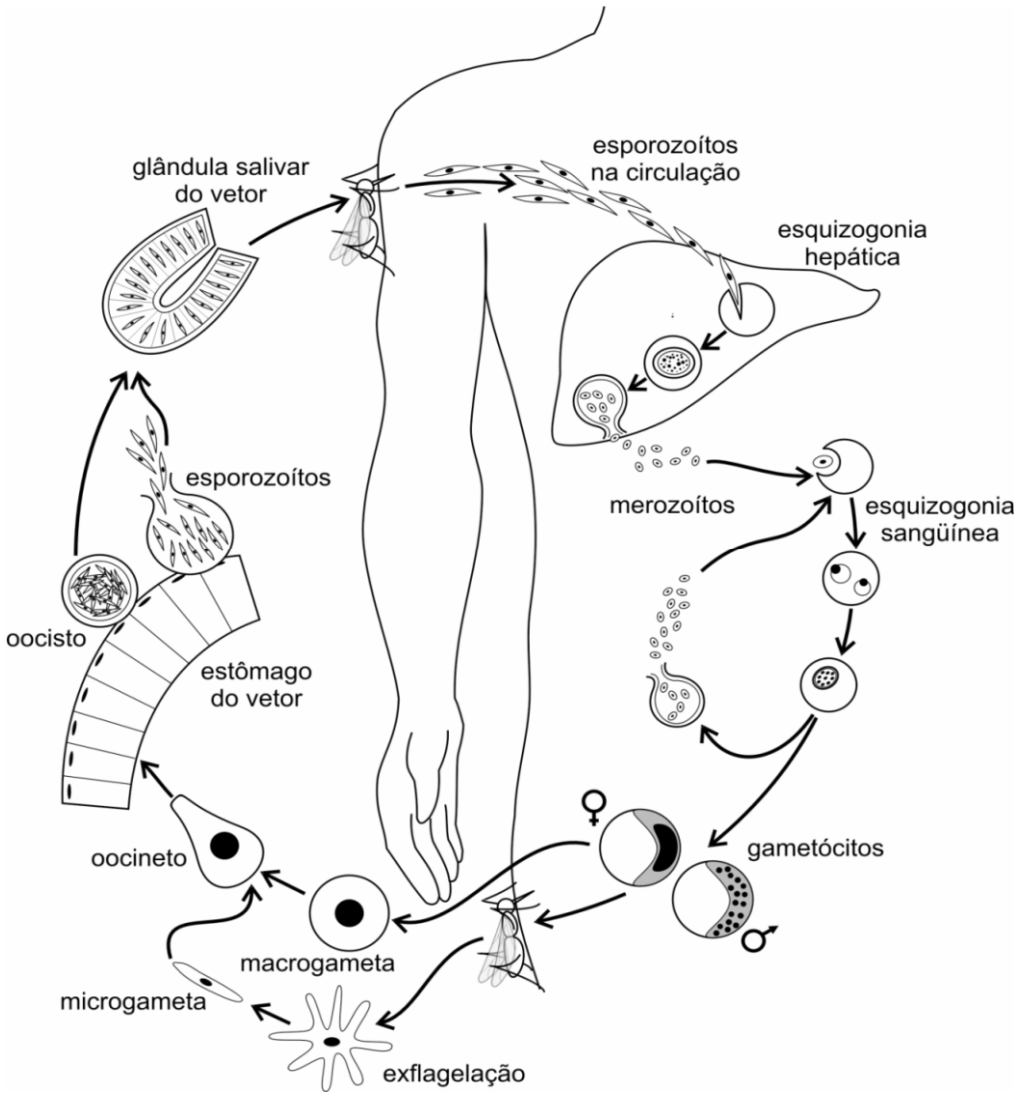


Figura 15 - Ciclo vital simplificado dos Plasmódios que infectam o homem (Ferreira, Foronda e Schumaker, 2003).

Pela sua importância no continente africano tanto pelo número de casos como pela gravidade dos mesmos, grande parte dos estudos publicados sobre malária concentra-se em *P. falciparum*, sendo que poucos antígenos de *P. vivax* são bem caracterizados do ponto de vista

imunológico e podem ser incluídos em uma lista de candidatos ao desenvolvimento de vacinas (Arévalo-Herrera; Herrera, 2001). Neste projeto, investigar-se-á a aquisição de imunidade contra os estágios assexuados eritrocitários de *P. vivax*, por ser esta a espécie predominante no Brasil nas últimas décadas, utilizando-se como antígeno a proteína principal de superfície de merozoítos-1 (PvMSP-1).

2.2.2 Imunidade contra o estágio eritrocitário

A imunidade humoral exerce importante papel contra os estágios eritrocíticos do parasita. Anticorpos citofílicos anti-*P. falciparum*, em cooperação com monócitos e macrófagos (Bouharoun-Tayoun *et al.,* 1990; Gysin; Druilhe; da Silva, 1992) bloqueiam a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, bem como o desenvolvimento intra-eritrocítico (Druilhe; Perignon, 1994). A imunidade celular contra o ciclo eritrocitário também tem sido extensivamente estudada. Relatos apontam para imunossupressão na fase aguda da infecção, com pouca atividade proliferativa detectável contra antígenos de *P. falciparum* ou *P. vivax*, corroborado pelo fato de que a resposta celular (linfócitos T) em indivíduos sujeitos à sazonalidade da infecção é maior nos períodos mais baixos da transmissão (Troye-Blomberg; Berzins; Perlmann *et al.,* 1994). Muitos estudos fracassaram em demonstrar correlação entre proteção clínica e respostas celulares (Chizzolini; Geinoz; Schrijvers, 1990; Mshana *et al.,* 1993; Kabilan *et al.,* 1994) , o que indica a complexidade e heterogeneidade da aquisição de imunidade contra as formas eritrocíticas do parasita.

2.2.2.1 A proteína de superfície do merozoíto-1

A MSP-1 é expressa na superfície do merozoíto; contém 200 kDa e participa na invasão do eritrócito pelo merozoíto. Durante a invasão da hemácia, a MSP-1 é clivada, resultando num fragmento carboxila-terminal (C-terminal) de 19 kDa (MSP-1_{19}), que passa a ser expresso na superfície da célula infectada (Good; Doolan, 1999). Com base em comparações de seqüências da MSP-1 de *P. vivax* com seqüências de diferentes espécies de *Plasmodium*, definiram-se inicialmente dez blocos conservados entre espécies (Interspecies Conserved Blocks ou ICB), entremeados por regiões essencialmente dimórficas ou

polimórficas (del Portillo *et al.,* 1991; Gibson *et al.,* 1992). As duas famílias alélicas, Salvador-I e Belém, são encontradas em isolados amazônicos (Porto *et al.,* 1992); novas variantes da PvMSP-1 podem ser geradas por recombinação entre essas famílias dimórficas (Premawansa *et al.,* 1993; Putaporntip *et al.,* 1997). Mais recentemente Putaporntip *et al.* (2002) seqüenciaram 31 alelos diferentes da PvMSP-1, incluindo 8 alelos da Amazônia Brasileira, e definiram 6 blocos variáveis entremeados por 7 blocos conservados.

Muita atenção tem sido dada à MSP-1 pelo seu potencial como candidato vacinal contra *P. falciparum* e *P. vivax* (Sierra *et al.,* 2003; Conway, 1997; Conway *et al.,* 2000). Vários estudos da PvMSP-1 e PfMSP-1 mostraram que anticorpos anti-MSP-1_{19} inibem o desenvolvimento de *Plasmodium in vitro* (Blackman *et al., 1990;* Chang *et al., 1992;* Uthaipibull *et al.*, 2001), e induzem imunidade protetora em modelos animais (Herrera *et al.,* 1992; Egan *et al.,* 2000; Yang *et al.,* 1999; Sierra *et al.,* 2003; Perera *et al.,* 1998). Estudos clínicos sobre a PfMSP-1_{19} mostraram que a indução de anticorpos, proliferação de células T e produção de citocinas causadas por esse antígeno se associaram à diminuição da sintomatologia (Riley *et al.,* 1992), e redução da morbidade por *P. falciparum* em crianças abaixo de um ano (Branch *et al.,* 1998).

Embora a PvMSP-1 também desperte interesse como candidato vacinal, seu reconhecimento imune em seres humanos e o papel na imunidade naturalmente adquirida contra o *Plasmodium* ainda continua pouco investigado. Estudos transversais na Amazônia brasileira sobre o reconhecimento humoral da porção C-terminal da PvMSP-1 (PvMSP-1_{19}) mostram que indivíduos com malária *vivax* aguda e/ou prévia freqüentemente apresentam anticorpos contra a região conservada da MSP-1 (Soares *et al.,* 1997, 1999a, Rodrigues *et al.,* 2003; Barbedo *et al.,* 2007). Quanto ao reconhecimento imunológico das regiões variáveis, na década de noventa um estudo na Colômbia mostrou que indivíduos com malária produzem anticorpos capazes de discriminar entre antígenos recombinantes representando versões altamente divergentes do bloco 6 (Mancilla *et al.,* 1994), mas não investigou a relação com proteção clínica. Mais recentemente demonstrou-se que o reconhecimento imunológico da porção amino-terminal (N-terminal) da PvMSP-1, em especial a produção de anticorpos do tipo IgG_3, confere proteção clínica contra a malária *vivax* (Nogueira *et al.,* 2006), entretanto ainda permanece ignorado se os anticorpos protetores são variante-específicos.

A imunidade celular também é induzida por MSP-1_{19}. Linfócitos T helper específicos para MSP-1_{19} são necessários para aumentar a produção de anticorpos em camundongos

(Hirunpetcharat *et al.,* 1998). Camundongos que não produzem anticorpos anti-MSP-1_{19} sucumbem à infecção experimental. A transferência passiva de anticorpos anti-MSP-1_{19} reduz a parasitemia e protege contra o óbito, mas na ausência de T CD4+ ou células B, os animais sucumbem à infecção (Hirunpetcharat *et al.,* 1999). Em populações naturalmente expostas à malária na Amazônia brasileira, os epítopos mais freqüentemente reconhecidos por anticorpos localizam-se em regiões conservadas da PvMSP-1, especialmente em sua extremidade C-terminal (Soares *et al.,* 1997).

2.2.3 O quadro clínico da infecção plasmodial e sua relação com imunidade adquirida

Em indivíduos não-imunes (como viajantes e migrantes provenientes de áreas não-endêmicas) é comum a ocorrência de paroxismos característicos da malária. Os paroxismos iniciam-se com calafrios, acompanhados de mal estar, cefaléia e dores musculares e articulares. Náuseas e vômitos são sintomas freqüentes, podendo também ocorrer dor abdominal intensa. Em algumas horas inicia-se febre alta, que produz adinamia e prostração; a esta fase segue-se um período de sudorese profusa, com melhora progressiva do estado geral. Em geral, pacientes com infecção por *P. falciparum, P. vivax* e *P. ovale* têm paroxismos febris a cada 48 horas (febre terçã), enquanto aqueles infectados por *P. malariae* têm paroxismos a cada 72 horas (febre quartã). Complicações cerebrais (convulsões e coma), respiratórias (dispnéia e edema pulmonar), renais (insuficiência renal) e hematológicas (sangramentos espontâneos e anemia severa) podem acontecer, sendo relativamente freqüentes na malária *falciparum* e menos freqüentes na malária *vivax* (Warrell, 1993).

Na infecção por *P. falciparum* é freqüente a ocorrência de casos graves (principalmente nos continentes africano e asiático) embora uma parcela dos infectados possa ser assintomática. Na África, essas diferenças no quadro clínico são facilmente caracterizáveis e freqüentemente encontradas; já na Ásia, a malária severa pode chegar a 50 % dos casos. No Brasil, a situação clínico-epidemiológica é diferente. Enquanto entre 5% e 20% dos pacientes com diagnóstico de malária *falciparum* necessitam ser internados devido à gravidade dos sintomas (Noronha *et al.,* 2000), somente 0,5% a 1,9% dos pacientes com malária *vivax* precisam de internação (Santos-Ciminera *et al.,* 2007), sendo que casos de malária *vivax* graves segundo a classificação adotada pela WHO (2000b) são infreqüentes no Brasil. Por outro lado, infecções assintomáticas e oligossintomáticas (presença de poucos sintomas) não

são facilmente identificados pelos serviços de saúde, necessitando de uma cuidadosa avaliação dos sinais, sintomas e parâmetros laboratoriais para caracterização desse espectro clínico variado. Karunaweera, Carter e Mendis (1998) empregaram uma estratificação de sinais e sintomas mais freqüentes em malária *vivax,* associada a parâmetros bioquímicos e hematológicos, como método de identificação de imunidade contra a doença (ou seja, a ausência ou diminuição dos sintomas na vigência de infecção, mediado pela imunidade). Após revisão da literatura quanto aos sintomas mais freqüentes em infecções plasmodiais (Mishra *et al.,* 2007; Noronha *et al.,* 2000; Praba-Egge *et al.,* 2003), utilizaremos uma modificação do método empregado por Karunaweera, Carter e Mendis (1998) para descrever o espectro clínico da infecção pelo *Plasmodium* na população de estudo e sua relação com possíveis indicadores de imunidade adquirida.

2.2.4 Mecanismos inatos de resistência ao *Plasmodium*

2.2.4.1 Grupo sangüíneo Duffy

O grupo sangüíneo Duffy foi descrito inicialmente em 1950 por Cutbush e Mollinson (1950) em um paciente chamado Duffy, e apresenta quatro alelos: FYA, FYB, FY (ou FYB-33) e FYX (ou FYB nulo), que expressam respectivamente os antígenos Fy^a, Fy^b, Fy, e pequena quantidade de Fy^b ($Fy^{b\ fraco}$). Indivíduos podem apresentar as seguintes combinações: Fy^aFy^a, Fy^bFy^b (homozigotos), Fy^aFy, Fy^bFy (heterozigotos com um único alelo expresso), Fy^aFy^b (heterozigotos com dois alelos expressos), FyFy (Duffy-negativo), ou ainda diferentes combinações com $Fy^{b\ fraco}$. Recentemente foi descrito um alelo FYA nulo, que à semelhança de FYB nulo resulta em baixa expressão do antígeno Fy^a (Zimmerman *et al.,* 1999; Langhi *et al.,* 2004) A distribuição dos alelos do grupo Duffy varia conforme as raças, sendo que em negros africanos é muito freqüente o fenótipo Duffy-negativo. Indivíduos Duffy-negativos constituem 11,5 a 12% da população não-ameríndia em duas áreas da Amazônia Ocidental brasileira (Colauto *et al.,* 1981; Cavasini *et al.,* 2000). Em outros estudos, as freqüências dos alelos FYA, FYB e FY foram respectivamente de 42,9%, 37% e 20,1% em Portuchuelo e 35,1%, 44% e 24,5% em Monte Negro, Rondônia (Ferreira *et al.,* 2002).

Eritrócitos que não expressam o grupo sangüíneo Duffy (FyFy) são refratários aos estágios sangüíneos de *P. vivax* (Miller *et al.,* 1976), representando um mecanismo inato de

resistência à malária por *P. vivax* (embora recentemente dois casos de infecção por *P. vivax* tenham sido identificados em indivíduos Duffy negativos por Cavasini *et al.,* 2007a). Sabe-se que a heterozigozidade (FYA/FY, FYB/FY) diminui o número de sítios antigênicos expressos na superfície do eritrócito em cerca de 50%; entretanto há poucos estudos avaliando se heterozigotos para o alelo FY apresentam menor risco de adquirir a infecção (Zimmerman *et al.,* 1999; Cavasini *et al.,* 2001; Cavasini *et al.,* 2007b), e apenas um estudo longitudinal associando heterozigozidade para o sistema Duffy e proteção contra *P. vivax* (Kasenhagen *et al.,* 2007). Portanto, o grupo sangüíneo Duffy representa uma importante variável de confusão a ser incluída em estudos sobre a aquisição de imunidade contra *P. vivax.*

2.2.4.2 Polimorfismo H/R^{131} em FcγRIIA

Receptores Fc são glicoproteínas expressas na superfície de todas as células do sistema imune, e ligam a porção Fc da imunoglobulina (Ig). Há várias classes e isoformas desse receptor humano; o receptor FcγRIIA é o mais comum deles, e está presente em monócitos, macrófagos, neutrófilos e plaquetas (Braga *et al.,* 2005). Anticorpos de subclasses IgG_1 e IgG_3 ligam-se ao receptor FcγRIIA, recrutando células efetoras que inibem indiretamente o crescimento de formas assexuadas sangüíneas de *Plasmodium* (Bouharoun-Tayoun *et al.,* 1995). A aquisição de imunidade aos estágios sangüíneos do *Plasmodium* depende de mecanismos humorais e celulares (Braga *et al.,* 2005), onde os anticorpos citofílicos IgG_1 e IgG_3 desencadeiam respostas efetoras eficazes contra parasitas, como a opsonização e fagocitose de eritrócitos parasitados (Ferrante *et al.,* 1990; Groux; Gysin, 1990) e mecanismos de inibição celular dependente de anticorpos (Bouharoun-Tayoun *et al.,* 1990) Esse tipo de resposta é inibido *in vitro* por anticorpos não-citofílicos do tipo IgG_2 e IgG_4 (Groux; Gysin, 1990; Bouharoun-Tayoun; Druilhe, 1992). Por essa razão, o balanço de subclasses pode ser um fator decisivo na imunidade naturalmente adquirida à malária (Bouharoun-Tayoun; Druilhe, 1992; Ferreira *et al.,* 1996).

A substituição de arginina (R) por histidina (H) na posição 131 desse receptor altera o perfil de ligação de subclasses de IgG. A IgG_2 humana liga-se ao receptor mutado, tornando-se uma subclasse citofílica, com possível repercussão em termos funcionais (Pleass; Woof, 2001). Nessa siatuação, a resposta humoral anti-parasitária dependente do receptor FcγRIIA pode ser mais eficiente, e a fagocitose mediada por esse receptor é mais eficaz *in vitro* em indivíduos com o alelo H^{131} do que naqueles com o alelo R^{131} (Tebo; Kremsner; Luty, 2002).

Anticorpos IgG_2 contra antígenos de superfície de malária conferem proteção clínica à malária em indivíduos com o alelo H^{131}, mas não em indivíduos homozigotos para R^{131} (Aucan *et al.,* 2000). Portanto, avaliações de fatores de risco para malária devem incluir o estudo do polimorfismo H/R^{131} no receptor FcγRIIA na população humana, e do seu papel na proteção contra a malária.

2.2.5 Mecanismos de escape imunológico

O longo tempo necessário para a aquisição de imunidade sugere a ocorrência de imunidade isolado-específica, o que requer múltiplas infecções até que o indivíduo entre em contato com todas as cepas vigentes num determinado local (Kremsner *et al.,* 1989). Isso porque as espécies de *Plasmodium* apresentam vários mecanismos de evasão imunológica, entre eles: (a) polimorfismo genético das cepas, principalmente mutações em epítopos críticos, impedindo a estimulação de respostas T; (b) antígenos com regiões imunodominantes compostas de seqüências curtas repetitivas, que ao sofrerem pequenas mudanças impedem a maturação de anticorpos; (c) variação antigênica clonal (mesmo clone de parasitas apresenta diferentes versões de um antígeno); (d) indução da produção de IL-10, citocina anti-inflamatória que inibe a resposta imune celular.

A caracterização da resposta imune contra *P. vivax*, delineada neste projeto, será complementada pelo estudo da variação genética de MSP-1 de parte dos isolados de *P. vivax* obtidos dos mesmos indivíduos, o que permitirá avaliar a associação entre a diversidade de seqüências da PvMSP-1 e desenvolvimento de resposta humoral. Dessa forma, será possível verificar a ocorrência ou não de possíveis mecanismos de evasão imunológica de *P. vivax* na população em estudo, como polimorfismo antigênico, imunogenicidade dos antígenos e "pecado antigênico original" ou "*original antigenic sin*" (desvio na especificidade dos anticorpos causado pela exposição a novas variantes antigênicas devido a respostas variante-específicas pré-existentes).

3 OBJETIVOS

Avaliar fatores de risco para malária em uma população de assentamento rural da Amazônia brasileira, através da caracterização clínico-epidemiológica, imunológica e genética de indivíduos de uma coorte rural localizada no Acre, complementada pela caracterização genética dos parasitas circulantes. Esse objetivo principal pode ser desmembrado nos seguintes objetivos específicos:

1. Descrever a transmissão da malária na comunidade em estudo e os indivíduos quanto ao comportamento clínico-epidemiológico em relação ao Plasmodium.

2. Caracterizar o padrão de reconhecimento humoral de antígenos recombinantes da fase eritrocítica (MSP-1) de P. vivax, de forma quantitativa (quantificação de IgG e IgM) nos participantes da coorte, no início do estudo e durante episódios de malária.

3. *Caracterizar o reconhecimento celular da PvMSP-1 em indivíduos expostos ao Plasmodium vivax através de proliferação antígeno-induzida por painel de diferentes epítopos, para avaliar o grau de reconhecimento de cada versão do antígeno em indivíduos expostos à malária.*

4. Descrever a freqüência de ocorrência dos polimorfismos genéticos do receptor FcγRIIA e do sistema sangüíneo Duffy na população de estudo.

5. Caracterizar clinicamente os episódios de infecção plasmodial sintomáticos observados durante o período de estudo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A área escolhida para realizar o estudo sobre fatores de risco para malária em populações rurais denomina-se ramal do Granada, localizado no Projeto de Assentamento Dirigido (PAD) Pedro Peixoto, no município de Acrelândia, Acre. Além desse PAD, Acrelândia contém vários outros assentamentos rurais dentro de seus limites legais. Alguns aspectos históricos e atuais do PAD Pedro Peixoto serão revisados a seguir (seção 4.1), sendo que a área e população de estudo propriamente dita serão descritas na seção 4.2 .

4.1 CARACTERÍSTICAS DO PROJETO DE ASSENTAMENTO DIRIGIDO PEDRO PEIXOTO

4.1.1 Aspectos históricos dos Projetos de Assentamento no Acre

A história de colonização do Acre está associada ao extrativismo da borracha, que se iniciou na segunda metade do século XIX na região do Juruá e Purus. Esse período marca o primeiro ciclo da borracha, quando o látex se tornou o produto mais importante do Brasil entre 1880 e 1910, atraindo migrantes do Nordeste do Brasil e dando início à propriedade da terra e às povoações não-indígenas (IBGE, 1989[22] *apud* d'Oliveira; Sant'Anna, 2003). No início da década de 20, o Brasil perdeu a hegemonia do látex para a Ásia, e a Amazônia sofreu um período de decadência econômica. Com a Segunda Guerra Mundial, iniciou-se um novo ciclo da borracha, que no entanto entrou em decadência após o término da guerra (Cavalcanti, 1994[23] *apud* d'Oliveira; Sant'Anna, 2003). Com isso, grandes extensões de terra que pertenciam aos seringais passaram a ser vendidas a preços irrisórios para empresas do Sul do País (Cruz; Ramos Neto, 1983[24] *apud* Lorena, 2003).

---

[22] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. A organização do espaço na faixa da Transamazônica v.2 Acre e regiões vizinhas. Rio de Janeiro: IBGE; 1989. 224 p.

[23] Cavalcanti TJ da S. Colonização no Acre: uma análise sócio-econômica do projeto de assentamento dirigido Pedro Peixoto [dissertação (Mestrado em Economia Rural)]. Fortaleza: Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará; 1994.

[24] Cruz MBC da; Ramos Neto J. A colonização e a situação fundiária do Acre. In: Seminário Agropecuário do Acre, 1; Rio Branco. 1983. Anais. Rio Branco: EMBRAPA; 1983, p. 35- 78.

Em meados da década de 70, as tensões sociais agravaram-se na Amazônia Ocidental, com conflitos entre ex-seringueiros, posseiros e proprietários legais (Lorena, 2003). Para controlar a imigração e organizar a posse e uso da terra, o governo federal criou áreas especiais chamadas Projetos de Assentamento Dirigidos (PAD) e também os Projetos de Assentamento Rápido (PAR). No caso dos PAD, os lotes variavam entre 50 e 100 ha, distribuídos ao longo de ramais paralelos, perpendiculares a uma estrada principal (com o aspecto de espinha de peixe); o INCRA facilitava o acesso à terra, sendo que os programas assistenciais ficavam a cargo dos órgãos estaduais e municipais (Lorena, 2003). Quanto aos PAR, o papel do INCRA era apenas demarcar os lotes e distribuí-los aos colonos (Cruz; Ramos Neto, 1983[24] *apud* Lorena, 2003).

No final da década de 70 e durante a década de 80, cerca de 5.000 pessoas foram assentadas em diferentes PAD no estado do Acre, sendo que em 1985 esse número já havia subido para 33.600 (Marques, 1987). Em 1999 o Acre possuía 2 projetos de colonização, 35 projetos de assentamento dirigido e 8 projetos agro-extrativistas, com um total de 16.202 famílias assentadas, distribuídas em 9% do estado [1.572.531 hectares (ha)]. O maior e mais antigo é o Projeto de Assentamento Dirigido Pedro Peixoto (em algumas publicações denominado Projeto de Colonização Pedro Peixoto), localizado no extremo leste do estado (Figura 16). Esse assentamento foi fundado em 1977, contém 317.588 ha distribuídos em quatro municípios (Acrelândia, Senador Guiomard, Rio Branco e Plácido de Castro), com 4.225 famílias cadastradas em 1999 e distribuídas em 4.025 lotes (Acre, Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Naturais, 2000).

O mapa a seguir (Figura 16) mostra a situação fundiária do Acre em 2006. A maior parte dos assentamentos rurais localiza-se na região leste do estado, na fronteira com Rondônia, o Amazonas e a Bolívia; o noroste do estado também concentra vários projetos de colonização. O mapa mostra também as unidades de conservação, terras indígenas, áreas discriminadas (ação com o intuito de separar terras devolutas e de domínio público de terras particulares), áreas arrecadadas pelo Poder Público, imóveis rurais particulares, e áreas sem discriminação.

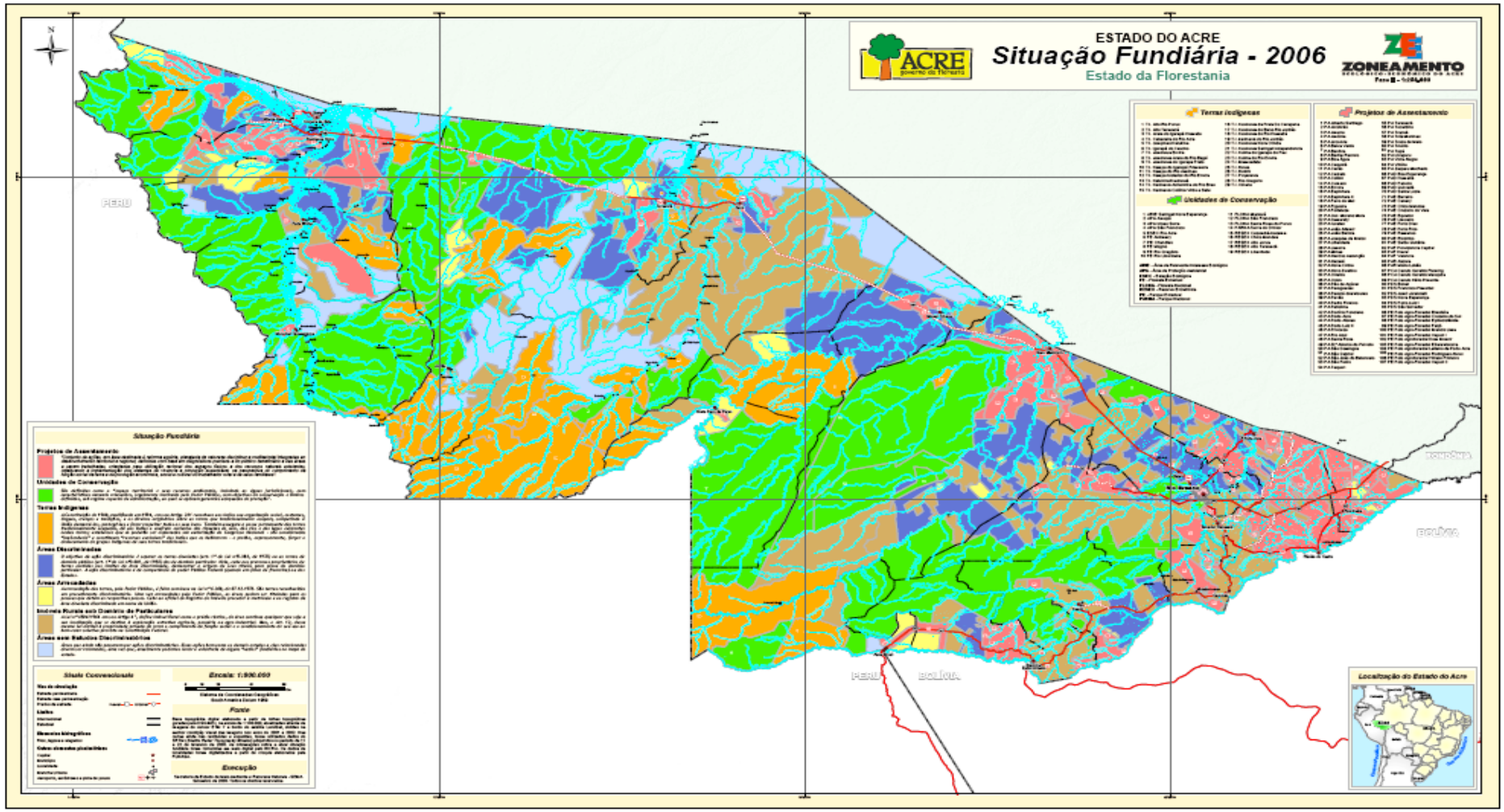


Figura 16 - Estrutura fundiária do Acre, 2006, mostrando projetos de assentamento (vermelho), unidades de conservação (verde), terras indígenas (alaranjado), áreas discriminadas (azul escuro), áreas arrecadadas pelo Poder Público (amarelo), imóveis rurais particulares (marrom) e áreas sem estudos discriminatórios (azul claro) (Acre, Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Naturais, 2006).

Outros projetos de colonização próximos ao PAD Pedro Peixoto (Figura 17) foram estabelecidos nos anos subseqüentes (Lorena; Lambin, 2007), com filosofias diferentes de distribuição da terra, visando estimular o contato social (Projeto Redenção 1 e 2, 1982), promover a produção agrícola em pequena escala aapenas para subsistência (Projeto Campinas, 1991), ou diminuir o impacto no meio ambiente através de incentivos ao extrativismo (Projeto Caquetá, 1997).

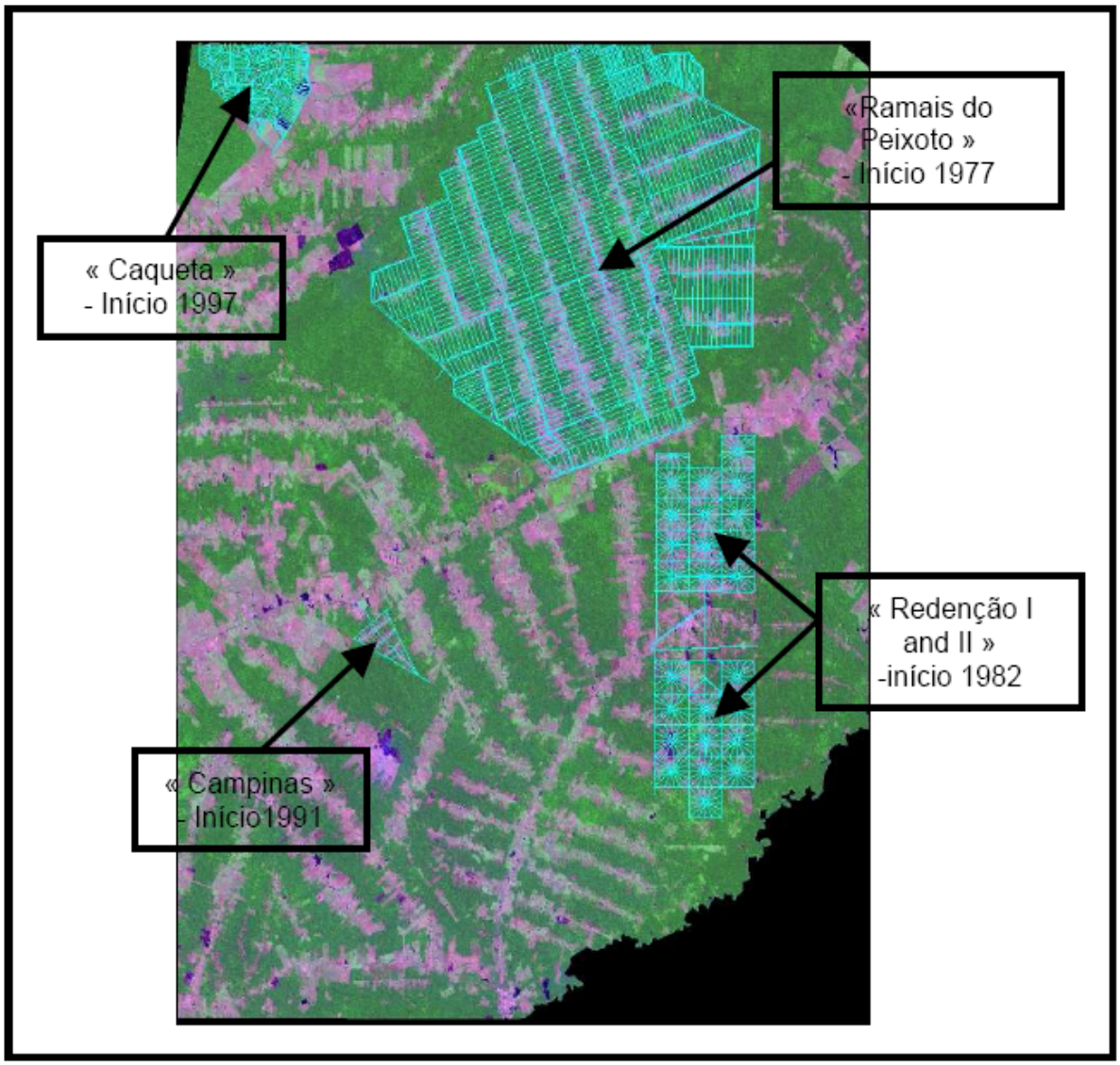


Figura 17 - Imagem da região leste do Acre, mostrando padrões de uso da terra na região (Nota: a área designada como "Ramais do Peixoto" por Lorena e Lambin corresponde a apenas parte do PAD Pedro Peixoto) (Lorena; Lambin, 2007).

4.1.2 Aspectos físicos, econômicos e sociais do PAD Pedro Peixoto

O PAD Pedro Peixoto localiza-se no nordeste do estado do Acre, a cerca de 90 km de Rio Branco, medindo em torno de 300.000 ha, situando-se aproximadamente entre os paralelos 9° 05'e 10° 30'S e meridianos 66° 41'e 67° 40'W. A área tem como ponto econômico central o município de Acrelândia e os ramais do Granada, Bigode, Oco do Mundo e Nabor Junior, e está limitada a norte/nordeste pela fronteira com o Estado do Amazonas, leste/sudeste pelo rio Abunã (na fronteira entre Brasil e Bolívia) e a oeste pela BR-317, que liga Rio Branco, no Acre (AC) a Boca do Acre, no Amazonas (AM). A BR-364, que liga Rio Branco (AC) a Porto Velho, em Rondônia (RO) e corta todo o projeto no sentido transversal (Figuras 18 e 19).

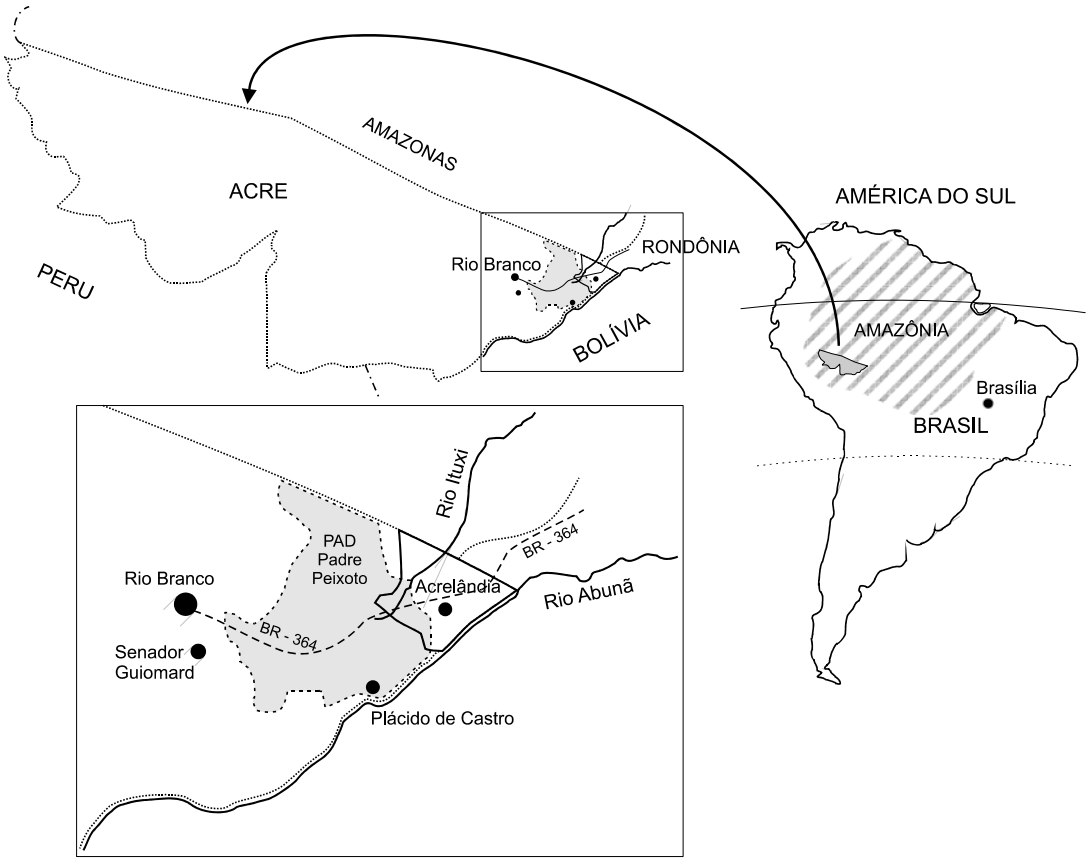


Figura 18 - Mapa mostrando a localização do PAD Pedro Peixoto.

O clima na região onde se localiza o PAD Pedro Peixoto é do tipo AM - tropical chuvoso (Köppen, 1948[25] *apud* Lorena; Santos; Shimabukuro, 2007), com cerca de três meses de período seco (d'Oliveira; Braz, 2006). A temperatura média anual fica entre 22 e 26°C e a precipitação anual varia entre 1700 e 2400 mm, com uma estação chuvosa entre outubro e fevereiro, chuvas intermitentes em maio, e estiagem entre junho e setembro (Fujisaka *et al*. 1996). A umidade relativa do ar é elevada, situando-se em média acima dos 80%. Entre maio e setembro há ocasionalmente a entrada de frentes frias vindas do Oceano lacial Antártico, levando a temperaturas mais baixas, entre 6 ° e 15 °C. O solo predominante é o Oxisol (Fujisaka *et al*. 1996) ou Latosolo Amarelo Vermelho Distrófico na classificação brasileira (Cochrane *et al*., 1985[26] *apud* d'Oliveira; Braz, 2006), que tem baixa fertilidade e altos níveis de acidez, baixo conteúdo de fósforo e altos níveis de alumínio [International Food Policy Research Institute (IFPRI), 2002].

Existem duas unidades geomorfológicas principais: as planícies e terraços aluviais e os baixos platôs amazônicos (Radambrasil, 1976a[27] *apud* Lorena, 2003). A topografia predominante é plana, com declividade em torno de 5%, e quase nunca superior a 10%. A vegetação predominante é de floresta tropical semi-perenifólia, com formações de floresta aberta [predominando a floresta aberta com palmeiras, como a paxiúba (*Iriartea exorhisa Mart*.) e o açaí (*Euterpe spp*.)], e floresta densa [destacando-se a castanheira *(Bertholletia excelsa*) e a seringueira (*Hevea brasiliensis*)] (Radambrasil, 1976b[28] *apud* d'Oliveira; Braz, 2006). Em seus limites Norte e Sul correm os rios Iquiri e Abunã, dois importantes afluentes dos Rios Purus e Madeira, respectivamente (Lorena, 2003). As áreas de planícies e terraços baixos caracterizam-se pelas inundações periódicas, sendo que os rios Iquiri e Abunã chegam a inundar áreas com 2 km de largura em média (Radambrasil, 1976a[27] *apud* Lorena, 2003). No entanto, a rede de drenagem no interior do PAD é constituída por pequenos igarapés, formando cursos d'água semiperenes, sem uso para navegação (d'Oliveira; Sant'Anna, 2003).

---

[25] Köppen W. Climatologia: com um estudio de los climas de la tierra. México: Fondo de Cultura Economica; 1948. 478 p.

[26] Cochrane TT, Sánchez LG, de Acevedo LG, Porras JA, Garver CL. Land in Tropical America, vol.1. Cali, Colombia: CIAT; 1985.

[27] Radambrasil. Levantamento dos Recursos Naturais. Rio Branco: geologia, geomorfologia, solos, vegetação. Folha SC19, Rio de Janeiro, 1976a. 522 p. (vol. 10).

[28] Radambrasil. Levantamento dos Recursos Naturais. Folha SC19, Rio de Janeiro, 1976b. 458 p. (vol. 12).

A existência de uma estação seca permite o processo de "slash-and-burn" (derrubada seguida de queimada), que empobrece o solo e diminui o rendimento das colheitas a partir do segundo ano de cultura, sendo pouco empregado o processo de "slash-and-mulch" (derrubada deixando os restos vegetais como cobertura do solo) adotado em áreas mais úmidas da Amazônia (Pichón, 1997[29] *apud* IFPRI, 2002). Em geral os agricultores plantam culturas anuais no primeiro ano (como arroz ou feijão), mandioca e/ou milho no segundo ano, (Fujisaka *et al*., 1996), e acabam abandonando a agricultura a partir do terceiro ano (devido ao esgotamento do solo), para adotar a pecuária com plantação de pastos ou culturas perenes como café e banana. Isto ocorreu no Acre como um todo entre 1985 e 1995, quando após um período de estagnação da agricultura passou a predominar a pecuária de corte em 1996 (IBGE, 1998[30] *apud* IFPRI, 2002).

4.1.3 Estudos prévios na área e uso da terra

Membros do Programa de Alternativas a Queimadas (Alternatives to Slash and Burn Programme, Consultative Group on International Agricultural Research), amostraram 156 pequenas propriedades no PAD Pedro Peixoto (no Acre), e em Theobroma (em Rondônia), entre 1994 e 1996 (IFPRI, 2002). Embora os autores descrevam dados em conjunto para as duas áreas de estudo, é possível ter um bom retrato das variáveis sócio-econômicas e políticas da região. A maior parte dessas propriedades (69%) foi aberta entre 1980 e 1982; alguns lotes já existiam mesmo antes da abertura pelo INCRA, pertencendo a colonos autônomos ou seringueiros, e o restante foi aberto em ondas sucessivas até 1996. A maioria dos migrantes dos dois assentamentos vieram da região Sul e Sudeste do país (57%), sendo que apenas um terço dos assentados cresceram na região Amazônica. Dentre os migrantes, mais de 40% haviam passado por dois ou mais estados antes de se estabalecerem no assentamento rural. Cerca de 15% haviam se mudado de lote dentro do mesmo assentamento, indicando grande mobilidade da população.

Os lotes distribuídos pelo INCRA ao longo dos anos diminuíram de tamanho (de 100 hectares em 1980 para 25 ha em 1996); o tamanho médio das propriedades era de 81 ha em 1994 e 76 ha em 1996. Embora a legislação proíba a venda dos lotes antes de 5 anos de uso

[29] Pichón FJ. Colonist land allocation decisions, land use and deforestation in Amazon Ecuadorian frontier. Economic development and cultural change. 1997; 44:707-744.

[30] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 1995/1996. Rio de Janeiro: IBGE; 1998.

pelos colonos (quando então o título de propriedade é conferido), na prática vendas e trocas acontecem a qualquer momento. Muitos lotes foram vendidos ou trocados, ocorrendo mudanças no tamanho das propriedades. Entre 1994 e 1996, 13% das famílias realizaram alguma transferência de terra; apenas 1/3 dos lotes amostrados em 1996 ainda pertenciam ao dono original agraciado pelo INCRA. Com a compra ilegal, os novos proprietários encontram dificuldades para obter financiamento bancário para atividades agrícolas; 21% das famílias usavam fontes informais de crédito (vizinhos, parentes ou agiotas); 24% possuíam financiamento bancário e 37% recebiam algum tipo de pensão.

A distância máxima dos assentamentos aos mercados consumidores era de 125 km, com áreas inacessíveis durante a estação chuvosa. O tempo de acesso foi em média de 3 horas na seca e 6 horas na chuva. Aproximadamente 17% das famílias afirmaram morar em travessões sem acesso motorizado na seca e 40% sem acesso na estação chuvosa. A densidade populacional das diferentes linhas ou travessões variou de 3 a 60 pessoas por km^2 (média de 9 pessoas/km^2). Densidades populacionais altas foram significantemente correlacionadas com menor proporção de floresta nos lotes.

4.2 POPULAÇÃO E ÁREA DE ESTUDO

4.2.1 Descrição da área e população de estudo

Acrelândia tem população de 8.697 habitantes (Datasus, 2005), e área de 1.607,5 km^2, estando situada entre os rios Abunã e Iquiri, no Vale do Rio Acre. Situa-se a 112 km a leste de Rio Branco (capital do estado do Acre), fazendo fronteira com os municípios acreanos de Senador Guiomard e Plácido de Castro, os estados do Amazonas e Rondônia, e a Bolívia (Figura 18). O índice de desenvolvimento humano é de 0,680 [Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira (INEP), 2004], com uma taxa de mortalidade infantil de 24,69 por 1.000 nascidos vivos (Datasus, 2005). A taxa de analfabetismo é de 26,7%, chegando a 31,9% na zona rural (INEP, 2004), onde vivem 57% dos habitantes do município. Os principais produtos agropecuários comerciais da região são café, banana, pupunha e açaí, e derivados da pecuária leiteira e de corte.

A Secretaria Estadual de Saúde do Acre (SESACRE) divide o município de Acrelândia em 92 microáreas de notificação de casos de doenças transmissíveis. Tanto em 2001 como em 2002, a gleba Q da Linha 14 (Ramal do Granada, PAD Pedro Peixoto) foi a

microárea com maior número de notificações de casos de malária (192 em 2001 e 75 em 2002). A Linha 14 também é a microárea com maior número de habitantes (415 habitantes cadastrados em 2002 pela Coordenação local de controle de endemias). Essa linha foi aberta na década de 70, logo após o início do projeto de assentamento realizado pelo INCRA, e compreende ambas as margens dos 14 quilômetros finais da Linha 14, estrada não-pavimentada que se inicia na rodovia que liga Rio Branco a Porto Velho (BR-364).

Em virtude dessas características epidemiológicas, da facilidade de acesso e da presença de três postos de diagnóstico de malária bem como de um posto de Saúde municipal localizado no km 16 do Ramal do Granada, a gleba Q da Linha 14 (km 14 a 30 do ramal Granada) foi a área escolhida para a realização do estudo de coorte. Além dessa área, incluiu-se também a Reserva da Linha 14, uma área de colonização recente (5 anos), que compreende as margens de uma estrada não-pavimentada que se origina no final (km 30) da Linha 14, perpendicularmente a ela, com curso paralelo ao do Rio Iquiri, e que apresenta grande número de casos de malária (50 casos em 2002 para uma população de 50 habitantes). Ambas as áreas (9° 41'-9° 49'S, 67° 05'-67° 07'W) são denominadas pela população local como "Ramal do Granada", ou simplesmente "Granada" (Figura 20).

Há três postos de diagnóstico de malária, mantidos pela SESACRE, no km 16, km 24 e km 30 do Ramal do Granada; o maior deles, no km 16, conta também com auxiliares de enfermagem treinados para a atenção primária à saúde. Além disso, há uma equipe de campo volante composta por um inspetor e quatro agentes que percorre diariamente a área realizando busca ativa de casos de malária. Todos os atendimentos são registrados nos diários da equipe de saúde, facilitando a identificação dos indivíduos com malária e outras patologias. Os microscopistas participam de um programa contínuo de controle de qualidade do diagnóstico microscópico, onde todas as lâminas positivas e parte das negativas são revisadas no Laboratório Central do Estado em Rio Branco, e divergências no diagnóstico são retornadas ao microscopista em questão para reavaliação.

O vetor de malária predominante no município é o mosquito *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* (Root, 1926), que corresponde a mais de 80% dos anofelinos capturados pelas equipes de Entomologia da Fundação Nacional da Saúde; *Anopheles oswaldoi* é atualmente raro na região (Fundação Nacional de Saúde, dados não-publicados, dezembro de 2001), embora estudos de Branquinho *et al.* (1993, 1996) relatem abundância desse vetor no Acre na década de 90.

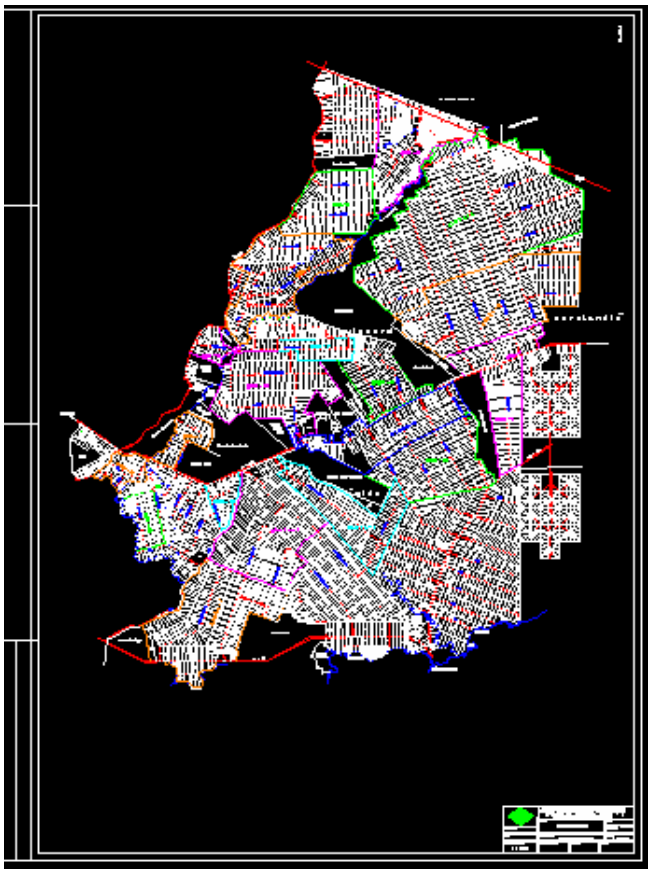


Figura 19 - Mapas do PAD Pedro Peixoto mostrando a localização da Linha 14 Gleba Q e Reserva da Linha 14. (A) Mapa total do PAD Pedro Peixoto; (B) Ampliação da área indicada no quadrado branco em (a) mostrando os ramais que se originam a partir da BR-364; a área do Granada encontra-se dentro do quadrado negro; (C) Ampliação da região do Granada mostrando a Linha 14 Gleba Q em vermelho e a Reserva da Linha 14 em amarelo [(A) INCRA, 2004; (C) modificado de Araujo, 2006].

Durante o censo, todas as edificações (habitadas ou não) situadas na área de estudo foram localizadas (com auxílio de plantas fornecidas pelas equipes locais da Coordenação de Controle de Endemias da SESACRE) e visitadas por nossa equipe de campo. O censo domiciliar identificou 473 habitantes (226 do sexo masculino e 247 do sexo feminino) no primeiro estudo transversal e 43 novos habitantes no segundo estudo transversal, com idade variando entre um dia e 90 anos, distribuídos em 123 famílias localizadas em 122 domicílios. Todos os habitantes desses domicílios foram considerados elegíveis para ingresso em nossa coorte e convidados a participar do estudo.

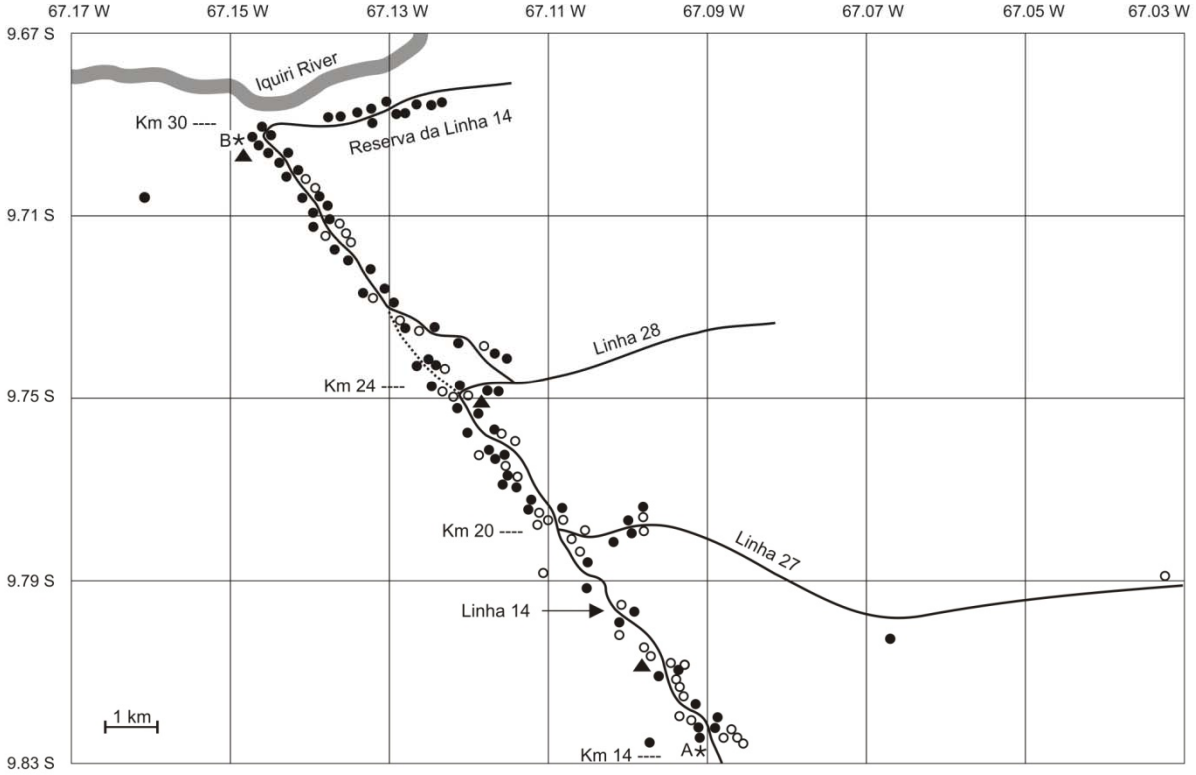


Figura 20 - Mapa mostrando a área de estudo, com a localização de cada domicílio (círculos). Os círculos pretos e brancos indicam, respectivamente, domicílios com e sem casos de malária registrados durante o seguimento longitudinal. Os triângulos pretos indicam os postos de diagnóstico microscópico de malária mantidos pelo serviço de saúde local, e as estrelas são as habitações usadas para se calcular a distância de cada habitação em relação à casa-índice.

4.2.2 Dados pluviométricos da área

Até 2007, Acrelândia não possuía estação pluviométrica própria; foram colhidos dados de precipitação mensal acumulada (em mm) das duas estações medidoras mais próximas do ramal do Granada, localizadas nos municípios de Rio Branco e Plácido de Castro (distando entre 50 e 100 km da área de estudo; dados fornecidos pela Defesa Civil de Rio Branco e de Plácido de Castro). Calculou-se a média da precipitação mensal cumulativa entre os dois locais para o período de janeiro de 2004 a maio de 2005, a ser usada em comparação com os dados de incidência de malária durante o seguimento longitudinal.

4.3 DESENHO EPIDEMIOLÓGICO DO ESTUDO

Primeiro Estudo Transversal (Determinação da linha de base): Durante o 1° inquérito transversal (realizado entre 16 de março e 29 de abril de 2004) todos os domicílios habitados da área de estudo foram visitados pela equipe de campo (dois médicos, um biólogo e um auxiliar de pesquisa). Os objetivos do projeto de pesquisa foram expostos a cada família, para obtenção de consentimento informado por escrito. Realizou-se também: (a) aplicação de um amplo questionário para obtenção de dados demográficos, sócio-econômicos e de morbidade pregressa, bem como uma descrição detalhada dos domicílios, (b) exame clínico de todos os habitantes do domicílio por um médico da equipe de campo, (c) coleta de amostra sangüínea venosa de todos os habitantes do domicílio com idade igual ou superior a cinco anos e (d) determinação da localização exata do domicílio com um equipamento portátil de navegação eTrex® (Garmin International, Olathe, KS, EUA), com precisão de 15 metros. Os dados obtidos nesse inquérito transversal correspondem à linha de base da coorte prospectiva.

Seguimento Longitudinal: A partir da visita inicial, todos os indivíduos foram mantidos sob vigilância de morbidade, através de visitas diárias (no mínimo 5 vezes na semana) à área de estudo. Os três postos de diagnóstico microscópico eram visitados diariamente, para identificar indivíduos com malária e indivíduos que procuraram o serviço por outros motivos (por exemplo febre com lâmina negativa). Além disso, os participantes do estudo foram orientados a procurar a doutoranda sempre que apresentassem febre ou outros sintomas sugestivos de malária. Em todos os casos foi aplicado um questionário para a quantificação de sintomas e realizou-se o exame clínico; procedeu-se a coleta de sangue venoso para exame de

gota espessa realizado no local e determinação de outros parâmetros laboratoriais (reação em cadeia da polimerase ou *PCR*, dosagem de anticorpos, isolamento viral) sempre que o paciente concordou com a coleta. O seguimento teve como objetivos: (a) detectar todos os indivíduos com episódios de malária incidentes entre habitantes da área de estudo, (b) investigar parâmetros imunológicos nesses pacientes durante a infecção aguda, (c) identificar indivíduos com sintomas de malária mesmo com lâmina negativa, (d) identificar a circulação de outros patógenos sempre que possível. A identificação dos casos de malária foi complementada com uma verificação semanal de todas as notificações no município, para identificação de malárias diagnosticadas em outros postos.

Segundo e terceiro estudos transversais: Todos os domicílios foram revisitados em setembro-outubro de 2004 e fevereiro-março de 2005, e seus habitantes submetidos aos mesmos procedimentos realizados na primeira visita (sendo que no segundo estudo transversal as amostras de sangue foram colhidas em papel filtro somente). Os objetivos destes estudos transversais complementares foram: (a) atualizar os dados demográficos, (b) diagnosticar infecções maláricas assintomáticas, (c) obter amostras sangüíneas para investigar mudanças temporais nos parâmetros imunológicos de interesse e (d) diagnosticar outros agravos à saúde que tenham escapado à vigilância de morbidade. Após o terceiro estudo transversal, coletou-se sangue venoso para estudos de imunologia celular de indivíduos com diagnóstico prévio de malária ocorrida durante o estudo (grupo exposto) e de indivíduos residentes em área não-endêmica (município de São Paulo) que nunca tiveram malária (grupo controle).

4.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS EPISÓDIOS DE INFECÇÃO PLASMODIAL

A avaliação clínica dos episódios de infecção plasmodial encontra-se publicada e é descrita em detalhes no Anexo 4. Os indivíduos da amostra foram interrogados quanto à presença de febre, calafrios, sudorese, cefaléia, vômitos, náuseas, mialgia, dor abdominal, diarréia, artralgia, vertigens, tosse e dispnéia. Cada sintoma referido foi graduado conforme a intensidade [ausente (0), leve (1), moderado (2) ou intenso (3)]; duração [ausente (0), intermitente (1) ou contínuo (2)] e tipo de remissão [ausente (0), remissão espontânea (1) ou não (2)]. A intensidade da febre foi graduada em baixa (1) ou alta (3) apenas.

4.5 MÉTODOS LABORATORIAIS

4.5.1 Processamento das amostras sangüíneas

As amostras de soro, plasma e papa foram colhidas em tubos estéreis do tipo *Vaccutainer* e processadas em Acrelândia. Amostras de sangue de polpa digital foram colhidas em papel filtro (FTA, Whatman, Florham Park, NJ, EUA). As amostras destinadas ao estudo celular foram colhidas em *Vaccutainer* (BectonDickson Biosciences, San Jose, CA) com heparina sódica e separadas através de centrifugação em colunas de Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) conforme descrito em Soares *et al.,* 1997. As alíquotas de papa foram submetidas à extração de ácido desoxiribonucleico (DNA) utilizando-se kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega, Madison, WI, EUA) ou método do fenol-clorofórmio (Ferreira *et al*., 1998); extraiu-se o DNA das amostras em FTA conforme instruções do fabricante.

4.5.2 Diagnóstico laboratorial das infecções maláricas

Microscópico: As lâminas com gota espessa foram coradas com Giemsa segundo a técnica de Walker (FNS/MS, 1995) e examinadas pelos microscopistas do Granada. Posteriormente as lâminas foram enviadas para revisão pelo Sr. Francisco das Chagas O. Luz, consultor da WHO em Brasília. Pelo menos 100 campos microscópicos de médio aumento (700×) foram examinados por cada examinador antes de definir-se o resultado de cada lâmina (Trape, 1985).

Molecular: Amostras de DNA de todos os indivíduos analisados nos estudos transversais e no seguimento foram testadas para a presença de DNA de plasmódios humanos através de reação em cadeia da polimerase (*PCR*) aninhada, desenvolvida por Kimura *et al.* (1997) e modificada por Win *et al.* (2002). O protocolo empregado tem como alvo o gene que codifica a subunidade 18S de ácido ribonucléico ribossômico (rRNA); a primeira reação emprega oligonucleotídios iniciadores gênero-específicos, enquanto a segunda reação utiliza oligonucleotídios espécie-específicos.

4.5.3 Antígenos de Plasmodium vivax

Estudo da PvMSP-1: No estudo imunológico das respostas à PvMSP-1 foram empregados 16 antígenos recombinantes derivados de regiões polimórficas da PvMSP-1 (Putaporntip, 2002), expressos como proteína de fusão com glutationa-S-transferase (GST), e um antígeno recombinante derivado da região C-terminal de 19 kDa da molécula, conhecida como PvMSP-1_{19}, expresso em vetor pGEX. Os alelos escolhidos para o estudo e a expressão dos antígenos recombinantes são descritos no Anexo C, página 1251. No estudo de imunologia humoral, todos os 17 antígenos foram testados. Já para o estudo de imunologia celular, foram escolhidos 6 antígenos recombinantes, bem como a região C-terminal (PvMSP-1_{19}).

4.5.4 Amplificação e seqüenciamento do gene da PvMSP-1

Estes procedimentos encontram-se descritos em detalhe no Anexo C, página 1251.

4.5.5 Ensaios imunológicos

Enzime-Linked Absorbance Assay (ELISA) para detecção e quantificação de anticorpos de classes IgM e IgG e subclasses de IgG: Foi empregada metodologia convencional (ELISA indireto) para a detecção de anticorpos de classes IgG e IgM contra os peptídeos derivados de MSP-1 (descrito no Anexo C, página 1251).

Ensaios de proliferação: O protocolo de estimulação de células periféricas foi obtido após testes de padronização prévia realizado com doadores sãos (5 indivíduos) e indivíduos expostos à malária (12 indivíduos) utilizando a porção C-terminal da MSP-1 (MSP-1_{19}) e os mitógenos Fitohemaglutinina (PHA, Sigma, Saint Louis, MO, EUA), Candidina, Pokeweed (PKW, Sigma) e a proteína purificada tuberculínica (Tuberculina PPD RT 23 SSI, Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca). Testou-se a dose do antígeno recombinante (0,05 ug/poço; 0,1 ug/poço; 0,2 ug/poço e 0,4 ug/poço) e dos diferentes mitógenos, o tempo de estímulo (4 dias, 5 dias, 6 dias e 7 dias), a concentração de células por poço (0,1; 0,2 e 0,3 x 10^6 células/poço) e o tempo de incorporação de timidina (6 horas e 18 horas). Conforme os resultados obtidos, determinou-se as condições ideais de teste: 0,2 x 10^6 células/poço (200 µl/poço, volume final), tempo de estímulo de 3 dias e 12 horas para PHA e 6 dias e 12 horas

para PKW, PPD, Candidina e antígenos recombinantes para PvMSP-1; tempo de incorporação de Timidina tritiada ([Methyl-3H] Thymidine, TRK300, 1mCi, 37MBq, com atividade específica de 9256Bq/mmol ou 25 Ci/mmol, marca Amersham Biosciences, Amersham Pharmacia Biotech) de 18 horas na concentração final de 1 μCi/poço. A dose de cada antígeno e mitógeno escolhida encontra-se na Tabela 1.

Dessa forma, células mononucleares periféricas foram coletadas e isoladas através de gradiente de densidade de 30 indivíduos expostos à malária pertencentes ou não à coorte, e residentes em Acrelândia. Após a determinação da viabilidade celular inicial com teste de vitalidade com Azul de Tripan (Sigma), as células foram resuspensas na concentração desejada em meio de cultura completo (Soares *et al.,* 1997) e estimuladas em quintuplicatas com antígenos recombinantes em placas estéreis de 96 poços (Costar, NewYork, NY, EUA) mantidas a 37° C, em ambiente rico em CO_2 (5%). Os antígenos usados foram a porção C-terminal da PvMSP-1 (PvMSP-1_{19}), o Bloco 2 da PvMSP-1 (variantes Belém, BP13 e BR7), o Bloco 10 da PvMSP-1 (variantes Belém, BP1 e BP39) e os mitógenos PHA, PKW, PPD e Candidina, descritos em detalhe nas páginas 1250-1251 do Anexo C.

Os antígenos recombinantes foram adicionados às células em concentrações variando de 0,05 ug a 2 ug/poço/200 ul volume final (Tabela 1). Controles negativos (células em meio de cultura apenas ou meio de cultura contendo GST) foram incluídos em cada teste. Além disso, foram utilizados poços contendo apenas meio de cultura, ou meio com antígeno na concentração de 2,5 ug/ml, para testar-se a esterilidade do meio de cultura, dos antígenos recombinantes e dos mitógenos. O índice de proliferação celular foi determinado pela técnica de incorporação de timidina tritiada (Soares *et al.,* 1997) em triplicatas, medindo-se a contagem de partículas com radiação gama por minuto (CPM) e calculando-se o Índice de Estimulação (IEC) conforme descrito na Tabela 2.

Alguns doadores foram excluídos da análise final por apresentarem baixa viabilidade celular determinada pela resposta aos mitógenos (IEC<5), enquanto outros não foram testados para todos os antígenos por número insuficiente de células, o que resultou em 27 indivíduos testados para a MSP-1_{19} e bloco 2 dos alelos Belém, BP13 e BR7; e 26 indivíduos testados para o bloco 10 dos alelos Belém, BP1 e BP39. Dos 27 doadores expostos mantidos no estudo celular, 13 eram do sexo feminino e 14 do sexo masculino. A idade variou entre 12 e 65 anos; o intervalo de tempo entre a última malária *vivax* e o experimento foi de 14 a 300 dias. Como grupo controle, foram escolhidos 26 indivíduos sãos moradores de área não-endêmica que

nunca tiveram malária, proliferados conforme o mesmo protocolo utilizado para o grupo exposto.

Tabela 1 – Concentração em ug/ml, ug/poço e tempo de cultura dos antígenos e mitógenos utilizados no estudo celular (d=dias; h=horas).

Antígeno/ Mitógeno	**Concentração em ml**	**Concentração/poço**	**Tempo cultura**
Fitohemaglutinina (PHA), 50ul/poço	10ug/ml	0,5 ug/poço	3d 12h
Candidina, 50 ul/poço	110 ug/ml	0,11 ug/poço	6d 12h
Tuberculina (PPD), 50 ul/poço	2 ug/ml (10 UT)	0,1 ug/poço	6d 12h
Pokeweed (PKW), 50 ul/poço	4 ug/ml	0,2 ug/poço	6d 12h
PvMSP-1, Porção C-terminal (MSP-1_{19}), 20 ul/poço	2,5 ; 10; 20 e 100 ug/ml	0,05; 0,2; 0,4 e 2 ug/poço	6d 12h
PvMSP-1, Bloco 2 alelos Belém, BP13 e BR7, 20 ul/poço	2,5 ; 10; 20 e 100 ug/ml	0,05; 0,2; 0,4 e 2 ug/poço	6d 12h
PvMSP-1, Bloco 10 alelos Belém, BP1 e BP39, 20 ul/poço	2,5 ; 10; 20 e 100 ug/ml	0,05; 0,2; 0,4 e 2 ug/poço	6d 12h
GST, 20ul/poço	2,5 ; 10; 20 e 100 ug/ml	0,05; 0,2; 0,4 e 2 ug/poço	6d 12h

Tabela 2 – Tipo de estímulo, tipo de controle negativo, e cálculo do Índice de Estimulação Celular (IEC) (cpm= contagem por minuto; GST= Glutationa-S-Transferase).

Estímulo	**Tipo de controle negativo**	**Cálculo do Indíce de Estimulação (IEC)**	**Valor de Corte do IEC**
células + antígenos recombinantes contendo GST	células + GST apenas	IEC= cpm cél + antígeno / cpm cél + GST	Positivo = IEC >2
células + mitógenos	células sem estímulo	IEC= cpm cél + mitógeno / cpm cél sem estímulo	Positivo = IEC >5

4.5.6 Análise de fatores genéticos humanos

Grupo sangüíneo Duffy : A tipagem molecular do sistema sangüíneo Duffy foi feita como descrito em Cavasini *et al.,* 2000. A fenotipagem de Duffy foi feita usando-se reagentes de microtipagem comercial (Diamed ID-Card Fy^a / ID-Card Fy^b , Diamed, Cressier, Suíça), segundo instruções do fabricante.

Polimorfismo H/R^{131} em FcγRIIA: Esta análise foi feita em toda a população amostral da qual se obteve sangue venoso, através de amplificação pela *PCR* seguida de digestão com enzima de restrição, como descrito em Jiang *et al.,* 1996.

4.5.7 Diagnóstico laboratorial de outras infecções e de anemia

A pesquisa de parasitas intestinais foi feita através de exame coproscópico de rotina. A pesquisa de outras infecções foi feita através de testes de hemaglutinação (Febre Amarela e outras arboviroses) ou sorologia convencional (Febre Amarela, vírus Mayaro e Dengue, descrito em detalhe no Anexo A, página 110-111). A quantificação da hemoglobina sérica foi feita utilizando-se fotômetro dosador de B-Hemoglobina (HemoCue AB, Ängelholm, Suécia), calibrado pelo método da hemiglobinacianida ou HiCN (Padlle, 2002). Com exceção dos estudos sobre arboviroses, que foram realizados somente nos ingressantes do primeiro estudo transversal, os demais testes foram oferecidos a todos os participantes da coorte.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística das características clínico-epidemiológicas da coorte, dos fatores de risco para malária, dos dados de reconhecimento humoral e celular da PvMSP-1 e dos dados clínicos encontra-se descrita em detalhes nos Anexos A, B, C e D, respectivamente.

A análise estatística dos dados genéticos e sorológicos como fatores de risco para malária utilizaram a mesma metodologia do Anexo B, incorporando os resultados de genotipagem de FcγRIIa e sistema sangüíneo Duffy, e a detecção de IgG contra antígenos recombinantes de PvMSP-1 no modelo multinível descrito no Anexo B.

Quanto aos dados de imunologia celular, comparações entre o grupo exposto e não-exposto à malária foram feitas com Teste de Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher; comparações dentro do grupo exposto quanto às características clínicas dos respondedores e não-respondedores foram feitas usando-se o teste de Mann-Whitney; comparações entre os dados de imunologia celular e humoral foram realizadas aplicando-se o Teste de McNemar para amostras dependentes, e a análise dos índices de reatividade para os dados sorológicos dos indivíduos submetidos ao estudo celular foi feita empregando-se o coeficiente de correlação de Spearman (Dawson; Trapp, 2001).

4.7 ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo de pesquisa foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (pareceres 318/CEP, de 19/07/2002, e CEPH.015/2004, de 07/05/2004).

5 RESULTADOS

Grande parte dos resultados já foi publicada ou está no prelo; entretanto, uma parte dos resultados ainda não foi publicada. Para facilitar a leitura, os resultados são apresentados na forma de Anexos contendo os artigos publicados, tendo como material suplementar os resultados não-publicados relacionados a cada artigo em questão. É recomendada a leitura dos Anexos e do material suplementar na ordem em que são apresentados, antes de se efetuar a leitura das demais seções da tese.

Anexo 1 - Artigo publicado (páginas 1325-1334) e material suplementar (páginas 148-167) descrevendo as características da coorte e dados sobre a transmissão de malária na área de estudo.

Anexo 2 - Manuscrito no prelo (aceito para publicação no American Journal of Tropical Medicine and Hygiene) contendo análise sobre fatores de risco epidemiológicos para malária e material suplementar contendo os pareceres da revista e resultados das variáveis genéticas do hospedeiro (páginas 169-174).

Anexo 3 - Artigo publicado descrevendo resultados de imunologia humoral com antígenos recombinantes da PvMSP-1 e diversidade genética dos isolados de *P. vivax* obtidos durante o estudo (páginas 1249-1259). Material suplementar contendo avaliação da associação entre a presença de anticorpos na linha de base e a ocorrência de malária no seguimento longitudinal (páginas 176-177), bem como os resultados de imunologia celular (páginas 178-190).

Anexo 4 - Artigo publicado descrevendo as características clínicas dos episódios de infecção plasmodial (páginas 341-347).

6 DISCUSSÃO

6.1 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA NA POPULAÇÃO ESTUDADA E EM OUTRAS POPULAÇÕES

A coorte avaliada neste estudo apresenta características típicas de população de assentamento rural da Amazônia, sendo uma população jovem, com proporção semelhante entre os sexos masculino e feminino. É composta em sua maioria por migrantes oriundos de estados não-endêmicos para malária, com tempo de residência na Amazônia variável, mas que em sua maioria já foram expostos ao parasita.

A morbidade pregressa por malária (69,1%) é grande; a morbidade recente por malária (episódios de malária nos 12 meses que antecederam o início do estudo) também foi importante (33,2%), e se mostrou um fator de risco para novos episódios clínicos no seguimento, indicando que o comportamento de risco desses indivíduos persiste por um longo período, e que provavelmente só diminui sua importância na aquisição da doença quando a imunidade passa a ser adquirida. De fato, a baixa prevalência de malária nos estudos transversais (< 5%), associada à ocorrência de infecção assintomática tanto por *P. vivax* como por *P. falciparum* sugere que essa população, embora jovem e de relativa mobilidade, é capaz de adquirir imunidade contra a doença. Finalmente, a incidência de malária *vivax* (30.0/100 pessoas-ano) e de malária *falciparum* (16,3/100 pessoas-ano) durante o seguimento longitudinal, bem como o índice esplênico obtido no início do estudo (5,7%), permitem caracterizar a transmissão na região como instável e a endemicidade como hipoendêmica.

Duas características são extremamente importantes para se entender a epidemiologia da malária nessa população. A primeira é que pelo fato de terem migrado de outros estados não-endêmicos, a idade não é um bom estimador da exposição cumulativa ao parasita, sendo que somente o tempo de residência em área endêmica é capaz de indicar essa exposição cumulativa. Essa característica, própria de populações de assentamento rural, é um diferencial importante em relação a populações nativas da Amazônia (como os ribeirinhos e indígenas) e da África, onde idade e tempo de exposição, por serem praticamente idênticos, podem ser ambos usados como correlatos de exposição cumulativa. A outra característica importante é que a ocupação da área de estudo pela coorte se deu ao longo do tempo; existe portanto uma heterogeneidade espaço-temporal no que se refere ao local de moradia e nas condições ambientais a que cada família é ou foi exposta.

Os fatores de risco mais importantes para malária foram a ocupação do indivíduo (principalmente o envolvimento em derrubadas, seguido pelo exercício da agricultura e/ou pecuária), o número de moradores por domicílio, a localização das residências e a co-habitação com indivíduo que pratica derrubadas, além de episódio prévio recente de malária. Foi fator protetor contra a malária o tempo de residência no local, o que indica que ocorre aquisição de imunidade nessa população com o decorrer do tempo, embora seja uma área de transmissão hipoendêmica. Em relação às características físicas das habitações, as residências eram muito parecidas entre si, não sendo possível determinar componentes físicos que se relacionassem ao risco de adquirir malária nessa população, com exceção do local de residência e do número de habitantes por domicílio. Estas duas variáveis sugerem transmissão intradomiciliar da malária em pelo menos parte dos casos. As diferenças sócio-econômicas existentes na coorte não tiveram relação causal direta com o risco de se ter malária, mas sim indiretamente, já que pessoas com menor poder aquisitivo acabam se instalando em terras mais distantes da estrada, nos locais de maior incidência de malária, e mais freqüentemente desempenham funções de alto risco, como derrubadas e agricultura em lotes que não o seu.

Este estudo mostra, portanto, que a epidemiologia da malária em áreas de assentamento rural na Amazônia apresenta fatores de risco inerentes a esse tipo de população, principalmente ligados ao uso e ocupação da terra. Mostra também que populações migrantes adquirem imunidade contra a doença após alguns anos de exposição ao parasita (em média 5-6 anos para *P. vivax* e 8-9 anos para *P. falciparum*), mesmo com níveis baixos de transmissão e independentemente do sexo ou da idade em que se iniciou a exposição. Quanto aos trabalhos realizados em Irian Jaya (Baird *et al*., 1991, 1993) sugerindo que em populações migrantes o risco de malária diminui mais rapidamente em crianças do que em adultos após a chegada em área endêmica, não pudemos avaliar essa hipótese no presente estudo, devido ao tamanho amostral insuficiente após estratificação da coorte em dois grupos etários.

Comparando estes achados com os de estudos epidemiológicos realizados em outros tipos de populações amazônicas, vemos que o presente estudo confirma trabalhos prévios realizados em Rondônia (Camargo *et al*., 1994, 1996), que também mostraram associação entre atividades profissionais e risco de malária em populações rurais; e também completam os trabalhos realizados na década de oitenta por Sawyer e colaboradores (1988[19] *apud* de Castro *et al*., 2006) e mais recentemente por de Castro *et al*. (2006), ao detalhar os fatores de risco envolvidos na malária de fronteiras, típica dos assentamentos rurais da Amazônia brasileira. Também observamos uma semelhança com a epidemiologia da malária em

populações ribeirinhas, onde foi evidenciado aquisição de imunidade em decorrência da exposição cumulativa, tanto na Amazônia brasileira (Alves *et al*.; 2002; Ladeia-Andrade, 2005) como na Amazônia peruana (Roshanravan *et al*., 2003; Branch *et al*., 2005); o mesmo tipo de imunidade foi encontrado em populações indígenas no Brasil, Venezuela e Peru (Sá *et al*., 2005; Spindel *et al*., 2001; Suárez-Mutis, 2000[18] *apud* Coura; Suárez-Mutis; Ladeia-Andrade, 2005; Laserson *et al*., 1999). Há, entretanto, uma diferença importante entre populações migrantes e populações nativas da Amazônia, pois a imunidade adquirida aumenta conforme a idade nas populações ribeirinhas e indígenas, mas não na população de assentamento rural, pelos motivos já descritos anteriormente. Em comparação com a epidemiologia da malária na população de mineradores, temos como características comuns a presença de infecções assintomáticas demonstradas no Brasil por de Andrade *et al*. (1995), Fontes (2001) e Scopel *et al*. (2004); e a heterogeneidade espacial na incidência de malária, identificada por Barbieri e Sawyer (2007). Todas essas populações têm em comum os baixos níveis de transmissão e a hipoendemicidade; em apenas alguns casos de malária urbana na Amazônia brasileira, ocorre padrão mesoendêmico de transmissão, onde a malária incide principalmente nas crianças e adolescentes (Tada *et al*., 2007).

Em contraste, a malária em populações de outros continentes tem padrão variável. No Mali, Dicko *et al*. (2007) observaram que a relação entre episódios de malária e idade varia conforme os níveis de transmissão: em áreas com altas taxas de inoculação entomológica (TIE > 100 picadas infectantes/ano por pessoa), há larga evidência de imunidade e imunidade anti-parasitária na população em geral; em locais de menor transmissão (TIE < 15 picadas infectantes/ano por pessoa) há baixa imunidade clínica e anti-parasitária antes dos 20 anos de idade, fato que já havia sido demonstrado em áreas de baixa transmissão no Sudão (Giha *et al*., 2000). No Senegal, moradores de áreas de transmissão intensa e perene apresentam imunidade clínica a partir dos 10 anos de idade, enquanto em áreas de baixa transmissão, a imunidade demora mais para ser adquirida (Marsh; Snow, 1999; Smith *et al*, 2004). Em áreas de alta transmissão do Quênia, a prevalência do parasita chega a 83% em crianças de 1 a 4 anos de idade, sendo que nessa faixa etária já começa a aquisição de imunidade, que irá levar a um padrão clínico bem diferente entre 10 e 14 anos de idade, com acentuada redução da parasitemia e dos sintomas de malária (Bloland *et al*., 1999a). Na Índia também se observa esse padrão de imunidade adquirida em função da idade em áreas de transmissão hiperendêmica, com predomínio de infecções sintomáticas em crianças abaixo de 5 anos de idade (Sharma *et al*., 2004). Pode-se dizer, portanto, que a epidemiologia da malária em

populações de assentamento rural da Amazônia é semelhante ao que ocorre em áreas hipoendêmicas em outros continentes, mas difere dos padrões observados em áreas holo e hiperendêmicas.

6.2 ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO PLASMODIAL

Quanto aos aspectos clínicos da infecção plasmodial observados na coorte, encontramos uma ampla variação na freqüência e intensidade dos sintomas. Em primeiro lugar, todos os episódios ocorridos ao longo de 15 meses de estudo foram de malária não-complicada, embora tanto *P. vivax* como *P. falciparum* circulem na região. Em segundo lugar, muitos dos indivíduos com infecção sintomática tiveram poucos sintomas ou sintomas de intensidade leve, sendo que o quadro clássico descrito em livros texto (febre com calafrios seguido de sudorese) não foi observado em boa parte dos episódios de malária. Em terceiro lugar, os dados clínicos mostraram que infecções assintomáticas são freqüentes nessa população majoritariamente migrante (tendo muitas vezes resolução espontânea), e que as infecções por *P. falciparum* tendem a evoluir com baixa parasitemia em qualquer faixa etária, fato que ainda merece estudos mais aprofundados. Finalmente, os sintomas avaliados permitem detectar casos de malária, embora sejam pouco específicos, já que outras viroses próprias da Amazônia ocorrem com relativa freqüência na população estudada (da Silva-Nunes *et al*., 2008). Embora essa co-circulação do *Plasmodium* e outros processos infecciosos agudos com quadro clínico semelhante possa dificultar o diagnóstico diferencial baseado em sintomas apenas, a simples pesquisa sistemática de um pequeno número de sintomas (e não apenas febre) pode aumentar a sensibilidade da busca ativa de casos, ajudando no controle da malária na Amazônia.

O acompanhamento longitudinal dos casos de infecção assintomática detectada durante os estudos transversais mostrou que uma pequena parte desses indivíduos vêm a apresentar sintomas em até dois meses de seguimento, enquanto a maioria continua sem sintomas por vários meses com *PCR* positiva ou não, nesse caso sugerindo resolução espontânea da infecção. O mesmo comportamento foi observado entre indivíduos com parasitemias sintomáticas subpatentes não-tratadas, mostrando a existência de imunidade contra a doença e imunidade anti-parasitária. Infecções plasmodiais assintomáticas já foram encontradas em diferentes populações, como na África (Trape *et al*., 1994; Bloland *et al*.,

1999b), Ásia (Erhart *et al*., 2005) e América (González *et al*., 1997; Alves *et al*., 2002; Roshanravan *et al*., 2003; Tada *et al*., 2007), mas poucos estudos acompanharam a evolução clínico-parasitológica desses indivíduos na região amazônica, descrevendo resolução espontânea das infecções assintomáticas (Branch *et al*, 2005; Ladeia-Andrade, 2005).

Quanto ao tratamento dessas infecções assintomáticas, os poucos estudos publicados são inconclusivos; há a necessidade de se determinar primeiramente a importância das infecções assintomáticas como estímulo antigênico que perpetua a imunidade clínica, e o papel desses indivíduos como reservatório do parasita na comunidade. A indicação de tratamento vai depender da resposta a essas duas questões. Estudos preliminares de infectividade vetorial sugerem que indivíduos com infecção plasmodial assintomática possuem reduzida capacidade infectiva para anofelinos quando comparados com indivíduos sintomáticos, embora possam transmitir a infecção por mais tempo (Alves *et al*., 2005). Estudos na África sugerem que portadores assintomáticos de *P. falciparum* apresentam menor risco de episódios sintomáticos subseqüentes do que não-portadores (Males; Gaye; Garcia, 2008); por outro lado, o tratamento radical das infecções assintomáticas acaba aumentando o risco e a gravidade de episódios posteriores de malária (Owusu-Agyei *et al*., 2002).

6.3 ALTERAÇÕES AMBIENTAIS E SEU IMPACTO NA TRANSMISSÃO DO *Plasmodium*

A análise dos dados de precipitação mensal acumulada e incidência de malária no Granada, mostram que a variação na incidência de malária segue a variação da precipitação mensal acumulada prévia (entre um e dois meses anteriores), sugerindo que o aumento da precipitação propicia o aumento da transmissão do parasita. Entre janeiro e maio de 2005, os dados sugerem que as condições ambientais tiveram um impacto maior na biologia dos vetores locais, já que o efeito das chuvas sobre a transmissão leva mais tempo para aparecer.

Vários estudos investigaram a relação entre precipitação (e outras variáveis ambientais) e incidência de malária. Oesterholt *et al*. (2006) mostraram que na Tanzânia o número de mosquitos vetores aumenta entre 2 a 4 semanas após as chuvas pesadas, provavelmente pelo surgimento de criadouros propícios. No Quênia encontrou-se associação entre o aumento volumoso da precipitação mensal e epidemias de malária subseqüentes (Hay *et al*., 2003); na Etiópia epidemias de malária foram precedidas por aumento da temperatura mínima (Abeku *et al*., 2003). Modelos matemáticos contendo variáveis como temperatura

média máxima, precipitação cumulativa mensal, índice de vegetação e número de casos de malária no mês anterior conseguiram prever a incidência de malária no Burundi em um determinado mês com 93% de acurácia (Gomez-Elipe *et al*., 2007); em Ruanda (Loevinsohn, 1994) cerca de 80% da variabilidade na incidência de malária pôde ser explicada pela precipitação cumulativa mensal anterior (2-3 meses anteriores) e temperatura mínima prévia (1-2 meses anteriores); a precipitação cumulativa mensal e a temperatura anual também explicam grande parte da variação sazonal da malária em outras áreas endêmicas na África (Craig *et al*., 2004 e 2007; Thomson *et al*., 2005), Ásia (Nagao *et al*., 2003), Índia (Dev *et al*., 2004) e no Brasil (Camargo *et al*, 1994, 1996; Laserson *et al*., 1999; Vasconcelos; Novo; Donalisio, 2006; Tada *et al*., 2007).

A interação entre precipitação, evaporação e temperatura modula a umidade do ambiente, alterando a sobrevida e atividade dos mosquitos do gênero *Anopheles* (Martin; Lefebvre, 1995). A capacidade vetorial dos anofelinos pode variar com a temperatura, sendo maior entre 22 º e 30 ºC (Dutta; Dutt, 1978; Molineaux, 1988); nessa faixa de temperatura a duração dos mosquitos aumenta, bem como o número de refeições feita pelas fêmeas. Além disso, o ciclo aquático do mosquito diminui de 20 para 7 dias (Kondrashin, 1992) e o intervalo de tempo entre a emergência e oviposição diminui (Molineaux, 1988). A própria duração do ciclo do *Plasmodium* no vetor pode variar conforme a temperatura ambiente, sendo menor entre 27 º e 31 ºC. A modelagem de dados ambientais para o continente africano como um todo mostrou que a transmissão de malária tem relação com altos níveis de precipitação, enquanto a maturação e sobrevida de larvas de *A. gambiae* se relacionam com a temperatura (Hoshen; Morse, 2004); a sazonalidade da precipitação se associa positivamente com a sazonalidade da taxa de inoculação entomológica, enquanto a temperatura mínima e a irrigação se associam negativamente com essa variável entomológica (Mabaso *et al*., 2007).

O desmatamento expande os habitats vetoriais já existentes, podendo também criar novos habitats ou alterá-los de forma a aumentar a população de vetores pré-existentes. Em áreas deflorestadas, ocorre perda das copas e alteração do solo, propiciando a formação de pequenas coleções de água que recebem luz e calor do sol, favorecendo o desenvolvimento das larvas e pupas e eclosão dos mosquitos adultos (Norris, 2004). *Anopheles darlingi*, por exemplo, prefere áreas desmatadas onde os criadouros recebem bastante luz (Norris, 2004), sendo pouco encontrado em áreas de floresta densa ou habitats inalterados (Tadei *et al*., 1998); o mesmo parece ocorrer com *Anopheles gambiae* (Minakawa *et al*., 2004, 2005). Em criadouros temporários há menor predação das larvas de *Anopheles* (Washburn, 1995;

Sunahara; Ishizaka; Mogi, 2002); como esses criadouros recebem mais luz e calor, há maior disponibilidade de algas para sua alimentação (Gimnig *et al*., 2002), levando ao aumento da produtividade de mosquitos adultos e aumentando o risco da transmissão de malária. Com a perda da cobertura vegetal, ocorre também aumento da temperatura ambiente, o que por sua vez favorece a capacidade vetorial dos mosquitos (Lindsay; Birley, 1996).

A agricultura também leva a modificações ambientais propícias para os vetores da malária e outras doenças (Norris, 2004). Causa aumento da densidade populacional de vertebrados, ou seja, aumenta a disponibilidade de sangue humano para a alimentação das fêmeas de mosquitos, e induz o desmatamento da floresta para proporcionar áreas de cultivo, que servirão de abrigo aos mosquitos adultos. Também causa a sedimentação dos rios, criando coleções rasas de água propícias para o estabelecimento de criadouros (Dian, Changxing, 2001); e leva a microalterações locais do clima, aumentando a densidade dos vetores, diminuindo o tempo de incubação extrínseco do *Plasmodium* e resultando em aumento da transmissão das doenças (Lindblade *et al*., 2000). Na Amazônia peruana, as taxas de picadas de *A. darlingi* em áreas de pasto e culturas foram quase 300 vezes maior do que as taxas obtidas em áreas de florestas intactas (Vittor *et al*., 2006), mostrando um impressionante efeito da agricultura e do desflorestamento na ecologia do principal vetor de malária na América do Sul (Kiszewski *et al.*, 2004).

Munga *et al*. (2006) avaliaram o impacto de diferentes usos do solo na produtividade dos vetores de malária no Quênia, e demonstraram que a produtividade vetorial dos vetores locais (número de mosquitos adultos/m^2/semana) emergentes dos ambientes aquáticos localizados em área cultivadas, era maior do que aqueles emergentes de ambientes aquáticos situados em florestas intactas ou pântanos naturais, além do tempo de desenvolvimento de larva a adulto ser menor nas áreas cultivadas, onde a temperatura da água dos criadouros era maior. Afrane *et al*. (2007) relatam menor tempo de emergência de adultos, maior tempo de sobrevida e maior produtividade de *Anopheles arabiensis* em áreas desmatadas do Quênia quando comparado com florestas intactas.

A associação entre alterações ambientais e transmissão de malária parece ser mais pronunciado nas populações de assentamento rural, porque ocorrem mudanças intensas e contínuas no meio-ambiente, como já indica o termo malária de fronteira; tal fenômeno não parece ocorrer nas populações ribeirinhas e indígenas estáveis, onde ocorre pouca mudança ambiental pelo próprio estilo de vida dessas populações. Entretanto, populações urbanas em expansão, como as de Porto Velho e Manaus, acabam modificando bastante o meio-ambiente,

o que vem provocando aumento das transmissões de malária em virtude do surgimento de criadouros permanentes para *A. darlingi* (Ferreira-Gonçalves; Alecrim, 2004; Tada et al., 2007; Gil *et al*., 2007).

Essas alterações ambientais podem se dar em pequenas áreas que no entanto são suficientes para desencadear ou aumentar a transmissão do *Plasmodium,* levando ao conglomerado de vetores em áreas específicas ou ao redor de poucas casas (Ribeiro *et al*., 1996; Mbogo *et al*., 1995, Keating *et al*., 2005) e à heterogeneidade espacial na prevalência e incidência de malária (Gamage-Mendis *et al*., 1991b; Brooker *et al*., 2004). Como medida de controle, seria mais eficiente concentrar as intervenções em habitats com alta produtividade vetorial que se localizam próximos a fontes de repasto sangüíneo; para tanto, é necessário definir quais são esses habitats a partir de análises de produtividade vetorial e da avaliação espacial de sua localização (Gu; Utzinger; Novak, 2008).

6.4 HETEROGENEIDADE ESPACIAL DA MALÁRIA E PERSPECTIVAS PARA O CONTROLE DA TRANSMISSÃO

No presente estudo, a análise das variáveis epidemiológicas envolvidas na transmissão de malária (apresentada no Anexo B, artigo no prelo) mostrou que a localização das casas é um importante fator de risco para malária, além de sugerir que está ocorrendo transmissão intra ou peridomiciliar do parasita. Após o controle para o agrupamento em domicílios, a localização das casas permanece como fator de risco significante, sugerindo que o componente ambiental desempenha papel importante na incidência de malária nessa área de estudo. A análise espacial com SaTScan reproduziu esse achado, ao identificar conglomerados significantes tanto para casos de malária *falciparum* como de malária *vivax*, sugerindo portanto a presença de criadouros próximos a essas habitações, fornecendo uma importante diretriz para estudos entomológicos futuros destinados a identificar áreas com criadouros permanentes ou temporários e planejar intervenções ambientais bem-sucedidas na região do Granada. De fato, heterogeneidade espaço-temporal na composição das populações de vetores de malária e nas taxas de inoculação entomológica já foi descrita em vários estudos na África (Mbogo *et al*., 2003; Minakawa *et al*., 2005; Mushinzimana *et al*., 2006; Zhou *et al*., 2007), alguns dos quais mostraram íntima associação de criadouros de *Anopheles* com rios e pântanos (Zhou *et al*., 2007; Bøgh *et al*., 2007; Oesterholt *et al*., 2006).

Estudos espaciais de prevalência de malária sem envolver avaliações entomológicas

também são capazes de identificar conglomerados de casos e fatores ambientais envolvidos, como feito em Eritrea, onde 90% dos casos de malária identificados em inquéritos populacionais foram encontrados em apenas 6,7% dos domicílios visitados, localizados em vilas situadas em altitudes menores, na porção mais baixa e úmida do país (Sintasath *et al*., 2005). Em Uganda, um estudo longitudinal envolvendo 558 crianças identificou como principal fator de risco para malária a distância entre os domicílios e o pântano mais próximo (Clark *et al*., 2008). No Vietnã, estudos espaciais mostraram que as comunidades com maior prevalência de infecções estavam situadas próximas a florestas (Erhart *et al*., 2005); e no Peru, pelo menos dois estudos epidemiológicos com análises de dados espaciais confirmaram a heterogeneidade espacial e temporal da malária na Amazônia peruana (Branch *et al*., 2005; Bautista *et al*., 2006). Algumas dessas áreas são classificadas como áreas de alta transmissão, embora ocorra conglomerados de infecções em pequena parcela da população local (Gaudart *et al*., 2006).

Programas de controle devem contemplar a heterogeneidade espacial da transmissão de malária. Análises espaciais podem ajudar a prever criadouros baseados em dados ambientais e epidemiológicos combinados, bem como avaliar mudanças no padrão espacial de transmissão ao longo do tempo. Essas análises, quando combinadas com informações epidemiológicas, podem identificar famílias, populações, ou mesmo áreas com maior participação na transmissão de malária, permitindo o uso de medidas de combate vetorial em domicílios selecionados, direcionando as medidas de controle e prevenção e maximizando o impacto das mesmas ao selecionar alvos específicos e facilitar a ação dos serviços de saúde. No caso do Ramal do Granada, a identificação de um conglomerado contendo 64,3% dos casos de malária *falciparum* em apenas 19,6% dos domicílios, permite direcionar eficazmente as medidas de combate vetorial e de busca ativa de casos na tentativa de diminuir a transmissão de malária em toda a área.

6.5 MALÁRIA E USO DA TERRA: QUESTÃO LOCAL, REGIONAL OU GLOBAL?

No presente estudo, encontramos como principal fator de risco para malária a ocupação do indivíduo, notadamente o envolvimento em derrubadas, e em segundo lugar o exercício da agricultura e/ou pecuária. Entretanto, o fato de existirem apenas 54 indivíduos envolvidos em derrubadas em uma coorte com 509 pessoas levanta a seguinte discussão: é este um problema pontual e de pequena dimensão, com pouco impacto sobre a comunidade,

ou um fator de risco mais abrangente? Em outras palavras, o desflorestamento de pequenas propriedades contribui para o aumento ou manutenção da transmissão de malária na região Amazônica como um todo?

Para responder a essa pergunta, precisamos primeiramente determinar se essa associação já foi observada em outros locais. Em segundo lugar, precisamos determinar qual a extensão do desmatamento na região de estudo (PAD Pedro Peixoto) e quanto desse desmatamento tem a participação de assentados rurais e suas famílias, e se esse fato se reproduz em outras áreas da Amazônia brasileira onde ocorre transmissão de malária.

De fato, a associação entre desflorestamento/uso do solo e aumento da transmissão de malária já foi demonstrado no Brasil por vários outros autores, e também em outros países. A construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré levou a uma epidemia de malária nos trabalhadores (Coimbra, 1985[31] *apud* Singer; de Castro, 2001). Marques (1987) mostrou como o desflorestamento causado pela abertura de garimpos e assentamentos rurais na Amazônia levou ao aumento da malária na década de 80. Singer e de Castro (2001) analisaram em detalhes a relação entre migração humana, desenvolvimento agrícola e transmissão de malária no Projeto de Assentamento Machadinho, em Rondônia, no período de pouco mais de uma década (1984-1995), comprovando mais uma vez que os padrões de uso da terra (desflorestamento para construção de estradas e estabelecimento de culturas e pecuária) causaram o aumento da transmissão de malária no local. Resultado semelhante foi obtido por Erhart *et al*. (2004) em áreas rurais do Vietnã com transmissão hipoendêmica; nessas comunidades o envolvimento em atividades regulares na floresta (derrubadas e agricultura) se associou fortemente à ocorrência de malária *falciparum*.

O uso da terra no PAD Pedro Peixoto (onde se localiza o ramal do Granada e a coorte estudada) foi quantificado por diferentes grupos de pesquisa. Em 1984, cerca de 78% da área avaliada correspondia a lotes de colonos assentados pelo INCRA, somente 6% pertenciam a grandes fazendas, e 16% tinham outros usos. Nos lotes de colonos assentados, ou seja, em pequenas propriedades, a área de floresta convertida em outros usos aumentou progressivamente de 8.8% para 25% entre 1984 e 1992 (Fujisaka *et al*., 1996); em 1995, os lotes possuíam 34% de área deflorestada, sendo 25% transformado em pasto, 2% em capoeiras, 7% em culturas anuais e menos de 1% em culturas perenes (Fujisaka; White, 1998). Em 2005, a área deflorestada aumentou para 39%, com aumento expressivo da área de

[31] Coimbra MELS. SUCAM and malaria control. Centro de Desenvolvimento e Planejamento Regional, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte: CEDEPLAR, 1985.

pastagens (32%), enquanto a área de capoeira (2%) e de culturas perenes (1,65%) praticamente não mudaram (d'Oliveira *et al.,* 2005).

A taxa média de desflorestamento anual contabilizada em 2005 no PAD Pedro Peixoto foi de 1,5 a 2,0% (d'Oliveira *et al.,* 2005); mais da metade da área total estará desmatada nos próximos 10 anos se as formas de uso da terra continuarem as mesmas. Isso significa que ocorrerá uma inversão dos percentuais de uso da terra, com 40% de floresta e 60% de área desmatada, um cenário contrário à lei de política florestal vigente, que estabelece o limite de 20% para as áreas abertas e 80% para a cobertura vegetal. (d'Oliveira *et al*., 2005). Entretanto, alguns autores já estimam em 50 a 60% a alteração da cobertura florestal original para formação de pastagens e desmatamentos para agricultura em pequena escala ou de subsistência (Sant'Anna; Sant'Anna; Sassagawa, 2001; Araujo, 2006).

Sant'Anna; Sant'Anna e Sassagawa (2001) quantificaram a área de desmatamento do PAD Pedro Peixoto através de imagens de satélite LANDSAT- 5 TM. A Figura 21 mostra em vermelho a área desmatada no PAD Pedro Peixoto em 1984 e 1999; podemos observar as intensas modificações na cobertura do solo provocadas pelo uso da terra. Em 1984, 16,7% da área total avaliada encontrava-se desmatada, aumentando para 50,1% em 1999. Enquanto no estado do Acre a taxa de desflorestamento cresceu 65,3% entre 1988 e 1998, o desflorestamento no PAD Pedro Peixoto aumentou em 200% entre 1984 e 1999, mostrando o alto grau de antropização da região (Sant'Anna; Sant'Anna e Sassagawa, 2001). Os autores encontraram desmatamento inclusive de áreas de reserva legal e de proteção ambiental, e concluem que na prática a legislação em vigor e a política florestal não garantem a preservação do ambiente, devido à assistência inadequada do INCRA, com subutilização das áreas apropriadas e implantação de pastagens e lavouras em áreas de florestas, culminando na extinção dos recursos florestais como conseqüência da falta de políticas públicas eficientes para promover seu uso racional.

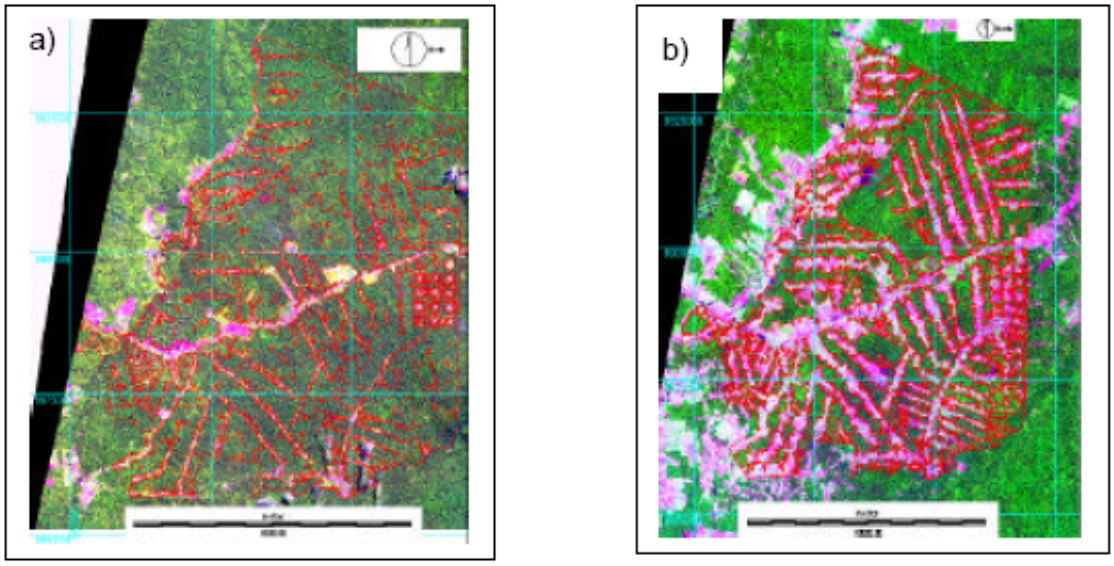


Figura 21- Polígonos de desmatamento do PC Peixoto (em vermelho) sobre imagem Landsat-5 TM em composição colorida; A) Desmatamento em 1984; B) Desmatamento em 1999 (Sant'Anna; Sant'Anna; Sassagawa, 2001).

Segundo estudo sobre uso da terra em 156 propriedades do PAD Pedro Peixoto e em Theobroma (RO), realizado entre 1994 e 1996 pelo IFPRI (2002), a área média de cobertura florestal dessas propriedades diminuiu 7% nesses dois anos, enquanto a área de pasto aumentou 10% (ocupando em média 56% e 27% dos lotes em 1996, respectivamente). A Figura 22 mostra a conversão de floresta em pasto nos lotes avaliados, baseados em dados referidos em 1994 e estudos de campo de 1996, e a Figura 23 mostra o uso da terra conforme a idade da propriedade. Cerca de 40% das famílias visitadas em 1996 trabalharam em atividades de desflorestamento ou manutenção de pasto para outros proprietários; 50% das famílias empregaram mão-de-obra para atividades de desflorestamento de mata nativa e 23% empregaram mão-de-obra para desflorestamento de mata secundária em seu próprio lote. Os colonos praticavam a derrubada de uma área média de 1.8 ha de floresta a cada 2-3 anos, dispendendo cerca de 23 dias de trabalho para isso, com uso de motossera em 90% dos casos (Fujisaka; White 1998).

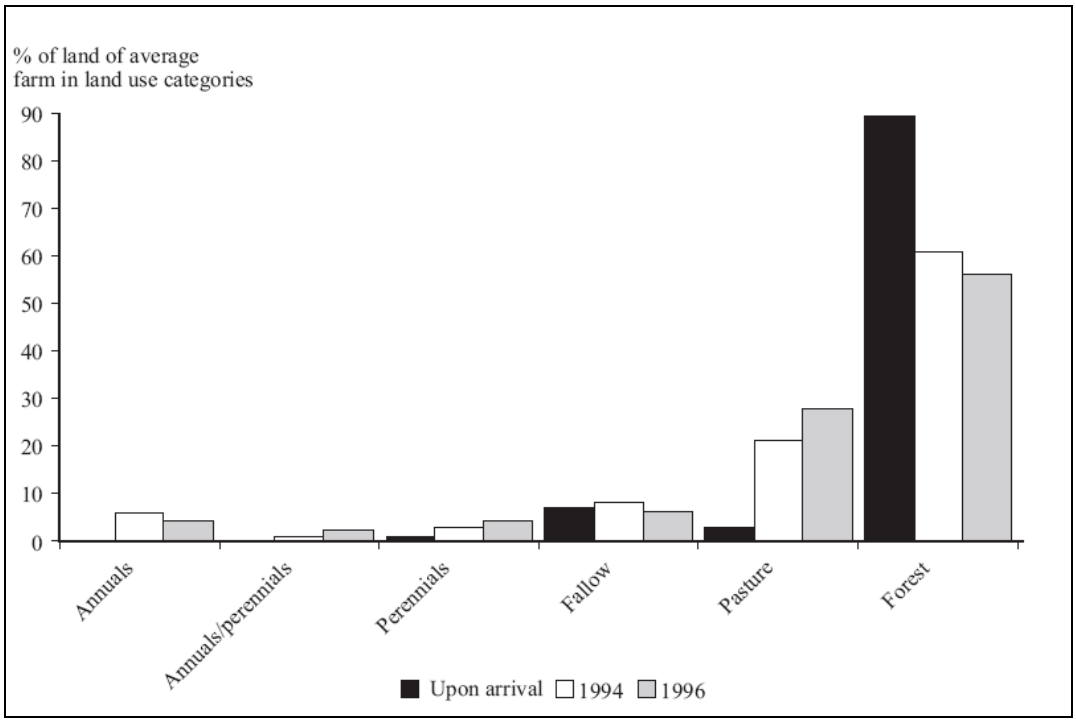


Figura 22 - Uso da terra no PAD Pedro Peixoto e em Theobroma, no momento da chegada à área, em 1993/94 e 1995/96 (Modificado de IFPRI, 2002).

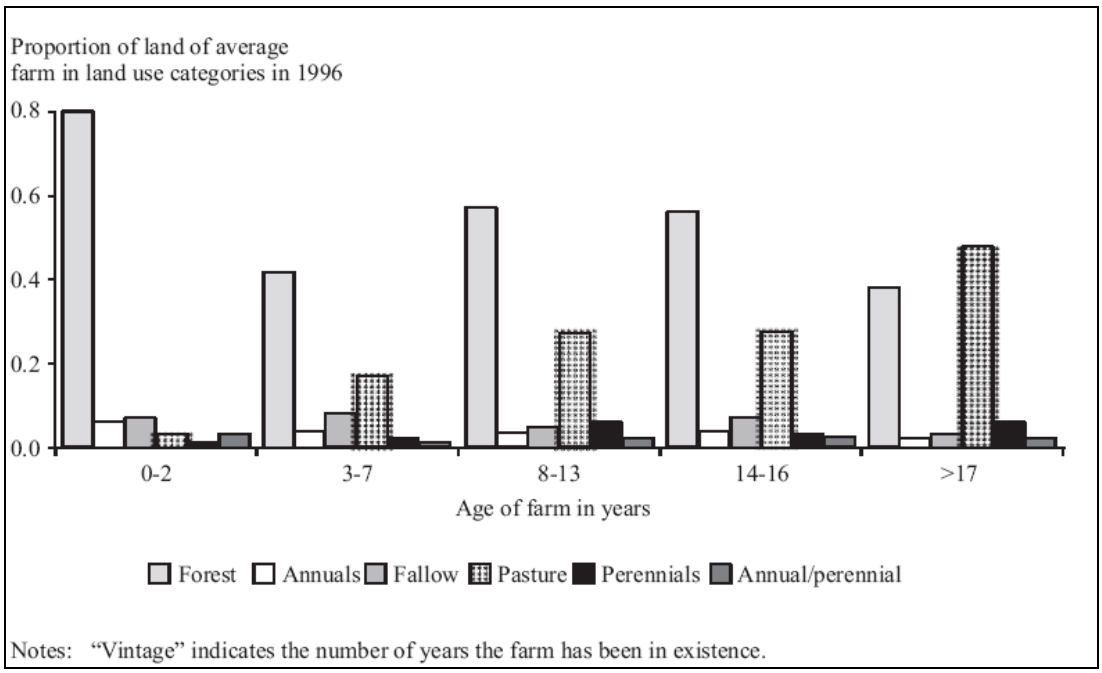


Figura 23 - Uso da terra no PAD Pedro Peixoto e em Theobroma, por tempo de existência do lote (F = Floresta; CA = Cultura Anual; C = Capoeira; P = Pastagens, CP = Culturas Perenes, CA/CP = Culturas Anuais/Culturas Perenes) (Modificado de IFPRI, 2002).

Em resumo, a área de pastagem aumentou nos lotes amostrados, enquanto a área de floresta diminuiu. Culturas permanentes parecem levar a um ritmo mais lento de desflorestamento, porém sem impedir tal prática, e sem melhorar os rendimentos dos proprietários. No período de estudo (1994-1996) a taxa de desflorestamento parece ter acelerado, com poucos lotes contendo mais do que 50% de cobertura vegetal intacta, como requerido por lei nessa época. Esses dados sugerem que a pressão pelo desmatamento é maior em ambientes com população maior e maior mercado consumidor, do que em locais onde os colonos dependem apenas da terra para subsistência. Os dados indicam ainda que o tamanho da área desmatada é relativamente constante entre os colonos, apenas muda o momento em que isso é realizado, abrindo portanto espaço para que políticas anti-desmatamento possam entrar em ação ao longo da existência do assentamento (IFPRI, 2002).

Lorena (2003) também estudou a dinâmica de uso do solo no PAD Pedro Peixoto entre 1990 e 1999. À semelhança do estudo anterior, Lorena (2003) descreve a existência de áreas de floresta primária, áreas de sucessão secundária (capoeira) que se formam em ambientes antropizados a partir de atividades agropecuárias, áreas de culturas anuais e perenes, e áreas de pastagens. Comparando imagens de satélites de 1990, 1997 e 1999 o autor encontrou mudanças importantes no uso da terra: a floresta tropical primária sofreu forte redução em área, ao ritmo de uma taxa bruta de desflorestamento oscilando em torno de 86 km^2 /ano até 1997, com aumento para 165 km^2 /ano no período restante. A Figura 24 mostra as imagens processadas da área estudada, e a Figura 25 mostra a distribuição percentual das classes e as mudanças ocorridas ao longo do período considerado.

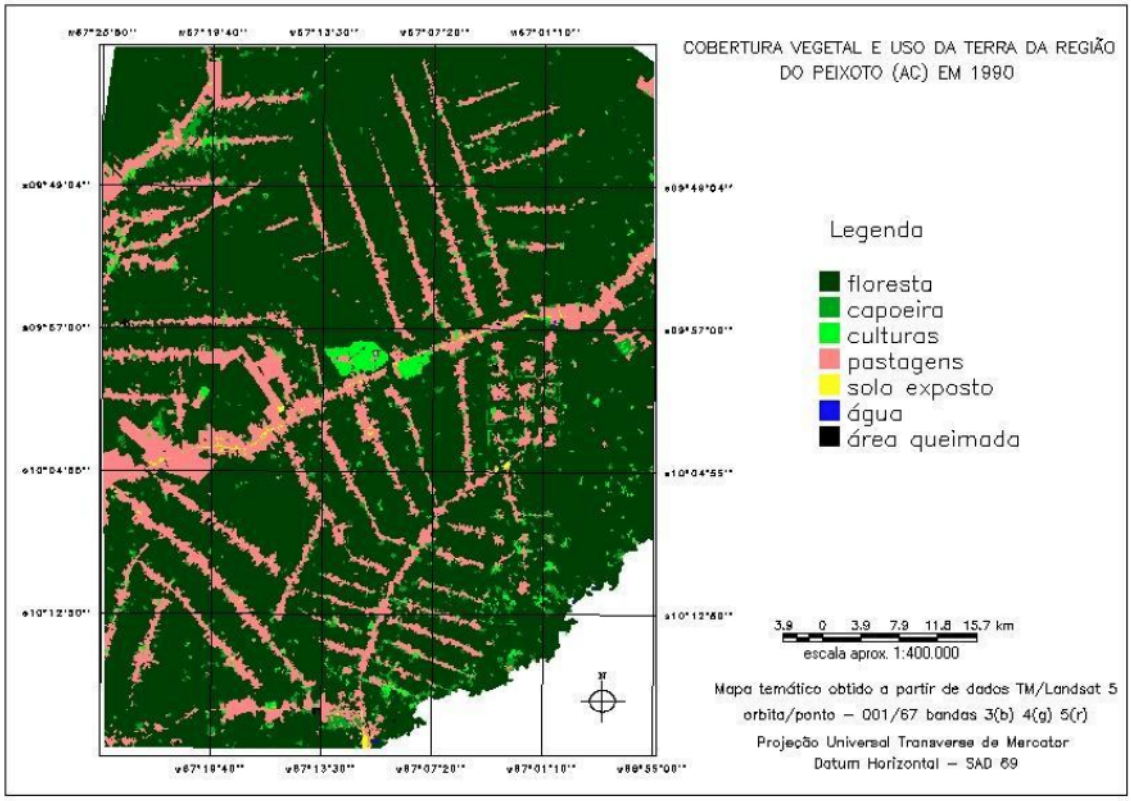


Figura 24 - Mapa de uso e cobertura do solo da Região do Peixoto (AC) em 1990 (acima) e 1999 (abaixo) (Lorena, 2003).

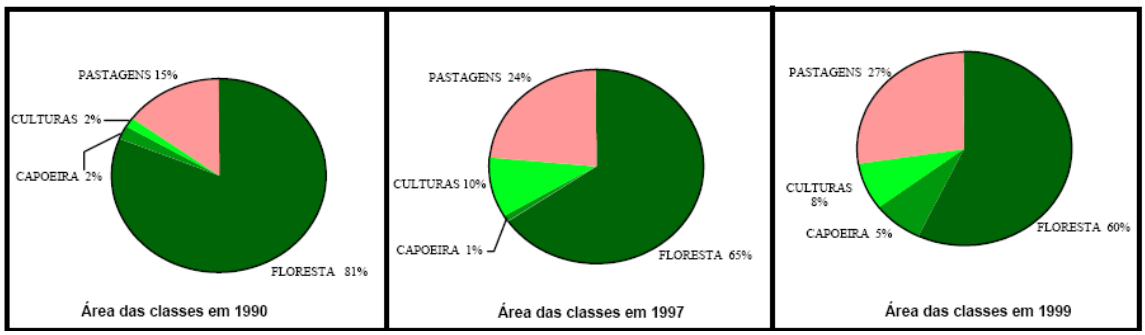


Figura 25 - Quantificação percentual das classes de uso e cobertura do solo no PAD Pedro Peixoto para os anos de 1990, 1997 e 1999 (Lorena, 2003).

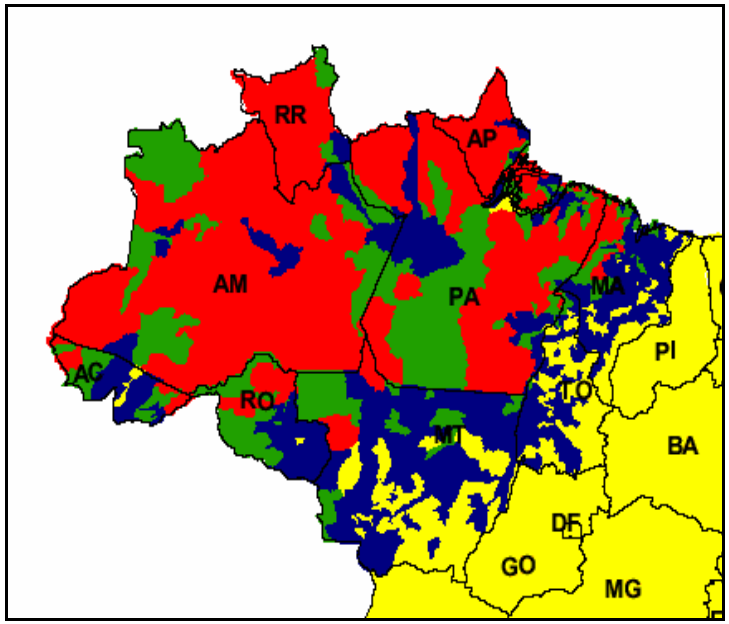
Segundo Lorena (2003), houve um rápido acréscimo em áreas de culturas anuais/perenes nos primeiros anos do assentamento, com certa estabilização em área ao final do período considerado, cobrindo cerca de 300 km^2 em 1999. A área de pastagens aumentou em mais de 90% durante o período de estudo, chegando a 1.022 km^2 em 1999, estando presente em todos os lotes, em maior ou menor percentual, de acordo com a origem e condição do proprietário. As capoeiras tiveram um acréscimo significativo entre 1997 e 1999, ocasionada pelo abandono temporário do lote devido ao baixo retorno financeiro, ou abandono temporário da parcela cultivada devido à baixa produtividade (solos pobres em nutrientes), numa prática de manejo comum do pequeno agricultor, que deixa aquela parcela de terra em repouso para abrir um novo roçado na área de floresta primária. Comparando as imagens de satélite de 1990 e 1997, o autor encontrou grande ocupação do espaço físico na região, com expansão de atividades agrícolas pelos colonos com cultivos de subsistência e/ou perenes, como também expressiva ocupação em setores da área relacionados às grandes propriedades destinadas à pecuária. Para o período 1997-1999, as imagens avaliadas mostraram expansão dos assentamentos na área, com aumento dos roçados e das pastagens. O autor conclui que os colonos, após terem o roçado em produção durante 3 ou 4 anos, "abrem" uma nova frente cultivável, devido ao declínio de produtividade da terra. Com a derrubada e queima, prática comum na Amazônia (Brown *et al.,* 2006), o conteúdo de cinzas momentâneas da floresta torna o solo temporariamente "mais rico", permitindo um bom desempenho da lavoura nesses primeiros anos, para depois entrar em declínio novamente, impulsionando novas frentes de expansão agrícola (Lorena, 2003).

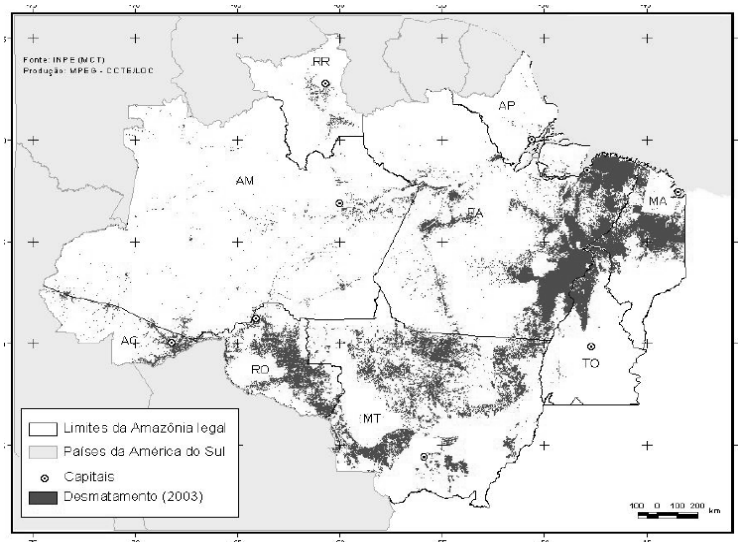
Portanto, esses estudos descritos anteriormente mostram que o uso da terra no PAD Pedro Peixoto mantém um padrão constante ao longo das últimas duas décadas, indicado pela substituição da floresta nativa por áreas de pastagens e culturas temporárias, com aumento

progressivo da taxa de desmatamento devido a necessidade de ocupação de novas áreas em função da baixa produtividade do solo (decorrente de técnicas de agricultura deficientes ou falta de apoio técnico especializado). Esse padrão de uso da terra perpetua as condições propícias para a transmissão de malária nas áreas de fronteira agrícolas, destacando-se entre elas: (a) a escavação de buracos ao longo de estradas que se transformam em poças ideais para o desenvolvimento de larvas de anofelinos; (b) o desflorestamento que acelera a erosão dos solos, criando áreas de deposição de água e levando ao assoreamento dos rios, com represamento de pequenas coleções de água quando da época das chuvas; (c) drenagem ineficiente ao longo de estradas formando espelhos d'água; (d) criação de açudes próximos às habitações humanas com a finalidade de abastecimento de água. Todas essas atividades podem facilitar a transmissão de malária por aumentarem a densidade vetorial.

Essas alterações ambientais não ocorrem apenas na área do PAD Pedro Peixoto, mas em toda a região amazônica. Em 1970, o estado do Acre possuía 4,1 milhões de hectares contabilizados como propriedades agrícolas, atingindo 5,6 milhões em 1980, e diminuindo para 3,2 milhões em 1995 (IBGE, 1998[30] *apud* IFPRI, 2002). Enquanto em 1970 as propriedades possuíam 95% de floresta nativa e somente 1 % de pasto plantado, em 1995 essa proporção foi de 73% e 18%, respectivamente, refletindo aumento importante do desflorestamento no estado (IBGE 1998[30] *apud* IFPRI, 2002). Esse fenômeno também é observado em outras regiões da Amazônia; a área cumulativa desmatada da Amazônia Legal foi de 16,3% em 2003, com aumento progressivo nos últimos 10 anos (Ferreira; Venticinque; Almeida, 2005), como mostram as Figuras 9 e 10 da Introdução.

A Figura 26 mostra o Índice Parasitário Anual de 1999 e de 2007, o mapa dos assentamentos rurais existentes na Amazônia Legal até 1999 e o mapa da área desmatada cumulativa até 2003. Ao comparar esses mapas em conjunto com a Figura 27 (assentamentos rurais e transmissão de malária em 1985), observamos que em grande parte as áreas deflorestadas coincidem com áreas de assentamento rural, e conforme o desmatamento avança, as áreas de maior risco para malária se deslocam para as fronteiras do desmatamento. Áreas de colonização antiga, como certas áreas do Pará e os estados do Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, possuíam alta transmissão de malária em 1985 (Marques, 1987, Figura 27), mas possuem atualmente IPA baixo ou transmissão inexistente, enquanto áreas de ocupação recente, como o norte de Rondônia e o sudoeste do Acre, ainda apresentam IPA elevado, ilustrando graficamente a associação entre desflorestamento, uso da terra e transmissão de malária, tanto na década de 80, como nos últimos 20 anos.


RR
AP
AM
PA
MA
PI
AC
RO
TO
MT
BA
DF
GO
MG


Fonte: INPE (MCT)
Produção: MPEG - CCTB/LOC
RR
AP
AM
PA
MA
AC
RO
TO
MT
Limites da Amazônia legal
Países da América do Sul
Capitais
Desmatamento (2003)
100 0 100 200 km

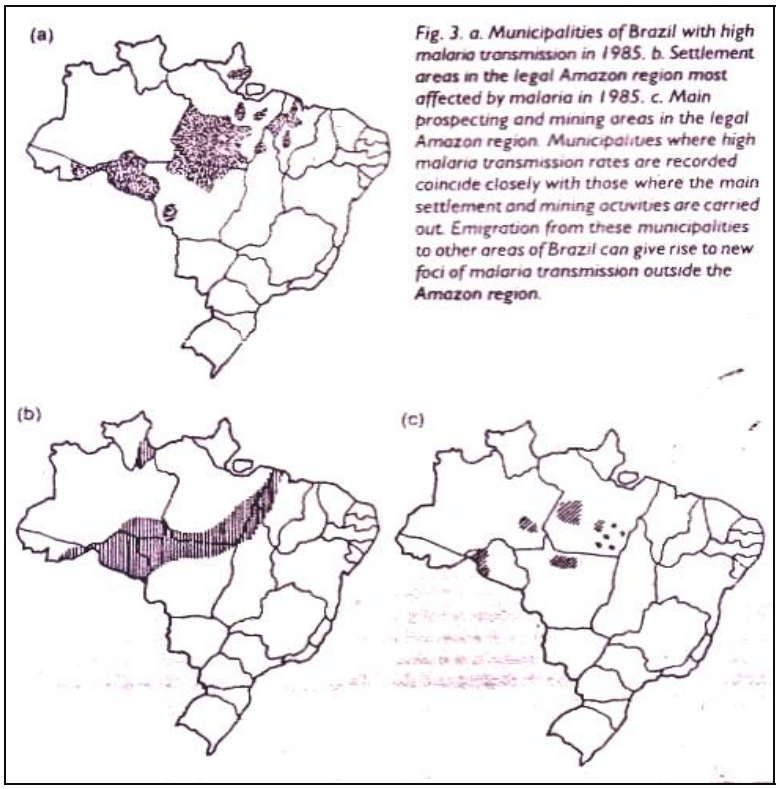


Figura 27 - Mapa do Brasil mostrando (A) municípios com alta transmissão de malária em 1985, (B) assentamentos rurais da Amazônia Legal com alta transmissão de malária em 1985, (C) áreas de mineração na Amazônia Legal (Marques, 1987).

Nos primeiros anos de colonização de novas áreas, as alterações ambientais impetradas incorrem em alterações do equilíbrio da população de vetores anofelinos com conseqüente aumento da transmissão do *Plasmodium* (Sawyer; Sawyer, 1992[32] *apud* de Castro *et al*., 2006). Com o avanço das mudanças ambientais e estabelecimento de pastos e culturas, o risco ambiental diminui (na opinião de alguns autores, como de Castro *et al*., 2006), passando a predominar os riscos comportamentais, como por exemplo: local da moradia, proximidade com áreas de expansão da fronteira agrícola, uso de medidas protetoras e qualidade da habitação (de Castro *et al*., 2006). Enquanto mineradores com malária podem ser repostos por outros empregados, pequenos agricultores assentados em suas próprias terras podem ter a produção agrícola comprometida por episódios freqüentes de malária, principalmente se vários membros da família adoecem ao mesmo tempo (Sawyer; Ferreira

[32] Sawyer DR, Sawyer DO. The malaria transition and the role of social science research. Chen LC, ed. Advancing the health in developing countries: the role of social research. Westport: Auburn House, CT, 1992. p. 105-122.

1986[33] *apud* de Castro *et al*., 2006). Dessa forma, cria-se um ciclo vicioso onde as alterações ambientais introduzidas pelo homem acabam por inviabilizar a própria atividade econômica, levando ao êxodo para outras áreas na esperança de maior prosperidade econômica, resultando em novas fronteiras de expansão, mais mudanças ambientais, e novos criadouros, perpetuando o ciclo da malária. Além disso, a mobilização de pessoas potencialmente infectadas pode levar à introdução de novos isolados de *Plasmodium* em áreas isoladas, iniciando novos focos de transmissão (Marques, 1987).

Frente a esses dados, fica claro que a associação entre uso do solo e transmissão de malária ocorre em toda a Amazônia, sendo muito importante principalmente em áreas de assentamento rural, que embora descontínuas e constituídas primariamente por aglomerados familiares situados em pequenas propriedades, representam em sua totalidade um expressivo contigente populacional distribuído em boa parte da região amazônica. Essa associação entre uso do solo e malária também ocorre em outras regiões do mundo, tanto em áreas rurais (Vittor *et al*., 2006; Munga *et al*., 2006) como em áreas periurbanas (Matthys *et al*., 2006).

6.6 ALTERNATIVAS AO DESMATAMENTO: DA TEORIA AO CONTROLE DA MALÁRIA

Se o desflorestamento propicia a transmissão de malária, quanto da transmissão seria evitada caso se adotassem medidas para seu controle? E quais seriam medidas eficazes para se obter o controle da transmissão de malária em áreas de fronteiras agro-pastoris? Em outras palavras, quais são as alternativas para o desmatamento, e como colocá-las em prática?

Através da modelagem dos dados obtidos no presente estudo, Codeço (comunicação pessoal)[34] calculou a fração prevenível esperada de malária em um grupo de 100 indivíduos jovens (18-25 anos) do sexo masculino, recém-chegados na área do Granada (15 meses de residência no local), distribuídos aleatoriamente em um dos 129 domicílios ou em qualquer das casas localizadas entre os quilômetros 24-30 ou Reserva da Linha 14, usando as características daquele domicílio sorteado aleatoriamente (número de moradores no domicílio,

[33] Sawyer DR, Ferreira AHB. Estrutura produtiva, migração e malária: notas sobre duas áreas amazônicas. Centro de Desenvolvimento e Planejamento Regional, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte: CEDEPLAR; 1986.

[34] Codeço CT. Rio de Janeiro, 2008 (comunicação pessoal).

índice sócio-econômico, co-habitação com alguém que pratica derrubada) em duas situações diferentes: (a) todos os recém-chegados praticam atividades de derrubada na região do Iquiri, e alguns passam a praticar derrubadas fora do Iquiri; (b) todos os recém-chegados praticam derrubada em outras regiões que não o Iquiri; alguns passam a exercer outras atividades que não a derrubada. As intervenções foram aplicadas em cada cenário em 25%, 50%, 75% e 100% dos indivíduos; os cenários (a) e (b) têm distribuição aleatória dos indivíduos na área e distribuição restrita na parte final (recente) do ramal, respectivamente.

Os resultados da modelagem das intervenções nos assentamentos rurais (Tabela 3) mostram que a fração de malária prevenível esperada, varia entre 6,7 e 31,1% simplesmente ao mudar o local das derrubadas de áreas de alto risco (no caso a região na proximidade do rio Iquiri) para outras áreas. Se no entanto forem oferecidas outras atividades ocupacionais aos moradores da comunidade, a fração de malária prevenível aumentará proporcionalmente ao número de indivíduos que deixam de participar em atividades de derrubada, podendo chegar a 59,2% caso as derrubadas sejam eliminadas. Entretanto, a intensidade da prevenção sofre influência entretanto do local de residência do indivíduo, isso porque mesmo não praticando atividades ocupacionais de risco, existe ainda um risco ambiental residual.

Tabela 3 - Fração Prevenível Esperada de malária de qualquer tipo segundo diferentes cenários distribuídos pelo tipo de ocupação (A e B) e local de residência (1 e 2), submetidos a diferentes tipos e intensidades de intervenção.

Cenário	Tipo de intervenção	Intensidade da intervenção	FPE (%) - Média e IC 95% (1) Local de residência aleatório	FPE (%) - Média e IC 95% (2) Local de residência no final do ramal
A) Todos os recém-chegados praticam derrubadas na região do Iquiri (N=100)	Uma porção dos recém-chegados passa a praticar derrubadas em outros locais	25%	6.7 (-7.0 – 21.7)	6.3 (-3.8- 13.7)
		50%	14.6 (2.8 – 26.0)	12.0 (2.7- 20.7)
		75%	22.9 (13.0 – 37.0)	17.5 (10.6- 23.7)
		100%	31.1 (19.0 – 41.0)	23.7 (16.3-30.7)
B) Todos os recém-chegados praticam derrubadas em diferentes locais, incluindo o Iquiri (N=100)	Uma porção dos recém-chegados se dedicam a outras atividades	25%	14.4 (-1.0 – 28.0)	11.9 (0.2 – 21.7)
		50%	29.0 (18.4 – 41.0)	24.0 (14.4 – 34.2)
		75%	43.6 (33.0 – 55.0)	36.5 (27.6 – 45.0)
		100%	59.2 (48.5 - 66.9)	49.0 (43.6 – 55.3)

FPE = Fração Prevenível Esperada, IC = Intervalo de confiança de 95%.

Resultados semelhantes foram obtidos por Erhart *et al*. (2004) ao calcular a fração atribuível populacional para atividades na florestas do Vietnã (trabalhar ou dormir em áreas de floresta). Os autores estimaram que pelo menos metade dos casos de malária de comunidades rurais do Vietnã poderia ser evitada ao se abolir esse tipo de atividade.

Obviamente, qualquer modelo teórico está sujeito a falhas, pois permite apenas uma previsão grosseira do que aconteceria em determinadas intervenções, uma vez que tendem a reduzir sistemas biológicos e sociais complexos a poucas variáveis. Entretanto, quando interpretados, levando-se em conta suas possibilidades e limitações, podem comparar estratégias de intervenção antes que elas sejam postas em prática e auxiliar na escolha de decisões que potencialmente trarão o maior benefício quando implementadas (Breman; Alilio; Mills, 2004).

Controlar o desflorestamento na Amazônia pode diminuir a transmissão de malária além de preservar a biodiversidade e reduzir a erosão dos solos, através de métodos de agricultura sustentáveis guiados pelo uso apropriado do solo e prevenção do desflorestamento descontrolado que se segue à abertura de novas estradas e ocupação de novas áreas (Vittor *et al*., 2006). Estratégias destinadas para tal fim devem levar em conta os motivos que desencadeiam cada uso do solo para serem bem sucedidas.

Para Alencar *et al.* (2004) áreas de pastagens para criação de gado têm sido consideradas a causa principal do desmatamento. A principal razão para a transformação da floresta em pasto é o alto valor capital atribuído às terras em detrimento do valor das culturas e da exploração da floresta nativa (Fujisaka *et al*., 1996; Fujisaka e White, 1998). Além de requerer atividades intensas de desflorestamento para sua criação, diminuir a riqueza de espécies e degradar o solo, as pastagens na Amazônia já estão infestadas com pragas (International Centre for Research on Agroforestry and Alternative to Slash-and-Burn Project 1994; Riesco *et al*., 1982) e portanto degradadas, diminuindo o rendimento da pecuária. Além disso, a implantação de projetos de assentamento em áreas pouco adequadas para agricultura tem contribuído para altas taxas de rotatividade de propriedades e um baixo retorno em termos dos objetivos sociais e econômicos da colonização (Alencar *et al*., 2004). Quanto às culturas permanentes, se por um lado podem diversificar os rendimentos dos assentados e serem consideradas como uso da terra relativamente sustentável, com custos ambientais menores quando comparados com pastagens e culturas temporárias (Sanchez,

1995; Harwood, 1996), por outro lado contribuem com uma porção significativa de desmatamento.

Lorena e Lambin (2007) avaliaram o uso da terra em quatro projetos de colonização distintos, projetados pelo INCRA para atender objetivos diferentes (agricultura e pecuária; integração comunitária, subsistência familiar, e preservação ambiental). Os padrões de desflorestamento e uso da terra foram similares nos quatro projetos avaliados, indicando que embora os assentamentos tenham sido projetados com finalidades diversas, foram submetidos à mesma política regional ou nacional de incentivo, o que levou à homogenização do comportamento dos colonos para sua subsistência. Faz-se necessário, portanto, uma mudança na política de desenvolvimento da Amazônia, que permita aos moradores das zonas rurais garantirem o seu sustento a partir das pequenas propriedades, ao mesmo tempo que preservem o meio-ambiente, possibilitando deste modo o controle da malária e a preservação da biodiversidade amazônica.

Becker (2005) propõe para a Amazônia uma revolução científico-tecnológica capaz de dar valor econômico à floresta intacta, equiparando-a com o preço da madeira, soja e pecuária, para desta forma impedir a destruição das florestas e consolidar o desenvolvimento da região. Esta opinião é partilhada por Costa (2005), que vê na ciência agrária a tendência a criar sistemas botânicos homogêneos mecanizados (como a cultura da soja e do café) que negam o capital contido na biodiversidade, sendo necessário portanto uma reorientação nas instituições de Ciência e Tecnologia para a produção de técnicas ajustadas às necessidades regionais da Amazônia, que possam fornecer ao Estado brasileiro as ferramentas para essa transformação científico-tecnológica. Exemplos desse novo paradigma tecnológico visando a sustentabilidade são as propostas de financiamento para reforma de pastagens já existentes, para máximo aproveitamento das mesmas; e financiamento de pecuária baseada em animais de alto rendimento, para diminuir a tensão sobre as florestas (Costa, 2005).

Araújo (1998, 2006) e d'Oliveira e Braz (2006) descrevem um plano de manejo florestal proposto para o PAD Pedro Peixoto, que permite um ciclo de corte a cada 10 anos, focando o manejo florestal em pequena escala para a produção de madeira de forma sustentada, permitindo ao colono aproveitar economicamente a área de floresta sem destruir o meio-ambiente. O uso da reserva legal de cada propriedade é regulamentado pela Lei n° 4771, de 15.09.65, e por Medidas Provisórias que estabelecem em 80% a cobertura florestal a ser mantida; isso faz com que seja vista pelos produtores como um transtorno à expansão agropecuária. Esse sistema de manejo proposto para o PAD Pedro Peixoto e aplicável em

outros locais possibilita dar à reserva legal de cada propriedade uma importância econômica, reduzindo as chances de sua remoção (Araújo, 2006); entretanto, necessita de mecanismos práticos na divulgação e implementação de tais técnicas para que possam ser adotadas pelas famílias assentadas.

De Castro *et al*. (2006) propõe como intervenção para a mitigação da transmissão de malária em áreas de fronteiras agrícolas, o financiamento e suporte do desmatamento rápido e mecanizado de grandes porções de floresta para o estabelecimento imediato de áreas agrícolas. Tal proposta baseia-se no pressuposto de que o desmatamento mecanizado não envolveria grande quantidade de mão-de-obra e não criaria habitats favoráveis ao *A. darlingi*. Além de defender a destruição da biodiversidade amazônica de forma mecanizada, os autores substanciam sua proposta com apenas um relato de desmatamento mecanizado bem-sucedido (Sawyer, 1992[21] *apud* de Castro *et al*., 2006), sem provar que a rápida destruição da cobertura vegetal impeça a proliferação dos vetores de malária e que consiga interromper o círculo vicioso do desgaste rápido do solo por técnicas agrícolas inadequadas, além de minimizar o fato comprovado de que áreas de pastagem e culturas também causam desequilíbrio da fauna de vetores, como demonstrado na Amazônia peruana (Vittor *et al*., 2006) e na África (Afrane *et al*., 2007; Munga *et al*, 2006). Os resultados do presente estudo indicam que parte da redução na incidência de malária que ocorre após 6-8 anos de residência no Ramal do Granada, deve-se não somente à sucessão de alterações ambientais, mas também à aquisição de imunidade decorrente da exposição cumulativa ao *Plasmodium.* Em outras palavras, o desflorestamento rápido como meio de evitar epidemias de malária nos trabalhadores, pode funcionar num primeiro momento como prevenção da malária, mas continuará a prover um meio ambiente modificado onde o vetor tem chances de proliferar, próximo a indivíduos ainda sem imunidade contra a malária.

6.7 CONTROLE DA MALÁRIA NO RAMAL DO GRANADA E EM ÁREAS SEMELHANTES

Medidas de controle da malária devem captar as particularidades de cada área. No caso da população e área estudada, encontramos as seguintes características que favorecem a transmissão e manutenção da malária na população local:

1. Indivíduo com pouco tempo de residência em área endêmica.

2. Localização das habitações, com conglomerados de casos de malária *vivax* na segunda metade do ramal e de malária *falciparum* ao final do ramal do Granada e início da Reserva da Linha 14.

3. Envolvimento em ocupações de alto risco (derrubadas e em menor grau agricultura e pecuária), sugerindo transmissão extra-domiciliar do *Plasmodium*.

4. Número de indivíduos que habitam o domicílio e co-habitação com indivíduo que trabalha em derrubadas, sugerindo transmissão intradomiciliar ou peridomiciliar do *Plasmodium*.

5. Expressão clínica variável da infecção plasmodial, com ocorrência de episódios oligossintomáticos e assintomáticos.

6. Incidência sazonal da malária, relacionando-se aos níveis de precipitação.

Baseado nesses resultados, podemos sugerir algumas medidas de controle e prevenção da malária nessa população de assentamento rural, extensíveis a outras populações com perfil epidemiológico semelhante:

1. Posicionamento dos postos de microscopia nas áreas de alto risco, com busca ativa periódica de casos nas micro-áreas onde foram identificados os conglomerados de casos de malária (e em novas áreas com as mesmas características: população recente, maior porcentagem de mata residual, proximidade a brejos, lagoas e pântanos), para detecção e tratamento precoce da doença, que deve ser intensificada na época das chuvas.

2. Busca ativa de casos sintomáticos baseado em um conjunto de sintomas, que deve incluir principalmente febre, calafrios, sudorese, cefaléia (dor de cabeça), mialgia (dor no corpo), e artralgia (dor nas juntas), e eventualmente sintomas gastro-intestinais (dor na barriga, diarréia, enjôos e vômitos), sintomas respiratórios (tosse e falta de ar) e tontura, lembrando que os sintomas podem estar presente em conjunto ou isoladamente.

3. Centralização de medidas de combate vetorial (como o uso de mosquiteiros e a aplicação intra-domiciliar de inseticidas eficientes no combate ao vetor, mas seguros para uso humano) nas micro-áreas com alto risco, principalmente após as chuvas.

4. Estabelecimento de atividades didáticas com o intuito de orientar os moradores sobre os principais fatores de risco para malária e medidas preventivas adequadas para a região, Por exemplo, procura precoce do sistema de saúde, uso de mosquiteiros, uso de repelentes em situações de alto risco etc.

5. Capacitação técnica dos funcionários da saúde municipais e/ou estaduais no uso de equipamentos de GPS e softwares livres de análise espacial para direcionar o planejamento e execução das medidas de combate à malária.

6. Reorientação da política de desenvolvimento regional visando a reformulação do uso da terra, de modo a diminuir o desflorestamento e impedir o desequilíbrio ecológico que resulta na proliferação vetorial e aumento da transmissão do *Plasmodium,* como já discutido anteriormente.

6.8 GRUPO SANGÜÍNEO DUFFY

A inclusão desse polimorfismo no estudo tinha como objetivo responder duas questões: estabelecer a prevalência de indivíduos Duffy-negativos (FyFy) na população investigada e avaliar se indivíduos com apenas um alelo funcionante do gene apresentavam menor risco de se ter malária.

Os genótipos mais freqüentes foram FYA/FYA (36,2%), FYB/FYB (21,0%) e FYB/FY (18,5%); os genótipos menos freqüentes foram FYA/FYA (13,3%), FYA/FY (8,7%) e FY/FY (2,3%). Os resultados mostraram que a proporção de indivíduos FY/FY na população estudada é mínima, e portanto não representam uma variável de confusão importante para esse tipo de população. Além disso, indivíduos com apenas um alelo expresso do gene não apresentaram menor risco de se ter malária *vivax* do que indivíduos que expressavam ambos os alelos, mostrando que a diminuição de receptores na superfície da hemácia não inviabiliza a invasão da mesma pelo *Plasmodium vivax*.

As freqüências genotípicas observadas neste estudo são similares àquelas descritas por Cavasini *et al*. (2007b) para doadores de banco de sangue da Amazônia brasileira localizados em quatro cidades diferentes (Macapá, Belém, Porto Velho e Rio Branco), que encontraram alta freqüência de indivíduos FYA/FYB (31%), seguido por indivíduos heterozigotos para o alelo FYB (18,2%) e FYA (14,6%), enquanto indivíduos Duffy-negativos foram infreqüentes (3,2% da população geral e 5,5% em doadores de sangue).

A prevalência de indivíduos Duffy-negativos na área do Granada e no estudo de Cavasini *et al* (2007b) é inferior à descrita em estudos anteriores realizados em outras áreas da Amazônia brasileira, como em Rondônia (Cavasini, 2001) e no Amazonas (Colauto, 1981), onde a prevalência do genótipo FY/FY oscilou entre 10 e 12%. Já no sudeste brasileiro (Novaretti; Dorlbiac-Llacer; Chamone, 2000) e em comunidades isoladas do Amapá e Pará (Perna, Cardoso, Guerreiro, 2007), compostas essencialmente de descendentes de africanos, a freqüência do genótipo Duffy-negativo é bem maior (entre 33 e 44% dos examinados). Essas diferenças regionais podem ser explicadas pelo fato de que (a) o componente étnico negróide é de introdução recente na Amazônia brasileira (Alves-Silva *et al*., 2000; Calegari-Jacques; Grattapaglia; Salzano, 2003), ao contrário do restante do Brasil; (b) alguns estados amazônicos receberam expressiva migração oriunda do Sul e Sudeste do país nas últimas décadas, enquanto outras áreas da Amazônia possuem grande influência ameríndia (Dos Santos *et al*., 1999).

Enquanto já se estabeleceu que indivíduos Duffy-negativos têm efetivamente menor risco de infecção pelo *Plasmodium vivax* (Miller *et al.,* 1976; Welch, McGregor, Williams, 1977; Spencer *et al*., 1978), ainda há poucos estudos sobre a refratariedade de indivíduos heterozigotos ao mesmo *Plasmodium.* Cavasini *et al*. (2007b) encontraram maior freqüência de heterozigotos entre indivíduos com malária *vivax* do que em doadores sãos de bancos de sangue da Amazônia, enquanto Sousa *et al.* (2007) também encontraram maior freqüência de heterozigotos em indivíduos sem malária quando comparados com indivíduos com malária *vivax*. Embora esses estudos sugiram que a presença de apenas uma cópia funcionante do gene leve à diminuição do risco de infecção pelo *P. vivax*, estudos de caráter longitudinal são necessários para comprovar tal hipótese. Kasehagen *et al*. (2007) conduziram vários estudos transversais consecutivos na mesma população de Papua New Guinea, e observaram que a heterozigozidade para um alelo Duffy-negativo se associou com proteção contra a infecção pelo *P. vivax* e com menor parasitemia.

No presente estudo não foi possível detectar uma alteração significativa no *odds* de ter malária *vivax* entre os indivíduos heterozigotos para o sistema Duffy quando comparados com indivíduos homozigotos. As causas para tal podem ser uma amostra de tamanho insuficiente que não resultou em poder estatístico para detectar diferenças significantes na ocorrência de malária, ou ainda necessidade de incorporar outras co-variáveis na análise como o polimorfismo da proteína ligante de Duffy (Duffy Binding Protein ou DBP).

6.9 POLIMORFISMO FcγRIIA

O estudo do polimorfismo FcγRIIA objetivou (a) descrever as freqüências genotípicas na população estudada e (b) avaliar se o alótipo FcγRIIA-H^{131} se associa com proteção contra episódios de malária.

Quanto às freqüências genotípicas obtidas neste estudo (RR 28,4%; HR 46,7%, HH 24,8%), são bem semelhantes às descritas por Kuwano *et al*. (2000) em 85 doadores de banco de sangue no Brasil (RR 32,9%, HR 44,7%, HH 22,4%) e similares às freqüências descritas em populações caucasóides dos Estados Unidos e Europa. Em ameríndios brasileiros, Kuwano *et al*. (2000) encontraram freqüências genotípicas diferentes, sendo o genótipo RR predominante (83,7%) e o genótipo HH extremamente infreqüente (1,1%). Scopel *et al*. (2006) examinaram 112 amostras de garimpeiros do Mato Grosso e encontraram freqüências de 69% e 31% para os alelos H^{131} e R^{131}, respectivamente.

Indivíduos não-imunes ou parcialmente imunes tendem a produzir predominantemente IgG_2 durante episódios agudos de malária, e essa subclasse tem sido associada com imunidade clínica ineficiente. Entretanto, na presença do alelo H^{131} esses anticorpos específicos do tipo IgG_2 podem desencadear inibição celular dependente de anticorpos e fagocitose através de células efetoras que apresentem esse alelo. Essa resposta mais eficiente já foi demonstrada *in vitro* (Tebo *et al*., 2002). Estudos *in vivo* mostram que a presença de anticorpos IgG_2 confere proteção significativa contra os estágios sangüíneos do *Plasmodium* em indivíduos com o alelo H131, mas não em indivíduos R^{131}/R^{131} (Aucan *et al*., 2000). Se esses indivíduos adquirem proteção mediada pela IgG_2 antes do "switch" para produção de IgG_1 e IgG_3 parasita-específico (que ocorre naturalmente pela exposição cumulativa ao *Plasmodium*), o alótipo FcγRIIA-H^{131} se associa com o desenvolvimento de imunidade clínica mais rapidamente, levando à redução da morbidade por malária.

Na prática, os poucos estudos publicados sobre polimorfismo do receptor FcγRIIA e malária divergem quanto aos resultados obtidos. Sinha *et al*. (2008), em estudo com 121 casos de malária e 100 controles, encontraram associação entre o genótipo H^{131}/H^{131} e proteção contra malária *falciparum* grave, bem como associação entre o alelo R^{131} e maior risco de malária grave. Nasr *et al*. (2007) também encontraram associação entre o genótipo R^{131}/R^{131} e desenvolvimento de malária grave, enquanto o genótipo H^{131}/H^{131} se associou com malária não-complicada. Por outro lado, há vários outros estudos de caso-controle que encontraram resultados opostos: associação da homozigozidade H^{131}/H^{131} com maior risco de malária grave (Omi *et al*., 2002), malária cerebral (Cooke *et al*., 2003) e malária placentária (Brouwer *et al*., 2004) e da homozigozidade R^{131}/R^{131} com proteção contra altas parasitemias (Shi *et al*. 2001; Ouma *et al*., 2006), ou ainda falta de associação entre esse polimorfismo e polarização de subclasses de IgG (Scopel *et al*., 2006).

No presente estudo, a ocorrência de um único alelo H^{131} (indivíduos HR) esteve significantemente associada com proteção contra ocorrência de malária qualquer (OR= 0,58, P = 0,057) e malária *vivax* (OR= 0,54, P = 0,048) na população do Ramal do Granada. Esse efeito se mantém quase inalterado na análise ajustada embora os valores de P não sejam mais significantes. Indivíduos com dois alelos H^{131} (indivíduos HH) também apresentam menor chance de ter malária qualquer ou malária *vivax* no seguimento (OR de 0,72 e 0,58, respectivamente), mas sem alcançar significância estatística mesmo na análise não-ajustada para fatores de confusão. Em outras palavras, esse polimorfismo genético fornece relativa proteção contra a ocorrência de malária nesta população de estudo, mas não é determinante,

uma vez que seu efeito protetor desaparece ao se ajustar a análise para outros fatores de risco, como os comportamentais, ambientais e sócio-econômicos. Stinardel *et al*. (2000), ao avaliarem o papel dos fatores genéticos na resposta humoral contra diferentes antígenos de *P. falciparum*, demonstraram que o efeito da contribuição genética é confundido pelos fatores ambientais e sócio-econômicos que são compartilhados por membros de uma mesma família.

É possível que o tamanho amostral tenha sido insuficiente para detectar uma associação efetiva entre esse polimorfismo e proteção ou mesmo risco aumentado contra malária; outros estudos futuros se fazem necessários para detalhar a magnitude e direção da associação entre o polimorfismo do receptor FcγRIIA e a morbidade por malária na população brasileira, que possui uma herança genética diferente das populações já estudadas por outros pesquisadores.

6.10 RECONHECIMENTO HUMORAL DA PvMSP-1

Em resumo, os resultados sobre o polimorfismo antigênico e o reconhecimento humoral da PvMSP-1 mostraram que: (a) os antígenos utilizados no estudo representam apropriadamente o repertório das variantes da PvMSP-1 circulantes na área de estudo, embora nem todos as seqüências encontradas nos isolados tenham sido representadas pelos antígenos recombinantes usados; (b) a região C-terminal é freqüentemente reconhecida pela maioria dos indivíduos da área endêmica, enquanto apenas um terço dos indivíduos testados apresentou anticorpos do tipo IgG contra as regiões variáveis; (c) existe alta correlação entre o reconhecimento humoral de antígenos variáveis com alta similaridade mas não entre os de baixa similaridade, mostrando que os anticorpos IgG provavelmente reconhecem as seqüências polimórficas dos antígenos e não as seqüências conservadas flanqueadoras compartilhadas por todas as variantes do mesmo blocos; (d) exposição cumulativa ao *Plasmodium* (tempo de residência em área endêmica) prediz a presença e os níveis de anticorpos do tipo IgG para alguns domínios variáveis da PvMSP-1, enquanto exposição recente ao *Plasmodium* prediz a presença e níveis de anticorpos contra a porção C-terminal da PvMSP-1; (e) a presença de anticorpos contra uma determinada variante da PvMSP-1 não prediz o risco de uma infecção subseqüente por um parasita com a mesma variante e também não prediz o risco de um novo episódio de malária *vivax*; (f) Anticorpos do tipo IgG presentes na infecção aguda geralmente não corresponderam à variante da PvMSP-1 detectada no

isolado obtido, mas sim a variantes não-relacionadas estruturalmente; (g) os dados obtidos não apóiam a hipótese do pecado original ("original antigenic sin"), pois não há evidência de que infecções sucessivas com variantes diferentes ocasionem um "booster" de anticorpos pré-existentes ao invés de gerar anticorpos com novas especificidades. A discussão desses resultados é apresentada em detalhes no artigo que se encontra nas páginas 1255-1256 deste anexo. Aqui serão feitos apenas comentários adicionais.

A imunogenicidade das diferentes regiões da PvMSP-1 tem sido estudada desde a década de noventa, com o intuito de se identificar uma região da molécula que desencadeie imunidade protetora. Após estudos iniciais da estrutura primária da PvMSP-1 identificando regiões conservadas e variáveis (Del Portillo, 1991) e sua imunogenicidade (Mancilla *et al*., 1994), estudos subseqüentes mostraram que a porção N-terminal (ICB2-5) é pouco reconhecida em infecções naturalmente adquiridas (Soares *et al*., 1997), enquanto a região conservada C-terminal (MSP-1_{19}) é bastante imunogênica (Levitus *et al*., 1994; Soares *et al*, 1997; Fraser *et al*., 1997; Soares *et al*., 1999a; Park *et al*., 2001; Nogueira *et al*., 2006; Barbedo *et al*., 2007; Ladeia-Andrade *et al*., 2007, Zeirek *et al*., 2008). Embora usando uma porção distinta da região N-terminal que inclui apenas parte do antígeno recombinante ICB2-5 utilizado por outros autores, nossos dados confirmam o baixo reconhecimento humoral da região não-conservada da PvMSP-1, bem como da alta imunogenicidade da região conservada C-terminal.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o reconhecimento da porção C-terminal da PvMSP-1 ocorre em grande parte dos indivíduos com episódio recente de malária e parece durar por bastante tempo, evidenciado pela alta porcentagem de indivíduos com IgG-anti-MSP-1_{19} na linha de base. Soares *et al*. (1999b) também encontraram associação entre o reconhecimento humoral da região conservada da PvMSP-1 e malária recente. Entretanto, o papel protetor dessa resposta ainda não está completamente elucidado. Enquanto estudos experimentais da MSP-1_{19} de *P. yoelli, P. falciparum* e *P. vivax* apontam para proteção clínica (Daly; Long, 1993; Ling; Ogun; Holder, 1994; Chang *et al*., 1996; Kumar *et al*., 1995; Yang *et al*., 1999; Collins *et al*., 1999), estudo em infecções naturalmente adquirida divergem.

Anticorpos contra a região conservada da PfMSP-1 inibem o crescimento do parasita *in vitro* (Egan *et al*., 1999; O'Donnell *et al*., 2001) e reduzem o risco de infecção subseqüente (John *et al*., 2004; Egan *et al*., 1996; Okech *et al*., 2004); entretanto, alguns poucos estudos

não encontraram associação com proteção clínica (Dodoo *et al*., 1999; Wang *et al*., 2001). Anticorpos contra a região conservada da MSP-1 de *P. vivax* não parecem estar relacionados com proteção clínica em infecções naturalmente adquiridas, como evidenciado por Nogueira *et al*. (2006) e pelos dados do presente estudo. Uma possível hipótese para esse paradoxo é que a proporção de anticorpos inibitórios induzidos pela PvMSP-1 possa ser menor do que a induzida pela PfMSP-1.

Quanto às regiões variáveis, vários estudos demonstraram que essa porção da MSP-1 de *P. falciparum* é capaz de induzir imunidade protetora (Conway 2000; Cavanagh *et al*., 2004; Polley *et al*., 2003). Já para a PvMSP-1, há apenas um estudo publicado associando proteção clínica contra malária e presença de anticorpos contra essa porção da molécula (Nogueira *et al*., 2006) utilizando o antígeno ICB2-5 (Nogueira *et al*., 2006). Embora esses resultados não sejam diretamente comparáveis aos obtidos no presente estudo, uma vez que os antígenos recombinantes são diferentes, essa associação com proteção clínica não foi reproduzida aqui, embora o presente estudo tenha várias limitações já descritas na página 1257 deste anexo.

6.11 RECONHECIMENTO CELULAR DA PvMSP-1

No presente estudo celular foram usados antígenos recombinantes representando a porção N-terminal da PvMSP-1 de vários alelos circulantes no Brasil, bem como um fragmento da porção conservada C-terminal ($MSP\text{-}1_{19}$), com o intuito de avaliar o reconhecimento celular dessas regiões na população brasileira. Os resultados obtidos mostraram que 73% dos indivíduos testados apresentam resposta celular contra pelo menos um dos antígenos da região variável da PvMSP-1, enquanto somente 22% reconhecem a $MSP\text{-}1_{19}$.

A resposta celular contra a MSP-1 de diferentes espécies de *Plasmodium* tem sido estudada por vários pesquisadores na busca de epítopos de células T que possam conferir imunidade protetora e portanto serem utilizados na construção de vacinas. A PfMSP-1 já foi extensivamente estudada e epítopos para células T foram identificados na sua porção N-terminal (Quakyi *et al*., 1994; Parra *et al*., 2000), que no entanto parecem ser fracamente imunogênicos. Epítopos de células T também já foram descritos para a porção N-terminal da PvMSP-1 (Soares *et al*., 1997; de Oliveira *et al*., 1999), capazes de agir como epítopos

universais com ampla interação com alelos HLA-DR, ou seja, sem restrição genética (Caro-Aguilar *et al*., 2002).

Soares *et al.* (1997) obtiveram 75% e 47,2% de resposta celular contra as porções N-terminal e C-terminal da PvMSP-1, respectivamente; embora esses autores tenham usado um antígeno recombinante (ICB2-5) representando a porção N-terminal que engloba cinco blocos (blocos 1, 2, 3, 4 e 5), dos quais apenas um (bloco 2) foi usado no presente estudo, os resultados sobre a freqüência de respondedores são concordantes com os obtidos no presente estudo. Quanto à PvMSP-1_{19}, encontramos baixa imunogenicidade para células T, corroborando os estudos prévios existentes (Soares *et al*., 1997; de Oliveira *et al*., 1999).

No presente estudo houve baixa concordância entre o reconhecimento celular e humoral das diferentes regiões testadas (em especial da MSP-1_{19}). Esse falta de correlação entre o reconhecimento celular e humoral da MSP-1_{19} de *P. falciparum* também foi relatada por outros autores. Já se demonstrou que a PfMSP-1_{19} possui múltiplos epítopos de células T que são reconhecidos por linfócitos T *helper* e desencadeiam resposta de anticorpos (Egan *et al*., 1997; Garraud *et al*., 1999), mas que não são reconhecidos por células T efetoras (Egan *et al*., 1997). Além disso, o reconhecimento celular da MSP-1_{19} parece ser bloqueado pela presença de pontes de dissulfídio na estrutura da proteína natural (Egan *et al*., 1997), restringindo o processamento da MSP-1 pelos antígenos de histocompatibilidade humanos de classe II (MHC classe II) (Quinn *et al*., 2001); esses achados podem explicar também a baixa proliferação *in vitro* induzida pela PvMSP-1_{19} observada no presente estudo, e ao desvio da resposta celular para a porção N-terminal da molécula. Quinn *et al*. (2001) sugerem que o alto reconhecimento humoral da porção C-terminal da PfMSP-1 se deve na verdade à ajuda cognata de epítopos de células T localizados fora dessa região. Já Lee *et al*. (2006) mostraram que determinados epítopos da PfMSP-1 com baixa reatividade contra células contra alelos dominantes ("altered peptide ligand"), que diferem entre si em apenas poucos aminoácidos, são capazes de suprimir respostas de células T policlonais tanto em indivíduos expostos à malária, como em não-expostos, interferindo com o processo de *priming* das células T, expansão clonal, conversão em células T de memória, e as funções efetoras (secreção de INFγ).

Antígenos recombinantes da MSP-1_{19} usando a mesma seqüência da MSP-$1_{19,}$ porém com proteína de fusão GST ou com cauda de Histidina, levaram a respostas imunes em modelos experimentais mapeadas para genes murinos H-2 diferentes, mostrando que seqüências genéticas não relacionadas ao *Plasmodium* são críticas na regulação dessas

respostas imunes (Good *et al*., 2005). Em modelos experimentais com *P. yoelii*, anticorpos anti-PvMSP-1_{19} mesmo em níveis elevados não são capazes de proteger contra a infecção na ausência de células T CD_4, sugerindo a participação da imunidade celular nesse processo (Tian *et al*., 1998; Hirunpetcharat *et al*., 1999). Dados recentes sugerem que células de memória B específicas para MSP-1_{19} também não são capazes de conferir proteção sozinhas, e sofrem apoptose durante a infecção aguda (Wykes *et al*., 2005). Células T CD_4 parasita-específicas tanto com função efetora (Th1) como aquelas com função *helper* também sofrem apoptose durante a infecção aguda por *P. berghei* (Hirunpetcharat; Good, 1998), *P. yoelii* (Wipasa *et al*., 2001) e *P. falciparum* (Toure-Balde *et al*., 1996). Isso talvez possa explicar a aparente contradição entre a alta prevalência de anticorpos contra essa porção da PvMSP-1 na população de estudo e a falta de proteção contra malária, uma vez que seu efeito protetor demonstrado em modelos animais é suprimido em infecções naturalmente adquiridas. Entretanto, estudos de fenotipagem celular em episódios agudos de malária *vivax* usando extrato de *P. vivax* mostraram alta proporção de linfócitos T CD4 com fenótipo de células de memória (CD4+CD45RO+), sugerindo que as células T de memória não foram suprimidas por este parasita (Jangpatarapongsa *et al*., 2006).

Alguns autores encontraram reconhecimento celular de antígenos do *Plasmodium* em pequena porcentagem de indivíduos não-expostos à malária (Zevering *et al*., 1990, 1992, 1994; Fern; Good, 1992; Bilsborough, Carlisle, Good, 1993; Quakyi *et al*., 1994). No presente estudo, até 15,4% dos indivíduos não-expostos à malária reconheceram algum antígeno da porção N-terminal. Soares *et al*. (1997) descreveram entre 6,7% e 16,7% de resposta celular positiva para a PvMSP-1 entre doadores nunca expostos à malária, variando conforme a região da molécula testada. Essa positividade pode ser devida à reatividade residual contra a proteína de fusão (GST) utilizada na preparação do antígeno recombinante por Soares *et al.* (1997) e no presente estudo, à presença de epítopos com reação cruzada com outros organismos levando a ativação de células de memória (Zevering *et al*., 1992; Jones *et al*., 1990), *priming* e ativação *in vitro* de células T CD_4 *naive* (Artavanis-Tsakonas; Riley, 2002; Waterfall; Black; Riley, 1998), ou menos provavelmente a contaminantes do antígeno.

Os dados celulares do presente estudo sugerem que a resposta celular contra as regiões variáveis está associada com exposição cumulativa ao *Plasmodium* (número de malárias prévias e tempo de residência em área endêmica) sem no entanto variar em função do tempo decorrido da última malária; enquanto a resposta celular contra a região C-terminal e a resposta humoral contra ambas as regiões C-terminal e N- terminal parecem variar em função

do tempo decorrido do estímulo antigênico mas não em função da exposição cumulativa. Os poucos estudos celulares longitudinais publicados sobre resposta contra outros antígenos são contraditórios: enquanto alguns apontam para estabilidade da resposta celular por vários meses contra a proteína de superfície do circunsporozoíto ou CSP (Zevering *et al*., 1994; Bilsborough, Carlisle, Good, 1993) e o antígeno de superfície do eritrócito infectado ou Pf155/RESA (Favaloro *et al*., 1986), estudos com africanos que migraram para a Europa sugerem que o reconhecimento celular diminui conforme aumenta o tempo decorrido da última exposição ao parasita (Ballet *et al*., 1985). Udhayakumar *et al*. (2001) também descreveram respostas celulares de curta duração contra o antígeno apical de membrana-1 de *P. falciparum* em africanos seguidos longitudinalmente no Quênia, embora não fique claro se houve variação na incidência da malária durante o seguimento longitudinal; tanto Chougnet *et al*. (1990) como Troye-Blomberg *et al*. (1989) encontraram diminuição da resposta celular contra Pf155/RESA, após diminuição da intensidade de transmissão do parasita.

Carvalho, Fontes e Krettli (1999) estudaram a resposta celular contra a porção N-terminal da MSP-1 de *P. falciparum* em fazendeiros e mineiros do Mato Grosso, e encontraram associação entre o número de episódios pregressos de malária e a freqüência de resposta celular contra o antígeno utilizado; não houve associação, entretanto, com a idade, sexo, tempo de residência em área endêmica e intervalo de tempo decorrido entre a última malária e o experimento. Outros trabalhos sugerem associação entre a PfMSP-1 e a intensidade de transmissão de *P. falciparum* (Garraud *et al*., 1999; Riley *et al*., 1993). Em uma coorte de crianças de Uganda, respostas celulares contra a PfCSP e PfMSP-1 foram mais freqüentes em crianças acima de 4 anos de idade; não houve associação entre reconhecimento celular e episódios recentes de parasitemia sintomática, mas sim com parasitemia assintomática (Ssewanyana *et al*., 2008).

Enquanto respostas celulares contra a PfMSP-1 já foram associadas com imunidade clínica em alguns estudos (Riley *et al*., 1991; Riley *et al*., 1992; Petersen *et al*., 1989) mas não em outros (Chougnet *et al*., 1990), a natureza protetora da resposta celular contra a MSP-1 de *P. vivax* permanece não-investigada. Entender os mecanismos que levam ao desenvolvimento inicial da imunidade específica é importante para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra qualquer *Plasmodium*. É necessário portanto definir quais mecanismos desencadeiam respostas celulares antígeno-específicas, e se as mesmas conferem proteção contra a doença ou contra a infecção plasmodial. O presente estudo contribui para demonstrar a existência de resposta celulares específicas contra a PvMSP-1, além de sugerir fatores associados ao

desenvolvimento e regulação dessa resposta. Serve também de base para o planejamento de estudos longitudinais com o objetivo específico de detalhar os mecanismos imunológicos celulares que se associam com proteção contra o *Plasmodium,* e capturar variáveis clínicas e epidemiológicas que complementem as medidas dessa imunidade protetora.

7 CONCLUSÕES

1. A coorte apresenta características típicas de população de assentamento rural da Amazônia: população jovem, composta em sua maioria por migrantes oriundos de estados não-endêmicos para malária, com tempo de residência na Amazônia variável, mas que em sua maioria já foram expostos ao parasita. A prevalência e incidência de malária nesta coorte, bem como o índice esplênico obtido, permitem caracterizar a endemicidade na área como hipoendêmica.

2. Os principais fatores de risco para malária foram: (a) atividades ocupacionais relacionadas ao desmatamento, agricultura e pecuária; (b) tempo de residência na área; (c) malária pregressa recente; (d) local de moradia; (e) co-habitação com indivíduo que pratica o desflorestamento; (f) número de moradores no domicílio. Esses resultados sugerem que a transmissão de malária na coorte ocorre tanto intra ou peridomiciliar, como em áreas distantes do domicílio, adquirida neste caso em função da atividade ocupacional.

3. Por ser uma população migrante, a idade não é bom estimador de exposição cumulativa ao parasita e não se associa ao risco de se ter malária; apenas o tempo de residência na área é capaz de indicar exposição cumulativa, uma diferença importante em relação a populações nativas da Amazônia e populações africanas.

4. Há fortes evidências de aquisição de imunidade nesta população de área hipoendêmica para malária, mostrado pela diminuição do risco de apresentar malária com o aumento do tempo de residência na área e a heterogeneidade do quadro clínico dos episódios de infecção plasmodial detectados.

5. Há também importante heterogeneidade espacial na localização dos casos de malária observados durante o seguimento longitudinal, concentrando-se na metade posterior do ramal (malária vivax) ou nos últimos quilômetros do ramal do Granada (malária falciparum).

6. Não foi encontrada associação entre as variáveis genéticas (polimorfismo do grupo sangüíneo Duffy e receptor FcγRIIA) e a ocorrência de malária no seguimento longitudinal, o que sugere que o controle da malária na região depende muito dos programas de combate governamentais.

7. Os dados imunológicos humorais mostraram que a região invariável C-terminal da PvMSP-1 é mais freqüentemente reconhecida pelos indivíduos testados do que as regiões variáveis da porção N-terminal; a exposição cumulativa ao *Plasmodium* (tempo de residência em área endêmica) prediz a presença e os níveis de anticorpos do tipo IgG para alguns domínios variáveis da PvMSP-1, enquanto a exposição recente ao parasita prediz a presença e níveis de anticorpos contra a porção C-terminal da PvMSP-1, embora nenhum desses anticorpos pareça exercer papel protetor contra a malária. Finalmente, os dados obtidos não apóiam a hipótese do pecado original ("original antigenic sin"), pois não há evidência de que infecções sucessivas com variantes diferentes ocasionem um "booster" de anticorpos pré-existentes ao invés de gerar anticorpos com novas especificidades.

8. A resposta celular contra antígenos da PvMSP-1 é específica, indicando a presença de epítopos de células T nessas regiões da proteína, e é mais freqüente contra antígenos que representam as regiões variáveis do que contra a região conservada da proteína, enquanto a resposta humoral específica tem comportamento inverso (é maior contra a região conservada do que contra as regiões variáveis. Essa falta de concordância entre o reconhecimento celular e humoral das diferentes regiões testadas, sugere que diferentes mecanismos imunológicos distintos são desencadeados por regiões variáveis e conservada da PvMSP-1.

Este estudo mostra, portanto, que a epidemiologia da malária em áreas de assentamento rural na Amazônia apresenta fatores de risco inerentes a esse tipo de população, principalmente ligados ao uso e ocupação da terra, e muito pouco relacionadas com variáveis constitucionais (genéticas e imunológicas) do indivíduo. As atividades de desmatamento, por provocarem mudanças ambientais que criam condições propícias para a transmissão do *Plasmodium*, constituem-se no principal fator de risco para os que a desempenham, e também para os demais moradores do assentamento rural, podendo-se estender essa conclusão para outras populações com as mesmas características epidemiológicas.

Além disso, o constante influxo de indivíduos não-imunes para as regiões de fronteira agrícola, onde estão ocorrendo essas mudanças ambientais, acaba perpetuando o ciclo de transmissão do *Plasmodium* nessas comunidades rurais. A marcante distribuição espacial dos casos de malária sugere que medidas de intervenção domiciliares podem ser eficientes para diminuir a transmissão de malária na região, acopladas a medidas político-econômicas mais amplas que visem eliminar as causas primordiais do problema, e não apenas reduzir os danos.

REFERÊNCIAS*

Abeku TA, van Oortmarssen GJ, Borsboom G, de Vlas SJ, Habbema JD. Spatial and temporal variations of malaria epidemic risk in Ethiopia: factors involved and implications. Acta Trop. 2003;87:331-40.

Ab'Saber A. Problemas da Amazônia brasileira. Dossiê Amazônia brasileira I. Estudos Avançados. 2005;19:7-35.

Acre (Estado). Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Naturais. Zoneamento Ecológico-Econômico do Acre, 1ª fase. Aspectos sócio-econômicos e ocupação territorial, volume 2. Rio Branco; 2000. Disponível em : http:// http://www.ac.gov.br/meio_ambiente/Vol-I/05_ZEE_V_I_Caracteristics.pdf [2008 ago 26].

Acre (Estado). Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Naturais. Zoneamento Ecológico-Econômico do Acre, 2ª fase. Mapa da estrutura fundiária do Acre. Rio Branco; 2006. Disponível em : http://www.seiam.ac.gov.br/index.php?option=com_content&task= view&id=995&Itemid=1 [2008 ago 26].

Afrane YA, Zhou G, Lawson BW, Githeko AK, Yan G. Life-table analysis of Anopheles arabiensis in Western Kenya highlands: effects of land covers on larval and adult survivorship. Am J Trop Med Hyg. 2007;77: 660-6.

Alencar A, Nepstad N, McGrath D, Moutinho P, Pacheco P, Diaz MDCV, Filho BS. Desmatamento na Amazônia: indo além da emergência crônica. Manaus: Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia; 2004. 89 p.

Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Pereira da Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. Am J Trop Med Hyg. 2002;66:641-8.

Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, Da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium spp*. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. J Med Entomol. 2005;42:777-9.

* De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt H-J, Pena SDJ, Prado VF. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. Am J Hum Genet. 2000;67:444-61.

Araujo HJB. Índices técnicos da exploração e transformação madeireira em pequenas áreas sob manejo florestal no PC Pedro Peixoto. Rio Branco: Embrapa-CPAF/AC; 1998. 30 p. (Circular Técnica n° 23).

Araujo HJB. Inventário florestal a 100% em pequenas áreas sob manejo florestal madeireiro. Acta Amazonica. 2006;36:447- 64.

Arévalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* malaria vaccine development. Mol Immunol. 2001;38:443-55.

Arruda ME, Argaki C, Gagliardi F, Haile RW. A seroprevalence and descriptive epidemiological study of malaria among Indian tribes of the Amazon basin of Brazil. Ann Trop Med Parasitol. 1996;90:135-43.

Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: Rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. J Immunol. 2002;169:2956–63.

Aucan C, Traoré Y, Tall F, Nacro B, Traoré-Leroux T, Fumox F, Rihet P. High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. Infect Immun. 2000;68:1252-8.

Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Basri H, Purnomo, Masbar S. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. Am J Trop Med Hyg. 1991;45:65-76.

Baird JK, Purnomo, Basri H, Bangs MJ, Andersen EM, Jones TR, Masbar S, Harjosuwarno S, Subianto B, Arbani PR. Age-specific prevalence of *Plasmodium falciparum* among six populations with limited histories of exposure to endemic malaria. Am J Trop Med Hyg. 1993;49:707-19.

Ballet JJ, Druilhe P, Vasconcelos I, Schmitt C, Agrapart M, Frommel D. Human lymphocyte responses to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens. A functional assay of protective immunity? Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985;79:497-9.

Barbedo MB, Ricci R, Jimenez MCS, Cunha MG, Yazdani SS, Chitnis CE, Rodrigues MM, Soares IS. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins

representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:335-9.

Barbieri AF, Sawyer DO. Heterogeneity of malaria prevalence in alluvial gold mining areas in northern Mato Grosso state, Brazil. Cad Saúde Pública. 2007;23:2878-86.

Barreto P, Souza JR C, Noguerón R, Anderson A, Salomão R. Pressão Humana na Floresta Amazônica Brasileira. Belém:World Resources Institute; 2005. 84 p.

Bautista Ct, Chan AST, Ryan JR, Calampa RC, Roper MH, Hightower AW, Magill AJ. Epidemiology and spatial analysis of malaria in the northern Peruvian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2006;75:1216-22.

Becker B. Geopolítica da Amazônia. Dossiê Amazônia brasileira I, Estudos Avançados. 2005; 19:71-86.

Bilsborough J, Carlisle M, Good MF. Identification of Caucasian CD4 T cell epitopes on the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. T cell memory. J Immunol. 1993;151:890-9.

Blackman MJ, Heidrich, HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. J Exp Med. 1990; 172:379-82.

Bloland PB, Ruebush TK, McCormick JB, Ayisi J, Boriga DA, Oloo AJ, Beach R, Hawley W, Lal A, Nahlen B, Udhayakumar V, Campbell CC. Longitudinal cohort study of the epidemiology of malaria infections in an area of intense malaria transmission I. Description of study site, general methodology, and study population. Am J Trop Med Hyg. 1999a;60:635-40.

Bloland PB, Boriga DA, Ruebush TK, McCormick JB, Roberts JM, Oloo AJ, Hawley W, Lal A, Nahlen B, Campbell CC. Longitudinal cohort study of the epidemiology of malaria infections in an area of intense malaria transmission II. Descriptive epidemiology of malaria infection and disease among children. Am J Trop Med Hyg. 1999b;60:641-8.

Bøgh C, Lindsay SW, Clarke SE, Dean A, Jawara M, Pinder M, Thomas CJ. High spatial resolution mapping of malaria transmission risk in The Gambia, West Africa, using Landsat TM satellite imagery. Am J Trop Med Hyg. 2007;76:875-81.

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

Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druillhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. J Exp Med. 1990;172:1633-41.

Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. Infect Immun. 1992;60:1473-81.

Braga EM, Scopel KKG, Komatsu NT, da Silva-Nunes M, Ferreira MU. Polymorphism of the Fcγ receptor IIA and malaria morbidity. J Molecular Genetic Medicine. 2005;1:5-10.

Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL, Bloland PB, Kaslow DC, Lal AA. A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kiloDalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. Am J Trop Med Hyg. 1998;58:211-9.

Branch OL, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, Alvarez E, Perez EJ, Gotuzzo E. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazonian community. Malar J. 2005;4:27.

Branquinho MS, Lagos CB, Rocha RM, Natal D, Barata JM, Cochrane AH, Nardin E, Nussenzweig RS, Kloetzel JK. Anophelines in the state of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, the variant *P. vivax* VK247 and *P. malariae*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993;87:391-4.

Branquinho MS, Araújo MS, Natal D, Marrelli MT, Rocha RM, Taveira FA, Kloetzel JK. Anopheles oswaldoi a potential malaria vector in Acre, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996;90:233.

Brasil (Governo Federal). Ministério da Integração Nacional. Ministério do Meio Ambiente. Plano Amazônia Sustentável, Anexo ao volume 1 - Caderno de Mapas. Brasília: Governo Federal; 2003. Disponível em http:// http://www.planalto.gov.br/casacivil/arquivospdf/pas.pdf [2008 jul 23].

Breman JG, Alilio MS, Mills A. Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. Am J Trop Med Hyg. 2004;71 Suppl 2:1-15.

Brooker S, Clarke S, Njagi JK, Polack S, Mugo B, Estambale B, Muchiri E, Magnussen P, Cox J. Spatial clustering of malaria and associated risk factors during an epidemic in a highland area of western Kenyan. Trop Med Int Health. 2004,9:757-66.

Brouwer KC, Lal AA, Mirel LB, Otieno J, Ayisi J, Van Eijk AM, Lal RB, Steketee R, Nahlen BL, Shi YP. Polymorphism of Fc receptor IIa for immunoglobulin G is associated with placental malaria in HIV-1-positive women in Western Kenya. J Infect Dis. 2004;190:1192-8.

Brown IF, Schroeder W, Setzer A, Rio MJ de L, Pantoja NV, Fonseca AAD, Marengo J. EOS Transactioss. American Goephysical Union. 2006;87:253-64.

Calegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM: Historical Genetics: Spatiotemporal Analysis of the Formation of the Brazilian Population. Am J Hum Biol. 2003;15:824-34.

Camargo LMA, Ferreira MU, Krieger H, De Camargo EP, Da Silva LP. Unstable hypoendemic malaria in Rondonia (western Amazon region, Brazil): epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agro-industrial rural settlement. Am J Trop Med Hyg. 1994; 51:16-26.

Camargo LM, dal Colletto GM, Ferreira MU, Gurgel Sde M, Escobar AL, Marques A, Krieger H, Camargo EP, da Silva LH. Hypoendemic malaria in Rondonia (Brazil, Western Amazon region): seasonal variation and risk groups in an urban locality. Am J Trop Med Hyg. 1996;55:32-38.

Camargo LMA, Noronha E, Villalobos Salcedo JM, Dutra AP, Krieger H, Pereira da Silva LH, Camargo EP. The epidemiology of malaria in Rondonia (Western Amazon region, Brazil): study of a riverine population. Acta Tropica. 1999;72:1-11.

Caro-Aguilar I, Rodríguez A, Calvo-Calle JM, Guzmán F, De la Vega P, Patarroyo ME, Galinski MR, Moreno A. *Plasmodium vivax* promiscuous T-helper epitopes defined and evaluated as linear peptide chimera immunogens. Infect Immun. 2002;70:3479-92.

Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. Clin Microbiol Rev. 2002;15:564-94.

Carvalho LH, Fontes CJF, Krettli AU. Cellular responses to *Plasmodium falciparum* major surface antigens and their relationship to human activities associated with malaria transmission. Am J Trop Med Hyg. 1999;60:674-9.

Cavanagh DR, Dodoo D, Hviid L, Kurtzhals JA, Theander TG, Akanmori BD, Polley S, Conway DJ, Koram K, McBride JS. Antibodies to the N-terminal block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are associated with protection against clinical malaria. Infect Immun. 2004;72:6492–502.

Cavasini MT, Ribeiro WL, Kawamoto, Ferreira MU. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, western Brazilian Amazon? Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33:489-92.

Cavasini CE, Pereira FJT, Ribeiro WL, Wunderlich G, Ferreira MU. Duffy blood group genotypes among malaria patients in Rondônia, Western Brazilian Amazon. Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34:591-5.

Cavasini CE, de Mattos LC, D'Almeida Couto AAR, Domingos CRB, Valencia SH, Neiras WCS, Alves RT, Rossit ARB, Castilho L, Machado RLD. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 2007a;101:1042-4.

Cavasini CE, de Mattos LC, D'Almeida Couto AAR, D´Almeida Couto VSC, Gollino Y, Moretti LJ, Bonini-Domingos CR, Rossit ARB, Castilho L, Machado RLD. Duffy blood group gene polymorphism among malaria *vivax* patients in four areas of the Brazilian Amazon region. Malaria J. 2007b;6:167 .

Chang SP, Gibson HL, Lee-Ng CT, Barr PJ, Hui GS. A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth. J Immunol. 1992;149:548-55.

Chang SP, Case SE, Gosnell WL, Hashimoto A, Kramer KJ, Tam LQ, Hashiro CQ, Nikaido CM, Gibson HL, Lee-Ng CT, Barr PJ, Yokota BT, Hui GSN. A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects *Aotus* monkeys against malaria. Infect Immun. 1996;64:253–61.

Chizzolini C, Geinoz A, Schrijvers D. Interleukin-2 reverses T cell unresponsiveness to *Plasmodium falciparum*-antigen in malaria immune subjects. Cell Immunol. 1990;128:1-10.

Chougnet C, Deloron P, Lepers JP, RAson MD, SAvel J, Coulanges P. Longitudinal study of the cellular response to Pf155/RESA and circumsporozoite protein in Madagascar. Imunnol Lett. 1990;25:231-6.

Clark TD, Greenhouse B, Njama-Meya D, Nzarubara B, Maiteki-Sebuguzi C, Staedke SG, Seto E, Kamya MR, Rosenthal PJ, Dorsey G. Factors determining the heterogeneity of malaria incidence in children in Kampala, Uganda. J Infect Dis. 2008;198:393-400.

Colauto EMR, Barraviera B, Meira DA, Matsubara LS, Pellegrino Jr. J, Machado PEA, Sogayar R, Barboza AF, Silva EA, Colauto R, Pirolla JAG, Mendes RP. Malária no Município de Humaitá, Estado do Amazonas. XII – Freqüência de fatores de resistência eritrocitária na população geral e em doentes: hemoglobina S e sistema sangüíneo Duffy. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1981;23 Suppl 5:72-8.

Collins WE, Kaslow DC, Sullivan JS, Morris CL, Galland GG, Yang C, Saekhou AM, Xiao L, Lal AA. Testing the efficacy of a recombinant merozoite surface protein (MSP-1(19) of *Plasmodium vivax* in Saimiri boliviensis monkeys. Am J Trop Med Hyg. 1999;60:350-6.

Confalonieri UEC. Saúde na Amazônia: um modelo conceitual para a análise de paisagens e doenças. Dossiê Amazônia brasileira I. Estudos Avançados. 2005;19:221-36.

Conway DJ. Natural selection on polymorphic malaria antigens and the search for a vaccine. Parasitol Today. 1997;13:26–9.

Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N, Bojang KA, Oduola AMJ, Kremsner PG, Arnot DE, Greenwood BM, McBride JS. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. Nat Med. 2000;6:689-92.

Cooke GS, Aucan C, Walley AJ, Segal S, Greenwood BM, Kwiatkowski DP, Hill AV. Association of Fcγ receptor IIa (CD32) polymorphism with severe malaria in West Africa. Am J Trop Med Hyg. 2003;69:565-8.

Costa RA. Epidemiologia da malária em Acrelândia - Acre (1999-2002): avaliação e proposições. Rio Branco: Universidade Federal do Acre; 2003. 47 p.

Costa RA, Leal O, Leal EAS. Evolução da infecção malárica no município de Acrelândia, Estado do Acre (1999-2002). Rev Soc Bras Med Trop São Paulo. 2004; 37 Suppl I:269.

Costa FA. Questão agrária e macropolíticas na Amazônia. Dossiê Amazônia brasileira I. Estudos Avançados. 2005;19:131-56.

Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge of malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101:229-37.

Cox-Singh J, Singh B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public importance? Trends Parasitol. 2008;24:406-10.

Cutbush M, Mollinson PL. The Duffy blood system. Hereditary. 1950;4:383-9.

Craig MH, Sharp BL, Mabaso MLH, Kleinschmidt I. Developing a spatial-statistical model and map of historical malaria prevalence in Botswana using a staged variable selection procedure. Int J Health Geogr. 2007;6:44.

Daly TM, Long CA. A recombinant 15-kilodalton carboxylterminal fragment of *Plasmodium yoelii* 17XL merozoite surface protein-1 induces a protective immune response in mice. Infect Immun. 1993;61:2462–7.

da Silva-Nunes M, de Souza VAF, Pannuti CS, Sperança MA, Terzian ACB, Nogueira ML, Yamamura AMY, Freire MS, da Silva NS, Malafronte RS, Muniz PT, Vasconcelos HB, da Silva EVP, Vasconcelos PFC, Ferreira MU. Risk factors for Dengue virus infection in rural Amazonia: population-based cross-sectional surveys. Am J Trop Med Hyg. No prelo 2008.

Dawson B, Trapp RG. Basic & Clinical Biostatistics. 3rd edition. New York: Appleton & Lange; 2001. 399 p.

Datasus. Banco de dados do SUS. Brasília: Ministério da Saúde; 2005. Disponível em http://www.datasus.gov.br [2007 dez 27].

de Andrade AL, Martelli CMT, Oliveira RM, Arias JR, Zicker F, Pang L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining áreas in Brazil. Clin Infec Dis. 1995;20:475.

de Castro MC, Monte-Mór RL, Sawyer DO, Singer BH, 2006. Malaria risk on the Amazon frontier. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;14:2452-7.

de Castro MC, Sawyer DO, Singer BH. Spatial patterns of malaria in the Amazon: implications for surveillance and targeted interventions. Health Place. 2007;13:368-80.

del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88:4030-4.

de Oliveira CI, Wunderlich G, Levitus G, Soares IS, Rodrigues MM, Tsuji M, del Portillo HA. Antigenic properties of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. Vaccine. 1999;17:2959–68.

Dev V, Phookan S, Sharma VP, Anand SP. Physiographic and entomologic risk factors of malaria in Assam, India. Am J Trop Med Hyg. 2004;71:451-6.

Dicko A, Sagara I, Diemert D, Sogoba M, Niambele MB, Dao A, Dolo G, Yalcouye D, Diallo DA, Saul A, Miller LH, Toure YT Klion AD, Doumbo OK. Year-toyear variation in the age-specific incidence of clinical malaria in two potentional vaccine testing sites in Mali with different levels of malaria transmission intensity. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:1028-33.

Dian Z, Changxing S. Sedimentary causes and management of two principal environmental problems in the lower Yellow River. Environ Manage. 2001;28:749-60.

Dodoo D, Theander TG, Kurtzhals JAL, Koram K, Riley E, Akanmori BD, Nkrumah FK, Hviid L. Levels of antibody to conserved parts of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in Ghanaian children are not associated with protection from clinical malaria. Infect Immun. 1999;67:2131-7.

d'Oliveira MVN, Sant'Anna H. Inventário florestal e avaliação do avanço do desmatamento no Projeto de Colonização Pedro Peixoto. Rio Branco: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Acre; 2003. 47 p. (Série Documentos, n ° 83).

d'Oliveira HS, Cavalcante CRS, Magalhães AA, Rocha KS. Utilizando Sistema de Posicionamento Global (GPS) e métodos participativos para mapeamento de uso e cobertura do solo em um projeto de assentamento rural no Leste do Estado do Acre. In: XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto; Goiânia, Brasil. 2005. Resumos, São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais; 2005. p. 3559-61.

d'Oliveira MVN, Braz EM. Estudo da dinâmica da floresta manejada no projeto de manejo florestal comunitário do PC Pedro Peixoto na Amazônia Ocidental. Acta Amazonica. 2006; 36:177-82.

Dos Santos SEB, Rodrigues JD, Ribeiro-dos-Santos AKC, Zago MA: Differential Contribution of Indigenous Men and Women to the Formation of an Urban Population in the Amazon Region as Revealed by mtDNA and Y-DNA. Am J Phy Anthrop. 1999;109:175-80.

Druilhe P, Perignon JL. Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stages in humans. Immunol Lett. 1994;41:115-20.

Duarte EC, Fontes CJF. Associação entre a produção anual de ouro em garimpos e incidência de malária em Mato Grosso - Brasil, 1985 - 1996. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35:665-8.

Duarte EC, Gyorkos TW, Pang L, Abrahamowicz M. Epidemiology of malaria in a hypoendemic brazilian Amazon migrant population: a cohort study . Am J Trop Med. 2004; 70:229-37.

Dutta HM, Dutt AK. Malaria ecology: a global perspective. Soc Sci Med Part D, Med Geogr. 1978;12:69-84.

Egan AF, Morris J, Barnish G, Allen S, Greenwood BM, Kaslow DC, Holder AA, Riley EM. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum m*alaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. J Infect Dis. 1996;173:765–9.

Egan A, Waterfall M, Pinder M, Holder A, Riley E. Characterization of human T- and B-cell epitopes in the C terminus of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1: evidence for poor T-cell recognition of polypeptides with numerous disulfide bonds. Infect Immun. 1997;65:3024-31.

Egan AF, Burghaus P, Druilhe P, Holder AA, Riley EM. Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro. Parasite Immunol. 1999;21:133–9.

Egan AF, Blackman MJ, Kaslow DC. Vaccine efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in malaria-naive, -exposed, and/or -rechallenged *Aotus vociferans* monkeys. Infect Immun. 2000;68:1418–27.

Erhart A, Thang ND, Hung NQ, Toi le V, Hung le X, Tuy TQ, Cong le D, Speybroeck N, Coosemans M, D'Alessandro U. Forest malaria in Vietnam: a challenge for control. Am J Trop Med Hyg. 2004;70:110-8.

Erhart A, Ngo DT, Phan VK, Ta TT, Van Overmeir C, Speybroeck N, Obsomer V, Le XH, Le KT, Coosemans M, D'alessandro U. Epidemiology of forest malaria in central Vietnam: a large scale cross-sectional survey. Malar J. 2005;4:58.

Escada MIS, Vieira ICG, Kampel AS, Araújo R, Veiga JB, Aguiar APD, Veiga I, Oliveira M, Pereira JLG, Carneiro Filho A, Fearnside PM, Venturieri A, Carrielo F, Thales M, Carneiro TSG, Monteiro AMV, Câmara G. Processos de ocupação nas novas fronteiras da Amazônia. Dossiê Amazônia brasileira II. Estudos Avançados. 2005;19:9-23.

Favaloro JM, Coppel RL, Corcoran LM, Foote SJ, Brown GV, Anders RF, Kemp DJ. Structure of the RESA gene of *Plasmodium falciparum*. Nucleic Acids Res. 1986;14:8265-77.

Fern J, Good M. Promiscuous malaria peptide epitope stimulates CD45Ra T cells from peripheral blood of nonexposed donors. J Immunol. 1992;148:907–13.

Fearnside PM. Desmatamento na Amazônia: dinâmica, impactos e controle. Acta Amazonica. 2006;36:395-400.

Ferrante A, Kumaratilake LM, Rzepczyk CM and Dayer J-M. Killing of *Plasmodium falciparum* by cytokine acti-vated effector cells (neutrophils and macrophages). Immunol Lett. 1990;25:179-88.

Ferreira MU, Kimura EAS, Souza JM, Katzin AM. The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients. Am J Trop Med Hyg. 1996;55:315-23.

Ferreira MU, Liu Q, Zhou M, Kimura M, Kaneko O, Van Thien H, Isomura S, Tanabe K, Kawamoto F. Stable patterns of allelic diversity at the Merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from southern Vietnam. J Eukaryot Microbiol. 1998;45:131-6.

Ferreira RGM, Moura MM, Engracia V, Pagotto RC, Alves FP, Camargo LMA, Pereira da Silva LH, Camargo EP, Beiguelman B, Krieger H. Ethnic admixture composition of two western Amazonian populations. Hum Biol. 2002;74:607-13.

Ferreira MU, Foronda AS, Schumaker TTS. Plasmódios e a malária. In: Ferreira MU, Foronda AS, Schumaker TTS. Fundamentos biológicos da Parasitologia humana. Barueri: Manole; 2003. p. 5-15.

Ferreira AMM, Salati E. Forças de transformação do ecossistema amazônico. Dossiê Amazônia brasileira II. Estudos Avançados. 2005;19:25-44.

Ferreira LV, Venticinque E, Almeida A. O desmatamento na Amazônia e a importância das áreas protegidas. Dossiê Amazônia brasileira I. Estudos Avançados. 2005;19:157-66.

Ferreira-Gonçalves MJ, Alecrim WD. Non-planed urbanization as a contributing factor for malaria incidence in Manaus-Amazonas, Brazil. Rev Salud Publica. 2004; 6:156-66.

Firestone LA, Souza Jr C. The role of remote sensing and GIS in enforcement of areas of permanent preservation in the Brazilian Amazon. Geocarto. 2002;17:51-56.

Fontes CJF. Epidemiologia da malaria e fatores associados à infecção assintomática por *Plasmodium* em uma população de garimpeiros da Amazônia brasileira (Mato Grosso, 1996) [tese (Doutorado em Medicina Tropical)]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.

Fraser T, Michon P, Barnwell JW, Noe AR, Al-Yaman F, Kaslow DC, Adams JH. Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. Infect Immun. 1997;65:272-77.

Fujisaka S, Bell W, Thomas N, Hurtado L, Crawford E. Slash-and-burn agriculture, conversion to pasture, and deforestation in two Brazilian colonies. Agric Ecosyst Environ. 1996;59:115-30.

Fujisaka S, White D. Pasture or permanent crops after slash-and-burn cultivation? Land-use choice in three Amazon colonies. Agrofor Syst. 1998;42:45–59.

Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Diagnóstico e tratamento da malária. Brasília: FNS/MS; 1995. 103 p.

Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Gerência Técnica de Malária. Índice Parasitário Anual de 1999 [mapa eletrônico]. Brasília: FNS/MS; 1999. Disponível em : http: //dw.saude.gov.br [2002 mai 15].

Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Plano de intensificação das ações de controle da malária na Amazônia Legal. Brasília: FNS/MS; 2000. Disponível em: http://dw.saude.gov.br [2002 out 23].

Gamage-Mendis AC, Rajakaruna J, Carter R, Mendis KN. Infectious reservoir of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria in an endemic region of Sri Lanka. Am J Trop Med Hyg. 1991a;45:479-87.

Gamage-Mendis AC, Carter R, Mendis C, De Zoysa AP, Heratch PR, Mendis KN. Clustering of malaria infections within an endemic population: risk of malaria associated with the type of housing construction. Am J Trop Med Hyg 1991b,45:77-85.

Garraud O, Diouf A, Holm I, Perraut R, Longacre S. Immune responses to *Plasmodium falciparum*-merozoite surface protein 1 (MSP1) antigen. II. Induction of parasite-specific

immunoglobulin G in unsensitized human B cells after in vitro T-cell priming with MSP119. Immunology. 1999; 97:497–505.

Gaudart J, Poudiougou B, Dicko A, Ranque S, Toure O, Sagara I, Diallo M, Diawara S, Ouattara A, Diakite M, Doumbo OK. Space-time clustering of childhood malaria at the household level: a dynamic cohort in a Mali village. BMC Public Health. 2006;6:286.

Gibson HL, Tucker JE, Kaslow DC, Krettli AU, Collins WE, Kiefer MC, Bathurst IC, Barr PJ. Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. Mol Biochem Parasitol. 1992;50:325-34.

Giha HA, Rosthoj S, Dodoo D, Hviid L, Satti GM, Scheike T, Arnot DE, Theander TG. The epidemiology of febrile malaria episodes in an area of unstable and seasonal transmission. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000; 94:645-51.

Gil LHS, Tada MS, Katsuragawa TH, Ribolla PE, da Silva LH. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102:271-76.

Gimnig JE, Ombok M, Otieno S, Kaufman MG, Vulule JM, Walker ED. Density-dependent development of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae in artificial habitats. J Med Entomol. 2002;39:162-72.

Gomez-Elipe A, Otero A, van Herp M, Aguirre-Jaime A. Forecasting malaria incidence based on monthly case reports and environmental factors in Karuzi, Burundi, 1997-2003. Malaria J. 2007;6:129.

González JM, Olano V, Vergara J, Arévalo-Herrera M, Carrasquilla G, Herrera S, López JA. Unstable, low-level transmission of malaria on the Colombian Pacific Coast. Ann Trop Med Parasitol. 1997;91:349-58.

Good MF, Doolan DL. Immune effector mechanisms in malaria. Curr Opin Immunol. 1999; 11:412-9.

Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. Annu Rev Immunol. 2005;23:69-99.

Groux H, Gysin J. Opsonisation as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum:* functional role of IgG sub-classes. Res Immunol. 1990;141:529-42.

Gu W, Utzinger J, Novak RJ. Habitat-based larval interventions: a new perspective for malaria control. Am J Trop Med Hyg. 2008;78:2-6, 2008.

Guerra CA, Snow RW, Hay SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. Trends Parasitol. 2006;22:353-8.

Gysin J, Druilhe P, Da Silva LP. Mechanisms of immune protection in the asexual blood stage infection by *Plasmodium falciparum*: analysis by in vitro and ex-vivo assays. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992; 87 Suppl 5:145-9.

Harwood RR. Development pathways towards sustainable systems following slash-and-burn. Agric Ecosyst Environ. 1996;58:75–86.

Hay S, Were E, Renshaw M, Noor AM, Ochola S, Olusanmi I. Forecasting, warning, and detection of malaria epidemics: a case study. Lancet. 2003;361:1705-6.

Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present and future. Lancet Infect Dis. 2004;4:327-36.

Herrera MA, Rosero F, Herrera S, Caspers P, Rotmann D, Sinigaglia F, Certa U. Protection against malaria in *Aotus* monkeys immunized with a recombinant blood-stage antigen fused to a universal T-cell epitope: correlation of serum gamma interferon levels with protection. Infect Immun. 1992;60:154–8.

Hirunpetcharat C, Stanisic D, Liu XQ, Vadolas J, Strugnell RA, Lee R, Miller LH, Kaslow DC, Good MF. Intranasal immunization with yeast-expressed 19 kD carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein-1 (yMSP119) induces protective immunity to blood stage malaria infection in mice. Parasite Immunol. 1998;20:413-20.

Hirunpetcharat C, Vukovic P, Liu XQ, Kaslow DC, Miller LH, Good MF. Absolute requirement for an active immune response involving B cells and Th cells in immunity to *Plasmodium yoelii* passively acquired with antibodies to the 19-kDa carboxyl-terminal fragment of merozoite surface protein-1. J Immunol. 1999;162:7309-14.

Hoshen MB, Morse AP. A weather-driven model of malaria transmission. Malar J. 2004; 3:32.

International Centre for Research on Agroforestry (ICRAF) and the project Alternatives to Slash-and-Burn (ASB). Report of research site selection in Acre and Rondonia states of the Amazon region, Brazil. Nairobi: ICRAF and ASB; 1994. 45 p.

International Food Policy Research Institute. Agricultural intensification by smallholders in the Western Brazilian Amazon: from deforestation to sustainable land use. Washington, DC, EUA International Food Policy Research Institute; 2002. 147 p . (Report 130).

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa de Biomas do Brasil. Brasília: IBGE; 2004. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/default_prod.shtm [2008 fev 23].

Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira, Ministério da Educação. Mapa do analfabetismo no Brasil. Brasília: Ministério da Educação; 2004. Disponível em: http://www.oei.es/quipu/brasil/estadisticas/analfabetismo2003.pdf [2005 mar 13].

Instituto Nacional de Reforma Agrária. Divisão de Assentamento. Projetos de colonização, de assentamento, e agroextrativista em execução. Rio Branco: INCRA; 1999. 12 p.

Instituto Nacional de Reforma Agrária. Divisão de Cadastro Rural. Seção de Cartografia e Recursos Naturais. PAD Pedro Peixoto. Escala 1: 100.000. [CD-ROM]. Rio Branco: INCRA; 2005. 1 CD-ROM.

Jangpatarapongsa K, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Cui L, Montgomery SM, Looareesuwan S, Troye-Blomberg M, Udomsangpetch R. Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection. Microbes Infect. 2006;8:680-6.

Jiang X.-M, Arepally G, Poncz M, McKenzie SE. Rapid detection of the Fc gamma RIIA-H/R 131 ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). J Immunol Methods. 1996;199:55-9.

John CC, O'Donnell RA, Sumba PO, Moormann AM, de Koning-Ward TF, King CL, Kazura JW, Crabb BS. Evidence that invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of merozoite surface protein-1 (MSP-1 19) can play a protective role against blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in individuals living in a malaria endemic area. J Immunol. 2004;173:666-72.

Jones KR, Hickling JK, Targett GA, Playfair JH. Polyclonal in vitro proliferative responses from nonimmune donors to *Plasmodium falciparum* malaria antigens requite UCHL1+(memory) T cells. Eur J Immunol 1990;20:307-15.

Kabilan L, Sharma VP, Kaur P, Ghosh SK, Yadav RS, Chauhan VS. Cellular and humoral immune responses to well-defined blood stage antigens (major merozoite surface antigen) of *Plasmodium falciparum* in adults from an Indian zone where malaria is endemic. Infect Immun. 1994;62:685-91.

Karunaweera ND, Carter R, Grau GE, Mendis K. Demonstration of anti-disease immunity to *Plasmodium vivax* malaria in Sri Lanka using a quantitative method to assess clinical disease. Am J Trop Med Hyg. 1998;58:204-10.

Kasehagen LJ, Mueller I, Kiniboro B, Bockarie MJ, Reeder JC. Kazura JW, Kastens W, McNamara DT, King CH, Whalen CC, Zimmerman PA. Reduced *Plasmodium vivax* erythrocyte infection in PNG Duffy-negative heterozygotes. PLoS ONE. 2007;2:e336.

Keating J, Mbogo CM, Mwangangi J, Nzovu JG, Gu V Regens JL, Yan G, Githure JI, Beier JC. Anopheles gambiae s.l. and Anopheles funestus mosquito distributions at 30 villages along the Kenyan coast. J Med Entomol. 2005,42:241-6.

Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, Otani S, Yamaguchi, Y., Tanabe K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested *PCR* that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. Parasitol Int. 1997;46:91-5.

Korenkomp EL for the Roll Back Malaria Monitoring and Evaluation Reference Group task force on malaria morbidity: malaria incidence estimates at country level for the year 2004 - Proposed estimates and draft report. Geneva: World Health Organization, Roll Back Malaria, 2005. Disponível em: http://mosquito.who.int/docs/incidence_estimations2.pdf. [2008 jun 26].

Kremsner PG, Zotter GM, Feldmeier H, Graninger W, Rocha RM, Wiedermann G. A comparative trial of three regimens for treating uncomplicated *falciparum* malaria in Acre, Brazil. J Infect Dis. 1988;158:1368-71.

Kiszewski A, Mellinger A, Spielman A, Malaney P, Sachs SE, Sachs J. A global index representing the stability of malaria transmission. Am J Trop Med Hyg. 2004;70:486-98.

Kondrashin AV. Malaria in the WHO Southeast Asia region. Ind J Malariol. 1992;29:129-60.

Kumar S, Yadaya A, Keister DB, Tian JH, Ohl M, Perdue-Greenfield KA, Miller LH, Kaslow DC. Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in *Aotus* monkeys. Mol Med. 1995;1:325-32.

Kuwano ST, Bordin JO, Chiba AK, Mello Ab, Figueiredo MS, Vieira-Filho JP, Fabron A Jr, Kerbauy J. Allelic polymorphisms of human *Fcγ receptor IIa* and *Fcγ receptor IIIb* among distinct groups in Brazil. Transfusion. 2000;40:1388-92.

Ladeia-Andrade S. Aspectos epidemiológicos da malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil. 287 f. Dissertação [tese (Doutorado em Medicina Tropical)]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz; 2005.

Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, Scopel KK, Braga EM, Bastos Mda S, Wunderlich G, Coura JR. Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)-1(19) and cumulative exposure to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:943-51.

Ladislau JLB, Leal MC, Tauil PL. Avaliação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na região da Amazônia Legal, Brasil, no contexto da descentralização. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 2006;15:9-20.

Langhi Jr DM, Albuquerque S, Covas DT, Perez CA, Bordin JO. Presença do alelo FYAnull, do sistema de grupo sangüíneo Duffy em habitantes de região endêmica para malária e doadores de sangue no Brasil. Rev Bras Hemat Hemot. 2004;26:268-9.

Laserson KF, Wypij D, Petralanda I, Spielman A, Maguire JH. Differential perpetuation of malaria species among Amazonian Yanomami Amerindians. Am J Trop Med Hyg. 1999; 60:767-73.

Lee EA, Flanagan KL, Minigo G, Reece WH, Bailey R, Pinder M, Hill AV, Plebanski M. Dimorphic *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 epitopes turn off memory T cells and interfere with T cell priming. Eur J Immunol. 2006;36:1168-78.

Levitus G, Mertens F, Speranca MA, Camargo LM, Ferreira MU, del Portillo HA. Characterization of naturally acquired human IgG responses against the N-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg. 1994;51:68-76.

Lindblade KA, Walker ED, Onapa AW, Katungu J, Wilson ML. Land use change alters malaria transmission parameters by modifying temperature in a highland area of Uganda. Trop Med Int Health. 2000;5:263-74.

Lindsay SW, Birley MH. Climate change and malaria transmission. Ann Trop Med Parasitol. 1996;90:573-88.

Ling IT, Ogun SA, Holder AA. Immunization against malaria with a recombinant protein. Parasite Immunol. 1994;16:63–7.

Loevinsohn ME. Climatic warming and increased malaria incidence in Rwanda. Lancet. 1994;343:714-8.

Loiola CCP, Mangabeira da Silva CJ, Tauil PL. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. Rev Panam Salud Pública/Pan Am J Health. 2002;11:235-44.

Lorena RB. Evolução do uso da terra em porção da Amazônia Ocidental (Acre), com uso de técnicas de detecção de mudanças. [dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto)]. São José dos Campos : Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais; 2003.

Lorena RB, Santos JR, Shimabukuro YE. Técnica de detecção de mudanças aplicada em imagens de satélite como ferramenta de monitoramente de uso e cobertura da terra na Amazônia Ocidental (Acre). Espaço & Geografia. 2004;7:47-76.

Lorena RB, Lambin EF. Linking spatial patterns of deforestation to land use using satellite and field data. In: XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto; Florianópolis. 2007. Livro de resumos. São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais; 2007. p.6807-14.

Luxemburger C, Thwai KL, White NJ, Webster HK, Kyle DE, Maelankirri L, Chongsuphajaisiddhi T, Nosten F. The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996;90:105-11.

Luxemburger C, Nosten F, White NJ. Naturally acquired immunity to *vivax* malaria. Lancet. 1999;354:162.

Mabaso MLH, Craig M, Ross A, Smith T. Environmental predictors of the seasonality of malaria transmission in Africa: the challenge. Am J Trop Med Hyg. 2007;76:33-8.

MacDonald G. The epidemiology and control of malaria. London: Oxford University Press; 1957. 157 p.

Males S, Gaye O, Garcial A. Long-Term Asymptomatic Carriage of *Plasmodium falciparum* protects from malaria attacks: a prospective atudy among Senegalese children. Clinical Infectious Diseases. 2008;46:516–22

Mancilla, L. I., G. Levitus, K. Kirchgatter, F. Mertens, S. Herrera, and H. A.del Portillo. *Plasmodium vivax:* dimorphic DNA sequences form the MSP-1 gene code for regions that are immunogenic in natural infections. Exp Parasitol. 1994;79:148–58.

Marcano TJ, Morgado A, Tosta CE, Coura Jr. Cross-sectional study defines difference in malaria morbidity on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99:369-76.

Marengo J, Nobre CA, Tomasella J, Oyama MD, d'Olilveira GS, Oliveira R, Camargo H, Alves LM, Brown IF. The drought of Amazonia in 2005. J Climate. 2008:21:45-516.

Marques AC. Human migration and the spread of malaria in Brazil. Parasitology Today 3:166-170, 1987.

Marrelli MT, Branquinho MS, Hoffmann EHE, Taipe-lagos CB, Natal D, Kloetzel JK. Correlation between positive serology for *Plasmodium vivax*-like/*Plasmodium simiovale* malaria parasites in the human and anopheline populations in the State of Acre, Brazil. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 1998;92:149-51.

Marsh K. Immunology of human malaria. In: Gilles HM, Warrell DA. Bruce-Chwatt's essential malariology. London: Arnold; 1993. p. 60-77.

Marsh K, Snow RW. Malaria transmission and morbidity. Parassitologia. 1999;41:241-6.

Martin PH, Lefebvre MG. Malaria and climate: sensitivity of malaria potential transmission to climate. Royal Swed Acad Sci. 1995;24:200-7.

Matthys B, Vounatsou P, Raso G, Tschannen AB, Becket EG, Gosoniu L, Cissé G, Tanner M, N'Goran EK, Utzinger J. Urban farming and malaria risk factors in a medium-sized town in Côte D'Ivoire. Am J Trop Med Hyg. 2006;75:1223-31.

Mbogo CN, Snow RW, Khamala CP, Kabiru EW, Ouma JH, Githure JI, Marsh K, Beier JC. Relationships between *Plasmodium falciparum* transmission by vector populations and the incidence of severe disease at nine sites on the Kenyan coast. Am J Trop Med Hyg. 1995; 52:201-6.

Mbogo CM, Mwangange JM, Nzovu J, Gu W, Yan G, Gunter JT, Swalm C, Keating J, REgens JL, Shililu JI, Githure JI, Beier JC. Spatial and temporal heterogeneity of *Anopheles* mosquitoes and *Plasmodium falciparum* transmission along the Kenyan coast. Am J Trop Med Hyg. 2003;68:734-42.

Mendis KN, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. Am J Trop Med Hyg. 2001;64:97-106.

Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. N Engl J Med. 1976;295:302-4.

Minakawa N, Sonye G, Mogi M, Yan G. habitat characteristics of *Anopheles gambiae s.s.* larvae in a Kenyan higland. Med Vet Entomol. 2004;18:301-5.

Minakawa N, Munga S, Atieli F, Mushinzimana E, Zhou G, Githeko AK, Yan G. Spatial distribution of anopheline larval habitats in western Kenyan higlands: effects of land cover types and topography. Am J Trop Med Hyg. 2005;73:157-65.

Mishra SK, Mohanty S, Satpathy SK, Mohapatra DN. Cerebral malaria in adults - a description of 526 cases admitted to Ispat General Hospital in Rourkela, India. Ann Trop Med Parasitol. 2007;101:187-93.

Mshana RN, Boulandi J, Mayombo J, Mendome G. In vitro lymphoproliferative responses to malaria antigens: a prospective study of residents of a holoendemic area with perennial malaria transmission. Parasite Immunol. 1993;15:35-45.

Molineaux L. The epidemiology of human malaria as an explanation of its distribution, including some implications for its control. In: Wernsdorfer WH, McGregor IA, editor. Malaria: Principles and Practice of Malariology. London: Churchill Livingstone; 1988. Vol. 1, p. 913-98.

Monteiro MA. Meio século de mineração industrial na Amazônia e suas implicações para o desenvolvimento regional. Dossiê Amazônia brasileira I. Estudos Avançados. 2005;53:187-207.

Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. *Plasmodium*malariae and *Plasmodium*ovale - the 'bashful'malaria parasites. Trends Parasitol. 2007;23:278-83.

Munga S, Minakawa N, Zhou G, Mushinzimana E, Barrack OJ, Githeko AK, Yan G. Association between land cover and habitat productivity of malaria vectors in western Kenyan highlands. Am J Trop Med Hyg. 2006;74:69-75.

Mushinzimana E, Munga S, Minakawa N, Li L, Feng C, Bian L, Kitron U, Schimdt C, Beck L, Zhou G, Ghiteko AK, Yang G. Comparison of three remote sensors for identification of anopheline mosquito larval habitats in western Kenya highlands. Malar J. 2006;5:13.

Nagao Y, Thavara U, Chitnumsup P, Tawatsin A, Chansang C, Campbell-Lendrum D. Climatic and social risk factors for Aedes infestation in rural Thailand. Trop Med Int Health. 2003;8:650-9.

Nasr A, Iriemenam NC, Troye-Blomberg M, Giha HA, Balogun HA, Osman OF, Montgomery SM, ElGhazali G, Berzins K. Fc gamma receptor IIa (CD32) polymorphism and antibody responses to asexual blood-stage antigens of *Plasmodium falciparum* malaria in Sudanese patients. Scand J Immunol. 2007;66:87-96.

Nogueira PA, Alves FP, Fernandez-Becerra C, Pein O, Santos NR, Pereira da Silva LH, Camargo EP, del Portillo HA. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but the C terminus of merozoite surface protein 1. Infect Immun. 2006;74:2726-33.

Noronha E, Alecrim MGC, Romero GAS, Macêdo V. Estudo clínico da malária *falciparum* em crianças em Manaus, AM, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33:185-90.

Norris DE. Mosquito-borne diseases as a consequence of land use change. Ecohealth. 2004; 1:19-24.

Novaretti MCZ, Dorlbiac-Llacer PE, Chamone DAF: Estudo de grupos sangüíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo. Rev Bras Hematol Hemot. 2000;22:23-32.

O'Donnell RA, de Koning-Ward TE, Burt RA, Bockarie M, Reeder JC, Cowman AF, Crabb BS. Antibodies against merozoite surface protein (MSP-)1_{19} are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. J Exp Med. 2001;193:1403-12.

Oesterholt MJAM, Bousema JT, Mwerinde OK, Harris C, Lushino P, Masokoto A, Mwerinde H, Mosha FW, Drakeley CJ. Spatial and temporal variation in malaria transmission in a low endemicity area in northern Tanzania. Malar J. 2006;5:98.

Okech BA, Corran PH, Todd J, Joynson-Hicks A, Uthaipibull C, Egwang TG, Holder AA, Riley EM. Fine specificity of serum antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein, PfMSP-1(19), predicts protection from malaria infection and high-density parasitemia. Infect Immun. 2004;72:1557–67.

Omi K, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Naka I, Looareesuwan S, Tokunaga K. *Fcγ receptor IIA* and *IIIB* polymorphisms are associated with susceptibility to cerebral malaria. Parasitol Int. 2002;51:361-6.

Ouma C, Keller CC, Opondo DA, Were T, Otieno RO, Otieno MF, Orago AS, Ong'Echa JM, Vulule JM, Ferrell RE, Perkins DJ. Association of FCgamma receptor IIA (CD32) polymorphism with malarial anemia and high-density parasitemia in infants and young children. Am J Trop Med Hyg. 2006;74:573-7.

Owusu-Agyei S, Binka F, Koram K, Anto F, Adjuik M, Nkrumah F, Smith T. Does radical cure of asymptomatic *Plasmodium falciparum* place adults in endemic areas at increase risk of recurrent symptomatic malaria? Trop Med Int Health. 2002;7:599-603.

Paddle JJ. Evaluation of the Haemoglobin Colour Scale and comparison with the HemoCue haemoglobin assay. Bull W Health Org. 2002;80:813-6.

Parra M, Hui G, Johnson AH, Berzofsky JA, Roberts T, Quakyi IA, Taylor DW. Characterization of conserved T- and B-cell epitopes in *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein 1. Infect Immun. 2000;68:2685-89.

Park JW, Moon SH, Yeom JS, Lim KJ, Sohn MJ, Jung WC, Cho YJ, Jeon KW, Ju W, Ki CS, Oh MD, Choe K. Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. Clin Diagn Lab Immunol. 2001;8:14-20.

Perera KL, Handunnetti SM, Holm I, Longacre S, Mendis K. Baculovirus merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant antigens are highly protective in a natural primate model for human *Plasmodium vivax* malaria. Infect Immun. 1998;66:1500–6.

Perna SJQ, Cardoso GL, Guerreiro JF: Duffy blood group genotypes among African-Brazilian communities of the Amazon region. Genet Mol Res. 2007,6:166-72.

Petersen E, Högh B, Perlmann H, Kabilan L, Troye-Blomberg M, Marbiah NT, Hanson AP, Björkman A, Perlman P. An epidemiological study of humoral and cell-mediated immune response to the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155/RESA in adult Liberians. Am J Trop Med Hyg. 1989;41:386-94.

Pleass RJ, Woof JM. Fc receptors and immunity to parasites. Trends Parasitol. 2001;17:545-51.

Porto M, Ferreira, MU, Camargo LMA, Premawansa S, del Portillo HA. Second form in a segment of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax* among isolates from Rondônia (Brazil). Mol Biochem Parasitol. 1992;54:121-4.

Polley SD, Tetteh KK, Cavanagh DR, Pearce RJ, Lloyd JM, Bojang KA, Okenu DM, Greenwood BM, McBride JS, Conway DJ. Repeat sequences in block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are targets of antibodies associated with protection from malaria. Infect Immun. 2003;71:1833–42.

Praba-Egge AD, Montenegro S, Arevalo-Herrera M, Hopper T, Herrera S, James MA. Human cytokine responses to meso-endemic malaria on the Pacific Coast of Colombia. Ann Trop Med Parasitol. 2003;97:327-37.

Premawansa S, Snewin VA, Khouri E, Mendis KN, David PH. *Plasmodium vivax*:recombination between potential allelic types of the merozoite surface protein MSP1 in parasites isolated from patients. Exp Parasitol. 1993;76:192-9.

Putaporntip C, Jongwutiwes S, Tanabe K, Thaithong S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (MSP-1) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. Mol Biochem Parasitol. 1997;84:49-56.

Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU, Kho WG, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, Tanabe K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. Proc Natl Acad Sci. 2002;99:16348-53.

Quakyi IA, Currier J, Fell A, Taylor DW, Roberts T, Houghten RA, England RD, Berzofsky JA, Miller LH, Good MF. A conserved subdominant T-cell epitope on a malaria merozoite surface protein that induces parasiticidal T cells. J Immunol. 1994;153:2082-92.

Quin SJ, Seixas EM, Cross CA, Berg M, Lindo V, Stockinger B, Langhorne J. Low CD4(+) T cell responses to the C-terminal region of the malaria merozoite surface protein-1 may be attributed to processing within distinct MHC class II pathways. Eur J Immunol. 2001;31:72-81.

Ribeiro JM, Seulu F, Abose T, Kidane G, Teklehaimanot A. Temporal and spatial distribution of anopheline mosquitos in an Ethiopian village: implications for malaria control strategies. Bull World Health Organ. 1996;74:299-305.

Riesco A, Meini M, de la Torre M, Huaman H, Reyes C, Garcia M. Analisis exploratorio de los sistemas de fundo de pequenos productores en la Amazonia, region de Pucallpa. Lima: Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA)-Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID); 1982. 47 p.

Riley EM, Allen SJ, Troye-Blomberg M, Bennett S, Perlmann H, Andersson G, Smedman L, Perlmann P, Greenwood BM. Association between immune recognition of the malaria vaccine candidate antigen Pf155/RESA and resistance to clinical disease: a prospective study in a malaria-endemic region of West Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991;85:436-43.

Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG, Blackman MJ, Bennett S, Takacs B, Schönfeld H-J, Holder AA, Greenwood BM. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. Parasite Immunol. 1992;14:321-37.

Riley EM, Morris-Jones S, Blackman MJ, Greenwood BM, Holder AA. A longitudinal study of naturally acquired cellular and humoral immune responses to a merozoite surface protein (MSP1) of *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal malaria transmission. Parasite Immunol. 1993;15:513–24.

Rodrigues MHC, Cunha MG, Machado RLD, Ferreira-Jr OC, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. Malar J. 2003;2:39.

Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, Calderon M, Lescano AG, Montenegro SH, Calampa C, Vinetz JM. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. Am J Trop Med Hyg. 2003;69:45-52.

Sá DR, Souza-Santos R, Escobar AL, Coimbra CE Jr. Malaria epidemiology in the Pakaanóva (Wari') Indians, Brazilian Amazon. Bull Soc Pathol Exot. 2005;98:28-32.

Sanchez, PA. Science in agroforestry. Agrofor Syst. 1995;30:5–55.

Sant'Anna HM, Sant'Anna R, Sassagawa HSY. Alerta sobre o avanço do antropismo na Amazônia: Projeto de Colonização (PC) – Peixoto. In: X Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto; Foz do Iguaçu, Brasil. 2001. Resumos, São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais; 2001. p. 655-8.

Santos-Ciminera PD, Roberts DR, Alecrim MG, Costa MR, Quinnan GV Jr. Malaria diagnosis and hospitalization trends, Brazil. Emerg Inf Dis. 2007;13:1597-600.

Secretaria de Vigilância da Saúde, Ministério da Saúde. Malária (todas as formas) - Lâminas positivas por unidade federada, Brasil (1980-2005) [documento eletrônico]. Brasília: Secretaria de Vigilância da Saúde, Ministério da Saúde; 2006. Disponível em: http://dw.saude.gov.br [2008 ago 25].

Secretaria de Vigilância da Saúde, Ministério da Saúde. Índice Parasitário Anual [mapa eletrônico baseado no Sivep-Malária e Sinan]. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde; 2007. Disponível em : http: //dw.saude.gov.br [2008 ago 25].

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. SIVEP-Malária, Resumo Epidemiológico por local de notificação-Nacional [banco de dados eletrônico]. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde; 2008. Disponível em : http: //dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep-malaria [2008 ago 25].

Scopel KG, Fontes CJF, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic área (Apiacás, Mato Grosso state) as detected by polymerase chain reaction. Acta Trop. 2004;90:6-14.

Scopel KK, Fontes CJ, Ferreira MU, Braga EM. Factors associated with immunoglobulin G subclass polarization in naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins: a cross-sectional survey in Brazilian Amazonia. Clin Vaccine Immunol. 2006;13:810-3.

Sharma SK, Tyagi PK, Padhan K, Upadhyay AK, Haque MA, Nanda N, Joshi H, Biswas S, Adak T, Das BS, Chauhan VS, Chitnis CE, Subbarao SK. Epidemiology of malaria transmission in forest and plain ecotype villages in Sundargarh District, Orissa, India. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006;100:917-25.

Shi YP, Nahlen BL, Kariuki S, Urdahl KB, McElroy PD, Roberts JM, Lal AA. Fcγ receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with protection of in fants against high-density *Plasmodium falciparum* infection. VII. Asembo Bay Cohort Project. J Infect Dis. 2001; 184:107-11.

Sierra AY, Barrero CA, Rodriguez R, Silva Y, Moncada C, Vanegas M, Patarroyo MA. Splenectomised and spleen intact Aotus monkeys' immune response to *Plasmodium vivax* MSP-1 protein fragments and their high activity binding peptides. Vaccine. 2003; 21:4133–44.

Sinha S, Mishra SK, Sharma S, Patibandla PK, Mallick PK, Sharma SK, Mohanty S, Pati SS, Mishra SK, Ramteke BK, Bhatt R, Joshi H, Dash AP, Ahuja RC, Awasthi S; Indian Genome Variation Consortium, Venkatesh V, Habib S. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcgammaRIIa correlate with the severity of *falciparum* malaria in the ethnically diverse Indian population. Malar J. 2008;7:13.

Sintasath DM, Ghebremeskel T, Lynch M, Kleinau E, Bretas G, Shililu J, Brantly E, Graves PM, Beier JC. Malaria prevalence and associated risk factors in Eritrea. Am J Trop Med Hyg. 2005;72:682-7.

Singer BH, Castro MC. Agricultural colonization and malaria on the Amazon frontier. Ann N Y Acad Sci. 2001;954:184-222.

Smith T, Killeen G, Lengeler C, Tanner M. Relationships between the outcome of *Plasmodium falciparum* infection and the intensity of transmission in Africa. Am J Trop Med Hyg. 2004;71:80-6.

Soares IS, Levitus G, Souza JM, del Portillo HA, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. Infect Immun. 1997;65:1606-14.

Soares IS, Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. Am J Trop Med Hyg. 1999a;60:357-63.

Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N and C-terminal regions of hte *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of P.*vivax* malaria in the north of Brazil. Acta Trop. 1999b;72:13-24.

Souza Jr. C, Barreto P. An alternative approach for detecting and monitoring selectively logged forests in the Amazon. Int J Remote Sens. 2000;21:173-9.

Souza TN, Cerávolo IP, Fontes CJF, Couto A, Carvalho LH, Brito CFA. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. Mol Biochem Parasitol. 2006;146:251-4.

Spencer HC, Miller LH, Collins WE, Knud-Hansen C, McGinnis MH, Shiroishi T et al. The Duffy blood group and resistance to *Plasmodium vivax* in Honduras. Am J Trop Med Hyg 1978;27:664-70.

Spindel R, Baruzzi RG, Souza VA, Ferreira AW, Avila SL. Measles vaccine coverage and immune response in children of Caiabi and Metuktire Indian tribes living in malarial endemic área: Parque Indígena do Xingu, Central Brazil. Trop Doct. 2001;31:142-4.

Ssewanyana I, Pietras C, Baker CA, Nghania F, Jones NG, Rosenthal PJ, Dorsey G, Cao H. Pattern of malaria-specific T-cell responses in a cohort of Ugandan children. J Trop Ped. 2008;54:6-13.

Stinardel HA, Al-Yaman F, Genton B, Alpers MP, Smith TA. Assessment of different sources of variation in the antibody responses to specific malaria antigens in children in Papua New Guinea. Int J Epidemiol 2000;29:579-86.

Suárez-Mutiz MC, Cuervo P, Leoratti FMS, Moraes-Ávila SL, Ferreira AW, Fernandes O, Coura JR. Cross-sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. Rev Inst Med trop S Paulo. 2007;49:159-64.

Sunahara T, Ishizaka K, Mogi M. Habitat size: a factor determining the opportunity for encounters between mosquito larvae and aquatic predators. J Vector Ecol. 2002;27:8-20.

Tada MS, Marques RP, Mesquita E, Dalla Martha RC, Rodrigues JA, Costa JDN, Pepelascov RR, Katsuragawa TH, Pereira-da-Silva LH. Urban malaria in the Brazilian Western Amazon region. I. High prevalence of asymptomatic carriers in an urban riverside district is associated with a high level of clinical malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:263-9.

Tadei WP, Thatcher BD, Santos JMH, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1998;59:325-35.

Tauil PL. Avaliação de uma nova estratégia de controle da malária na Amazônia Brasileira [tese (Doutorado em Medicina Tropical)]. Brasília: Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília; 2002.

Tebo AE, Kremsner PG, Luty JF. Fcγ receptor-mediated phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes *in vitro.* Exp Parasitol. 2002;130:300-6.

Thomson MC, Mason SJ, Phindela T, Connor SJ. Use of rainfall and sea surface temperature monitoring for malaria early warning in Botswana. Am J Trop Med Hyg. 2005;73:214-21.

Tian JH, Good MF, Hirunpetcharat C, Kumar S, Ling IT, Jackson D, Cooper J, Lukszo J, Coligan J, Ahlers J, Saul A, Berzofsky JA, Holder AA, Miller LH, Kaslow DC. Definition of T cell epitopes within the 19 kDa carboxylterminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 1 (MSP1(19)) and their role in immunity to malaria. Parasite Immunol. 1998; 20:263-78.

Toure-Balde A, Sarthou JL, Aribot G, Michel P, Trape JF, Rogier C, Roussilhon C. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. Infect Immun. 1996; 64:744-50.

Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, Legros F, Badji A, Ndiaye G, Ndiaye P, Brahimi K, Faye O, Druilhe P, Pereira da Silva. The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. Am J Trop Med Hyg. 1994;51:123-37.

Troye-Blomberg M, Riley EM, Perlmann H, Andersson G, Larsson A, Snow RW, Allen SJ, Houghten RA, Olerup O, Greenwood BM, et al. T and B cell responses of *Plasmodium falciparum* malaria-immune individuals to synthetic peptides corresponding to sequences in different regions of the P. *falciparum* antigen Pf155/RESA. J Immunol. 1989; 143:3043-8.

Troye-Blomberg M, Berzins K, Perlmann P. T-cell control of immunity to the asexual blood stages of the malaria parasite. Crit Rev Immunol. 1994;14:131-55.

Trape JF. Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985;79:181-4.

Udhayakumar V, Kariuki S, Kolczack M, Girma M, Roberts JM, Oloo AJ, Nahlen BL, Lal AA. Longitudinal study of natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VII. Am J Trop Med Hyg. 2001;65:100-7.

Uthaipibull C, Aufiero B, Syed SE, Hansen B, Guevara Patino JA, Angov E, Ling IT, Fegeding K, Morgan WD, Ockenhouse C, Birdsall B, Feeney J, Lyon JA, Holder AA. Inhibitory and blocking monoclonal antibody epitopes on merozoite surface protein 1 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum.* J Mol Biol. 2001;307:1381–94.

Vasconcelos CH, Novo EMLM, Donalisio MR. Uso do sensoriamento remoto para estudar a influência de alterações ambientais na distribuição da malária na Amazônia brasileira. Cad Saude Publica. 2006;22:517-26.

Vittor AY, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Lozano WS, Pinedo-Cancino V, Patz JA. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of f*alciparum* malaria in the Peruvian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2006;74:3-11.

Wang L, Richie TL, Stowers A, Nhan DH, Coppel RL. Naturally acquired antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 4 in a population living in an area of endemicity in Vietnam. Infect Immun. 2001; 69:4390-7.

Warrell DA. (1993). Clinical features of malaria. In: Gilles HM, Warrell DA. Bruce-Chwatt's essential malariology. London: Arnold; 1993. p. 35-49.

Washburn JO. Regulatory factors affecting larval mosquito populations in container and pool habitats: implications for biological control. J Am Mosq Control Assoc. 1995;11:279-83.

Waterfall M, Black A, Riley E. Gammadelta+ T cells preferentially respond to live rather than killed malaria parasites. Infect Immun. 1998;66:2393–8.

Welch SG, McGregor IA, Williams K. The Duffy blood group and malaria prevalence in Gambian West Africans. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1977;71: 295-6.

Wipasa J, Xu H, Stowers A, Good MF. Apoptotic deletion of Th cells specific for the 19-kDa carboxyl-terminal fragment of merozoite surface protein 1 during malaria infection. J Immunol. 2001;167:3903-9.

World Health Organization. Expert Committee on Malaria: 20th Report. Geneva: World Health Organization, 2000a. Disponível em: http://www.rbm.who.int/docs/ecr20.pdf [2008 jun 26].

World Health Organization. Severe *falciparum* malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000b; 94 Suppl 1:S1-S90.

Wykes MN, Zhou YH, Liu XQ, Good MF. *Plasmodium yoelii* can ablate vaccine-induced long-term protection in mice. J Immunol. 2005;175:2510-6.

Yang C, Collins WE, Sullivan JS, Kaslow DC, Xiao L, Lal AA. Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in *Saimiri* monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. Infect Immun. 1999;67:342–9.

Zevering Y, Houghten RA, Frazer IH, Good MF. Major population differences in T cell response to malaria vaccine candidate. Int Immunol.1990;2:945-55.

Zevering Y, Amante F, Smillic A, Currier J, Smimth G, Houghten RA, Good MF. High frequency of malaria-specific T cells in non-exposed humans. Eur J Immunol. 1992;22:689-96.

Zevering Y, Khamboonruang C, Rungruengthanakit K, Tungviboonchai L, Ruengpipattanapan J, Bathurst I, Barr P, Good MF. Life-spans of human T-cell responses to determinants from the circumsporozoite proteins of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91:6118–22.

Zeyrek FY, Babaoglu A, Demirel S, Erdogan DD, Ak M, Korkmaz M, Coban C. Analysis of naturally acquired antibody responses to the 19-kd C-terminal region of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* from individuals in Sanliurfa, Turkey. Am J Trop Med Hyg. 2008;78:729-32.

Zhou G, Munga S, Minakawa N, Ghiteko A, Yan G. Spatial relationship between adult malaria vector abundance and environmental factors in western Kenya highlands. Am J Trop Med Hyg. 2007;77:29-35.

Zimmerman PA, Woodley I, Masinde GL, Miller SM, McNamara DT, Hazlett F, Mgone CS, Alpers MP, Genton B, Boatin BA, Kazura JW. Emergence of FY*A(null) in a *Plasmodium vivax* endemic region of Papua New Guinea. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96:13973-7.

Win TT, Lin K, Mizuno S, Zou M, Liu Q, Ferreira MU, Tantular IS, Kojima S, Ishii A, Kawamoto F. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. Trop Med Int Health. 2002;7:231-9.

ANEXO A - CARACTERÍSTICAS DA MALÁRIA NA POPULAÇÃO ESTUDADA

Este anexo contém um artigo e um texto suplementar. A referência do artigo é:

Silva-Nunes M, Malafronte Rdos S, Luz Bde A, Souza EA, Martins LC, Rodrigues SG, Chiang JO, Vasconcelos PF, Muniz PT, Ferreira MU. The Acre Project: the epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. Cad Saude Publica. 2006; 22:1325-34.

O artigo, publicado em 2006, descreve os resultados obtidos no primeiro estudo transversal sobre a composição da coorte, bem como dados sobre malária pregressa e de malária incidente na linha de base, correspondendo ao Objetivo 1. Esta é a primeira publicação originada da tese, tendo ocorrido em 2006, meses após o início do trabalho de campo; por causa disso contém dados somente da linha de base. O texto suplementar que se segue ao artigo descreve características epidemiológicas da coorte completa (466 indivíduos ingressantes no primeiro e 43 no segundo estudo transversal).

O artigo também descreve resultados da linha de base sobre arboviroses na coorte; as arboviroses são comuns na região amazônica e entram no diagnóstico diferencial da malária, uma vez que o quadro clínico pode ser bastante semelhante ao da infecção pelo *Plasmodium*. Dentro deste contexto, a parte referente às arboviroses será mencionada somente como informação suplementar sobre patologias concomitantes na população de estudo.

Como primeira autora da publicação, participei do planejamento e execução do estudo de campo, coleta e análise dos dados e participação na redação do manuscrito.

The Acre Project: the epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population

Projeto Acre: epidemiologia da malária e das arboviroses em uma população rural amazônica

Mônica da Silva-Nunes [1,2]
Rosely dos Santos Malafronte [2,3]
Bruna de Almeida Luz [1]
Estéfano Alves de Souza [1]
Lívia Carício Martins [4]
Sueli Guerreiro Rodrigues [4]
Jannifer Oliveira Chiang [4]
Pedro Fernando da Costa Vasconcelos [4]
Pascoal Torres Muniz [2,5]
Marcelo Urbano Ferreira [1,2]

[1] *Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.*
[2] *Centro de Saúde de Acrelândia, Acrelândia, Brasil.*
[3] *Laboratório de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, Brasil.*
[4] *Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Instituto Evandro Chagas, Belém, Brasil.*
[5] *Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Brasil.*

Correspondence
M. U. Ferreira
Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes 1374, São Paulo, SP 05508-900, Brasil.
muferrei@usp.br

Abstract

The authors describe the baseline malaria prevalence and arbovirus seroprevalence among 467 subjects in an ongoing cohort study in rural Amazonia. Most subjects (72.2%) reported one or more previous episodes of malaria, and 15.6% had been hospitalized for malaria, but only 3.6% of individuals five years or older had malaria parasites detected by microscopy (10 with Plasmodium vivax *and 4 with* P. falciparum*). Antibodies to* Alphavirus, Orthobunyavirus, *and/or* Flavivirus *were detected by hemagglutination inhibition (HI) in 42.6% of subjects aged five years or older, with a higher seropositivity rate among males (49.2%) than females (36.2%). Since 98.9% of subjects had been immunized for yellow fever, the presence of cross-reactive antibodies to dengue and other* Flaviviruses *cannot be ruled out, but at least 12 subjects (3.3%) with IgM antibodies to dengue virus detected by ELISA had a putative recent exposure to this virus.*

Malaria; Dengue; Arboviruses; Arbovirus Infections; Amazonian Ecosystem

Introduction

Since early 2003, the county (municipality) of Acrelândia in the easternmost area of the State of Acre, Brazil, has been the site of a collaborative research project involving the Universidade Federal do Acre (Federal University of Acre – UFAC), the Instituto Evandro Chagas (Evandro Chagas Institute – IEC), and the Universidade de São Paulo (University of São Paulo – USP), aimed at investigating the population's health conditions and proposing possible targets for public health interventions. Acrelândia is located in an area with high malaria transmission, with an annual parasite index (number of malaria cases per year per thousand inhabitants) of 104.3 in 2002 [1]. It is also one of the priority counties in the Amazon Basin for dengue control activities [2]. The follow-up of a cohort of 467 individuals began in March 2004 (including all age brackets) in an agricultural settlement in rural Acrelândia. The principal objective of this prospective study is to identify risk and protective factors associated with acute febrile diseases, particularly malaria and arbovirus infections. The current article describes the baseline malaria prevalence and arbovirus seroprevalence in March-April 2004.

Methodology

Study area and population

Acrelândia, a county (municipality) founded in January 1993 through repartitioning of the counties of Plácido de Castro and Senador Guiomard, has a population of 8,697 (estimated for 2003 by the IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, or National Census Bureau, 2000 Census; unpublished data). The county has a territory of 1,607.5km² and is located between the Abunã and Iquiri Rivers (the latter also known as the Ituxi) in the Acre River Valley (Figure 1). The estimated human development index (HDI) in 2000 for the total population was 0.680 [3], with an infant mortality rate of 70.75 per thousand live births (IBGE estimate for 1998; unpublished data). The overall illiteracy rate is 26.7%, reaching 31.9% in the rural area [3], which includes 57% of the population. Acrelândia is located 112km east of Rio Branco, capital of the State of Acre, and borders on the counties of Senador Guiomard and Plácido de Castro in Acre as well as the Brazilian States of Amazonas and Rondônia and the country Bolivia (Figure 1).

The study area encompasses rural localities known as Linha 14 Gleba Q and Reserva da Linha 14 (9º41'-9º49'S, 67º05'-67º07'W), demarcated by the Coordinating Body for the Control of Endemics under the Acre State Secretariat of Health and Sanitation (SESACRE). Linha 14 Gleba Q includes both sides of the last 16 kilometers of Linha 14, an unpaved road that begins at the highway connecting Rio Branco to Porto Velho (BR-364); Reserva da Linha 14 includes the edges of an unpaved road that begins at the end (km 30) of Linha 14 and is perpendicular to it, running parallel to the Iquiri River. In this article, these sites will be referred to collectively as Ramal do Granada, the name used by the local population to refer to Linha 14.

Ramal do Granada is located in the largest farming settlement in the State of Acre, the Pedro Peixoto Organized Agricultural Settlement (Figure 1), implemented by the National Institute for Colonization and Agrarian Reform in the mid-1970s. The main economic activities are coffee and banana growing and beef and dairy cattle-raising. There are three malaria diagnostic outposts maintained by the SESSACRE at kilometers 16, 24, and 30 of Ramal do Granada; the largest, at km 16, also has nursing technicians trained in primary health care.

During the census conducted by our fieldwork team, all buildings (both inhabited and uninhabited) in the study area were located (with the aid of maps provided by the local teams from the Coordinating Body for the Control of Endemics under SESACRE) and visited by our team. The household census identified 473 inhabitants (226 males, 247 females), ranging in age from one day to 90 years (mean 23.5 years), distributed in 114 households. All members of these households were considered eligible for entry into our cohort and were invited to participate in the study.

Field study

During the cross-sectional survey from March 16 to April 29, 2004, all households in the study area were visited by the field team (two physicians, a biologist, and a research assistant). The project objectives were explained to each family in order to obtain written informed consent. The following procedures were also performed: (a) application of an extensive questionnaire to obtain demographic, socioeconomic, and prior disease history data and a detailed description of the households, (b) clinical examination of all household members by a field team physician, (c) collection of venous blood samples from all household members aged five years or older, and (d) determination of the household's exact location using portable navigation equipment (eTrex®, Garmin International, Olathe, USA), with an accuracy of 15 meters. Data obtained during this cross-sectional survey provide the baseline for the prospective cohort, maintained since then under clinical and epidemiological surveillance for acute febrile diseases.

Microscopic diagnosis of malaria

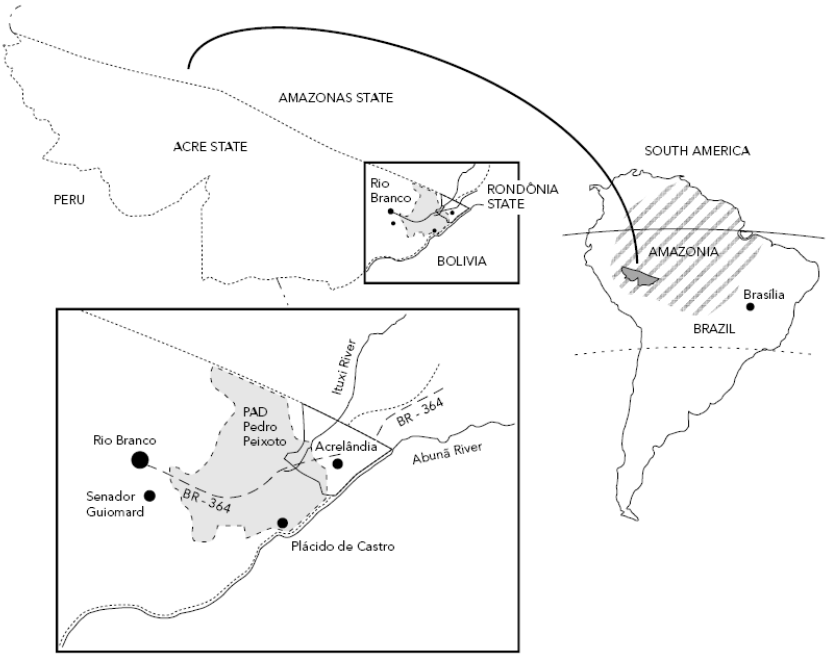
Microscopic diagnosis of malaria used thick blood smears stained with Giemsa according to the Walker technique and thin smears fixed with methanol and stained with Giemsa [4]. At least 200 high-magnification (700x) microscopic fields were examined by two experienced microscopy technicians before defining the result for each slide [5]. Individuals with a malaria diagnosis received free medication provided by the SESACRE based on Ministry of Health treatment protocols [4]. The drugs used were: (a) chloroquine and primaquine for *Plasmodium vivax* and (b) mefloquine or a quinine-doxycycline combination (in addition to primaquine in cases with patent gametocytemia) for *P. falciparum*.

Investigation of arbovirus antibodies

All serological assays were performed at the Division of Arbovirology and Hemorrhagic Fevers

Figure 1

Location of the County (Municipality) of Acrelândia, Acre State, Brazil, and the Pedro Peixoto Organized Settlement Project where the study area is located.



at IEC in Belém, Pará. Serum samples were obtained by centrifuging the venous blood in the field laboratory and storing at -20ºC in dry ice until shipping by airplane to Belém. The samples were initially submitted to microplate hemagglutination inhibition (HI) [6] against standardized antigens from 19 types of arbovirus, including four from genus *Alphavirus* (Eastern equine encephalomyelitis [EEE], Western equine encephalomyelitis [WEE], Mayaro, and Mucambo), nine from genus *Flavivirus* (two samples of yellow fever virus [wild and vaccinal], Ilhéus, São Luís, Rocio, dengue [DEN] 1, DEN-2, DEN-3, and DEN-4), and six from genus *Orthobunyavirus* (Caraparu, Catu, Guaroa, Maguari, Oropouche, and Tacaiuma). Positive sera according to HI (titer ≥ 1:20) against the Mayaro virus were submitted to a confirmatory enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgM antibodies [7]. Regardless of the HI results, the serum samples were also tested by ELISA for IgM antibodies to the dengue and yellow fever viruses.

Statistical analysis

Two or more proportions were compared using the χ^2 or linear trend χ^2 tests. Odds ratios and respective 95% confidence intervals (95%CI) were calculated for the target associations using 2x2 tables. The 95% confidence intervals were obtained for proportions. These analyses used the open-access software Epidat (http://www.paho.org/spanish/sha/epidat.htm; Pan-American Health Organization).

Median exposure time until the first episode of malaria and median age at the first episode, along with their respective 95%CI, were estimated by weighted linear regression models, commonly applied to dose-response type situations in which the proportions of responses

are transformed into probits [8]. In this analysis the sample population was stratified by age or time of residence in Amazonia, and an exposure "dose" was attributed to each stratum, corresponding to mean age or time of residence in Amazonia, in years. The "doses" were log-transformed to adjust the probit models. In the probit model, the proportion of individuals in each stratum who reported at least one prior episode of malaria corresponds to the proportion of "responses". The same analytical procedure was applied separately to the proportion of individuals who reported at least one prior episode of *P. falciparum* and *P. vivax* malaria. Calculations used a program written in BASIC [8]. The study adopted a 5% significance level.

Ethical aspects

The research protocol was analyzed and approved by the Research Ethics Committee for Experimentation in Human Beings at the Institute of Biomedical Sciences, USP (reviews 318/ CEP, July 19, 2002, and 538/ CEP, January 7, 2004).

Results

Malaria: prior exposure and prevalence of current infection

The study participants included 98.7% of the 473 eligible individuals identified during the household census; four males and two females refused to participate or were not found in the residences after at least three attempts. The sample population consisted of 467 individuals ranging in age from 1 day to 90 years (mean, 23.3 years) distributed in 113 households, with 42.4% under 15 years of age. The slight predominance of males in the sample population (1.08 males for every female) is similar to that of the overall population in Acrelândia (1.15:1), according to estimates by the IBGE for 2003 (unpublished data). Table 1 shows the sample population distribution by gender and age bracket.

The impact of malaria as a cause of prior morbidity in the sample population can be inferred from the data, obtained through individual interviews and shown in Tables 2 and 3. The vast majority (72.2%) reported at least one previous episode of malaria diagnosed by microscopy and treated (mean of 9 episodes, among the 337 who reported prior malaria), and 73 (15.6%) of these reported at least one hospitalization due to malaria. As shown in Tables 2 and 3, the proportions of individuals with a history at least one episode of malaria correlates positively with age (linear trend χ^2 = 72.70, 1 degree of freedom, $p < 0.00001$) and time of residence in Amazonia (linear trend χ^2 = 88.64, 1 degree of freedom, $p < 0.00001$).

Based on probit models adjusted to the data presented in Table 3, median residence time in Amazonia since the first episode of malaria was estimated at 3.3 years (95%CI: 1.9-4.7 years). In other words, after living 39 months in Amazonia, half of the sample population had already experienced at least one symptomatic malaria infection, confirmed by microscopy and treated. Probit models were also adjusted to the proportions of those reporting at least one episode of malaria attributed to *P. falciparum* and *P. vivax*, resulting in median residence times in Amazonia of 11.9 years (95%CI: 8.3-17.5 years) and 4.8 years (95%CI: 1.8-7.9 years), respectively, for the first documented episode of malaria attributed to each *Plasmodium* species.

The probit model adjusted to data in Table 2 estimated a median age of 4.8 years (95%CI: 3.2-6.4 years) for individuals presenting their first episode of malaria. The probit models were also applied separately to data on history of *P. falciparum* and *P. vivax* infection, resulting in medians of 20.2 years of age (95%CI: 16.2-25.4 years) and 6.4 years (95%CI: 3.7-9.1 years), respectively, at the time of primary infection by these *Plasmodium* species.

Of the 399 individuals five years of age or older, eligible for drawing venous blood samples, 387 (97.0%; mean age 27.4 years) had at least one thick and thin blood smears analyzed by microscopy for malaria diagnosis. Additional capillary blood samples were drawn by finger prick, at the request of the parents or guardians, in 23 children under five years of age, totaling 410 samples submitted to microscopic examination. Of these, 16 were positive for *P. vivax* and four for *P. falciparum* (4.9% positivity rate among the samples analyzed), with no case of co-infection by the two species. No individual with infection diagnosed during the cross-sectional survey, through active search, was classified as asymptomatic. However, three presented no signs or symptoms of malaria at the moment of blood sampling: (a) one adult who presented symptoms during the two weeks following the home visit and appeared at the SESACRE malaria diagnostic outpost for laboratory confirmation; (b) one child who had gone for medical care during the two weeks prior to the home visit due to an ill-defined fever; and (c) a pregnant woman on chloroquine chemoprophylaxis at the time of blood

Table 1

Sample population distribution (n = 467) by gender and age bracket. Ramal do Granada, Acre State, Brazil, 2004.

Age bracket (years)	Female		Male		Total	
	n	%	n	%	n	%
< 1	5	2.2	6	2.5	11	2.4
1-4	27	12.1	30	12.3	57	12.2
5-14	67	29.9	63	25.9	130	27.8
15-30	63	28.1	58	23.9	121	25.9
31-60	53	53.7	71	29.2	124	26.6
> 60	9	4.0	15	6.2	24	5.1
Total	224	100.0	243	100.0	467	100.0

The percentages in each column refer to the proportions of individuals from each gender in each age bracket.

Table 2

Proportions of sample population (n = 467) by age bracket with a history of one or more episodes of malaria. Ramal do Granada, Acre State, Brazil, 2004.

Age bracket (years)	*Plasmodium vivax*		*Plasmodium falciparum*		Either species	
	n	%	n	%	n	%
< 1	1	9.1	0	0.0	1	9.1
1-4	20	35.1	6	10.5	21	36.8
5-14	79	60.8	45	34.6	84	64.6
15-30	82	67.8	67	55.4	102	84.3
31-60	93	75.0	79	63.7	107	86.3
> 60	19	79.2	17	70.8	22	91.7
Total	294	63.0	214	45.8	337	72.2

The percentages in each line refer to the proportion of each age bracket reporting at least one prior episode of malaria diagnosed by microscopy and treated. The numbers of individuals in each age bracket are shown in Table 1.

Table 3

Proportions of sample population (n = 467) according to time of residence in Amazonia, with a history of at least one prior episode of malaria. Ramal do Granada, Acre State, Brazil, 2004.

Time of residence in Amazonia (years)	*Plasmodium vivax*		*Plasmodium falciparum*		Either species	
	n	%	n	%	n	%
< 5 [n = 89]	30	33.7	12	13.5	32	36.0
5-9 [n = 106]	64	60.4	39	36.8	70	66.0
10-19 [n = 175]	126	72.0	93	53.1	143	81.7
20 + [n = 97]	74	76.3	70	72.2	92	94.8
Total [n = 467]	294	63.0	214	45.8	337	72.2

The percentages on each line refer to the proportion of individuals in each stratum reporting at least one prior episode of malaria diagnosed by microscopy and treated.

sampling and who turned symptomatic as soon as prophylaxis was suspended.

Among the 387 individuals five years of age or older who had blood samples taken and examined, 14 (3.6%; 95%CI: 1.6-5.6%) were positive on microscopic examination; ten had *P. vivax* infection and four had *P. falciparum*. Since this age group was sampled systematically (regardless of symptoms), this positivity rate is considered a more adequate estimate of malaria prevalence in the sample population. No statistically significant difference was observed ($p = 0.55$, χ^2 with Yates correction) in overall malaria prevalence between males (4.4%; 95%CI: 1.3-7.5%) and females (2.8%; 95%CI: 0.9-5.4%).

Prevalence of arbovirus antibodies

Of the 399 individuals aged five years of age and older and eligible for venous blood sampling, 357 (89.5%; mean age, 27.5 years) were tested for antibodies to the various types of arbovirus using HI, and 358 (89.7%; mean age 27.5 years) were tested for IgM antibodies to dengue and yellow fever using ELISA. Of these, 15 individuals with antibodies to the Mayaro virus, detected by HI, were tested by ELISA for IgM antibodies to this virus.

A total of 152 samples (42.6%; 95%CI: 37.4-47.9%) were positive according to HI. Of these, 20 (5.6%) presented monotypical reactions (i.e., antibodies to a single type of virus from this genus) to *Alphavirus*, 15 (4.2%) had antibodies to *Orthobunyavirus* (of which 11 were monotypical and four heterotypical), and 65 (18.2%), all of which heterotypical, to *Flavivirus* (including the four dengue serotypes and the wild yellow fever virus). A statistically significant difference was observed ($p = 0.02$, χ^2 test with Yates correction) in the overall prevalence of antibodies to arboviruses comparing males (49.2%; 95%CI: 41.4-56.4%) and females (36.2%; 95%CI: 29.2-43.7%), with an odds ratio of 1.69 for males (95%CI: 1.08-2.64). Table 4 shows the gender and age distribution of individuals with antibodies to one or more of the 19 arboviruses tested; the overall arbovirus seroprevalence, estimated by HI, showed a positive correlation to age (linear trend $\chi^2 = 24.62$, 1 degree of freedom, $p < 0.00001$).

Table 5 shows the number and proportion of individuals with antibodies detected by HI to each type of *Alphavirus* and *Orthobunyavirus* tested. Of these viruses, based on seroprevalance, Mayaro is the only one that appears to circulate widely in the study area. Half of the 18 seropositive individuals from 11 to 49 years of age were natives of the State of Acre and two others had only resided previously in other States belonging to the Legal Amazonia (Rondônia and Mato Grosso). The others (ranging from 31 to 52 years of age) were originally from the South and Southeast of Brazil (States of Espírito Santo, Paraná, and Santa Catarina), but had lived between 13 and 28 years in Amazonia. Six of the seropositive individuals work frequently in timber cutting, an activity that involves frequent contact with the forest environment. However, of the 15 individuals with antibodies to the Mayaro virus and submitted to confirmation for detection of IgM antibodies, only one was positive, suggesting recent infection by this virus (i.e., in the three previous years).

Due to probable exposure of the local population to some *Flavivirus* species (dengue and wild and vaccinal yellow fever), the heterotypical reactions observed in the HI assay with the nine *Flavivirus* tested may be due largely to antibody cross-reactions to one or more of these viruses. Although 98.9% of individuals five years or older reported previous yellow fever immunization, only 66 (18.5%) of the 357 assessed with serology had antibodies (detected by HI) to the 17D vaccinal virus. Only four individuals showed IgM antibodies to the yellow fever virus detected by ELISA; in all cases, the history of vaccination may explain the occurrence of these antibodies.

Fourteen individuals (3.9%; 95%CI: 2.2-6.6%), seven males and seven females (from 17 to 79 years), had IgM dengue virus antibodies detected by ELISA. One had a history of yellow fever vaccination 30 days previously; another had IgM antibodies to the yellow fever virus, a situation in which a cross-reaction cannot be ruled out. In the remaining 12 (3.3% of the tested sample), the presence of specific IgM antibodies was interpreted as indicative of recent dengue infection. Of these 12, nine are relatives, and their households are located within a 2km radius in the study area. Two individuals with dengue IgM antibodies reported previous febrile episodes with clinical diagnosis of dengue (but without serological confirmation), 11 months and two years prior to the study, respectively.

Of the 467 interviewees, 11 (2.3%; six males and five females from 10 to 70 years of age) reported some lifetime diagnosis of dengue. In all of these cases the diagnosis was clinical, without laboratory confirmation. Of these individuals, 10 had serum samples tested by HI. All the results were *Flavivirus* antibody-negative, although two individuals (mentioned above) had dengue IgM antibodies detected by ELISA.

Discussion

Beginning in the 1970s, large-scale projects implemented by the National Institute for Colonization and Agrarian Reform (INCRA) attracted migrants from the South and Southeast of Brazil to Amazonia. The projects were of two types, the so-called Organized Settlement Projects (PAD), aimed at farmers with better technical training and financial resources, and the Integrated Colonization Projects (PIC), targeting low-income groups, specifically landless rural workers [9]. The impact of tropical diseases, especially malaria, on recently arrived migrants has been accurately described in Machadinho D'Oeste, Rondônia [10], but there are only limited data on the living and health conditions in settlements that have been consolidated over the course of several decades, and which now include the majority of the population in farming areas in Amazonia. The current article presents data on a sample population from a large-scale agricultural settlement, collected more than two decades after it was originally occupied.

Malaria

Malaria is still one of the main parasitic endemics in Brazil. From 1970 to the mid-1990s, the annual malaria incidence in Brazil increased ten-fold, then leveled off at around 500 thousand cases a year, of which 99% were acquired in Amazonia. However, in 1999 there was a new peak in incidence, reaching a record of 630 thousand reported cases [11]. In 2000, this situation prompted the Plan for Intensification of Malaria Control Activities in the Amazon Region, aimed at a major reduction in the number of cases in Amazonia in the following two years. This plan led to important decreases in malaria incidence in most of the States, with the important exception of Rondônia. The most recent available data are for 2003, with 350 thousand cases [12]. Despite the large drop in malaria incidence since 2001, Acrelândia is still among the counties at greatest risk in the State of Acre [1]. With less than 2% of the State's population, Acrelândia has nearly 20% of its reported malaria cases.

Malaria prevalence (3.6%) in Ramal do Granada in the late rainy season in 2004 is similar to that described in peri-urban (1.6%) [13] and rural populations (0.5-4.2%) [14] in the neighboring State of Rondônia, consisting predominantly of migrants who settled there at least a decade previously. The prevalence is still far lower than in mining areas (17.3-35.0%) [15,16] and isolated riverine communities (16.9%) [17] in Amazonia. However, the use of more sensitive diagnostic methods than conventional microscopy could show a higher proportion of malaria-infected individuals, with or without symptoms [17,18].

The impact of malaria on the study population in terms of prior morbidity can be assessed by the proportion of individuals reporting at least one episode of diagnosed and treated malaria (72.2% of the sample) and at least one hospitalization due to malaria (15.6%). The historical data confirm the trend in recent years,

Table 4

Positive hemagglutination inhibition for one or more arbovirus types, by age bracket. Ramal do Granada, Acre State, Brazil, 2004.

Age bracket (years)	Individuals tested (n)	Positive individuals (n)	Positive individuals (%)
5-14	111	26	23.4
15-30	103	48	46.6
31-60	116	64	55.2
> 60	27	14	51.9
Total	357	152	42.6

The percentages on each line refer to the proportion of individuals in each age bracket with antibodies to one or more types of arbovirus; only individuals five years or older were tested.

Table 5

Number and proportion of individuals with antibodies detected by hemagglutination inhibition to each type of *Alphavirus* and *Orthobunyavirus*. Ramal do Granada, Acre State, Brazil, 2004.

Virus	Positive	
	n	%
Alphavirus		
Eastern equine encephalomyelitis	1	0.3
Western equine encephalomyelitis	0	0.0
Mayaro	18	5.0
Mucambo	1	0.3
Orthobunyavirus		
Caraparu	4	1.1
Catu	3	0.8
Guaroa	5	1.4
Maguari	0	0.0
Oropouche	6	1.7
Tacaiuma	1	0.3

Only individuals five years or older (n = 357) were tested.
The same individual can have antibodies to more than one virus.

in which *P. vivax* predominated over *P. falciparum* in most of the Brazilian Amazonia [11]; more individuals in the current sample reported previous exposure to *P. vivax* as compared to *P. falciparum* (Tables 2 and 3). The mean time between initial exposure to malaria and primary infection in Ramal do Granada is comparable to the estimate for native Amazonian populations; based on different modeling strategies, and the median age at primary infection among natives in two different areas in the Brazilian Amazon during the last decade was estimated at 4 to 6 years [8,19].

Dengue and other arbovirus infections

Epidemiological data on dengue transmission in Brazil come mostly from large cities in the Southeast, Northeast, and more recently the North of the country [20,21,22,23]. The disease has received little epidemiological, clinical, and laboratory research in small cities [24] or rural areas, and no data are available on dengue transmission dynamics and its main determinants in typical Amazonian counties, even though they represent nearly 10% of what are considered priority Brazilian counties under the Ministry of Health's National Dengue Control Program [2]. However, sero-epidemiological studies in Loreto, in the Peruvian Amazon, show equivalent prevalence rates for dengue IgG antibodies in the urban population in Iquitos (66%) and in adjacent forest-dwelling populations (32-67%) [25], indicating intense circulation of the dengue virus in rural areas. In Southeast Asian countries, recent years have witnessed a predominance of hemorrhagic dengue (a disease until recently limited to large cities) in rural populations [26].

Although the re-introduction of the dengue virus into Brazil in 1981 started from Roraima [27], it was only in 1999 that the dengue epidemic spread throughout Amazonia [2,28]. Acre was the last Amazonian State to report autochthonous dengue cases (DEN-1 and DEN-2), with a major increase (40%) in incidence from 2002 and 2003 (FUNASA, unpublished data). The only available data on prevalence of antibodies to the dengue virus and other arboviruses in populations in Acre refer to a sample in the city of Rio Branco [21].

Joint analysis of serological data and individual history suggest that at least 12 individuals in our sample (3.3% of the tested population) had recent exposure to the dengue virus, although it is impossible to determine the precise site of infection (urban versus rural, in Acrelândia versus other counties). The hypothesis of local transmission is suggested by the fact that nine of the 12 individuals with serology compatible with recent dengue virus infection reside in a geographically limited area close to km 16 of Ramal do Granada. *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* have never been found in entomological surveys in the rural area of Acrelândia (SESACRE, unpublished data); however, these surveys were done somewhat haphazardly and were focused primarily on the winged and aquatic forms of malaria vectors, without prioritizing probable breeding sites for *Aedes*. Theoretically, the increasing population density in Ramal do Granada could allow domiciliary infestation with *Ae. aegypti*, a hypothesis whose proof depends on systematic entomological surveys, currently in the planning phase.

In Ramal do Granada, as well as in Rio Branco [21], the prevalence of antibodies to the vaccinal yellow fever virus (17D) was surprisingly low given the frequency of reported previous immunization. For example, in Rio Branco only 30% of individuals reporting prior yellow fever vaccination showed antibodies to the 17D virus [21]. However, we feel that the proportion of the sample population effectively vaccinated against yellow fever is higher than indicated by the serological data. For example, the State Vaccination Campaign in 1999 vaccinated 416,267 individuals, more than 80% of the population of Acre (SESACRE, unpublished data); since then, various vaccination drives have been held in Ramal do Granada, covering individuals who had still not been born or had not arrived in the area or were not eligible for vaccination in 1999. It is important to highlight that hemagglutination inhibition is not the test of choice for evaluating the immunity conferred by the yellow fever vaccine. The best technique for this evaluation is the plaque reduction neutralization test (PRNT), which was not used in this study. In the future it would be important to use PRNT to investigate the immunity induced by the 17D vaccine, whether in Acrelândia or in other counties in the State of Acre.

Current land occupation patterns in the Amazon Basin favor the emergence of various typically rural arbovirus diseases, including those produced by the Oropouche virus, associated with an epidemic in Xapuri, Acre (in 1996) [29] and the Mayaro virus [30]. However, in Rio Branco [21] and Ramal do Granada (Table 5), the prevalence of antibodies to the types of *Alphavirus* and *Orthobunyavirus* that were investigated is far inferior to that usually described in rural populations of Eastern Amazonia [31]. Although Mayaro has never been isolated in in-

dividuals from Acre, it appears to be the only *Alphavirus* circulating with a certain frequency in this State, judging by the available seroprevalence data (Table 5) [21]. This hypothesis is supported by the finding that half of the individuals in our sample with antibodies to the Mayaro virus are native Acreans.

Resumo

*Descrevem-se aqui dados de prevalência de malária e soroprevalência de arboviroses na linha de base de um estudo de coorte, envolvendo 467 indivíduos, atualmente em curso na Amazônia rural. A maioria (72,2%) dos indivíduos relatou um ou mais episódios maláricos prévios, tendo 15,6% deles tido pelo menos uma internação hospitalar motivada pela malária, mas somente 3,6% dos indivíduos com idade igual ou superior a cinco anos tinham plasmódios (*Plasmodium vivax *em dez e* P. falciparum *em quatro) diagnosticados por microscopia. Detectaram-se anticorpos contra* Alphavirus, Orthobunyavirus *e* Flavivirus, *pelo teste de inibição de hemaglutinação, em 42,6% dos indivíduos com idade igual ou superior a cinco anos, com uma taxa de soropositividade maior entre indivíduos do sexo masculino (49,2%) do que os do feminino (36,2%). Como 98,9% dos indivíduos entrevistados tinham sido previamente vacinados contra a febre amarela, a presença de reações cruzadas com o vírus do dengue e outros* Flavivirus *não pode ser descartada, mas a exposição recente ao vírus do dengue foi evidenciada pela detecção de anticorpos IgM por ELISA em 12 indivíduos (3,3%).*

Malária; Dengue; Arbovírus; Infecções por Arbovirus; Ecossistema Amazônico

Contributors

M. da Silva-Nunes, P. F. C. Vasconcelos, and M. U. Ferreira designed the field survey, which was conducted by M. da Silva-Nunes, R. S. Malaffronte, P. T. Muniz, and M. U. Ferreira. L. C. Martins, S. G. Rodrigues, J. O. Chiang, and P. F. C. Vasconcelos performed arbovirus serology, and M. da Silva-Nunes and R. S. Malafronte supervised the malaria microscopy and reviewed all the slides. B. A. Luz and E. A. Souza analyzed the data, under the supervision of M. U. Ferreira. M. da Silva-Nunes, P. F. C. Vasconcelos, and M. U. Ferreira wrote the paper, which was read and approved by all the other authors.

Acknowledgments

The authors wish to thank Sebastião Bocalom Rodrigues, Damaris de Oliveira, and Nésio Mendes de Carvalho (Acrelândia Municipal Government) and Raimundo A. Costa, Manoel Costa and other members of the local malaria control team from the Acre State Secretariat of Health and Sanitation for their excellent logistic support, Adamílson Luís de Souza for his assistance during the fieldwork, and Luís Antônio Vieira Garcia for assisting in the laboratory diagnostic activities. The study received funding from the São Paulo State Research Foundation (FAPESP, grants 03/09719-6 and 04/00373-2), the Brazilian National Research Council (CNPq, grants 504332/2004-0 and 302770/2002-0), and the Department of Science and Technology (DECIT) of the Secretariat for Science, Technology, and Strategic Inputs under the Brazilian Ministry of Health (grant 50.1489/2003-7). M. da Silva-Nunes and B. A. Luz are FAPESP research fellows; E. A. Souza, P. F. C. Vasconcelos, and M. U. Ferreira are CNPq research fellows.

References

1. Costa RA, Leal O, Leal EAS. Evolução da infecção malárica no Município de Acrelândia, Estado do Acre (1999-2002). Rev Soc Bras Med Trop 2004; 37 Suppl I:269.
2. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Programa nacional de controle da dengue. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.
3. Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira, Ministério da Educação. Mapa do analfabetismo no Brasil. Brasília: Ministério da Educação; 2004.
4. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Diagnóstico e tratamento da malária. Brasília: Ministério da Saúde; 1995.
5. Trape J-F. Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985; 79:181-4.

MATERIAL SUPLEMENTAR AO ANEXO A

A.1 Características epidemiológicas da coorte

Variáveis demográficas

Participaram do estudo 98,7% dos 473 indivíduos elegíveis identificados durante o primeiro estudo transversal. Quatro indivíduos do sexo masculino e dois do sexo feminino declinaram da participação. No segundo estudo transversal houve o ingresso de 43 indivíduos que haviam se mudado para a área recentemente e desejaram participar do estudo. A população amostral, portanto, compõe-se de 509 indivíduos com idade entre 1 dia e 90 anos (média= 22,6 anos) distribuídos em 123 famílias; 43,4% deles tinham idade inferior a 15 anos. Houve ligeiro predomínio do sexo masculino (51,9%). A distribuição da população amostral por gênero e faixa etária é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição absoluta (n) e relativa (%) da coorte por sexo e idade.

Estrato de idade	Sexo				Total	
	Feminino		Masculino			
	n	%	n	%	n	%
< 1 ano	16	45,7	19	54,3	35	6,9
1 a 4 anos	25	51,0	24	49,0	49	9,6
5 a 14 anos	72	52,6	65	47,4	137	26,9
15 a 29 anos	69	51,1	66	48,9	135	26,5
≥ 30 anos	63	41,2	90	58,8	153	30,1
Total	245	48,1	264	51,9	509	100,0

A população amostral é majoritariamente composta de migrantes: somente 167 (32,8%) dos indivíduos da amostra nasceram na área que hoje corresponde ao município de Acrelândia, embora 276 (54,2%) sejam naturais da Amazônia Legal. O tempo médio de permanência em Acrelândia é de 8,7 anos, no estado do Acre é de 12,6 anos, e na Amazônia é de 13 anos. Em média, os indivíduos da amostra permaneceram na Amazônia por pouco mais da metade (58,0%) de suas vidas. Entre os indivíduos com idade superior a 14 anos,

somente 27,7% nasceram na Amazônia Legal e 6,7% em Acrelândia. A idade de início de exposição ao *Plasmodium* variou entre 0 e 78 anos, sendo em média de 9 anos. Os estados de origem mais freqüentemente mencionados foram: Espírito Santo, Paraná e Minas Gerais.

Características sócio-econômicas e ambientais

A maior parte das famílias estudadas (84,6%) é proprietária das terras em que vivem, exercendo nelas atividades agrícolas ou de pecuária. Em 65.9% das propriedades havia gado; em 47,2% delas havia produção de leite para consumo da família. A maioria das famílias cultivava frutas (65,9%), verduras (52,8%) e arroz ou milho (56,1%). Além disso, 62,6% das famílias referiram alimentar-se com produtos de caça e pesca, mas somente 6,5% delas tinham algum membro dedicado a atividades extrativistas .

Na maioria dos domicílios havia fogão a gás (87%), geladeira (72,4%), televisor (61,8%), liquidificador (61%), antena parabólica (58,5%), aparelho de som (61,8%), lavadora de roupas (56,9%) e ferro elétrico (52,8%), mas somente 51 famílias (41,5%) tinham um veículo próprio (geralmente uma motocicleta) e 36 (29,3%) tinham móveis de sala estofados. Entre os 288 indivíduos entrevistados com idade igual ou superior a 15 anos, 31 (10,7%) referiam não saber ler nem escrever; outros 4 indivíduos (1,4%) referiam não ter freqüentado escola, mas sabiam ler e escrever, e 87,9% haviam freqüentado a escola e sabiam ler e escrever. O tempo médio de escolaridade entre os indivíduos com idade igual ou superior a 15 anos foi de 5,2 anos, indo de 0 a 12 anos.

Dos 122 domicílios estudados, 114 (93,5%) eram construídos predominantemente de madeira; somente 6 (4,9%) eram de alvenaria e dois (1,6%) eram construídos de outros materiais. Havia em média 4,13 moradores por domicílio e 0,94 morador por cômodo. A maioria dos domicílios (91,9%) tinha paredes com frestas que permitiam a passagem de mosquitos; em nenhum domicílio observaram-se telas nas janelas e somente 2,4% dos domicílios tinham o teto forrado. Embora a maior parte dos domicílios (78 %) fosse servida por rede de energia elétrica, nenhum recebia água tratada. A água utilizada provinha de poço (94,3%), nascentes (3,3%) ou rios (2,4%). A água de beber é, na maioria das vezes, filtrada (54,5%) ou clorada em casa (26,8%), mas 18,7% das famílias referiam consumir água sem nenhum tratamento. O destino mais freqüente do esgoto é uma vala a céu aberto (83,7%) ou

uma fossa séptica (14,6%). O lixo produzido geralmente é queimado (70,7%) ou jogado em área aberta (26%).

A área de estudo pode ser dividida em 4 subáreas, baseado nos ramais que fazem a intersecção com o ramal mestre (Linha 14): km 14 ao km 20; km 20 ao km 24; km 24 ao km 30 e Reserva da Linha 14. A distribuição dos ramais, por sua vez, segue uma ordem cronológica de ocupação da área, sendo que os primeiros 10 km da área são compostos por assentamentos mais antigos, ocupados por famílias com melhor poder aquisitivo do que aquelas localizadas entre os km 24 e a Reserva da Linha 14. Além desse fator sócio-econômico relacionado à posse da terra, a porcentagem de mata residual é maior após o km 24, devido às leis ambientais mais recentes que permitem o desmatamento de apenas 20% do lote para atividades agropecuárias. Cerca de 24,2% dos indivíduos residem entre o km 14 e o km 20; 26,5% residem entre o km 20 e o km 24; 36,1 % residem entre o km 24 e o km 30, e 13,2 % residem na Reserva da Linha 14.

Hábitos pessoais e ocupacionais

Em relação à profissão referida pelos entrevistados com mais de 15 anos de idade, 54,7% eram agricultores, 7,1% eram estudantes e também agricultores, 22% exerciam serviços domésticos, e os demais exerciam algum outro tipo de atividade (professores, motoristas, mecânicos, agentes de saúde, comerciante, farinheiro, auxiliar administrativo e serviços gerais). Quanto aos hábitos individuais referidos, 324 indivíduos (70,4%) nunca usavam mosquiteiro; 68 (14,8%) usavam intermitentemente, e apenas 14,8% usavam diariamente. Setenta e cinco indivíduos (19,4%) faziam uso de algum tipo de remédio caseiro para malária, sendo os mais freqüentes: chá de folha de laranjeira, chá de casca de quina-quina e chá de casca de copaíba. Cerca de 33% dos entrevistados tinham como hábito pescar ou dormir na beira de rios da região; 11,1% referiram ter trabalhado em atividades de derrubada de floresta na região ou no Amazonas em algum momento do estudo e 31,5% referiram ter trabalhado em atividades agropecuárias em algum momento durante o seguimento.

Morbidade pregressa

Quanto a morbidades pregressas referidas, 4 (0,8%) tiveram diagnóstico prévio de tuberculose, 55 (10,8%) hepatite, 131 (25,8%) anemia, e 11 (2,2%) dengue. Apenas 1,5% dos entrevistados tinham diabetes, e somente 7.2% tinham hipertensão arterial sistêmica. Em relação à morbidade por malária nos 509 indivíduos da coorte, 351 (69,1%) disseram já ter tido um episódio de malária diagnosticado e tratado antes da linha de base; 86,6% e 62,7% tiveram um episódio de malária *vivax* ou de malária *falciparum*, respectivamente. Setenta e sete indivíduos (15,2%) referiram ter tido pelo menos uma internação pregressa por malária. O número médio de episódios referidos foi de 8,85/pessoa, variando entre 1 e 70, sendo que o tempo médio em meses da última malária antes da linha de base foi de 46 meses. Entretanto, 155 indivíduos (33,2%) tiveram pelo menos um episódio de malária nos 12 meses que antecederam a linha de base. Dos indivíduos que já haviam usado antimaláricos anteriormente, 31,7% apresentaram algum tipo de efeito colateral, sendo os mais freqüentes prurido ("coceira", em geral com Cloroquina) e chinchonismo ("zumbido" ou "tonturas" causados pelo Quinino).

Patologias concomitantes

A maioria (53,4%) dos indivíduos albergava um ou mais helmintos ou protozoários intestinais; as espécies mais comuns foram os protozoários comensais *Entamoeba coli* (25,2%) e *Endolimax nana* (19,6%), o protozoário parasita *Giardia duodenalis* (19,6%), os ancilostomídeos (7,7%) e *Ascaris lumbricoides* (5,8%). Diagnosticou-se anemia em 18,5% dos indivíduos com idade igual ou superior a cinco anos, com prevalência maior entre indivíduos do sexo feminino (23,9%) do que do sexo masculino (13,7%). Durante as visitas domiciliares, foram diagnosticados quatro casos de leishmaniose tegumentar, acometendo indivíduos com idade entre 3 e 61 anos, incluindo dois irmãos. Três pacientes apresentavam úlcera cutânea única típica, enquanto um apresentava múltiplas lesões cutâneas em cicatrização, com lesão mucosa ativa. O diagnóstico foi confirmado por exame microscópico de raspado da lesão em três pacientes, enquanto o quarto paciente apresentava reação intradérmica de Montenegro positiva mas com exame microscópico negativo. Todos os pacientes diagnosticados com anemia, parasitoses intestinais e leishmaniose foram tratados

pela equipe de campo, ou encaminhados para o serviço de saúde mais próximo. Os resultados sobre arboviroses encontram-se na página 1330 do artigo constante deste anexo.

A.2 Características da transmissão do *Plasmodium* na população estudada

Prevalência de infecção plasmodial sintomática e assintomática nos estudos transversais

Dentre as pessoas com mais de 5 anos, estavam presentes 387, 398 e 366 inidvíduos no primeiro, segundo e terceiro estudos transversais, respectivamente. Foram submetidos ao diagnóstico de infecção pelo *Plasmodium* por microscopia e/ou *PCR*, 381 (98,44%), 368 (92,46%) e 323 (88,25%) desses indivíduos. A Tabela 5 mostra os de prevalência de infecção sintomática e assintomática nos estudos transversais, para a população acima de 5 anos de idade. Podemos observar que a prevalência de infecção sintomática pelo *Plasmodium* oscilou entre 4,00% e 7,08 nos estudos transversais, sendo ligeiramente maior para infecções sintomáticas por *P. vivax* do que por outras espécies; já a prevalência de infecções assintomáticas nos estudos transversais variou entre 5,76% e 10,04%, sendo maior para *P. falciparum* e menor para infecções mistas por *P. vivax e P. malariae.*

Além disso, algumas crianças abaixo de 5 anos foram também testadas a pedido dos pais ou por apresentarem sintomas de malária no dia da visita às casas (31 no primeiro, 19 no segundo e 11 no terceiro estudo transversal), totalizando portanto 412, 3872 e 334 indivíduos testados em cada estudo transversal. Das 31 crianças testadas na linha de base, 7 apresentavam infecção sintomática por *P. vivax*. Dentre as 19 crianças testadas no segundo estudo transversal, 3 apresentavam infecção sintomática por *P. vivax* (um detectado por microscopia e um somente pela *PCR*), uma apresentava infecção assintomática por *P. vivax* (diagnóstico pela *PCR* apenas), e duas apresentavam infecção assintomática por *P. falciparum* (diagnóstico pela *PCR* apenas). Nas 11 amostras colhidas no terceiro estudo transversal, foram identificados apenas dois casos de malária *vivax* e dois casos de malária *falciparum* (diagnóstico pela *PCR* somente).

Todas as crianças entre 2 e 9 anos foram examinadas para avaliação do tamanho do baço; das 106 crianças avaliadas, 6 (5,7%) apresentavam baço palpável entre 1 e 8 cm abaixo

do rebordo costal esquerdo. Uma dessas crianças (com baço palpável a 8 cm) apresentava no momento do exame malária *vivax* e leishmaniose tegumentar (forma cutâneo-mucosa) concomitantemente. Segundo os critérios da OMS, esse índice esplênico permite classificar a endemicidade da malária em hipoendêmica (IE < 10%).

Tabela 5 - Prevalência de infecção sintomática e assintomática por diferentes espécies de *Plasmodium* em indivíduos acima de 5 anos de idade , Ramal do Granada, Março-Abril 2004 (primeiro estudo transversal), Setembro-Outubro 2004 (segundo estudo transversal) e Fevereiro-Março 2005 (terceiro estudo transversal).

		Março-Abril 2004								**Setembro-Outubro 2004**									**Fevereiro-Março 2005**							
SINTOMAS	**ESPÉCIE**	**(N=381)**		**Gota espessa[a]**			**PCR[b]**			**(N=368)**		**Gota espessa[c]**			**PCR[d]**				**(N=323)**		**Gota espessa[e]**			**PCR[f]**		
		n	**Prev (%)**	**Pv**	**Pf**	**Neg**	**Pv**	**Pf**	**Pv+Pf**	**n**	**Prev (%)**	**Pv**	**Pf**	**Neg**	**Pv**	**Pf**	**Pv+Pf**	**Pv+Pm**	**n**	**Prev (%)**	**Pv**	**Pf**	**Neg**	**Pv**	**Pf**	**Pv+Pf**
Presentes	*P. vivax*	**9**	**2,36**	5	0	4	9	0	0	**6**	**1,63**	2	1	3	6	0	0	0	**9**	**2,78**	4	0	5	9	0	0
	P. falciparum	**9**	**2,36**	0	5	4	0	9	0	**8**	**2,17**	1	2	5	0	8	0	0	**3**	**0,92**	0	0	3	0	3	0
	P.v +P. f	**9**	**2,36**	2	0	7	0	0	9	**3**	**0,81**	0	2	1	0	0	3	0	**1**	**0,30**	0	0	1	0	0	1
Ausentes	*P. vivax*	**6**	**1,57**	0	0	6	6	0	0	**12***	**3,26**	0	0	11	12	0	0	0	**8**	**2,47**	0	0	8	8	0	0
	P. falciparum	**10**	**2,62**	0	1	9	0	10	0	**13**	**3,53**	0	0	13	0	13	0	0	**10**	**3,09**	0	0	10	0	10	0
	P.v +P. f	**6**	**1,57**	0	0	6	0	0	6	**10**	**2,71**	0	1	9	0	0	10	0	**8**	**2,47**	0	0	8	0	0	8
	P.v + P.m	**0**	**0,00**	0	0	0	0	0	0	**2**	**0,54**	0	0	2	0	0	0	2	**0**	**0,00**	0	0	0	0	0	0
Total	*P. vivax*	**15**	**3,93**	5	0	10	15	0	0	**18***	**4,89**	2	1	14	18	0	0	0	**17**	**5,26**	4	0	13	17	0	0
	P. falciparum	**19**	**4,98**	0	6	13	0	19	0	**21**	**5,70**	1	2	18	0	21	0	0	**13**	**4,02**	0	0	13	0	13	0
	P.v +P. f	**15**	**3,93**	2	0	13	0	0	15	**13**	**3,53**	0	3	10	0	0	13	0	**9**	**2,78**	0	0	9	0	0	9
	P.v + P.m	**0**	**0,00**	0	0	0	0	0	0	**2**	**0,54**	0	0	2	0	0	0	2	**0**	**0,00**	0	0	0	0	0	0

Prev= Prevalência, Pv = *Plasmodium vivax;* Pf= *Plasmodium falciparum*, Pm= *Plasmodium malariae*, Neg= negativo, *PCR*= Reação em cadeia da polimerase, N = número de indivíduos presentes durante o estudo transversal; n = número de indivíduos positivos para determinada espécie de *Plasmodium*; * um indivíduo sem exame de gota espessa. Número de indivíduos testados: [a] = 381, [b] = 379, [c] = 367, [d] = 368, [e] = 323, [f] = 323. .

Incidência de malária no seguimento longitudinal

O estudo longitudinal visou detectar e avaliar todos os indivíduos com malária que foram identificados pelo serviço de controle local, e que portanto apresentaram lâmina positiva. Dessa forma, o critério utilizado para a incidência de malária na coorte foi infecção plasmodial sintomática (denominada 'malária') com diagnóstico confirmado por microscopia, que é o desfecho a ser usado na análise dos dados. Para a determinação da espécie, foi usado o critério microscópico exclusivo (nos casos onde só este diagnóstico estava disponível) ou a combinação do resultado microscópico e molecular (nos casos onde ambos os resultados estavam disponíveis). Dois ou mais episódios da mesma espécie ocorridos no intervalo de 28 dias foram considerados como o mesmo episódio e portanto contados como um único evento. Dois ou mais episódios de espécies diferentes no intervalo de 28 dias foram considerados como malária mista e contados como um único evento. Os resultados de incidência encontram-se descritos em detalhe no Anexo B (artigo no prelo).

Aqui é reproduzido o gráfico de incidência de malária na coorte (que consta do artigo no prelo, no Anexo B), acrescido da precipitação acumulada mensal (em mm) calculada como a média aritmética simples entre as duas estações pluviométricas mais próximas do ramal do Granada (Tabela 6 e Figura 28). A precipitação mensal variou entre 29,9 mm e 345 mm (média das duas estações). No mês de março de 2004 (início do estudo) ocorreu a maior precipitação (345 mm), caindo nos meses subseqüentes (maio a setembro de 2004), para aumentar novamente a partir de outubro de 2004, porém sem atingir os mesmos níveis da estação chuvosa anterior. Nos meses subseqüentes a maio de 2005, a precipitação caiu drasticamente, resultando em estado de emergência na Amazônia (Brown et al., 2006; Marengo et al., 2008). Vemos que a variação na incidência de malária reflete a variação da precipitação média prévia (entre 1 e 2 meses anteriores).

Tabela 6 - Precipitação mensal acumulada (em mm) das estações puviométricas localizadas em Plácido de Castro e Rio Branco, Acre, 2004-2005.

Ano	Mês	Plácido de Castro (mm)	Rio Branco (mm)	Média (mm)
2004	Março	264.9	426.3	345.6
	Abril	198.6	162.3	180.45
	Maio	72.8	99.9	86.35
	Junho	36.9	22.9	29.9
	Julho	51.4	37.9	44.65
	Agosto	133.6	18.2	75.9
	Setembro	36.2	35.3	35.75
	Outubro	147.6	197.8	172.7
	Novembro	60.3	222.3	141.3
	Dezembro	245	126.7	185.85
2005	Janeiro	87.4	112.2	99.8
	Fevereiro	167.2	361	264.1
	Março	271.6	158.2	214.9
	Abril	205.9	167.7	186.8
	Maio	48.8	17	32.9

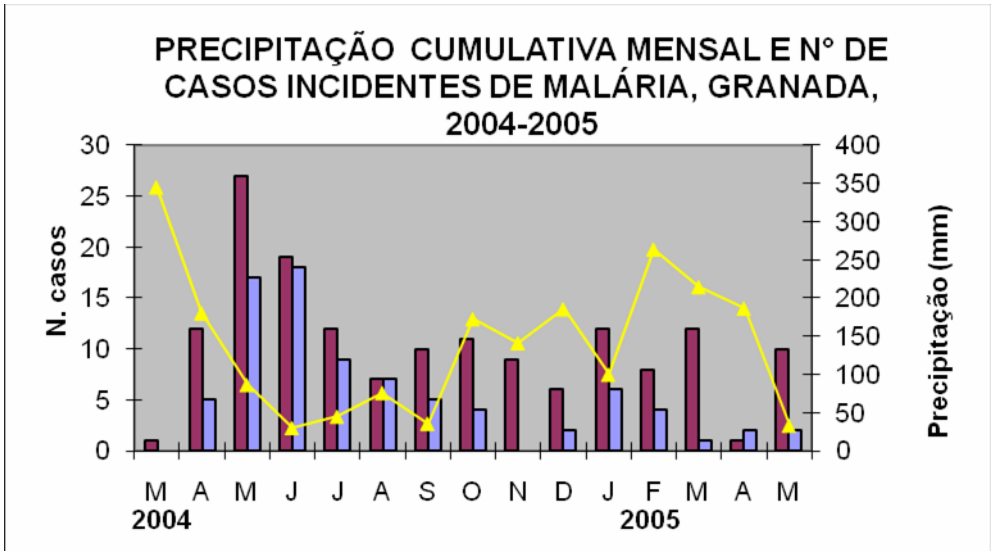


Figura 28 - Precipitação cumulativa mensal (em mm) e casos incidentes de malária na coorte. Barras vermelhas = malária *vivax*; barras azuis = malária *falciparum*, triângulos amarelos = média da precipitação acumulada no mês para as estações de Rio Branco e Plácido de Castro.

Infecção assintomática pelo Plasmodium: seguimento longitudinal

A Tabela 7 apresenta a evolução dos indivíduos com infecção assintomática pelo *Plasmodium* (indicando ausência de sintomas no dia da coleta) detectados no 1° estudo ou corte transversal, ao longo de 14 meses de seguimento. O primeiro conjunto de informações mostra o resultado da lâmina e da *PCR* da linha de base; em seguida é mostrado qual a última malária prévia apresentada pelo paciente (dados referidos pelo paciente que foram checados com registros oficiais do serviço estadual de combate à malária para o período de 2000-2005) e se houve sintomas de malária até 120 dias antes da linha de base. A seguir são mostrados os dados do seguimento entre o primeiro corte e o segundo corte transversal. O segundo conjunto de informações mostra os dados do segundo corte transversal e do seguimento até a data do terceiro corte transversal, e o terceiro conjunto de informações mostra os dados do terceiro corte e do seguimento até 31 de maio de 2005.

Observamos que a evolução dos indivíduos assintomáticos é heterogênea tanto clinicamente quanto parasitologicamente. Podemos separá-los em dois grupos principais: indivíduos com infecção assintomática que não apresentaram sintomas e/ou lâmina positiva no seguimento, e indivíduos que vieram a ter manifestações clínicas no seguimento com lâmina positiva ou não. De 27 indivíduos com infecção assintomática por *Plasmodium* detectada na linha de base, somente 7 haviam apresentado sintomas de malária até 120 dias antes do primeiro corte, sendo que 5 deles receberam tratamento por apresentar lâmina positiva diagnosticada pelo serviço local de controle de malária.

Catorze indivíduos assintomáticos na linha de base não apresentaram sintomas de malária ou referiram qualquer outra patologia ao longo de 14 meses de seguimento; a última malária prévia tratada desses indivíduos foi entre 6 e 78 meses, sendo que 2 indivíduos referiram nunca ter recebido um diagnóstico de malária na vida. Na evolução, dois indivíduos (209 e 354) apresentaram *PCR* negativa para malária no segundo corte transversal; 9 apresentaram *PCR* positiva no segundo corte transversal para a mesma espécie de Plasmódio e 5 apresentaram infecção diagnosticada pela *PCR* por uma espécie diferente de Plasmódio. Quando examinados no terceiro corte transversal, cinco indivíduos apresentaram *PCR* negativa, um indivíduo (341) apresentou *PCR* positiva para a mesma espécie (F) enquanto três indivíduos apresentaram *PCR* positiva para espécie diferente da anterior, todos assintomáticos.

Dentre os 10 indivíduos que evoluíram com infecção plasmodial sintomática com confirmação microscópica no seguimento, 6 (321 a 408) apresentaram lâmina positiva no intervalo de 11 dias a 2 meses e foram tratados; dois indivíduos apresentaram episódio clínico de malária (infecção plasmodial sintomática) com confirmação microscópica 6 meses depois da linha de base [um (337) pela mesma espécie e outro (141) por espécie diferente do episódio anterior]; e dois indivíduos somente apresentaram sintomas de malária com lâmina positiva 11 e 12 meses depois da linha de base (278 e 290, respectivamente). Três indivíduos (200, 208 e 53) com sintomas de malária tiveram lâmina considerada negativa (sugerindo baixa parasitemia) e não foram tratados, conforme recomendação da Gerência de Vigilância Ambiental de Acrelândia e as normas do Ministério da Saúde para tratamento de malária; dois deles (200 e 53) apresentaram *PCR* negativa no seguimento.

No segundo e terceiro estudos transversais, novos indivíduos assintomáticos no dia da coleta foram identificados e seguidos. A evolução é mostrada na Tabela 8 e é semelhante ao que já foi descrito para o primeiro corte transversal.

Temos portanto uma estratificação da imunidade entre os indivíduos com infecção plasmodial assintomática, indicada pela diferença de comportamento clínico-parasitológico observada durante o seguimento longitudinal. Os dados obtidos sugerem que enquanto alguns indivíduos evoluem para a cura parasitológica ou erradicação do parasita do sangue periférico, outros convivem com o *Plasmodium* por vários meses sem apresentar sintomas, e outros passam ainda por um período assintomático com elevação gradual da parasitemia até apresentarem sintomas. Outra hipótese para explicar essa diferença na evolução é que esses indivíduos assintomáticos apresentem uma resolução da infecção atual, mas adquiram uma nova infecção assintomática em um intervalo relativamente curto de tempo.

Tabela 7 - Seguimento longitudinal dos indivíduos com infecção plasmodial assintomática detectados no 1° corte transversal, Granada, Acre, 2004-2005.

Reg	Gota1	*PCR1*	MPT	S120	Ev 6m	Mal seg 6m	Gota2	*PCR2*	Sint 2C	Ev 6m	Mal seg 6m	Gota 3	*PCR3*	Sint 3C	Ev 3m	Mal s 3m
209	neg	V	48m, V	0	-	não	neg	neg	-	-	não	NR	NR	-	-	não
354	neg	F	36m, F	0	-	não	neg	neg	-	-	não	neg	Neg	-	-	não
368	neg	V	36m	0	-	não	neg	V	-	-	não	neg	FV	-	-	não
369	neg	V	32m	0	-	não	neg	V	-	-	não	neg	Neg	-	-	não
237	neg	F	28m	0	-	não	neg	F	-	-	não	neg	NR	-	-	não
244	neg	F	78m, F	0	-	não	neg	F	-	-	não	neg	NR	-	-	não
402	F	F	6m, F	1m	-	não	neg	F	-	-	não	neg	V	-	-	não
259	neg	F	72m, F	3m	-	não	neg	F	-	-	não	neg	Neg	-	-	não
204	neg	FV	nenhuma	0	-	não	neg	FV	-	-	não	neg	Neg	-	-	não
451	neg	FV	24m, F	0	-	não	neg	FV	-	-	não	neg	Neg	-	-	não
341	neg	FV	48m, V	0	-	não	neg	F	-	-	não	neg	F	-	-	não
306	neg	FV	36m, V	0	-	não	neg	V e M	-	-	não	neg	V	-	-	não
26	neg	F	30m, F	0	-	não	neg	V	-	-	não	NE	NE	NE	NE	NE
114	neg	F	nenhuma	0	-	não	neg	V	-	-	não	NE	NE	NE	NE	NE
200	neg	F	nenhuma	0	-	não	neg	FV	-	+ 2m	não	neg	Neg	-	-	não
208	neg	FV	11a, V	0	-	não	neg	FV	+, NT	-	não	neg	FV	-	-	não

Gota1, Gota2 e Gota3= microscopia no 1°, 2° e 3° cortes tranversais, respectivamente; *PCR*1, *PCR*2 e *PCR*3= *PCR* no 1°, 2° e 3° cortes transversais, respectivamente; MPT= malária prévia malária tratada antes do 1° corte; S120= sintomas de malária referidos até 120 dias antes do 1°corte; Ev 6m e Ev 3m = presença ou não de sintomas de malária durante o seguimento; Mal seg 6m e Mal s 3m= ocorrência de malária diagnosticada clinica e microscopicamente durante o seguimento de 6m ou 3m, respectivamente; Sint2C e Sint3C= sintomas de malária no dia da coleta do 2° e 3° cortes transversais, respectivamente; neg=negativo; F= *P. falciparum*; V=*P. vivax*; FV= *P. falciparum* + *P. vivax*; m=meses; T= tratamento com antimalárico, NT= não-tratado; (*)= diagnóstico por microscopia, apenas; S= sintomático; A=assintomático; NR= não-realizado; NE=não-entrevistado; (-)= ausência de sintomas; (+) = presença de sintomas; azul e amarelo = ausência e ocorrência de sintomas ou de diagnóstico de malária, respectivamente; branco = ausência de seguimento (continua na próxima página).

Tabela 7 - Seguimento longitudinal dos indivíduos com infecção plasmodial assintomática detectados no 1° corte transversal, Granada, Acre, 2004-2005.

Reg	Gota 1	*PCR 1*	MPT	S120	Ev 6m	Mal seg 6m	Gota 2	*PCR 2*	Sint 2C	Ev 6m	Mal seg 6m	Gota 3	*PCR 3*	Sint 3C	Ev 3m	Mal s 3m
337	neg	F	72m, F	0	-	não	F	F	+, T	-	não	neg	V	-	-	não
141	neg	F	4m, F	4m	-	não	V	V	+, T	-	não	NE	NE	NE	NE	NE
278	neg	FV	1m, FV	1m	-	não	nr	V	-	+ 5m	F 5m S,T	neg	F	+, NT	-	não
290	neg	V	48m, F	0	-	não	neg	V	-	-	não	V	V	+, T	-	não
53	neg	F	4m, V	4m	-	não	neg	F	-	+ 4m	não	neg	Neg	-	-	não
321	neg	V	16a, F	0	+	F 2m S, NT	neg	neg	-	-	não	neg	Neg	-	-	não
441	neg	F	36m, V	0	+	FV 1m S, NT	neg	F	-	-	não	NE	NE	NE	NE	NE
439	neg	V	40a	0	+	FV 2m S, T	neg	FV	-	-	não	NE	NE	NE	NE	NE
429	neg	FV	3m, FV	0	+	F(*)1m S, T F 15d S, T	neg	FV	-	-	não	NE	NE	NE	NE	NE
291	neg	F	8m, FV	0	+	F 11d S, T	neg	V	-	-	V 5m S,T	neg	Neg	-	-	não
408	F	F	3m, V	3m	+	V 2m S, T	F	FV	-	-	FV 1m A, T	neg	V	+, NT	-	-

Gota1, Gota2 e Gota3= microscopia no 1°, 2° e 3° cortes tranversais, respectivamente; *PCR*1, *PCR*2 e *PCR*3= *PCR* no 1°, 2° e 3° cortes transversais, respectivamente; MPT= malária prévia tratada antes do 1° corte; S120= sintomas de malária referidos até 120 dias antes do 1°corte; Ev 6m e Ev 3m = presença ou não de sintomas de malária durante o seguimento; Mal seg 6m e Mal s 3m= ocorrência de malária diagnosticada clinica e microscopicamente durante o seguimento de 6m ou 3m, respectivamente; Sint2C e Sint3C= sintomas de malária no dia da coleta do 2° e 3° cortes transversais, respectivamente; neg=negativo; F= *P. falciparum*; V=*P. vivax*; FV= *P. falciparum* + *P. vivax*; m=meses; T= tratamento com antimalárico, NT= não-tratado; (*)= diagnóstico por microscopia, apenas; S= sintomático; A=assintomático; NR= não-realizado; NE=não-entrevistado; (-)= ausência de sintomas; (+) = presença de sintomas; azul e amarelo = ausência e ocorrência de sintomas ou de diagnóstico de malária, respectivamente; branco = ausência de seguimento (conclusão).

Tabela 8 - Seguimento longitudinal dos indivíduos com infecção plasmodial assintomática não-tratada detectados no 2° e 3° cortes transversais, Granada, Acre, 2004-2005.

	2° corte transversal – Set/Out 2004						3° corte transversal – Fev/Mar 2005				
	Registro	**Gota2**	***PCR2***	**Sint 2C**	**Evol 6m**	**Malária seg 6m**	**Gota3**	***PCR3***	**Sint 3C**	**Evol 2-3m**	**Malária seg 2m**
A	112	neg	V	-	-	Não	NR	NR			
	238	neg	F	-	+	Não	neg	FV	-	-	Não
	275	neg	F	-	-	Não	neg	V	-	-	Não
	389	neg	V	-	-	Não	neg	neg	-	-	Não
	424	neg	F	-	-	Não	neg	FV	-	-	Não
	427	neg	F	-	-	Não	NR	NR			
	430	neg	FV	-	-	Não	neg	FV	-	-	Não
	435	neg	V	-	-	Não	NR	NR			
	443	neg	F	-	-	Não	NR	NR			
	452	neg	FV	-	-	Não	neg	FV	-	-	Não
	458	neg	F	-	-	Não	neg	neg	-	-	Não
	477	neg	FV	-	-	Não	neg	V	-	-	Não
	478	neg	F	-	-	Não	neg	neg	-	-	Não
	513	neg	FV	-	-	Não	NR	NR			
	543	neg	FV	-	-	Não	neg	neg	-	-	Não
B	159	neg	neg	-	-	Não	neg	F	-	-	Não
	170	neg	neg	-	-	Não	neg	F	-	-	Não
	202	neg	neg	-	-	Não	neg	F	-	-	Não
	256	neg	neg	-	-	Não	neg	F	-	-	Não
	267	neg	neg	-	-	Não	neg	V	-	-	Não
	410	neg	neg	-	-	Não	neg	F	-	-	Não
	479	NR	NR				neg	FV	-	-	Não
	504	neg	neg	-	-	Não	neg	F	-	-	Não
	531	neg	neg	-	-	Não	neg	F	-	-	Não

Gota2 e Gota3= microscopia no 2° e 3° cortes tranversais, respectivamente; *PCR*2 e *PCR*3= *PCR* no 2° e 3° cortes transversais, respectivamente; Evol 6m e Evol 2-3m = presença ou não de sintomas de malária durante o seguimento longitudinal de 6m ou 2-3m, respectivamente; Mal seg 6m e Mal seg 2-3m= ocorrência de malária diagnosticada clínica e microscopicamente durante o seguimento longitudinal de 6m ou 3m, respectivamente; Sint 2C e Sint 3C= presença de sintomas de malária no dia da coleta do 2° e 3° cortes transversais, respectivamente; neg=negativo; F= *P. falciparum*; V=*P. vivax*; FV= *P. falciparum* + *P. vivax*; m=meses; T= tratamento com antimalárico; NR= não-realizado; (-)= ausência de sintomas; (+)= presença de sintomas; A= indivíduos assintomáticos detectados no 2° corte transveral e seguidos até Maio de 2005; B= idema a A, porém detectados no 3° corte . Células azuis = ausência de sintomas ou de diagnóstico clínico-microscópico de malária; células amarelas = ocorrência de sintomas ou diagnóstico clínico-microscópico de malária; células brancas = ausência de seguimento.

Infecção plasmodial sintomática não-tratada: seguimento longitudinal

A Tabela 9 mostra a evolução de 13 indivíduos com infecção plasmodial sintomática que não foram tratados por apresentar lâmina negativa durante o primeiro corte (nota: algumas lâminas mostraram-se positivas na revisão realizada meses depois), e também a evolução de 6 indivíduos com infecção sintomática com lâmina negativa no segundo corte. A primeira parte da Tabela mostra os dados de microscopia e *PCR* do 1° corte transversal, a evolução dos sintomas e ocorrência de malária no seguimento até a data do 2° estudo transversal; a segunda parte da Tabela mostra os dados de microscopia e *PCR* do 2° corte transversal, com a evolução dos sintomas e ocorrência de malária no seguimento até a data do 3° estudo transversal; e a terceira parte da Tabela 9 mostra os dados obtidos durante o terceiro corte transversal e dados do acompanhamento longitudinal até 31 de maio de 2005.

Observamos três tipos de evolução: (a) indivíduo com infecção sintomática não-tratada que apresenta infecção assintomática no seguimento; (b) indivíduo com infecção sintomática não-tratada que mantém sintomas sem no entanto ter lâmina positiva e que apresenta no seguimento infecção pela mesma espécie de *Plasmodium* ou por uma espécie diferente; (c) indivíduos com infecção sintomática que evoluem com um quadro clássico de malária, com intensidade maior de sintomas e parasitemia alta que permite o diagnóstico microscópico e portanto, o tratamento.

Dos sete indivíduos com infecção sintomática não-tratada diagnosticados no 1° corte transversal que não apresentaram lâmina positiva no seguimento e portanto não receberam o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde para malária (FNS, 1995), cinco apresentaram infecção subseqüente pelo *Plasmodium* diagnosticada apenas por métodos moleculares, acompanhados ou não de sintomas, tanto no 2° como no 3° corte transversal, podendo representar persistência da infecção ou aquisição de nova infecção pela mesma espécie ou por espécie diferente. Um indivíduo (41) tornou-se negativo no seguimento sem receber antimalárico convencional; no entanto fez uso do antibiótico Amoxicilina por conta própria, o que pode ter levado à erradicação do *Plasmodium*; outro indivíduo (13) apresentou *PCR* negativa no terceiro corte, mas vinha apresentando sintomas de malária há várias semanas, sugerindo parasitemia abaixo do limiar de detecção da *PCR* (Tabela 9) ou então sintomas ocasionados por outra infecção que não malária (por exemplo dengue ou outra arbovirose).

Semelhantemente, 6 indivíduos apresentaram malária diagnosticada somente pela *PCR* no segundo estudo transversal, apresentando sintomas no dia da coleta (Tabela 10). Na evolução, cinco deixam de apresentar sintomas e somente um volta a ter sintomas de malária 4 meses depois (com *PCR* positiva para *P. falciparum*); quatro continuam sem sintomas e têm lâmina e *PCR* negativas no terceiro estudo transversal, e dois apresentam *PCR* positiva no terceiro estudo transversal; porém, sem sintomas, mostrando que a maior parte desses indivíduos deixa de apresentar sintomas ou parasitemia periférica mesmo sem tratamento. Por fim, no terceiro estudo transversal foram identificados outros cinco indivíduos com sintomas de malária e *PCR* positiva; dois continuaram a apresentar sintomas, e os demais deixaram de apresentar sintomas no seguimento de 2 meses (Tabela 10).

Ao longo dos 14 meses de seguimento longitudinal, vários indivíduos foram examinados por apresentarem quadro febril e/ou outros sintomas, todos com lâmina negativa (Tabela 11). Em 11 desses casos, a *PCR* revelou infecção pelo *Plasmodium*. Nove deles (214 a 396) evoluíram sem sintomas por intervalos de 5 a 13 meses. Um paciente (212) manteve-se sintomático por 5 meses (até o final do seguimento) e em um caso (438), sabemos que não há nenhuma notificação de malária no seguimento, mas o paciente não foi encontrado para a quantificação de sintomas. Oito indivíduos foram testados novamente com *PCR*; três deles (214, 187, 458) tiveram *PCR* negativa entre 2 e 5 meses após a *PCR* inicial; três (458, 430, 424) estavam positivos para a mesma espécie entre 15 dias e 3 meses após a *PCR* inicial, e dois indivíduos (275, 183) estavam positivos para uma espécie diferente entre 1 e 4 meses após a *PCR* inicial (Tabela 11). Nenhuma dessas infecções subseqüentes foi tratada, pois em nenhum caso houve diagnóstico microscópico de malária.

Dessa forma, podemos afirmar que também há uma diferença de comportamento entre os indivíduos com infecção sintomática não-tratada. É interessante notar que vários indivíduos com infecção sintomática evoluem para a cura clínica (remissão dos sintomas) sem necessidade de tratamento com antimaláricos, e em três casos parece estar ocorrendo também cura parasitológica. Isso ocorre tanto para malária *vivax*, malária *falciparum* e em menor grau para infecção mista (FV). Outra observação interessante é que parte dos indivíduos com malária mista (FV) não-tratada apresenta na evolução lâmina positiva para *P. falciparum* (que é tratado) e posteriormente infecção assintomática para *P. vivax*, sugerindo que *P. falciparum* predomina sobre *P. vivax* ao longo dos meses, sendo responsável pelos sintomas, enquanto *P. vivax* causa infecção assintomática.

Esse conjunto de dados sugere que está ocorrendo aquisição de imunidade na população estudada, e que essa imunidade explica em parte a variação no comportamento clínico-parasitológico encontrada (presença de infecção sem sintomas, infecção com baixa parasitemia e poucos sintomas, e infecção com ou sem sintomas que desaparece sem tratamento no seguimento longitudinal). Obviamente, características genéticas do parasita também podem estar contribuindo para essa amplitude do quadro clínico.

Tabela 9 – Seguimento longitudinal dos indivíduos com malária não-tratada detectados no primeiro estudo transversal (linha de base).

Registro	1° corte transversal Março/Abril 2004					2° corte transversal Setembro/Outubro 2004					3° corte transversal Fevereiro/Março 2005				
	Gota1	*PCR1*	Sint1C	Evol 6m	Malária 6m	Gota 2	*PCR2*	Sint2C	Evol 6m	Malária seg 6m	Gota3	*PCR3*	Sint3C	Evol 2-3m	Malária seg 2m
13	neg	F	+	-	Não	neg	F	-	-	Não	neg	neg	+	-	Não
304	neg	FV	+	-	Não	neg	F	-	+	F 1m, NT	neg	FV	-	-	Não
387	neg	FV	+	+	Não	neg	F	+	-	Não	neg	F	-	-	Não
388	neg	V	+	+	Não	neg	V	+	-	Não	neg	FV	+	-	Não
145	neg	F	+	+	Não	neg	F	+	+	Não	neg	V	+	+	Não
285	V	nr	+	+	Não	neg	V	+	+	Não	neg	V	+	+	Não
391	neg	V	+	+	F 2m, T	neg	V	-	-	Não	neg	V	-	-	Não
390	neg	FV	+	+	F 13d, T	neg	VM	-	-	Não	neg	V	-	-	Não
336	V	FV	+	+	F 1m, T	V	V	-	-	Não	neg	V	+	-	Não
389	neg	FV	+	+	F 2m, T	neg	V	-	-	Não	neg	neg	-	-	Não
475	neg	FV	+	+	FV 15d, T FV 3m, T	neg	V	-	+	V 2m, S,T	neg	neg	+	+	V 2m, S,T
420	V	FV	+	+	FV 4m, T	neg	neg	-	-	Não	neg	neg	+	+	FV 2m, S,T
41	F	F	+	+	F 2m NT F assint NT	neg	neg	-	-	Não	neg	neg	-	-	Não

Gota1, Gota2 e Gota3= resultado gota espessa 1°, 2° e 3° corte transversal; *PCR*1, *PCR*2 e *PCR*3= resultado *PCR* diagnóstico do 1°, 2° e 3°corte transversal; Evol= presença ou não de sintomas de malária durante o seguimento longitudinal; Malária seg= ocorrência de malária diagnosticada clinica e microscopicamente (tratada, T) ou com diagnóstico molecular (não-tratada, NT) durante o seguimento longitudinal; Sint2C e Sint3C= presença de sintomas de malária no dia da coleta do segundo e terceiro corte transversal, respectivamente; neg=negativo; assintom= assintomático; F= *P. falciparum*; V=*P. vivax*; FV= *P falciparum* + *P. vivax*; m=meses; T= tratamento com antimalárico, NT= não-tratado; Não= sem episódios de malária no seguimento, (-)= ausência de sintomas; (+)= presença de sintomas. Células azuis e amarelas = ausência ou presença de sintomas ou de diagnóstico clínico-microscópico de malária, respectivamente; células brancas = ausência de seguimento.

Tabela 10 – Seguimento longitudinal dos indivíduos com malária não-tratada detectados no segundo e terceiro estudos transversais.

Corte	Registro	1° corte transversal Março/Abril 2004					2° corte transversal Setembro/Outubro 2004					3° corte transversal Fevereiro/Março 2005				
		Gota1	*PCR1*	Sint 1C	Evol 6m	Malária 6m	Gota2	*PCR2*	Sint 2C	Evol 6m	Malária seg 6m	Gota3	*PCR3*	Sint 3C	Evol 2-3m	Malária seg 2m
A	83	neg	neg	-	-	Não	neg	V	+	-	Não	neg	neg	-	-	Não
	107	neg	neg	-	-	Não	neg	V	+	-	Não	neg	neg	-	-	Não
	219	neg	neg	-	-	Não	neg	F	+	+	F 4m S,NT	neg	F	-	-	Não
	224	neg	neg	-	-	Não	neg	F	+	-	Não	neg	neg	-	-	Não
	238	neg	neg	-	-	Não	neg	F	+	-	Não	neg	FV	-	-	Não
	320	NR	NR	-	-	Não	neg	V	+	-	Não	neg	neg	-	-	Não
B	62	neg	neg	-	-	Não	neg	neg	-	-	Não	neg	V	+	-	Não
	233	NR	NR	-	-	Não	NR	NR	-	-	Não	neg	F	+	-	Não
	274	neg	neg	-	-	Não	V	V	+, T	-	Não	neg	V	+	-	Não
	393	V	NR	+	+	F 3m, NT	neg	neg	-	-	Não	neg	V	+	+	V 3d, S,NT
	521	NR	NR				NR	NR	-	-	Não	neg	F	+	+	V 5s, S,T

Gota1, Gota2 e Gota3= resultado gota espessa 1°, 2° e 3° corte transversal; *PCR*1, *PCR*2 e *PCR*3= resultado *PCR* diagnóstico do 1°, 2° e 3°corte transversal; Evol= presença ou não de sintomas de malária durante o seguimento longitudinal; Malária seg= ocorrência de malária diagnosticada clinica e microscopicamente (tratada, T) ou com diagnóstico molecular (não-tratada, NT) durante o seguimento longitudinal; Sint2C e Sint3C= presença de sintomas de malária no dia da coleta do segundo e terceiro corte transversal, respectivamente; neg=negativo; assintom= assintomático; F= *P. falciparum*; V=*P. vivax*; FV= *P falciparum* + *P. vivax*; m=meses; T= tratamento com antimalárico, NT= não-tratado; Não= sem episódios de malária no seguimento, (-)= ausência de sintomas; (+)= presença de sintomas. Células azuis e amarelas = ausência ou presença de sintomas ou de diagnóstico clínico-microscópico de malária, respectivamente; células brancas = ausência de seguimento; A= indivíduos detectados no 2° estudo transversal, B= indivíduos detectados no 3° estudo transversal.

Tabela 11 – Evolução dos indivíduos com malária não-tratada detectados durante o seguimento longitudinal.

Registro	**Gota**	***PCR1***	***PCR2***	***PCR3***	***PCR4***	**Evolução**
214	neg	F	neg 3m			assintomático 5m
519	neg	F				assintomático 6m
458	neg	F	F 3m S	neg 5m		assintomático 12m
430	neg	FV	FV 3m A	FV 6m A		assintomático 12m
187	neg	V	neg 5m			assintomático 13m
424	neg	V	V 15d A	F 4m A	FV 6m A	assintomático 12m
275	neg	V	F 4m A	V 6m A		assintomático 13m
183	neg	V	F 1m A			assintomático 5m
396	neg	V				assintomático 6m
438	neg	V				sem malária 12m
212	neg	V	neg 2m			sintomas 5m

Gota= resultado da gota espessa; *PCR*1= resultado do 1° *PCR*; *PCR*2, *PCR*3 e *PCR*4= resultados de *PCR*s seqüenciais ao 1° *PCR*; Evolução= presença ou ausência de sintomas por determinado período; m= meses; S= sintomático; A= assintomático; F= *P. falciparum*; V= *P. vivax*; FV= *P. falciparum* + *P. vivax*; neg= negativo.

ANEXO B - FATORES DE RISCO PARA MALÁRIA NA COORTE

Este anexo contém um manuscrito com resultados sobre a incidência de malária na coorte durante o seguimento longitudinal e a análise dos fatores de risco epidemiológicos para malária, correspondendo ao Objetivo 1. O manuscrito foi submetido ao American Journal of Tropical Medicine and Hygiene em março de 2008, tendo sido aceito com pequenas mudanças; o manuscrito revisado é apresentado neste anexo juntamente com o parecer do revisor e a resposta dos autores; segue-se o título e autores do manuscrito:

da Silva-Nunes M, Codeço CT, Malafronte RS, da Silva NS, Juncansen C, Muniz PT, Ferreira MU. Malaria on the Amazonian Frontier: Transmission Dynamics, Risk Factors, Spatial Distribution, and Prospects for Control. Am J Tropical Med Hyg. Prelo, 2008.

Este manuscrito contém os dados principais da tese; mostra a incidência na área de estudo, avaliação da associação entre as variáveis epidemiológicas e o risco de malária apresentado sob a forma de *odds ratio*, e análise espacial dos casos incidentes de malária. Os achados descritos do manuscrito permitem sugerir perspectivas de controle da malária em áreas de assentamento rural da Amazônia, daí sua importância. Como material suplementar, foram incluídos neste anexo uma lista de importantes correções feitas à prova gráfica, e os pareceres dos revisores (primeiro e segundo pareceres).

Também foram incluídos como material suplementar os dados sobre as variáveis genéticas (polimorfismos do receptor FcγRIIA e Duffy), ainda não publicados. Essa informação complementa a análise das variáveis epidemiológicas (Objetivo 4).

Minha participação nesta publicação ocorreu em todas as etapas: planejamento e execução do trabalho de campo, coleta de dados, análise dos dados epidemiológicos e redação do manuscrito.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 00(0), 2008, pp. 000–000
Copyright © 2008 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Malaria on the Amazonian Frontier: Transmission Dynamics, Risk Factors, Spatial Distribution, and Prospects for Control

Mônica da Silva-Nunes,* Cláudia T. Codeço, Rosely S. Malafronte, Natal S. Silva, Camila Juncansen, Pascoal T. Muniz, and Marcelo U. Ferreira

Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil; Program of Scientific Computation, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; Laboratory of Protozoology, Institute of Tropical Medicine of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil; Department of Health Sciences, Federal University of Acre, Rio Branco, Acre, Brazil

Abstract. Little follow-up data on malaria transmission in communities originating from frontier settlements in Amazonia are available. Here we describe a cohort study in a frontier settlement in Acre, Brazil, where 509 subjects contributed 489.7 person-years of follow-up. The association between malaria morbidity during the follow-up and individual, household, and spatial covariates was explored with mixed-effects logistic regression models and spatial analysis. Incidence rates for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria were 30.0/100 and 16.3/100 person-years at risk, respectively. Malaria morbidity was strongly associated with land clearing and farming, and decreased after five years of residence in the area, suggesting that clinical immunity develops among subjects exposed to low malaria endemicity. Significant spatial clustering of malaria was observed in the areas of most recent occupation, indicating that the continuous influx of nonimmune settlers to forest-fringe areas perpetuates the cycle of environmental change and colonization that favors malaria transmission in rural Amazonia.

INTRODUCTION

Despite several decades of intensive control efforts, malaria remains a major cause of morbidity in Brazil.[1] Between 1970 and the mid-1980s, massive human migration to the Amazon Basin, where large-scale colonization and mining projects were started, led to a 10-fold increase in the annual incidence of malaria in the country.[2] The most recent available incidence data are for 2006, with 550,000 slide-confirmed malaria cases reported countrywide, 99.7% of which were diagnosed in Amazonia.[3]

Frontier agricultural settlements in the Amazon Basin favor malaria transmission not only by inducing massive environmental changes, such as deforestation, but also by favoring human clustering close to vector habitats.[4] Although the epidemiology of epidemic malaria in early frontier settlements in rural Amazonia was thoroughly described in the mid-1980s,[5] minimal follow-up information is available for the recent decades, during which extensive social and ecologic transformations took place.[6] To understand how malaria transmission is maintained in the more stable and organized communities originating from frontier settlements, a detailed knowledge of the transmission dynamics of malaria and associated risk factors is necessary.[7]

Here we describe the current patterns of malaria transmission in one of the largest agricultural settlements of Brazilian Amazon, the Pedro Peixoto Settlement Project, opened in the state of Acre in the 1980s. The combined analyses of malaria morbidity data and individual and household-level risk factors for a population-based prospective cohort are presented and discussed in relation to prospects for malaria control in this and other settings with similar endemicity.

* Address correspondence to Mônica da Silva-Nunes, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, São Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-900. E-mail: msnumes1@yahoo.com.br

MATERIALS AND METHODS

Study area. Granada, originally a sparsely populated rubber tapper settlement in the eastern corner of the state of Acre, northwestern Brazil (Figure 1), became part of the Pedro Peixoto Agricultural Settlement Project in 1982. With its equatorial humid climate, this area receives the most rainfall (annual average, 2198.5 mm) between December and March. The mean annual temperature is 24.5°C. Subsistence agriculture and cattle raising are the major economic activities, with coffee, bananas, and rice being the main cash crops. The majority of inhabitants are migrants from Southeast and South Brazil. The continuous influx of new settlers led more recently to the occupation of forested areas along the Iquiri River, the largest water body in the study area (Figure 1); most of the settlement has been deforested for agricultural use. Three government-run malaria diagnosis outposts provide free malaria diagnosis and treatment to the inhabitants of the study site.

This study was carried out in two adjacent localities in the Granada area, namely Ramal do Granada and Reserva da Linha 14. Ramal do Granada includes households on both sides of Linha 14, an unpaved road originating from the paved BR 364 highway, from km 14 to km 30, and also some dwellings in nearby secondary roads (Linha 27 and Linha 28); although Reserva da Linha 14 consists of all households found along the 2.5 km secondary road that lies nearly perpendicular to Ramal do Granada. The Iquiri River runs parallel to Reserva da Linha 14, at an average distance of 1 km (Figure 2).

Study design. A population-based open cohort study was initiated in 2004 to identify socioeconomic, immunologic, genetic, and environmental risk factors associated with malaria morbidity in the study area. All of the area's households were visited by our field team, and 466 dwellers of all age groups (98.5% of the permanent residents in the area) were enrolled between March and April 2004. An additional 43 individuals (mostly newcomers to the area) were enrolled between September and October 2004, giving a total of 509 subjects, from < 1 month to 90 years of age and distributed into 123 households, who contributed follow-up data. Baseline data

Proof Only

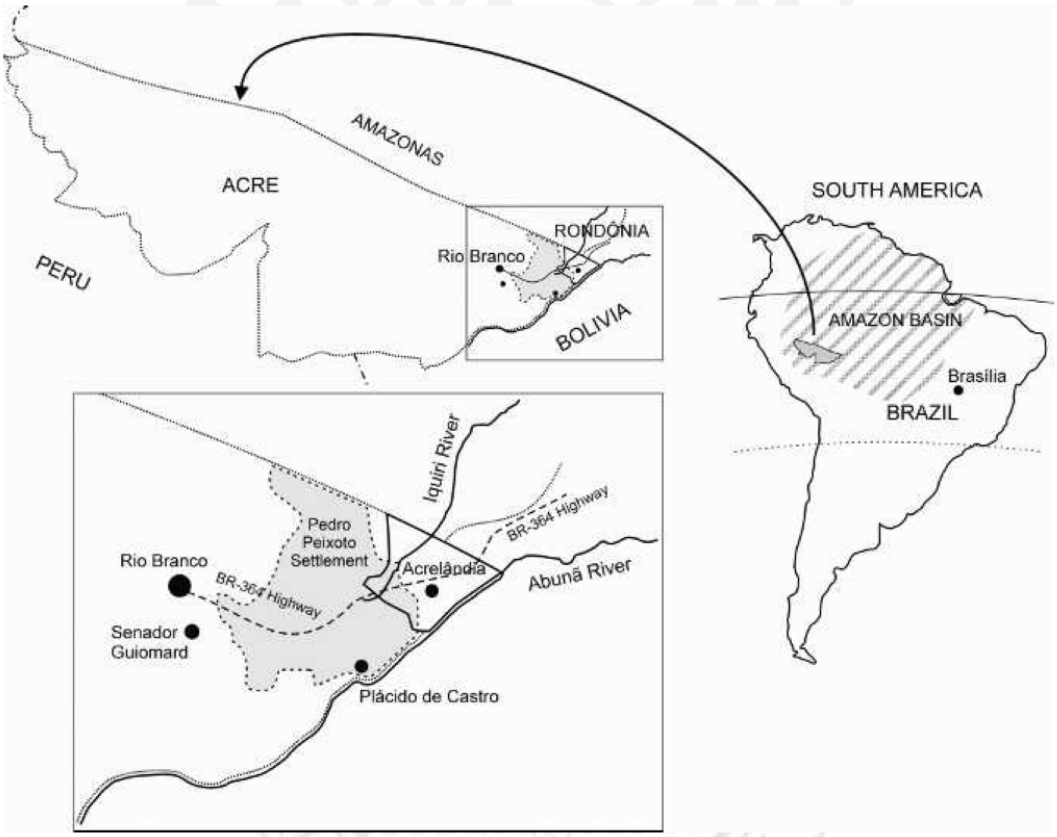


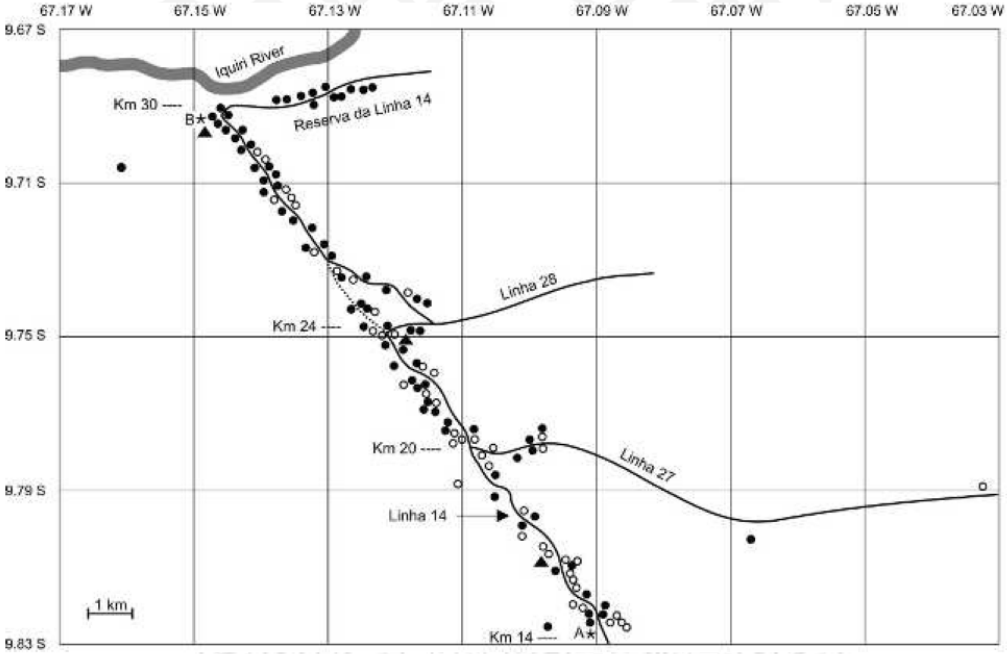
FIGURE 1. Maps showing the state of Acre, in northwestern Brazil, and the site of the cohort study carried out between 2004–2005 (Pedro Peixoto Settlement). Ramal do Granada is part of the Pedro Peixoto Agricultural Settlement, located 30–50 km northwest of the town of Acrelândia, which in turn is located 114 km east of Rio Branco, the capital of Acre.

are described elsewhere.[8] All dwellings were located using a hand-held 12-chanel global positioning system receiver (eTrex Personal Navigator, Garmin, Olathe, KS), with a positional accuracy within 15 m.

To characterize the place of residence, we created a continuous covariate, "house location," which gives the linear distance in km between each dwelling and an index house located in the sector of earliest ocupation. Briefly, the location of each dwelling along Ramal do Granada and on minor secondary roads was described in relation to an index house (index house A), the first house on the left side of Ramal da Linha 14 at km 14 (Figure 2); for subjects living along Reserva da Linha 14, the place of residence was calculated as the sum of two linear distances in km: 1) the distance between the subject's house and the index house B (the last house on the left of Ramal da Linha 14 at km 30) and 2) the distance between index houses A and B. New settlers typically occupied land plots close to Iquiri River, corresponding to house locations of 12–15.5 km.

A baseline questionnaire was applied to all study participants to collect demographic, health, and socioeconomic data. Cumulative exposure to malaria was estimated using age and the duration of residence in the study area as proxies, whereas recent malaria exposure was determined from the records of slide-confirmed malaria episodes that were diagnosed in local malaria diagnosis outposts between January 2001 and March 2004.

Information on selected household assets, land ownership, type of building material, and number of inhabitants per room was used to derive a wealth index, from which socioeconomic status was estimated. We combined the following data: 1) ownership of five household assets (gas stove, coach, bicycle, motor vehicle, and cattle); 2) land tenure (yes or no); 3) type of building material (brick walls versus others); and 4) number of inhabitants per room (≤ 1 per room or >1 per room). Principal component analysis, carried out using the XLSTAT software, version 7.5.2 (Addinsoft, New York, NY), was used to weigh each variable, as described by Filmer and Pritchett.[9] The first principal component explained 25.6% of variability and gave the greatest weights to ownership of a couch (0.670) and a motorized vehicle (car or motorcycle) (0.641), and to having a lower number of inhabitants



] FIGURE 2. The Global Positioning System (GPS)-determined location of 122 dwellings (comprising 123 households) along Linha 14 and secondary roads in the Granada area, inhabited by the 509 study subjects. These dwellings are located in the area shaded in Figure 1, close to the town of Acrelândia, between the BR-364 highway and the Iquiri River. For analytical purposes, the location of each dwelling (represented as circles) was described in relation to an index house (index house A, black star). Dwellings with at least one case of malaria during follow-up are represented as black circles, white circles represent households without malaria during follow-up period. House location of the 388 study subjects living along Linha 14 and minor secondary roads (Linha 27 and Linha 28) was defined as the linear distance in km between the subjects' dwelling and the index house A, using GPS coordinates. For the remaining 121 study subjects who lived along Reserva da Linha 14, the place of residence was calculated as the sum of two linear distances: 1) that between the subject's house and the index house B (black star) and 2) that between index houses A and B. The three government-run malaria diagnosis outposts in the study site are represented with triangles. Note that Iquiri river, the main permanent water body in the study site, runs nearly parallel to Reserva da Linha 14.

per room (0.574). After the standardized variables were weighted, the highest scores were given to the ownership of a brick house (2.262), a sofa set (1.040), and a motor vehicle (0.742). Lowest scores were given to households with no gas stove (−1.237), no land tenure (−1.054), > 1 inhabitant per room (−0.619), and no cattle (−0.614). The scores were summed to give a wealth index for each household (range, −4.871 to 5.409), and these indices were then used to stratify households into quartiles in decreasing order (first quartile, 25% richest).

Baseline malaria prevalence survey. The baseline survey participants five years of age or older were eligible for collection of 5-mL venous blood samples for malaria diagnosis and other laboratory studies, regardless of the presence of any clinical symptoms. Laboratory diagnosis of malaria was based on microscopic examination of thick smear and nested polymerase chain reaction (PCR) amplification of a species–specific segment of the 18S rRNA gene of human malaria parasites.[10,11] Thick blood smears were stained with Giemsa and examined for malaria parasites under 700× magnification (at least 100 fields) by two experienced local microscopists. Malaria infections diagnosed by onsite microscopy were treated according to the latest malaria therapy guidelines in Brazil.[12] All positive slides and the slides collected from febrile subjects that were declared negative by onsite microscopy were sent for review by an expert microscopist at the National Reference Laboratory of the Ministry of Health of Brazil, Brasília. The DNA templates for PCR amplification were isolated from 200 μL of whole blood using GFX genomic blood DNA purification kits (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Baseline blood samples were additionally used: 1) to investigate human genetic polymorphisms putatively associated with resistance to malaria (manuscript in preparation), 2) to measure hemoglobin and other iron status indicators and diagnose glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency,[13] 3) to measure antibodies to several arboviruses,[8] and 4) to measure antibodies to blood-stage malarial antigens.[14,15]

Malaria surveillance. Between March 2004 and May 2005, the study population was placed under clinical and laboratory surveillance for symptomatic malaria episodes, which included both active and passive case detection.[16] For this purpose, the study clinician and a health worker visited the area five times a week (Monday–Friday) and examined all study participants (irrespective of their ages) reporting current or recent fever, headache, or any other malaria symptom.

Venous or finger-prick blood samples for malaria diagnosis by microscopy and polymerase chain reaction (PCR) were obtained. As part of surveillance, all patients' files kept at the three local malaria diagnosis outposts were daily examined to detect additional malaria episodes among study participants who reported directly to these facilities. Because many of these patients received immediate treatment, their pre-treatment blood samples for PCR malaria diagnosis were not obtained. Thick blood smears were examined by local microscopists; a portion of them (all positive slides and those collected from febrile subjects that were declared negative by onsite microscopy) were reviewed by an expert microscopist at the National Reference Laboratory of the Ministry of Health of Brazil. The DNA templates for PCR amplification were obtained from venous blood samples as explained previously; those from finger-prick blood samples spotted on FTA Micro Cards were prepared as described by the manufacturer (Whatman, Clifton, NJ). As in other studies conducted in Amazonia,[17,18] our PCR often detected additional malaria species that were missed by conventional microscopy.

These additional species were also considered in the analysis. A clinical case of malaria (outcome variable) was present when a symptomatic patient, enrolled through either active or passive case detection, was found to have malaria parasites on thick smear. A minimal interval of 28 days between two or more consecutive sample examinations was required to count the latter positive slide as a new malaria episode. In addition, when different species were detected in samples obtained less than 28 days apart, the subject was considered to have a single episode of mixed-species infection. On the basis of the results of onsite microscopy, the treatment was given as described previously. Two additional cross-sectional surveys of the whole study population were performed in September–October 2004 and February–March 2005 to update census data and record temporary absences from the study area that lasted more than one week. These data were considered when computing the number of person-years at risk. Subjects diagnosed with malaria were excluded from the population at risk during the 28 days after initiation of treatment.

Statistical analysis. *Exploratory analysis.* A database was created with SPSS 13.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). Incidence rates were expressed as the number of cases per 100 person-years or person-months at risk, and their exact Poisson 95% confidence intervals (CIs) were calculated using StatsDirect 2.6.1 software (StatsDirect, Altrincham, Cheshire, UK). Exploratory logistic regression analysis, using R software version 2.6.0,[19] examined potential risk factors and confounders, including categorical individual-level variables (gender, migration history, main occupation, recreational fishing, bednet use, recent malaria, and work-related commutation during follow-up), continuous individual-level variables (age, years of schooling, years of residence in the current house, in the study site, and in other malaria-endemic areas, age at the start of malaria-exposure, self-reported number of slide-confirmed malaria episodes, and number of slide-positive malaria episodes recorded between 2001–2004), categorical household-level variables (type of house, type of material used in roof, walls and floor, presence of gaps in the walls, presence of screens in windows and doors, presence of a separate kitchen, presence of indoor animals, type of solid and liquid waste disposal, presence of electricity on the property, wealth index [stratified into quartiles], and sharing the household with a land clearer [land clearing was hypothesized to be an occupation of high risk for malaria]), and continuous household-level variables (number of household inhabitants, years of schooling of the household head, and house location). Separate multiple logistic regression models were fitted to individual- and household-level variables using manual inclusion. Covariates were maintained in subsequent multivariate models, together with the *a priori* potential confounders (age and gender), if they were associated with the outcome, in exploratory unadjusted analysis, at a level of significance of 20%. The goodness of fit was assessed by either analysis of variance, Akaike's information criterion (AIC) values,[20] or odds ratio (OR) changes. Interaction terms were evaluated, and diagnostic tests (Cook's distance[21] for influential points and studentized residuals[22]) were applied using the package car of R 2.6.0 software. A few statistically significant interaction terms were identified but did not improve the models; therefore they were not included in the final models. Important influential points were identified for the variable "occupation," which was then re-stratified and reevaluated; as for the other variables examined, influential points were maintained because overall results did not change significantly when such influential points were excluded from the analysis. Models and outliers were reassembled if needed until the best fit was achieved. Final logistic regression models for individual variables included gender, age, occupation, years of residence in the study site, years of residence outside the study site, the occurrence of recent malaria episodes, recreational fishing, and cohabiting with a land clearer, whereas those for household-level variables included wealth index, house location in the study site, number of household inhabitants, and sharing the house with a land clearer.

Mixed-effects logistic regression. We used logistic regression models to explore the association between individual and household-level covariates and the occurrence of: 1) at least one episode of either *Plasmodium vivax* or *Plasmodium falciparum* clinical malaria during the follow-up, 2) at least one episode of clinical *P. vivax* malaria, and 3) at least one episode of clinical *P. falciparum* malaria. Malaria episodes diagnosed during the baseline survey were not considered in this analysis of incident malaria. Because of the nested structure of the data (study subjects are clustered into households), we fitted mixed-effects logistic regression models with multivariate normal random effects using restricted maximum likelihood and numerical integration via adaptive Laplace[23] with the lme4 package of R 2.6.0.[19] Clustering into households was treated as a random effect in the model (using a variable that identified to which household the subject belonged), whereas all other covariates were entered as fixed-effect variables. Only the variables associated with statistical significance at the 5% level and those that altered the parameter estimate of fixed-effects variables (odds ratio) or the unexplained residual effects at household level (random-effects estimation) by $\geq 10\%$ were retained in the final models. Because of the open-cohort design of the study, duration of follow-up (in person-years) was entered as an offset. The following variables remained in final mixed-effects logistic regression models for each outcome: gender, occupation, length of residence in the study area, occurrence of recent slide-confirmed malaria, recreational fishing, wealth index, house location, number of inhabitants in the household, and sharing the house with a land clearer. Because of missing values, only 458

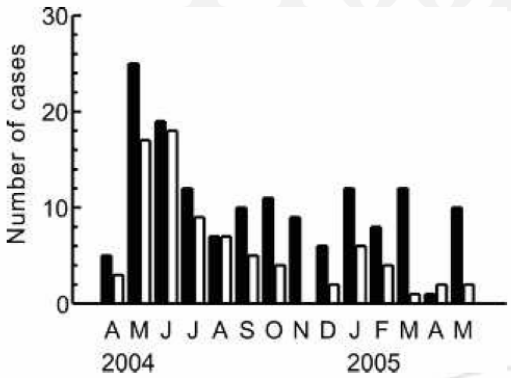


FIGURE 3. Monthly distribution of incident symptomatic infections with *Plasmodium falciparum* (N = 147, black bars) and *Plasmodium vivax* (N = 80, white bars) diagnosed in an open cohort of 509 subjects followed between March 2004 and May 2005 in rural Amazonia. The first "A" and the last "M" on the x-axis denote April 2004 and May 2005, respectively; no incident malaria episode was diagnosed in March 2004.

observations remained in the final adjusted models. Given the nonlinear relationship between house location and risk of *P. falciparum* malaria that was revealed by logistic additive regression (see below), a quadratic term was used to fit the corresponding parametric logistic model. The relationships between duration of residence in the study site and the expected probabilities for each outcome, derived from the final mixed-effects models, were represented graphically using a locally weighted polynomial regression.

Logistic additive models. We applied logistic additive models with integrated smoothness estimation, using penalized regression splines,[24] to explore the shape of the association between house location and the risk of clinical malaria during the follow-up. These analyses were performed with the mgcv package of R 2.6.0 software. A similar approach was used to study the association among age, years of residence inside and outside the study area, and the risk of clinical malaria during the follow-up. Because there was extensive overlap between age and time of residence in the study area for many subjects, we created a third variable (years of residence outside the study area) by subtracting the number of years of residence in the study area from the subject's age. Each time-related variable was modeled separately, and its contribution to the outcome was compared using AIC values, the percentage of deviance explained and the P value of the smooth term. Only years of residence in the study area was significantly associated with the risk of clinical malaria (regardless of the species) during the follow-up; whereas age and years outside the study area explained less than 1.12% of the deviance ($P > 0.005$) and were thus excluded from subsequent analysis (data not shown).

Spatial analysis. The Kulldorff spatial scan statistics was used to test whether malaria episodes were randomly distrib-

TABLE 1

Individual and household-level risk factors for having malaria of any type during the follow-up of 509 rural Amazonians between March 2004 and May 2005

Variables	N*	n†	OR (95% CI)‡	P	aOR (95% CI)§	P
Gender						
Female	245	51	1		1	
Male	264	65	1.24 (0.82–1.89)	0.307	0.75 (0.37–1.51)	0.431
Main occupation						
Land clearing in Iquiri area	24	12	4.01 (1.71–9.44)	0.001	7.35 (1.88–28.65)	0.004
Land clearing elsewhere	30	9	1.72 (0.71–3.82)	0.198	6.17 (1.78–21.39)	0.004
Farming	129	30	1.21 (0.73–1.97)	0.433	2.15 (0.91–5.04)	0.078
Other (students, housekeepers)	326	65	1		1	
Years of residence in the area	507		0.95 (0.91–0.98)	0.003	0.92 (0.87–0.97)	0.003
Recent malaria						
No	314	37	1		1	
Yes	195	79	5.09 (3.28–8.03)	< 0.0001	2.77 (1.46–5.27)	0.001
Recreational fishing						
No	309	77	1		1	
Yes, Iquiri area	49	18	1.75 (0.91–3.27)	0.084	0.69 (0.27–1.77)	0.447
Yes, elsewhere	101	14	0.48 (0.25–0.88)	0.022	0.68 (0.30–1.58)	0.381
House location‖	509		1.22 (1.16–1.29)	< 0.0001	1.19 (1.08–1.30)	0.0001
Number of inhabitants in the house	509		1.19 (1.09–1.30)	0.00004	1.31 (1.11–1.55)	0.001
Wealth index (quartiles)**						
1 (richest)	114	12	1		1	
2	140	34	2.72 (1.37–5.78)	0.005	0.83 (0.30–2.32)	0.728
3	127	29	2.51 (1.24–5.38)	0.012	0.91 (0.31–2.67)	0.868
4 (poorest)	128	41	4.00 (2.03–8.40)	0.0001	0.50 (0.15–1.69)	0.269
Sharing the house with a land clearer						
No	325	66	1		1	
Yes	161	49	1.72 (1.11–2.64)	0.014	2.26 (1.15–4.43)	0.017

For some variables, totals do not reach 509 because of missing values. Because of missing values, only 458 observations remained in the final mixed-effects logistic regression model.
* N = number of subjects.
† n = number of subjects with the outcome.
‡ OR = odds ratio; CI = confidence interval.
§ aOR = odds ratio adjusted for all covariates listed in the table using a mixed-effects logistic regression model.
¶ Slide-confirmed symptomatic malaria diagnosed between January 2001 and March 2004.
‖ House location gives the linear distance in km between each dwelling and an index house situated in the sector of earliest human occupation in the study area.
** The wealth index was derived from information on ownership of selected household assets, land tenure, type of housing material, and number of inhabitants per room, and used as a proxy of socioeconomic status.

TABLE 2

Individual and household-level risk factors for having *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria during follow-up of 509 rural Amazonians between March 2004 and May 2005.

		Plasmodium vivax malaria					*Plasmodium falciparum* malaria			
	N*	OR (95% CI)†	*P*	aOR (95% CI)‡	*P*	*n*	OR (95% CI)	*P*	aOR (95% CI)	*P*
Gender										
Female	41	1		1		29	1		1	
Male	46	1.04 (0.66–1.67)	0.836	0.97 (0.46–2.05)	0.940	38	1.25 (0.74–2.11)	0.395	0.54 (0.21–1.35)	0.190
Main occupation										
Land clearing in Iquiri area	7	2.02 (0.75–4.95)	0.135	2.70 (0.63–11.47)	0.176	8	4.29 (1.64–10.55)	0.002	10.74 (2.25–51.27)	0.002
Land clearing elsewhere	6	1.23 (0.44–2.98)	0.664	3.24 (0.82–12.70)	0.091	5	1.72 (0.55–4.46)	0.300	7.83 (1.57–39.08)	0.012
Farming	19	0.85 (0.47–1.48)	0.577	1.09 (0.43–2.79)	0.843	34	1.57 (0.86–2.83)	0.133	3.30 (1.13–9.63)	0.028
Other (students, housekeepers)	55	1		1		20	1			
Years of residence in the area	87	0.94 (0.89–0.97)	0.001	0.93 (0.87–0.99)	0.040	67	0.96 (0.92–1.00)	0.080	0.95 (0.88–1.02)	0.175
Recent malaria§										
No	27	1		1		16	1			
Yes	60	4.72 (2.90–7.88)	< 0.0001	2.57 (1.26–5.25)	0.009	51	6.59 (3.71–12.31)	< 0.0001	2.55 (1.10–5.89)	0.027
Recreational fishing										
No	61	1		1		46	1			
Yes, Iquiri area	9	0.91 (0.40–1.91)	0.821	0.43 (0.14–1.26)	0.125	15	2.52 (1.25–4.93)	0.008	1.01 (0.35–2.90)	0.977
Yes, elsewhere	11	0.49 (0.24–0.95)	0.045	1.05 (0.42–2.61)	0.909	3	0.17 (0.04–0.49)	0.004	0.17 (0.04–0.76)	0.020
House distance¶	87	1.23 (1.16–1.31)	< 0.0001	1.18 (1.06–1.31)	0.001	67	1.29 (1.20–1.40)	< 0.0001	1.01 (1.00–1.02)	< 0.0001
Number of inhabitants in the house	87	1.19 (1.08–1.30)	0.0002	1.25 (1.05–1.49)	0.009	67	1.21 (1.10–1.33)	0.0001	1.24 (1.02–1.50)	0.028
Wealth index (quartiles)‖										
1 (richest)	5	1		1		8	1			
2	28	5.45 (2.20–16.50)	0.0007	1.97 (0.53–7.32)	0.306	16	1.71 (0.72–4.36)	0.236	0.37 (0.10–1.35)	0.134
3	22	4.57 (1.79–14.03)	0.003	1.99 (0.51–7.70)	0.315	16	1.91 (0.80–4.88)	0.153	0.31 (0.08–1.27)	0.105
4 (poorest)	32	7.27 (2.95–21.91)	0.00007	1.42 (0.33–6.10)	0.633	27	3.54 (1.60–8.68)	0.002	0.22 (0.04–1.06)	0.059
Sharing the house with a land clearer										
No	45	1		1		43	1			
Yes	41	2.12 (1.32–3.42)	0.001	2.58 (1.24–5.36)	0.010	24	1.15 (0.66–1.95)	0.614	1.73 (0.75–3.94)	0.192

Because of missing values, only 458 observations remained in the final mixed-effects logistic regression models.

* *n* = number of subjects with the outcome

† OR = odds ratio; CI = confidence interval.

‡ aOR = odds ratio adjusted for all covariates listed in the table, using mixed-effects logistic regression models.

§ Slide-confirmed symptomatic malaria diagnosed between January 2001 and March 2004.

¶ House location gives the linear distance in km between each dwelling and an index house situated in the sector of earliest human occupation in the study area. Given the nonlinear relationship between house location and risk of *Plasmodium falciparum* malaria revealed by generalized additive modeling, a quadratic term was used to fit the corresponding logistic model.

‖ The wealth index was derived from information on ownership of selected household assets, land tenure, type of housing material, and number of inhabitants per room, and used as a proxy of socioeconomic status.

Proof only

uted within the study area and to identify significant spatial clusters if present.[25] Analysis was made using the Bernoulli model implemented in the version 4.0.3 of the SaTScan software.[26] This program creates circular windows that are moved systematically throughout the geographic space to identify significant clusters of infections. The windows are centered on each of the households; with the maximum window size set to include 50% of the households (i.e., the largest possible cluster would encompass 50% of the households). For each location and size of the scanning window, SaTScan performs a likelihood ratio test to evaluate whether infections are more prevalent within that specific circular window as compared with the outside. Separate analyses were made for: 1) at least one infection with any malaria parasite during the follow-up, 2) at least one infection with *P. falciparum*, and 3) at least one infection with *P. vivax*. Only subjects who stayed in the study site during the whole follow-up period (between March–April 2004 and May 2005) were included in the spatial analysis. The *P* values were determined by 100,000 Monte Carlo replications of the data set; and a level of significance of 5% was adopted.

Ethical considerations. The study protocol was approved by the Ethical Review Board of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, Brazil (318/2002 and 538/2004), and written informed consent was obtained from each adult participant and from the parent or legal guardian of every minor.

RESULTS

Baseline malaria prevalence. Of 405 subjects five years of age or older living in the study area, 388 (95.8%) had baseline blood samples examined for malaria parasites by thick smear microscopy and 386 (95.3%) by nested PCR. Conventional microscopy revealed 20 malarial infections at baseline (overall prevalence, 5.1%), with 14 *P. vivax* infections (prevalence, 3.6%) and 6 *P. falciparum* infections (prevalence, 1.5%). All but one slide-positive subject (infected with *P. falciparum*) had fever or other malaria-related symptoms at the time of blood sampling or within 60 days before or after the baseline survey. No mixed-species infection was found by microscopy. Nested PCR, however, revealed 60 baseline malaria infections (overall prevalence, 15.5%), with *P. falciparum* found in 20, *P. vivax* in 15, and both species in 15 subjects. The overall prevalence rates of PCR-diagnosed *P. falciparum* and *P. vivax* infections at baseline were 9.1% and 7.8%, respectively; 31 of 50 (62.0%) PCR-detected infections were asymptomatic. No *P. malariae* infections were diagnosed at *t* baseline by either microscopy or PCR.

Malaria morbidity during the follow-up. The study cohort comprised 264 males and 245 females (male:female ratio, 1.08:1) followed for an average of 11.5 months (10 days to 14.5 months), and thus contributing 489.7 person-years of follow-up. A total of 393 study participants (77.2%) remained free of malaria diagnosis during the follow-up. Of the remaining subjects, 71 had a single symptomatic malaria episode, 26 had two episodes, and 19 had between 3 and 6 episodes confirmed by microscopy. No episodes of severe or complicated malaria were diagnosed. Of 195 laboratory-confirmed malaria infections diagnosed during the follow-up, *P. vivax* accounted for 114 (58.5%), *P. falciparum* for 48 (24.6%), *P. falciparum* and *P. vivax* for 32 (16.4%), and *P. vivax* and *P. malariae* for 1 (0.5%). Overall, *P. vivax* (alone or in mixed-species infections) was found in 147 malaria episodes (incidence, 30/100 person-years at risk, 95% confidence interval [CI] of 25.4–35.3/100 person-years at risk), and *P. falciparum* (alone or in mixed-species infections) was found in 80 malaria episodes (incidence, 16.3/100 person-years at risk, 95% CI of 12.9–20.3/100 person-years at risk), with a 1.8:1 species ratio. The proportions of study participants who remained free of *P. vivax* and of *P. falciparum* malaria during the follow-up were similar (82.9% and 86.8%, respectively), although the proportions of subjects with two or more consecutive episodes due to each species differed substantially (6.7% and 2.2%, respectively), possibly because of relatively high rates of *P. vivax* relapses in this area.[27] The temporal distribution of malaria episodes according to species is shown in Figure 3; the monthly incidence of *P. vivax* malaria ranged between 0.24 (April 2005) and 6.25 (May 2004) episodes/100 person-months at risk, whereas that of *P. falciparum* malaria ranged between 0 (November 2004) and 4.24 (June 2004) episodes/100 person-months at risk.

Risk factors for malaria morbidity. Mixed-effects logistic regression analysis showed that being a land clearer or sharing a house with one, living in a crowded household, and having had one or more recent slide-confirmed malaria episodes were independent predictors of the risk of having at least one malaria episode of any type during the follow-up (Table 1). The risk of malaria morbidity was highest for newcomers to the study area as the following findings suggest: 1) prolonged residence in the study area, but not subjects' age, was associated with reduced risk and 2) living in the more recently occupied sectors of the study area (increased "house location") correlated with increased risk (Table 1). For example, 1) occupation was a stronger predictor of risk of *P. falciparum* than *P. vivax* malaria, 2) sharing the house with a land-clearer was a stronger predictor of *P. vivax* than *P. falciparum* malaria, and 3) recreational fishing in different water bodies was associated with reduced risk of morbidity with either species.

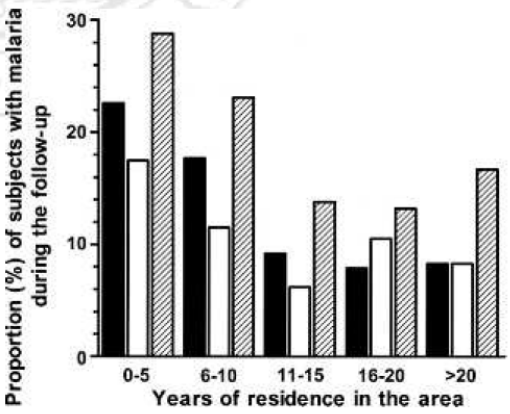


FIGURE 4. Proportions of subjects with one or more incident symptomatic infections with *Plasmodium falciparum* (black bars), *Plasmodium vivax* (white bars), and malaria episodes caused by any species (hatched bars), diagnosed between March 2004 and May 2005, according to the length of residence (in years) in the study area in rural Amazonia.

Interestingly, the positive association between poverty and malaria morbidity suggested by the exploratory analysis either disappeared (*P. vivax*) or reversed (*P. falciparum*) after adjusting for more distal determinants of malaria risk in multivariate models.

The proportions of subjects with at least one episode of symptomatic malaria diagnosed during the follow-up decreased with increasing length of residence in the study area (Figure 4). Accordingly, multivariate models showed that the probability of having malaria caused by any species and the result of solely *P. vivax* during the follow-up increased during the first 5–6 years of residence in the study area and declined sharply thereafter (Figure 5). In contrast, the probability of having *P. falciparum* malaria varied slightly less markedly with duration of residence in the area, reaching a peak at 8–9 years and decreasing slowly thereafter (Figure 5).

Spatial distribution of malaria. Complete data for spatial analysis were available for 401 subjects, residing in 107 households, who were under continuous malaria surveillance between March–April 2004 and May 2005. Spatial scan statistics revealed a single significant cluster ($P = 0.0001$) comprising 75 subjects with at least one malaria infection of any type diagnosed during the study (*v.* 42.6 expected). Therefore, 78.9% of all subjects with incident malaria lived in just 47 households (43.9%), which were inhabited by a total of 180 people (44.9% of the sample). These households were within a 6.2 km radius of each other (Figure 5). A smaller cluster, involving 36 subjects (*v.* 12.1 expected) with at least one incident episode of *P. falciparum* malaria, was also highly significant ($P = 0.0001$). Twenty-one households (19.6%), inhabited by 87 people (21.7% of the sample), comprised 64.3% of all subjects with one or more incident *P. falciparum* malaria episodes. These households were situated within a 1.9 km radius of each other and had been included in the larger cluster of malaria caused by any species. *P. vivax* malaria was also spatially clustered; the spatial scan statistics detected a single significant cluster ($P = 0.0001$) comprising 58 subjects with at least one clinical episode of slide-confirmed *P. vivax* malaria during the study (*v.* 33.2 expected). Therefore, 82.9% of all subjects who had *P. vivax* malaria lived in the 50 households (46.7%) inhabited by 190 people (47.4% of the sample). These 50 households were situated within a 6.6 km radius of

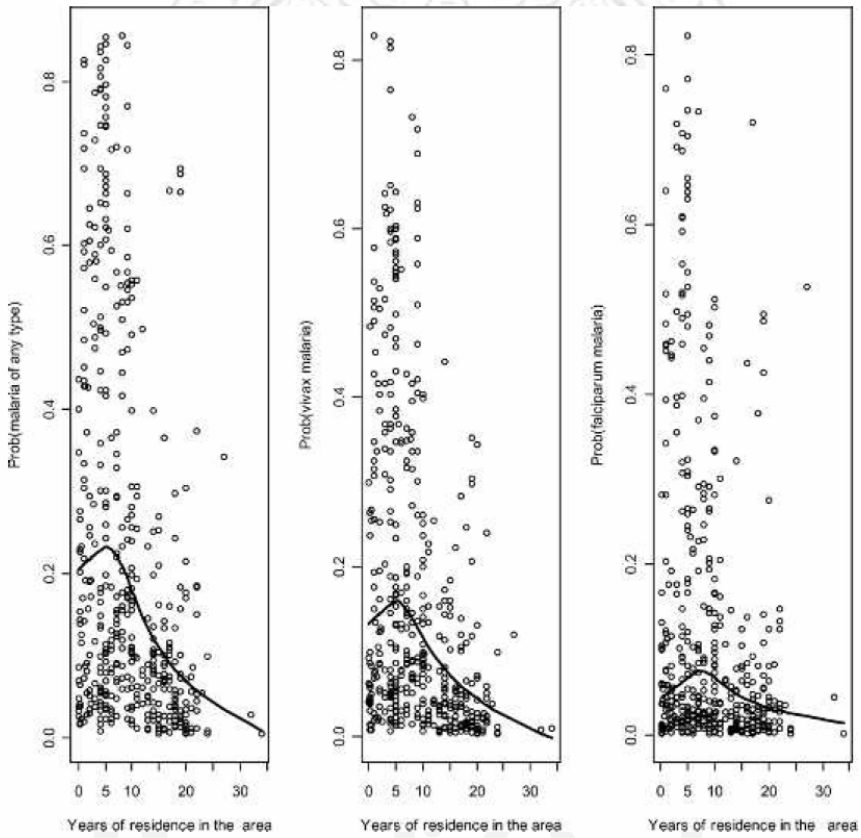


FIGURE 5. Lowess smoothed curve showing the association between length of residence in the study area (a proxy of cumulative exposure to malaria), and the probability of having of malaria of any type (left panel), *Plasmodium vivax* malaria (central panel), and *Plasmodium falciparum* malaria (right panel) during the follow-up. Circles represent individual probabilities derived from mixed-effects logistic regression models.

each other; and only three of them were not included in the larger cluster of malaria (regardless of the species) (Figure 6).

We used logistic additive models to explore the effect of the place of residence ("house location") on the odds of having malaria during the follow-up. The shapes of the association between place of residence and risk of *P. vivax* and *P. falciparum* malaria clearly differed from each other (Figure 7): although the risk of having *P. vivax* malaria increased linearly with distance from the index house, that of *P. falciparum* morbidity increased sharply at a distance of 12–15 km from the index house, peaking at 14 km. This high-risk area roughly coincides with the spatial cluster of *P. falciparum* detected by spatial scan statistics (Figure 6). The covariate "house location" explained 16.0%, 12.2%, and 20.2% of the deviance observed in logistic additive models for malaria of any type, *P. vivax* malaria and *P. falciparum* malaria, respectively ($P < 0.0001$), indicating that the place of residence was a major determinant of malaria morbidity in the study area.

DISCUSSION

Few population-based prospective studies have focused on malaria morbidity and associated risk factors in communities originating from frontier agricultural settlements in the Amazon Basin of Brazil.[28,29] The classic description of frontier malaria in Amazonia, by Sawyer,[5] comprises three stages: epidemic, transition, and endemic. The first stage is characterized by high malaria rates and the inefficacy of traditional control measures, whereas the transition period is marked by declines in malaria rates that are partially explained by improved health infrastructure and reduced mobility of settlers. Malaria transmission becomes less intense and more stable in the final stages. Our study site provides an example of how the continuous influx of settlers to the forest fringes of the original settlements creates a heterogeneous pattern of malaria transmission with both epidemic and endemic features.

At least three findings of the present study have clear implications for designing appropriate interventions against malaria in our site and other settings with similar endemicity. First, malaria morbidity is clearly associated with forest-related activities such as land clearing and, to a lesser extent farming, which together represent the primary occupation of 35.9% study participants. In addition, sharing the house with a land clearer nearly doubled the odds of having malaria, after controlling for house location and several other covariates. Because land clearing also leads to changes in relative vector abundance that may favor malaria transmission in such a modified environment,[30] this activity plays a crucial role in maintaining malaria transmission in the entire community. These circumstances are reminiscent of the well-studied

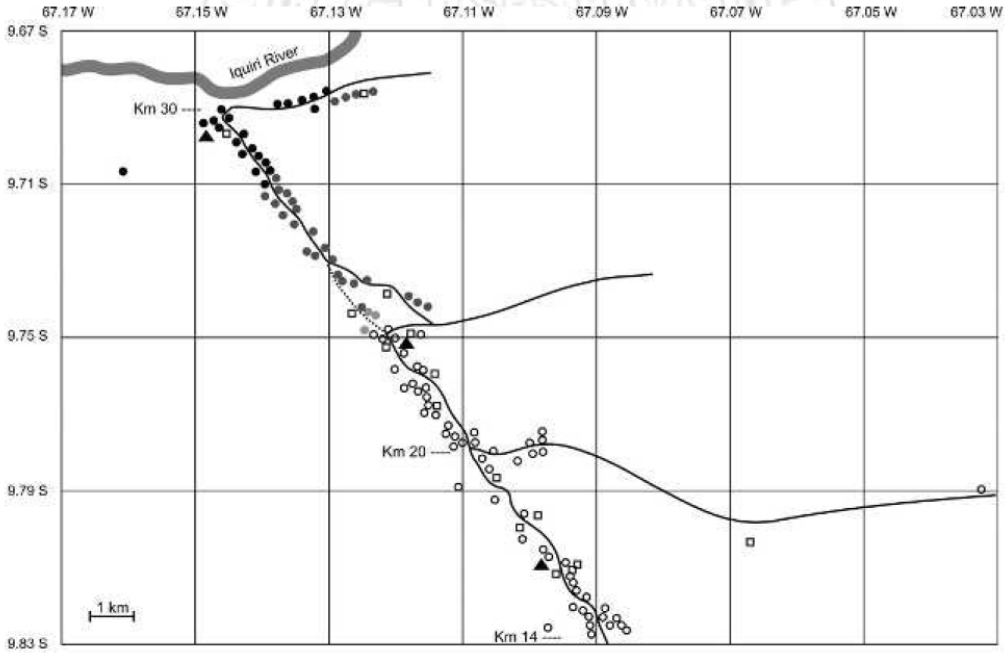


FIGURE 6. Spatial clustering of households with subjects having at least one malaria episode diagnosed during the follow-up, as detected with the spatial scan statistic.[22] Complete data for spatial analysis were available for 401 subjects distributed into 107 households, which are represented with either a black, dark gray, light gray, or white circles; households with incomplete follow-up data are represented with squares, and government-run malaria diagnosis outposts are represented with triangles. The 21 black circles show the Global Positioning System (GPS)-determined location of households included in the cluster of *Plasmodium falciparum* malaria; *Plasmodium vivax* malaria episodes were clustered into 50 households represented as either black, dark gray, or light gray circles, whereas malaria of any type was clustered into 47 households represented as either black or dark gray circles.

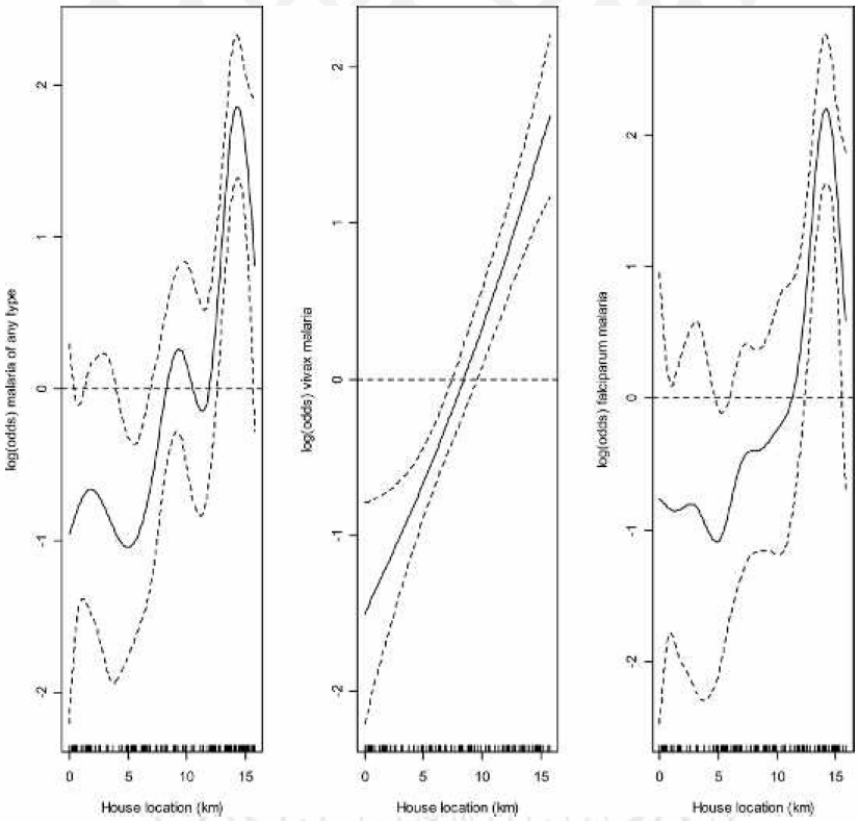


FIGURE 7. Risk of having malaria of any type (left panel), *Plasmodium vivax* malaria (central panel), and *Plasmodium falciparum* malaria (right panel) during the follow-up, expressed as log-transformed odds, according to the site of residence in the study area (house location). House location gives the linear distance in km between each dwelling and an index house situated in the sector of earliest human occupation in the study area. Data were fitted with logistic additive models with integrated smoothness estimation, using penalized regression splines; dotted lines represent the 95% confidence intervals (CI) around the spline. The horizontal dotted line corresponds to log (odds) of zero.

forest-malaria phenomenon in Southeast Asia[31,32] and call for specific individual- and community-level interventions to reduce the risk of forest-related malaria in frontier settlements of the Amazon Basin.

Second, the probability of having malaria decreases after five years of residence in the settlement, but is not affected by the subject's age. The decline in malaria morbidity with prolonged residence remains statistically significant after controlling for several factors that are potentially associated with increased malaria risk in newcomers, such as the place of residence (newcomers tend to settle in forest fringes, where transmission is more intense and environmental conditions differ from those in areas of earlier settling) and occupation (newcomers are often hired as land clearers before they can earn a living from their crops and cattle ranching). These findings suggest that gradual acquisition of clinical immunity to malaria exists under conditions of low endemicity that prevail in most communities originated from frontier settlements in rural Amazonia. Despite the relatively low levels of local malaria transmission, malaria-exposed subjects often harbor subclinical infections with very low parasite loads, most of them detected only by PCR.[33–36] Our data indicate that asymptomatic carriers may constitute a significant reservoir of malaria not only in isolated and sparsely populated riverine communities of native Amazonians,[33] but also in more densely populated agricultural settlements.

Third, we showed a significant spatial clustering of malaria risk in the study site. These results suggest that malaria control measures should be spatially targeted for maximum effect.[37] Significantly, two-thirds of subjects who had *P. falciparum* malaria episode(s) diagnosed during the follow-up lived in one-fifth of the dwellings, all situated in the more recently occupied areas of the study site. The spatial clustering of malaria revealed by this and other studies[6,7,37] indicates that selective house spraying and other household–specific interventions are possibly efficient malaria control strategies in this and other settings with similar endemicity.

Subjects with malaria episodes shortly before the baseline survey were at an increased risk for subsequent malaria infections during the follow-up, most likely a result of the continuous

exposure to some of the risk factors identified in our study. Interestingly, some predictors of malaria risk affect predominantly newcomers to the area in a synergistic way. First, the newcomers, before being able to earn the living from their own land, are often hired by local farmers to work in high-risk activities such as land clearing. Second, vacant land plots available for new settlers are often covered with native rain forest and are situated close to protected forest reserves. Extensive deforestation will thus be required before this land can be used for cultivation or cattle ranching. Finally, because most newcomers are migrants from malaria-free regions, they lack acquired immunity to malaria parasites. As a result, the continuous arrival of nonimmune settlers to occupy recently demarcated plots in the periphery of more structured colonization projects results in further environmental change that maintain malaria transmission in a number of communities in rural Amazonia.

Only two malaria parasite species, *P. vivax* and *P. falciparum*, are of public health importance in our study site. The absence of *P. malariae* in the baseline survey and the low incidence of *P. malariae* malaria during the follow-up (this parasite was found in only 1 of 195 infections) contrast with the high proportion of infections with this species (9.4–11.9%) found in other frontier areas of Brazil.[17,18] The reasons for these differences are unclear given that similar diagnostic methods were used in all studies. However, the proportions of mixed-species infections diagnosed in the baseline survey (15 of 60 PCR-diagnosed infections, 25%) and during the follow-up (33 of 195 infections, 16.9%) are within the previously reported ranges (determined by PCR) for native (5.4–36.1%)[33] and for migrant populations (25.7–30.2%)[17,18] across the Amazon Basin of Brazil.

Assessing malaria risk factors in frontier settlements is particularly challenging because of several factors: 1) there is no clear-cut correlate of cumulative exposure to malaria, as age is in rural Africa; 2) individuals cluster into households where several risk factors are shared; and 3) rural settlements usually consist of straight roads with linear or nonlinear gradients of time- and space-dependent covariates. These features were carefully considered in the present analysis, leading to the identification of several independent predictors of malaria risk in rural Amazonia that are potential targets for control measures. Further analyses of data generated by this ongoing cohort study are expected to provide additional insights into the phenomenon of frontier malaria in the Amazon Basin.

Received March 14, 2008. Accepted for publication July 7, 2008.

Acknowledgments: The authors thank the inhabitants of Ramal do Granada for their participation in the study; Sebastião Bocalom Rodrigues, Damaris de Oliveira, and Nésio M. Carvalho (Municipal Government of Acrelândia), Raimundo A. Costa and the malaria control teams in Granada and Acrelandia, for their logistic support, Adamílson Luís de Souza and Carlos E. Cavasini for help in fieldwork, Francisco das Chagas O. Luz (Ministry of Health, Brasília, Brazil) for reviewing all malaria slides, Marília Sá Carvalho and Oswaldo Gonçalves Cruz (Program of Scientific Computation, Oswaldo Cruz Foundation) for their helpful advice in the statistical analysis, Cassiano P. Nunes, for artwork, and Tatiana Havryliuk for a critical reading of the manuscript.

Financial support: CNPq (470067/2004-7) and FAPESP (03/09719-6 and 05/51988-0) to M.U.F.; scholarships from FAPESP (M.dS.N. and C.J.), and CNPq (N.S.dS. and M.U.F.) are also acknowledged.

Authors' addresses: Mônica da Silva-Nunes, Natal S. Silva, Camila Juncansen, and Marcelo U. Ferreira, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, São Paulo, São Paulo, Brazil 05508-900, E-mails: msnunes1@yahoo.com.br, natalss@gmail.com, camilacj@gmail.com, and muferrei@usp.br. Cláudia T. Codeço, Program of Scientific Computation, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil 21045-900, E-mail: codeco@fiocruz.br. Rosely S. Malafronte, Laboratory of Protozoology, Institute of Tropical Medicine of São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470, Cerqueira César, São Paulo, São Paulo, Brazil 05403-000, E-mail: rmalafronte@usp.br. Pascoal T. Muniz, Department of Health Sciences, Federal University of Acre, BR 364 km 4, Rio Branco, Acre, Brazil 69915-000, E-mail: pascoal@ufac.br.

Reprint requests: Mônica da Silva-Nunes or Marcelo U. Ferreira, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900 São Paulo (SP), Brazil, E-mails: msnunes1@yahoo.com.br and muferrei@usp.br.

REFERENCES

1. Loiola CC, da Silva CJ, Tauil PL, 2002. Malaria control in Brazil: 1965 to 2001. *Rev Panam Salud Publica 11:* 235–244.
2. Marques AC, 1987. Human migration and the spread of malaria in Brazil. *Parasitol Today 3:* 166–170.
3. National Program for Malaria Prevention and Control, Ministry of Health of Brazil. Available at: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/. Acessed January 2008.
4. Norris DE, 2004. Mosquito-borne diseases as a consequence of land use change. *EcoHealth 1:* 19–24.
5. Sawyer DR, 1988. *Frontier Malaria in the Amazon Region of Brazil: Types of Malaria Situations and Some Implications for Control.* Brasília, Pan American Health Organization/WHO/Special Programme for Research Training in Tropical Diseases.
6. de Castro MC, Monte-Mór RL, Sawyer DO, Singer BH, 2006. Malaria risk on the Amazon frontier. *Proc Natl Acad Sci USA 14:* 2452–2457.
7. de Castro MC, Sawyer DO, Singer BH, 2007. Spatial patterns of malaria in the Amazon: implications for surveillance and targeted interventions. *Health Place 13:* 368–380.
8. Silva-Nunes M, Malafronte Rdos S, Luz Bde A, Martins LC, Rodrigues SG, Chiang JO, Vasconcelos PF, Muniz PT, 2006. The Acre Project: the epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. *Cad Saude Publica 22:* 1325–1334.
9. Filmer D, Pritchett LH, 2001. Estimating wealth effects without expenditure data–or tears: an application to educational enrollments in states of India. *Demography 38:* 115–132.
10. Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, Otani S, Yamaguchi Y, Tanabe K, 1997. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Int 46:* 91–95.
11. Win TT, Lin K, Mizuno S, Liu Q, Ferreira MU, Tantular IS, Kojima S, Ishii A, Kawamoto F, 2002. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. *Trop Med Int Health 7:* 231–239.
12. Fundação Nacional de Saúde, 2001. *Diagnóstico e Tratamento da Malária.* Brasília: Ministério da Saúde, Brasil.
13. Ferreira MU, da Silva-Nunes M, Bertolino CN, Malafronte RS, Muniz PT, Cardoso MA, 2007. Anemia and iron deficiency in school children, adolescents, and adults: a community-based study in rural Amazonia. *Am J Public Health 97:* 237–239.
14. Bastos MS, da Silva-Nunes M, Malafronte RS, Hoffmann EH, Wunderlich G, Moraes SL, Ferreira MU, 2007. Antigenic polymorphism and naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in rural Amazonians. *Clin Vaccine Immunol 14:* 1249–1259.
15. Scopel KK, da Silva-Nunes M, Malafronte RS, Braga EM, Ferreira MU, 2007. Variant-specific antibodies to merozoite surface protein 2 and clinical expression of *Plasmodium falciparum* malaria in rural Amazonians. *Am J Trop Med Hyg 76:* 1084–1091.

16. Nájera JA, 2001. Malaria control: achievements, problems and strategies. *Parassitologia 43:* 1–89.
17. Cavasini MT, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU, 2000. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, western Brazilian Amazon? *Rev Soc Bras Med Trop 33:* 489–492.
18. Scopel KK, Fontes CJ, Nunes AC, Horta MF, Braga EM, 2004. High prevalence of *Plamodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop 90:* 61–64.
19. R Development Core Team, 2007. The R Foundation of Statistical Computing. Available at: http://R-project.org. Accessed between August 2007 and June 2008.
20. Sakamoto Y, Ishiguro M, Kitagawa G, 1986. *Akaike Information Criterion Statistics.* Boston: Reidel Publishing Company.
21. Cook RD, Weisberg S, 1984. *Residuals and Influence in Regression.* New York: Wiley.
22. Fox J, 1997. *Applied Regression, Linear Models, and Related Methods.* Thousand Oaks: Sage.
23. Bates D, Maechler M, Dai B, The lme4 package (2008). Available at: http://lme4.r-forge.r-project.org. Accessed June 2008.
24. Wood SN, 2004. Stable and efficient multiple smoothing parameter estimation for generalized additive models. *J Am Stat Ass 99:* 6736–6786.
25. Kulldorff M, Nagarwalla N, 1995. Spatial disease clusters: detection and inference. *Stat Med 14:* 799–819.
26. SaTScan, Software for spatial, temporal and space-time scan statistics. Available at: http://www.satscan.org/. Accessed January 2008.
27. Ferreira MU, Karunaweera ND, da Silva-Nunes M, da Silva NS, Wirth DF, Hartl DL, 2007. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. *J Infect Dis 195:* 1218–1226.
28. Camargo LM, Ferreira MU, Krieger H, de Camargo EP, da Silva LP, 1994. Unstable hypoendemic malaria in Rondonia (western Amazon region, Brazil): epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agro-industrial rural settlement. *Am J Trop Med Hyg 51:* 16–25.
29. Duarte EC, Gyorkos TW, Pang L, Abrahamowicz M, 2004. Epidemiology of malaria in a hypoendemic Brazilian Amazon migrant population: a cohort study. *Am J Trop Med Hyg 70:* 229–237.
30. Vittor AY, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Lozano WS, Pinedo-Cancino V, Patz JA, 2006. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of *Falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg 74:* 3–11.
31. Sharma VP, Kondrashin AV, 1991. Forest malaria in Southeast Asia. *Proceedings of an Informal Consultative Meeting WHO/MRC.* New Delhi: World Health Organization.
32. Erhart A, Thang ND, Hung NQ, Toi le V, Hung le X, Tuy TQ, Cong le D, Speybroeck N, Coosemans M, D'Alessandro U, 2004. Forest malaria in Vietnam: a challenge for control. *Am J Trop Med Hyg 70:* 110–118.
33. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP, 2002. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg 66:* 641–648.
34. Branch OL, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, Alvarez E, Perez EJ, Gotuzzo E, 2005. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazonian community. *Malar J 4:* 27.
35. Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, Calderon M, Lescano AG, Montenegro SH, Calampa C, Vinetz JM, 2003. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg 69:* 45–52.
36. da Silva-Nunes M, Ferreira MU, 2007. Clinical spectrum of uncomplicated malaria in semi-immune Amazonians: beyond the "symptomatic" vs "asymptomatic" dichotomy. *Mem Inst Oswaldo Cruz 102:* 341–347.
37. Carter R, Mendis KN, Roberts D, 2000. Spatial targeting of interventions against malaria. *Bull World Health Organ 78:* 1401–1411.

MATERIAL SUPLEMENTAR AO ANEXO B

B.1 Correções da prova gráfica e pareceres dos revisores do AJTMH

1. Na página 1, coluna à direita, linha 23: leia-se " Reserva da Linha 14..." ao invés de " although Reserva da Linha 14...".
2. Página 4, coluna à esquerda, linha 6: leia-se " The majority of samples were obtained before malaria treatment."
3. Página 5, Figure 3: as barras brancas correspondem a *P. falciparum* (N=80), e as barras pretas correspondem a *P. vivax* (N=147).
4. Página 6, coluna à direita, linha 25: leia-se " P > 0.05" ao invés de " P > 0.005".
5. Página 5, Tabela 1: " Recent malaria" corresponde a "slide-confirmed symptomatic malaria diagnosed between January 2001 and March 2004".
6. Página 6, Tabela 2: leia-se "n*" ao invés de "N*".
7. Página 7, coluna à direita, linha 32. Após Table 1, leia-se " When we analized risk factors for *P. vivax* and *P. falciparum* separately, a few differences emerged (Table 2)."

Decision Letter (AJTMH-08-0132)

From: ajtmh@hotmail.com

To: msnunes1@yahoo.com.br

Cc:

Subject: American Journal of Tropical Medicine & Hygiene - AJTMH-08-0132

Body: 07-May-2008
To: Dr. Mônica da Silva-Nunes, (Person not available)
From: Laura Buckley, American Journal of Tropical Medicine & Hygiene
Re: AJTMH-08-0132, MALARIA ON THE AMAZONIAN FRONTIER: TRANSMISSION DYNAMICS, RISK FACTORS, SPATIAL DISTRIBUTION AND PROSPECTS FOR CONTROL by da Silva-Nunes, Mônica; Codeço, Claudia; Malafronte, Rosely; da Silva, NATAL; Juncansen, Camila; MUNIZ, PASCOAL; Ferreira, Marcel

ACCEPT WITH MINOR REVISION

Dear Dr. da Silva-Nunes:

Below are the comments of independent reviewer(s) indicating that this manuscript contains material appropriate for the Journal, and recommending its publication, if the proposed changes are addressed. We would like to insure that the manuscript moves forward for publication without delay; therefore, it would be helpful if you would consider the following guidelines with your prompt decision to resubmit the manuscript. Revisions should be submitted within six months of receiving this message.

Please continue to use the same MS # number above. After revising the manuscript along the lines recommended by the referees, please go to http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh and click on author center. If you experience any problems with this site, please click Get Help Now button in the upper right corner of your screen.

You must provide an itemized list of your specific responses to each of the reviewers' comments, noting where the changes have been made in the revision. Authors are not mandated to agree with every reviewer comment but please include an explanation of why you feel the information should not be amended.

Please use the exact Journal format and style guidelines as they appear on the journal's website under "Instructions to Authors." The address is http://www.ajtmh.org/misc/ifora.shtml

Please specify in your revision cover letter that the material has not and will not be offered elsewhere for possible publication, as long as it is under AJTMH consideration. We also require signatures of all the contributing authors indicating that they have reviewed the revision and concur in the revised submission, if they did not agree to subsequent revisions in the original cover letter. Co-authors may FAX a copy of the cover letter with their signatures if they are not available at the time of re-submission.

If you have not yet done so, please return your signed Payment Authorization form, which you should have received shortly after submitting your manuscript.

Sincerely,
Laura Buckley
Editorial Assistant
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene
ajtmh@hotmail.com

Reviewer: 1
Comments to the Author
This is a useful study which seems well conducted and analysed, and my comments are relatively minor.

1 Page 9 (line 50-51)
Diagnostic tests such as detection of influential (not 'influent') points are described here in the methods but not mentioned later. For example, the paper doesn't say what was done about any influential points.

2 Page 10 line 46-49
It does make sense to include duration of follow-up in analysis. This should be included not as a usual covariate but as an 'offset' (effectively, a covariate whose regression coefficient is set to 1). For a cohort model the usual effect measure would be rate ratio. Here the main analysis is on presence of at least one episode but the analysis can still yield rate ratios if a) a complementary log-log link is used instead of logit link and b) the log time of follow-up is included as an offset. This is described, for example, in Collett's book Modelling Binary Data.

3 Page 30 (Table 1)
Please include the numbers positive for each row of the categorical variables in the table.

4 Page 38 (Figure 2)
It's not clear to me where this area fits in the map shown in Figure 1. Also, I suggest that this figure be used to show (eg by different shading of circle) which households were positive for malaria. This would be useful for comparing against the cluster shown in Figure 5.

5 Page 40 (Figure 4)
It may not be very clear that all the information in these figures is model output rather than empirical data. I suggest adding the latter, perhaps by two 'rugs' (like the one in Figure 6), one at the bottom to show malaria-negative people, and the other at the top to show positive ones.

Date Sent: 07-May-2008

Decision Letter (AJTMH-08-0132.R1)

From: ajtmh@hotmail.com

To: msnunes1@yahoo.com.br

Cc:

Subject: American Journal of Tropical Medicine & Hygiene - Manuscript AJTMH-08-0132.R1

Body: 07-Jul-2008
To: Dr. Mônica da Silva-Nunes, (Person not available)
From: Laura Buckley, American Journal of Tropical Medicine & Hygiene
RE: AJTMH-08-0132.R1, MALARIA ON THE AMAZONIAN FRONTIER: TRANSMISSION DYNAMICS, RISK FACTORS, SPATIAL DISTRIBUTION AND PROSPECTS FOR CONTROL by da Silva-Nunes, Mônica; Codeço, Claudia; Malafronte, Rosely; da Silva, NATAL; Juncansen, Camila; MUNIZ, PASCOAL; Ferreira, Marcel

Dear Dr. da Silva-Nunes:

Thank you for submitting your manuscript to the American Journal of Tropical Medicine & Hygiene. Your manuscript has been accepted for publication.

Please be sure that you have sent in your signed copyright form, which can be located on the journal's submission site (http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh) and that all authors have sent in a signed statement indicating participation in the study and acceptance of the original submission and subsequent revisions submitted by you. We will NOT send your manuscript to press until these items have been received.

We will contact you if questions arise during the copyediting process.

Sincerely,
Laura Buckley
Editorial Assistant
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene
ajtmh@hotmail.com

Date Sent: 07-Jul-2008

B.2 Variáveis genéticas do hospedeiro humano e resistência inata ao *Plasmodium.*

Grupo sangüíneo Duffy

Foram fenotipados 322 indivíduos utilizando-se kit comercial, dos quais 73 (22,7%) apresentaram o fenótipo a (Fy^aFy^a ou Fy^aFy), 129 (40,2%) apresentaram o fenótipo b (Fy^bFy^b ou Fy^bFy), 112 (34,9%) apresentaram o fenótipo ab (Fy^bFy^b ou Fy^bFy) e somente 7 (2,2%) foram negativos para a proteína Duffy (FyFy). A genotipagem foi realizada em 390 indivíduos. As freqüências genotípicas foram: FY/FY, 9 (2,3%); FYA/FYA, 52 (13,3%); FYB/FYB, 82 (21,0%); FYA/FYB, 141 (36,2%), FYA/FY, 34 (8,7%) e FYB/FY, 72 (18,5%). A Tabela 12 mostra a associação entre o sistema sangüíneo Duffy e malária no seguimento longitudinal, em análise univariada e ajustada para variáveis epidemiológicas (descritas no Anexo B, no artigo no prelo). Indivíduos com apenas uma cópia funcionante do gene avaliado apresentam odds semelhante aos indivíduos com duas cópias funcionantes de ter malária *vivax* e *falciparum* no seguimento longitudinal, e ligeiramente maior para malária qualquer (entretanto essa diferença não atingiu significância estatística na população estudada), sugerindo que mesmo quando há menos receptores disponíveis, o parasita ainda é capaz de invadir a hemácia eficientemente.

Polimorfismo H/R ^{131} em FcγRIIA

Esta análise foi realizada em 383 indivíduos da coorte, incluindo indivíduos que participaram do estudo desde março-abril de 2004 bem como os que ingressaram posteriormente. As freqüências genotípicas encontradas foram: 109 pessoas com genótipo R^{131}/R^{131} (RR; 0,2846 ou 28,46%), 179 pessoas com genótipo H^{131}/R^{131} (HR; 0,4674 ou 46,74%) e 95 pessoas com genótipo H^{131}/H^{131} (HH; 0,2480 ou 24,80%). Na análise não-ajustada, indivíduos com o genótipo HR tiveram odds significantemente menor do que indivíduos com o genótipo RR de ter malária *vivax* (P=0,048); para malária qualquer a significância foi limítrofe (P=0,057). Entretanto, na análise ajustada para variáveis epidemiológicas, essa diferença deixa de ser significante (P entre 0,134 e 0,277, Tabela 13), muito provavelmente devido às variáveis ocupacionais e local de moradia: indivíduos RR estão mais envolvidos com atividades ocupacionais de maior risco (44%) do que indivíduos HR (41%) ou HH (42%); além disso mais da metade desses indivíduos residem após o km 24

do ramal (56%), ao contrário dos indivíduos HR (46%) ou HH (40%), que se distribuem mais homogeneamente pela área de estudo.

Tabela 12- Associação entre sistema sangüíneo Duffy e malária.

Sistema Duffy	Genótipo	N	n	OR (IC 95%)	P	ORa (IC 95%)	P
Referência	FYA/FYA FYB/FYB FYA/FYB	275	*	1	--	1	--
Malária qualquer	FYA/FY FYB/FY	106	24	1,02 (1,75-0,92)	0,923	1,58 (0,71-3,51)	0,252
Malária *vivax*	FYA/FY FYB/FY	106	15	0,80 (0,42-1,50)	0,487	1,06 (0,44-2,56)	0,891
Malária *falciparum*	FYA/FY FYB/FY	106	15	0,99 (0,52-1,89)	0,994	1,04 (0,41-2,66)	0,919

Medidas de *odds ratio* não-ajustado (OR) e ajustado (ORa) com intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e valores de P. Indivíduos com duas cópias expressas do gene FY (FYA/FYA, FYB/FYB ou FYA/FYB, n=275, classe de referência) foram comparados com indivíduos com apenas uma ou nenhuma (FYA/FY ,FYB/FY ou FY/FY) cópia expressa do gene (n=115). Indivíduos FY/FY foram excluídos da análise. N = nº indivíduos genotipados e analisados; n= nº de indivíduos com malária durante o seguimento; * = 61 indivíduos com malária qualquer, 39 com malária *vivax* e 47 com malária *falciparum* no seguimento (Total de indivíduos analisados = 381).

Tabela 13- Polimorfismo do receptor FcγRIIA e ocorrência de malária.

Tipo de Malária	Genótipo	N	n	OR	IC 95%	P	ORa	IC 95%	P
Qualquer	RR	109	32	1	-	-	1	-	-
	HR	179	35	0,58	0,33-1,01	0,057	0,62	0,26-1,46	0,277
	HH	95	22	0,72	0,38-1,35	0,317	1,05	0,40-2,78	0,912
Malária *vivax*	RR	109	26	1	-	-	1	-	-
	HR	179	26	0,54	0,29-0,99	0,048	0,51	0,21-1,22	0,134
	HH	95	14	0,55	0,26-1,11	0,105	0,58	0,21-1,63	0,309
Malária *falciparum*	RR	109	20	1	-	-	1	-	-
	HR	179	21	0,59	0,30-1,15	0,122	0,89	0,32-2,46	0,825
	HH	95	16	0,90	0,43-1,85	0,778	2,11	0,68-6,55	0,194

Medidas de *odds ratio* não-ajustado (OR) e ajustado (ORa) com respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e valores de P. Indivíduos com genótipo H^{131}/R^{131} (HR) e H^{131}/H^{131} (HH) foram comparados com indivíduos com genótipo R^{131}/R^{131} (RR, classe de referência). N = número de indivíduos genotipados e incluídos na análise; n= número de indivíduos com malária durante o seguimento longitudinal (Total de indivíduos analisados = 383).

ANEXO C - RESPOSTA IMUNE E POLIMORFISMO ANTIGÊNICO DA PvMSP-1

Este anexo contém um artigo publicado com os dados de imunologia humoral (detecção de IgG e IgM contra antígenos recombinantes da PvMSP-1 no momento do início do estudo e em episódios agudos de malária *vivax*, e a diversidade genética da PvMSP-1 encontrada nos isolados obtidos), correspondendo ao Objetivo 3. A referência completa do artigo é:

Bastos MS, **da Silva-Nunes M**, Malafronte RS, Hoffman EH, Wunderlich G, Moraes SL, Ferreira MU. Antigenic Polymorphism and Naturally Acquired Antibodies to *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in Rural Amazonians. Clin Vaccine Immunol. 2007; 14:1249-59.

Como material suplementar, apresenta-se o *odds* de ter malária no seguimento longitudinal conforme a presença de anticorpos na linha de base, e a resposta celular a alguns antígenos recombinantes da PvMSP-1.

Este artigo descreve a resposta humoral contra a MSP-1 de *P. vivax* e complementa os dados descritos no Anexo B. O artigo em si constitui a tese de Mestrado de Melissa Bastos, que preparou os antígenos recombinantes, fez a detecção dos anticorpos e a análise molecular dos isolados. Minha participação no estudo humoral se deu na execução do trabalho de campo para obter os isolados, colaboração na interpretação dos dados imunológicos, e redação da discussão do artigo, além da análise da associação entre presença de anticorpos na linha de base e malária no seguimento longitudinal, apresentada no material suplementar. Além disso, a partir dos antígenos recombinantes preparados por Melissa, executei todo o estudo celular, bem como a análise dessa parte dos dados.

CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, Oct. 2007, p. 1249–1259 Vol. 14, No. 10
1556-6811/07/$08.00+0 doi:10.1128/CVI.00243-07
Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Antigenic Polymorphism and Naturally Acquired Antibodies to *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in Rural Amazonians[▽]†

Melissa S. Bastos,[1] Mônica da Silva-Nunes,[2] Rosely S. Malafronte,[3] Erika Hellena E. Hoffmann,[2] Gerhard Wunderlich,[2] Sandra L. Moraes,[1] and Marcelo U. Ferreira[2]*

Laboratories of Immunoepidemiology[1] and Protozoology,[3] Institute of Tropical Medicine of São Paulo, University of São Paulo, 05403-000 São Paulo, Brazil, and Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900 São Paulo, Brazil[2]

Received 13 June 2007/Returned for modification 18 July 2007/Accepted 27 July 2007

Merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* (PvMSP-1), a major target for malaria vaccine development, contains six highly polymorphic domains interspersed with conserved sequences. Although there is evidence that the sequence divergence in PvMSP-1 has been maintained over 5 million years by balanced selection exerted by the host's acquired immunity, the variant specificity of naturally acquired antibodies to PvMSP-1 remains poorly investigated. Here, we show that 15 recombinant proteins corresponding to PvMSP-1 variants commonly found in local parasites were poorly recognized by 376 noninfected subjects aged 5 to 90 years exposed to malaria in rural Amazonia; less than one-third of them had detectable immunoglobulin G (IgG) antibodies to at least one variant of blocks 2, 6, and 10 that were expressed, although 54.3% recognized the invariant 19-kDa C-terminal domain PvMSP-1_{19}. Although the proportion of responders to PvMSP-1 variants increased substantially during subsequent acute *P. vivax* infections, the specificity of IgG antibodies did not necessarily match the PvMSP-1 variant(s) found in infecting parasites. We discuss the relative contribution of antigenic polymorphism, poor immunogenicity, and original antigenic sin (the skew in the specificity of antibodies elicited by exposure to new antigenic variants due to preexisting variant-specific responses) to the observed patterns of antibody recognition of PvMSP-1. We suggest that antibody responses to the repertoire of variable domains of PvMSP-1 to which subjects are continuously exposed are elicited only after several repeated infections and may require frequent boosting, with clear implications for the development of PvMSP-1-based subunit vaccines.

Plasmodium vivax is a major public health challenge in Central and South America; the Middle East; Central, South, and Southeast Asia; Oceania; and East Africa, where 2.6 billion people are currently at risk of infection (11), and 70 to 80 million clinical cases are reported each year (22). This human pathogen reappeared in Asian countries where eradication efforts had been successful in the 1960s, such as Uzbekistan (30), Azerbaijan (16), and the Republic of Korea (18). In Brazil, *P. vivax* surpassed *Plasmodium falciparum* two decades ago as the main cause of malaria morbidity across the Amazon Basin (19) and caused 80% of the 600,000 malaria cases reported in that country in 2005 (Ministry of Health of Brazil, unpublished data). The emergence of resistance to the first-line antimalarial drug chloroquine is a major concern for the current strategies of *P. vivax* malaria control (1).

One of the main obstacles to the acquisition of antimalarial immunity is the polymorphism in potential target antigens, which enables parasites to evade immune responses elicited by past exposure to variant forms of the same antigen (6). The 200-kDa merozoite surface protein 1 (MSP-1) of *Plasmodium vivax* (PvMSP-1), a target of naturally acquired (25) and vaccine-induced (12, 40) immunity, contains six highly polymorphic domains (four of them repetitive) flanked by fairly conserved sequences (27) (Fig. 1A). The extensive sequence divergence in variable domains of PvMSP-1 (amino acid similarity, 21 to 34%) has been maintained by balanced selection over 5 million years, most likely as a result of variant-specific immune pressure (28).

Although domains under balancing selection have been suggested to represent potential candidates for malaria vaccine development (2, 3), the immune recognition of variable domains of PvMSP-1 and its role in antimalarial immunity remain poorly investigated. A decade ago, Colombian malaria patients were shown to contain antibodies that discriminated between recombinant antigens representing two highly divergent versions of block 6 (20), but no association was made between antibody response and clinical immunity. More recently, naturally acquired antibodies that recognize a recombinant protein (ICB2-5) encompassing variable blocks 2 and 4 of PvMSP-1 were associated with protection against clinical disease in Brazil (25), but it remains unknown whether protective antibodies are variant specific, since a single version of these highly polymorphic domains was used in serology, and PvMSP-1 variants have not been characterized in parasites from incident infections.

Here, we analyze the extent to which PvMSP-1 sequence diversity affects the development of antibody responses to this

* Corresponding author. Mailing address: Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900 São Paulo, Brazil. Phone: 55-11-30917746. Fax: 55-11-30917417. E-mail: muferrei@usp.br.

† Supplemental material for this article may be found at http://cvi.asm.org/.

▽ Published ahead of print on 15 August 2007.

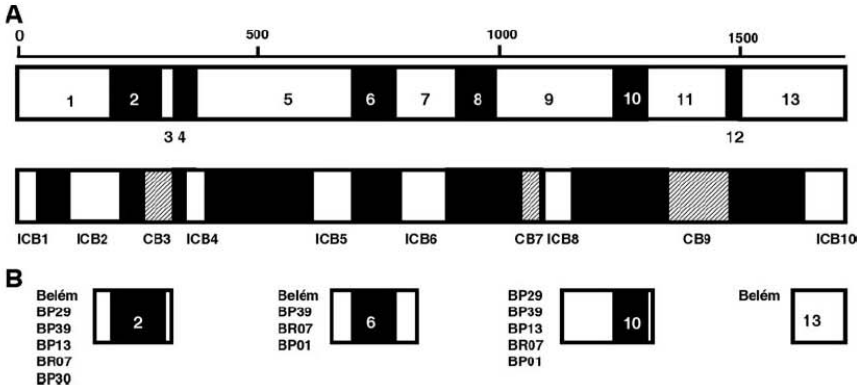


FIG. 1. Schematic representation of PvMSP-1 and the recombinant antigens used in this study. (A) The PvMSP-1 protein sequence comprises seven conserved blocks (amino acid similarity among Pv*MSP-1* allele products of 71 to 85% [represented as open boxes]) and six variable blocks (amino acid similarity of 21 to 34% [represented as black boxes]) described previously by Putaporntip et al. (27). For comparison, we also show the original division of PvMSP-1 into interspecies conserved blocks (ICB) (amino acid similarity of >48% in pairwise comparisons of *MSP-1* orthologs of *P. falciparum*, *P. vivax*, and *Plasmodium yoelii* [represented as open boxes]), conserved blocks (CB) (amino acid similarity of >50% between *P. falciparum* and *P. vivax* but lower in other pairwise comparisons [represented as hatched boxes]), and polymorphic blocks (amino acid similarity of <45% [represented as black boxes]) (5). These two ways of portioning PvMSP-1 differ in that Putaporntip et al. (27) made intraspecific-sequence comparisons, while del Portillo et al. (5) made sequence comparisons among species. Recombinant antigens used in previous studies are often named after interspecies conserved blocks (17, 24, 25, 32); for example, ICB2-5 comprises blocks 1, 2, 3, 4, and 5 defined previously by Putaporntip and others (27). (B) Location of the 16 recombinant antigens used in this study. Note that antigens corresponding to variable domains of PvMSP-1 comprise stretches of conserved flanking sequence. Block 13 antigen corresponds to ICB10, the C-terminal 19-kDa fragment of PvMSP-1.

major malaria vaccine candidate antigen. We compare naturally acquired antibody responses to three polymorphic domains and the highly conserved C-terminal domain of PvMSP-1 in a cohort of malaria-exposed rural Amazonians. We measured specific antibodies at the study baseline, in the absence of *P. vivax* infection, and during subsequent infections. Sequences of the variable domains of PvMSP-1 used in serology were characterized in local parasites circulating before and during the follow-up to confirm that the variants expressed as recombinant antigens match those to which subjects have been exposed. We discuss the relative contribution of antigenic polymorphism, poor immunogenicity, and original antigenic sin (the skew in the specificity of antibodies elicited by exposure to new antigenic variants due to preexisting variant-specific responses) to the observed patterns of antibody recognition of PvMSP-1 variants.

MATERIALS AND METHODS

Study area and population. The study protocol was approved by the Ethical Review Board of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil (protocol 318, 2002). Blood samples for serum separation and DNA extraction were collected during the first 15 months of follow-up (March 2004 to May 2005) of an ongoing, population-based cohort study in an agricultural settlement (Ramal do Granada [9°41′S-9°49′S, 67°05′W-67°07′W]) in the eastern part of the state of Acre, northwestern Brazil (see Fig. S1 in the supplemental material). Both *P. falciparum* and *P. vivax* are transmitted year-round. The study area, cohort recruitment strategies, and baseline data were described in detail elsewhere previously (31). Briefly, all households in the area were visited, and 509 residents (98.5% of the entire population of Ramal do Granada), aged between 1 day and 90 years, were enrolled from March to April 2004 (466 subjects [91.6%]) or September to October 2004 (43 subjects [8.4%]). A questionnaire was given to all study participants to obtain demographic and clinical information and assess their cumulative exposure to malaria. Since most (62.2%) subjects were migrants from malaria-free areas, their ages do not necessarily correlate with exposure to malaria. Cumulative exposure to malaria was therefore estimated as the length of residence in areas where malaria is endemic (either in Acre or elsewhere in Amazonia), while recent exposure to *P. vivax* was estimated as the number of slide-confirmed *P. vivax* malaria episodes recorded in the three local malaria diagnosis outposts between January 2001 and March 2004. The 399 study participants aged 5 years or older who had no evidence of *P. vivax* infection detected by thick-smear microscopy or PCR (15, 39) were considered to be eligible for participation in the serological study. Subjects with *P. vivax* infection at the baseline (22 infections detected by PCR only and 7 infections detected by both PCR and thick-smear microscopy [total, 29 infections in subjects aged ≥5 years]) were excluded from the serological study because current exposure to the parasite would be a major confounder in the analysis of other determinants (age and cumulative and recent exposure to malaria) of antibody reactivity; 376 (95.7%) eligible subjects had their baseline serum samples tested for antibodies to PvMSP-1.

Malaria surveillance, serum samples, and *P. vivax* isolates. Malaria episodes were diagnosed during 15 months of follow-up of our cohort population (between March 2004 and May 2005) through both active and passive case detection. For active case detection, all households in the study area were visited 5 days/week by our field team, and blood samples were collected from all subjects who had fever or other symptoms suggestive of malaria since the last visit. Additional malaria episodes were found by passive case detection when symptomatic study participants had a malaria diagnosis confirmed at one of the three government-run malaria outposts in the study area. The combined active and passive case detection strategy identified 157 episodes of symptomatic *P. vivax* infection confirmed by standardized thick-smear microscopy (38) during the cohort follow-up (489 person-years of follow-up), with an average monthly incidence of 2.67/100 person-months at risk (95% confidence interval [CI], 2.27 to 3.12/100 person-months at risk). *P. vivax* isolates from 55 (35.0%) infections were obtained for Pv*MSP-1* gene amplification and sequencing to characterize the PvMSP-1 variants circulating in the study area during the follow-up period. DNA templates for PCR amplification, isolated from 200 μl of whole blood using Wizard DNA purification kits according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI), were dissolved in 100 μl of sterile distilled water and stored at −20°C. Serum samples were obtained, at the time when acute, incident *P. vivax* infection was diagnosed, from 40 cohort subjects who were free of infection

at the baseline; levels of antibodies to PvMSP-1 were compared with those measured at the study baseline. To characterize the PvMSP-1 variants to which our study population had recently been exposed, prior to the cohort follow-up, we analyzed 27 *P. vivax* isolates collected in July 1999 from patients attending malaria clinics in the nearby towns of Acrelândia and Plácido de Castro (see Fig. S1 in the supplemental material). DNA templates for PCR amplification, isolated from 200 μl of whole blood using GFX genomic blood DNA purification kits (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), were dissolved in 100 μl of sterile distilled water and stored at −20°C (7) until used for Pv*MSP-1* gene amplification and sequencing.

Pv*MSP-1* gene amplification and sequencing. The analysis of sequence diversity and antibody recognition of PvMSP-1 focused on three polymorphic domains (blocks 2, 6, and 10) (Fig. 1) located in different parts of the molecule. Block 2 is the longest stretch of variable sequence contained in ICB2-5, a recombinant antigen recently shown to be targeted by naturally acquired protective antibodies (25). The centrally located block 6 is the most polymorphic block of PvMSP-1 (27), but little is known about the variant specificity of naturally acquired antibodies to this domain (20). Although block 10 is the longest stretch of variable sequence in the C-terminal part of PvMSP-1 (Fig. 1), no data are currently available about its immune recognition. These polymorphic domains of the Pv*MSP-1* gene were amplified with the following primers that target conserved flanking sequences (27): PVF1 (5′-CTCTGACAAAGAGCTGGAA-3′ [nucleotides 465 to 483 of the Pv*Msp-1* sequence of isolate Salvador-I]) (10) and PVR9 (5′-GCTCCTTCAGCACTTTCACGCG-3′ [nucleotides 979 to 958]) for block 2, PVF4 (5′-TACTACTTGATGGTCCTCAAAAG-3′ [nucleotides 2035 to 2057]) and PVR6 (5′-GTGCTTGTGACATGCGTA-3′ [nucleotides 2256 to 2539]) for block 6, and PVF7 (5′-CCTTAAGAATACCGAGATTTTGCTGAAG-3′ [nucleotides 3429 to 3456]) and PVR3 (5′-GCGATTACTTTGTCGTAG-3′ [nucleotides 4007 to 3990]) for block 10. The 25-μl PCR mixture contained 0.2 μM of each primer, 0.5 to 1 μl of template DNA, 2.5 μl of 10× buffer, 100 μM of each deoxynucleoside triphosphate, and 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech); thermal cycling started with a 5-min incubation at 95°C, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min, with a final 10-min extension step at 72°C. PCR products were purified with GFX PCR purification kits (Amersham Pharmacia Biotech) and sequenced on both strands with BigDye v3.1 terminator chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the forward and reverse primers described above (27). When PCR yielded two or more bands with different sizes, these bands were excised from agarose gels after electrophoretic separation, purified as described above, and sequenced separately. Sequencing reaction products were analyzed on an ABI 3100 automated DNA sequencer (Applied Biosystems). A total of 53 block 2 sequences, 69 block 6 sequences, and 59 block 10 sequences were obtained and analyzed.

Pv*MSP-1* alleles for antigen expression. Six versions of block 2 (amplified from isolates Belém, BP29, BP39, BP13, BR07, and BP30), four versions of block 6 (from isolates Belém, BP39, BR07, and BP01), five versions of block 10 (from isolates BP29, BP39, BP13, BR07, and BP01), and one version of block 13 (from isolate Belém) of PvMSP-1 were selected for the expression of recombinant antigens (Fig. 1B). Block 2 antigens comprise the whole sequence of block 2 and short stretches of the conserved blocks 1 and 3. Block 6 antigens comprise the whole sequence of block 6 and short stretches of the conserved blocks 5 and 7. Block 10 antigens comprise the whole sequence of block 10, the 3′ half of the conserved block 9, and a short stretch of the conserved block 11. Finally, the single block 13 antigen comprises the 3′ half of the conserved block 13, which corresponds to the 19-kDa product of the secondary enzymatic processing of PvMSP-1, also known as ICB10 or PvMSP-1_{19} (25, 32), which remains attached to the merozoite surface at the time of red blood cell invasion (9). This region has been shown to be invariant in Brazilian isolates of *P. vivax* (33). Table S1 in the supplemental material gives the precise locations of the fragments expressed as recombinant antigens in the Pv*MSP-1* nucleotide sequence of isolates Belém, BP29, BP39, BP13, BR07, BP30, and BP01 available in the GenBank database, while Fig. S2 in the supplemental material shows the translated amino acid sequences of the variable domain of each antigen. Isolate Belém was collected in Belém, the capital of Pará State (Eastern Brazilian Amazonia), in 1980; BR07 was collected in Porto Velho, the capital of Rondônia State (Western Brazilian Amazonia, bordering with Acre), in 1995; and BP29, BP39, BP13, BP30, and BP01 were collected in Porto Velho in 1997.

Recombinant antigen expression. For expression as recombinant proteins fused to the C terminus of *Schistosoma japonicum* glutathione *S*-transferase (GST), DNA coding for blocks 2, 6, 10, and 13 of PvMSP-1 was reamplified by PCR (as described above) from purified whole-gene amplicons kindly supplied by Somchai Jongwutiwes and Chaturong Putaporntip (Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand). PCR products were cloned into the pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and subcloned into the expression vector pGEX-3X from Amersham Pharmacia Biotech (blocks 2, 10, and 13) or pGEX-3Y, created from pGEX-3X by BamHI cleavage and subsequent blunting with Klenow polymerase (block 6). Recombinant proteins were expressed by transformed *Escherichia coli* (strain DH10B) and purified by affinity chromatography as described previously (36). GST was purified from *E. coli* transformed with the pGEX-3X vector lacking the Pv*MSP-1* insert for use as a control antigen in serology. The purity of recombinant proteins was assessed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (see Fig. S3 in the supplemental material); their recognition by control sera from malaria-exposed subjects was confirmed by Western blotting.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG and IgM antibodies. Assays with all recombinant antigens (including the GST control) were performed essentially as described previously (37). High-binding 96-well microplates (Costar, Cambridge, MA) were coated with 5 ng/well of solid-phase antigens, dissolved in 50 μl of 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6), for 18 h at 4°C. Serum samples (50 μl/well) were tested at a 1:200 dilution. After a 1-h incubation at 37°C, antibody binding to solid-phase antigen was detected with peroxidase-conjugated goat anti-human immunoglobulin G (IgG) (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD) at a 1:4,000 dilution and anti-human IgM (BioSys, Compiègne, France) at a 1:1,200 dilution. After the use of o-phenylenediamine and hydrogen peroxide at acidic pH as a substrate, absorbance values were measured at 492 nm. Corrected absorbance values were obtained by subtracting absorbance readings with GST run on the same microplate. Absorbance data used in statistical analyses correspond to corrected values. Reactivity indices (RIs) were calculated as the ratio between the corrected absorbance values of each test sample and a cutoff value for each antigen, corresponding to the average corrected absorbance for samples from 21 malaria-naïve blood donors plus 3 standard deviations. The cutoff values for IgG antibodies ranged between 0.216 and 0.460 for block 2 antigens, 0.122 and 0.311 for block 6 antigens, and 0.022 and 0.207 for block 10 antigens; the cutoff value for the block 13 antigen was 0.079. Cutoff values for IgM antibodies were 0.177 to 0.667 for block 2 antigens, 0.032 to 0.516 for block 6 antigens, 0.138 to 0.338 for block 10 antigens, and 0.103 for block 13 antigen. Positive samples had RIs greater than 1.

Statistical analyses. A database was created with SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Correlations were assessed with ρ coefficients obtained with Spearman nonparametric correlation models. Statistical significance was defined at the 5% level. Multiple logistic regression models with stepwise backward deletion were built to describe independent associations between covariates and the presence of antibodies to PvMSP-1 at the study baseline. Age, gender, and other variables associated with P values of <0.20 in unadjusted analysis were included in logistic regression models. Because the data have a nested structure, where individuals are nested within households, the assumption of independence of observations underlying standard logistic regression analysis was violated. We therefore used two-level logistic models with individual-level covariates (age, gender, time of residence in Amazonia, and recent slide-confirmed episode of *P. vivax* malaria) and household level covariates (socioeconomic status estimated by use of an asset index [8] and sector of residence within the study area). Malaria transmission is heterogeneously distributed across the Ramal do Granada because of different patterns of land use and deforestation rates. To adjust for these differences in logistic models, we divided the study area into four relatively homogeneous sectors with increasing malaria incidence: sector A (0.46 *P. vivax* episodes/100 person-months at risk between March 2004 and May 2005), sector B (0.79 *P. vivax* episodes/100 person-months at risk), sector C (3.44 *P. vivax* episodes/100 person-months at risk), and sector D (9.71 *P. vivax* episodes/100 person-months at risk). The HML software package (version 6.03; Scientific Software International, Lincolnwood, IL) was used for multilevel analysis. Only variables associated with statistical significance at the 5% level were maintained in the final models.

Nucleotide sequence accession numbers. DNA sequences obtained during this study were deposited into the GenBank database under accession numbers EF651844 to EF651876.

RESULTS

Antibody recognition of PvMSP-1 variants at the cohort baseline. We have investigated baseline antibody responses to PvMSP-1 in 376 subjects aged 5 to 90 years (median, 24 years), with a male-to-female ratio of 1.10:1. These subjects had between 1 month and 72 years of residence in Amazonia (median, 14 years), where they are continuously exposed to *P. vivax*

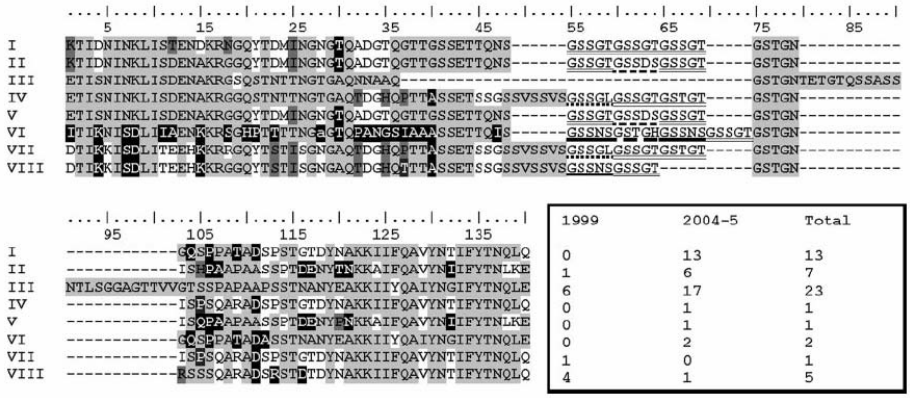


FIG. 2. The eight unique PvMSP-1 block 2 sequences found in *P. vivax* isolates circulating in the study area in 1999 and 2004 to 2005 and their absolute frequencies. The lowercase letter indicates a codon with a synonymous nucleotide replacement. Repetitive motifs are underlined. Four sequences (sequences II, III, VI, and VIII, corresponding to 69.8% of all block 2 sequences) match sequences found in recombinant antigens used in serology (BR07, BP39, BP13, and BP30, respectively). The remaining block 2 antigens, Belém and BP29, are quite similar to sequences III (91.5% amino acid identity) and VI (96.3% amino acid identity), respectively.

levels of antibodies to the BP1 version of block 10 ($\rho = -0.230$). No correlation was found between age and levels of IgG antibodies to any antigen. The total number of variants of blocks 6 and 10 recognized by IgG antibodies correlated with their time of residence in Amazonia ($\rho = 0.162$ and $\rho = 0.214$, respectively), while the number of block 2 variants recognized correlated with the number of recent slide-confirmed *P. vivax* episodes ($\rho = 0.116$).

We used multiple logistic regression models to determine whether cumulative or recent exposure to malaria predicted the presence of IgG antibodies to PvMSP-1 after controlling for several covariates putatively associated with malaria risk in our population, such as age, gender, place of residence, and socioeconomic status. The number of years of residence in Amazonia, a surrogate measure of cumulative exposure to malaria, was a strong predictor of the presence of IgG antibodies to at least one version of blocks 6 and 10 (adjusted odds ratio, 1.04; 95% CI, 1.02 to 1.07; $P = 0.001$ [identical results for blocks 6 and 10]). In other words, each additional year of exposure to malaria increased the probability of having IgG antibodies to at least one block 6 or block 10 antigen by 4% (95% CI, 2 to 7%). Recent exposure to *P. vivax*, as inferred by the occurrence of at least one slide-confirmed *P. vivax* infection between January 2001 and March 2004, was a strong predictor of the presence of IgG antibodies to block 13 at the study baseline (adjusted odds ratio, 4.16; 95% CI, 2.41 to 7.18; $P < 0.0001$) but not to other antigens. As expected, the sector of residence was also significantly associated with the presence of IgG antibodies in all models. We conclude that cumulative exposure to malaria predicted the presence and levels of IgG antibodies to many PvMSP-1 variants, while recent exposure to malaria was a strong predictor of the presence and levels of IgG antibodies to the C-terminal region of PvMSP-1.

Local repertoire of PvMSP-1 variants. To determine whether the poor recognition of variable domains of PvMSP-1 at the study baseline resulted from a mismatch between the sequences of recombinant antigens and those actually found in local parasites, we sequenced blocks 2, 6, and 10 of the Pv*MSP-1* gene from local *P. vivax* isolates circulating before (1999) and during (2004 to 2005) our cohort study. The translated amino acid sequences and their absolute frequencies in 1999 and 2004 to 2005 are shown in Fig. 2, 3, and 4. We found 8 unique block 2 sequences, 14 unique block 6 sequences, and 11 unique block 10 sequences. Note that none of these blocks can be defined as strictly dimorphic (i.e., not all sequences can be grouped as either Belém type [5] or Salvador-I type [10]), since some sequences clearly diverge from both putative prototypes, and many of them are generated by recombination between the prototypes (27). Sequences of four block 2 antigens (BP29, BP39, BP13, and BR07), two block 6 antigens (BP39 and BR07), and three block 10 antigens (BP39, BP13, and BR07) used in serological analyses were found in local parasites; the remaining antigens were very similar (amino acid similarity, 91.2 to 98.2%), although not identical, to at least one of the variants found in local isolates (Fig. 2 to 4). These results suggest that the panel of recombinant antigens used in serology properly represents the repertoire of PvMSP-1 variants to which subjects have been exposed before and during the study. As a consequence, the poor recognition of the block 2, block 6, and block 10 antigens at the study baseline cannot be ascribed to the fact that subjects are rarely exposed to these or quite similar PvMSP-1 variants.

Although all PvMSP-1 sequence types expressed as recombinant antigens were identical or quite similar to those circulating in local parasites, the reverse is not necessarily true: some relatively common local PvMSP-1 variants differed substantially from the sequence types represented in the panel of recombinant antigens. For example, the amino acid identity between block 2 sequence type I, which was particularly abundant (35.5%) among parasites collected from 2004 to 2005 (Fig. 2), and the most similar block 2 recombinant antigen, BP30 (see Fig. S2 in the supplemental material), is only 83.0%.

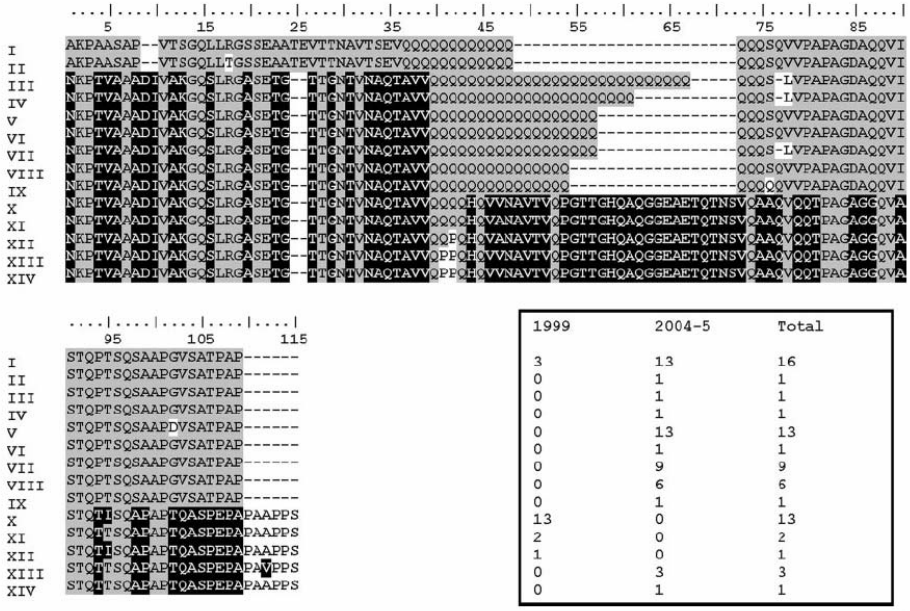


FIG. 3. The 14 unique PvMSP-1 block 6 sequences found in *P. vivax* isolates circulating in the study area in 1999 and 2004 to 2005 and their absolute frequencies. Two of the sequences (sequences I and VII, corresponding to 36.2% of all block 6 sequences) match sequences found in recombinant antigens used in serology (BR07 and BP39, respectively). The remaining block 6 antigens, Belém and BP1, are quite similar to sequences I (97.5% amino acid identity) and XII (98.1% amino acid identity), respectively.

Similarly, block 10 sequence type I (found in 7 of 42 parasites collected from 2004 to 2005) (Fig. 4) and the most similar block 10 recombinant antigen, BP29 (see Fig. S2 in the supplemental material), are only 78% identical at the amino acid level. Therefore, the recombinant antigens used in serology cover only part of the repertoire of sequences of blocks 2, 6, and 10 found in local parasites.

Interestingly, however, we found no clear association between the abundance of a given PvMSP-1 sequence type in 1999 or 2004 to 2005 and the proportion of responders to the corresponding recombinant antigen at the study baseline. For example, the BP1 version was the most frequently recognized block 6 variant at baseline (24.2% subjects had detectable IgG antibodies) (Table 1), but its sequence was not found in parasites circulating in 1999 or 2004 to 2005; the closest sequence type (sequence type XII, with 98.1% amino acid identity) was detected in only 1 of 19 parasites analyzed in 1999 and none of the 50 parasites analyzed from 2004 to 2005 (Fig. 3). In addition, block 2 sequence type III was the most abundant variant in both 1999 and 2004 to 2005 (Fig. 2) but was recognized by IgG antibodies from only 15.7% of study subjects at baseline (the corresponding recombinant antigen is BP39) (Table 1). In fact, all block 2 antigens were recognized by similar proportions of subjects (Table 1) irrespective of the relative abundance of the corresponding sequences in local parasites.

The proportion of responders to a given PvMSP-1 variant at the study baseline did not predict the risk of subsequent infections with parasites carrying that variant. For example, although block 10 antigens BR07 and BP39 were recognized by 13.8% and 9.8% of subjects at baseline (Table 1), their sequences (types V and IX) accounted for 29 of 50 (58.0%) block 10 variants observed in subsequent infections (Fig. 3). Conversely, the poor recognition of block 10 antigen BP13 at baseline (only 4.0% of subjects had specific IgG antibodies) (Table 1) did not translate into an increased risk of subsequent infection with parasites carrying the corresponding sequence (type IV), which was found in only 2 of 50 (4.0%) isolates analyzed from 2004 to 2005 (Fig. 4). However, the number of infections with known PvMSP-1 variants is too small for meaningful statistical analyses.

Antibody recognition of PvMSP-1 variants during *P. vivax* malaria episodes. Most or all serum samples from subjects experiencing acute *P. vivax* infection had IgG antibodies recognizing at least one variant of each block analyzed; the proportions of responders were 91.3% (21 of 23) for block 2 antigens, 78.6% (22 of 28) for block 6, and 100% (27 of 27) for block 10 (Fig. 5). These results suggest that the low proportion of responders detected at the study baseline, in the absence of *P. vivax* infection, cannot be ascribed to the poor immunogenicity of these variable domains. However, IgG antibodies present during acute infections often failed to match the PvMSP-1 variant characterized in infecting parasites while recognizing other, structurally nonrelated variants.

The most frequent block 2 sequences found in 23 acute

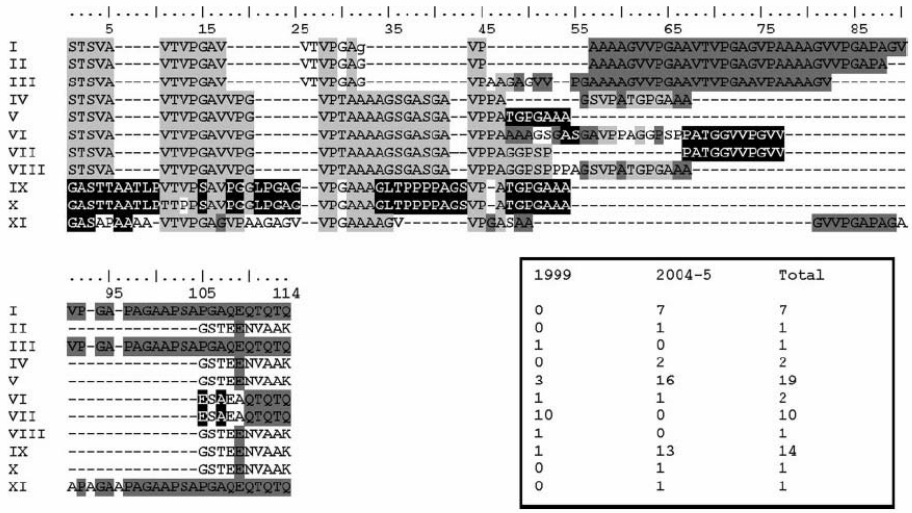


FIG. 4. The 11 unique PvMSP-1 block 10 sequences found in *P. vivax* isolates circulating in the study area in 1999 and 2004 to 2005 and their absolute frequencies. The lowercase letter indicates a codon with a synonymous nucleotide replacement. Three sequences (sequences IV, V, and IX, corresponding to 37.3% of all block 10 sequences) match sequences found in recombinant antigens used in serology (BP13, BR07, and BP39, respectively). The remaining block 10 antigens, BP1 and BP29, are quite similar to sequences XI (91.2% amino acid identity) and VI (98.2% amino acid identity), respectively.

malaria episodes with serum samples available for serology were types II and III (Fig. 5A), which are identical to those of antigens BR07 and BP39, respectively (Fig. 2). All seven subjects exposed to type II block 2 recognized the homologous antigen BR07, but only two of eight subjects exposed to type III block 2 sequences had detectable IgG antibodies to the homologous antigen BP39. These subjects who failed to mount IgG responses to BP39, despite the documented exposure to type III sequences, also failed to generate IgM antibodies to the same antigen (see Fig. S4 in the supplemental material). Comparable differences were found in the homologous recognition of block 6 antigens. Block 6 sequence types I and VII are identical to block 6 antigens BR07 and BP39 (Fig. 3), but only 3 of 10 subjects exposed to sequence type I had detectable IgG antibodies to the homologous antigen BR07, while four of five subjects exposed to the homologous antigen BP39 had specific antibodies (Fig. 5B). None of them had IgM antibodies to BR07 or BP39 (see Fig. S4 in the supplemental material). Block 10 antigens BR07 and BP39 match block 10 sequence types V and IX (Fig. 4); all subjects exposed to these sequence types had IgG antibodies to the homologous antigen, but they usually recognized other, unrelated variants as well (Fig. 5C). These findings are not unexpected, since block 10-derived recombinant proteins include the 3′ half of the conserved block 9 (Fig. 1B), which may contain common B-cell epitopes. Data shown in Fig. 5 do not reveal a clear association between patterns of IgG antibody responses to PvMSP-1 variants during acute *P. vivax* infection and cumulative exposure to malaria (measured as the time of residence in Amazonia), although the sample size is too small for formal statistical testing. The high immunogenicity of conserved block 13 (PvMSP-1_{19}) (32) was confirmed in our population: 37 of 40 (92.5%) serum samples collected during acute *P. vivax* infections had detectable IgG antibodies. The proportions of acute-phase samples with detectable IgM antibodies recognizing at least one variant of each block were low: 17.4% for block 2, none for block 6, and 44.4% for block 10 (see Fig. S4 in the supplemental material). Only 4 of 40 subjects tested (5.0%) had IgM antibodies to block 13.

Data shown in Fig. 5 do not support the original antigenic sin hypothesis, since there is no evidence that successive infections with different variants might boost preexisting antibody responses instead of generating antibodies with new specificities (34). For example, subjects 463 and 316 had IgG antibodies to block 2 variants other than BR07 at baseline but were able to seroconvert to BR07 when exposed to parasites carrying the type II sequence, while subject 373, who failed to seroconvert to BP39 when exposed to the homologous type III sequence, did not present a boost of preexisting heterologous antibodies (Fig. 5A). Although the small number of subjects with detectable IgG antibodies at baseline limits the power of this analysis, our data suggest that the original antigenic sin hypothesis (34) is unlikely to account for the observed mismatches in the variant specificities of IgG antibodies to PvMSP-1 elicited during acute *P. vivax* infections.

DISCUSSION

One of the critical issues when designing PvMSP-1-based subunit vaccines is to determine whether sequence polymorphism translates into variant-specific immunity. The notion that protective immunity targets predominantly highly poly-

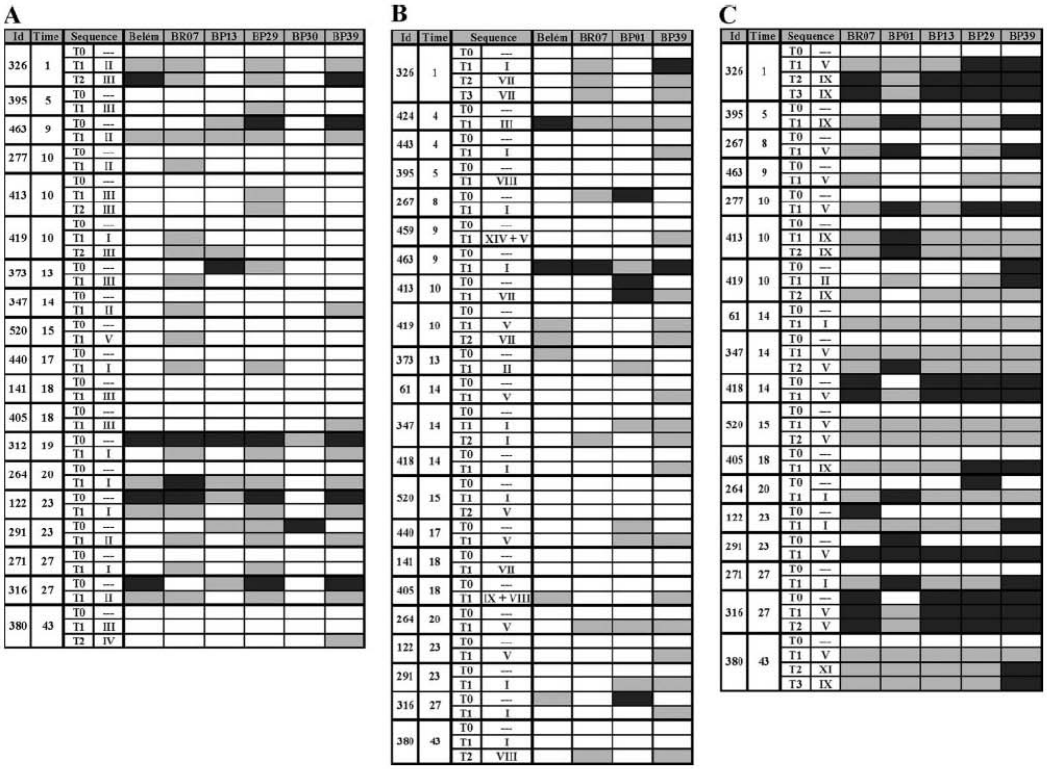


FIG. 5. IgG antibodies to PvMSP-1 variants in sequential samples from malaria-exposed rural Amazonians. "Id" refers to the identification number of each subject, and "Time" refers to the time of residence (in years) in Amazonia, a proxy of the cumulative exposure to malaria. "Sequence" indicates the PvMSP-1 sequence type(s) detected during the acute malaria infection (numbered as in Fig. 2 [block 2], Fig. 3 [block 6], and Fig. 4 [block 10]); dashes indicate the absence of malaria parasites at the time of sample collection. T0 denotes samples collected at the study baseline in the absence of *P. vivax* infection; other serum samples (T1, T2, and T3) were collected during incident *P. vivax* episodes that had the PvMSP-1 variant present in infecting parasites characterized by DNA sequencing. Serological results for incident *P. vivax* infections with parasites of undetermined PvMSP-1 type are not shown. Each box represents levels of antibodies, in an individual sample, to a given antigen. Box shading is proportional to the concentration of IgG antibodies measured by ELISA; RIs between 1.1 and 1.3 are represented with light gray shading, and RIs above 1.3 are represented with dark gray shading; negative results are represented as open boxes. (A) Data for six block 2 antigens (19 subjects; 42 samples analyzed). (B) Data for four block 6 antigens (22 subjects; 49 samples analyzed). (C) Data for five block 10 antigens (18 subjects; 45 samples analyzed). Corresponding data for IgM antibodies are shown in Fig. S4 in the supplemental material.

morphic domains of MSP-1 received recently is further supported by elegant experiments with rodent malaria parasites showing that these variable domains are selected, in a variant-specific manner, in mice previously immunized with parasites carrying heterologous MSP-1 variants (21). However, the recognition of variable domains of PvMSP-1 by naturally acquired antibodies remains poorly investigated. Here, we show that a panel of recombinant proteins corresponding to PvMSP-1 variants commonly found in local parasites was poorly recognized by noninfected subjects who are exposed to malaria in rural Amazonia (Table 1). Few subjects had detectable IgG antibodies to at least one of the several variants of blocks 2, 6, and 10 expressed as recombinant proteins, although most of them recognized the conserved C-terminal domain of PvMSP-1. The mechanisms underlying the limited immune recognition of antigenic variants that are known to circulate in a given area of endemicity remain unclear. Sequence polymorphism has surely affected the analysis of antibody recognition of PvMSP-1 variants, since the panel of recombinant antigens did not include the whole repertoire of PvMSP-1 variants found in local parasites (Fig. 2 to 4). In addition, variable antigens may be poorly immunogenic or may elicit antibody responses that are short-lived in the absence of frequent boosting (23).

The proportion of responders to PvMSP-1 variants increased substantially during subsequent *P. vivax* infections, suggesting that the poor immunogenicity of variable domains may not represent a major obstacle to variant-specific immunity (Fig. 5). Acute-phase antibody responses to block 10 antigens were particularly strong compared to those to the other variable domains analyzed despite the fact that several block

10 variants found in local parasites were not included in the panel of recombinant proteins used for serology (variants I, II, III, VII, and VIII) (Fig. 4). Because the block 10 recombinant antigens contain a long stretch of conserved sequence (see Fig. S2 in the supplemental material), these antibodies may be either cross-reactive among different variable domains or directed against conserved epitopes within these recombinant antigens. The poor correlation observed between the baseline levels of IgG antibodies to the block 10 antigens BP29 and BP01 (Table 2) suggests that the conserved sequences included in these antigens may not be a major target of naturally acquired antibodies.

However, the specificity of acute-phase IgG antibodies did not necessarily match the PvMSP-1 variants found in infecting parasites. These mismatches, which have also been observed in antibodies to *P. falciparum* MSP-1 (4, 29), might be explained (i) by the presence of PvMSP-1 variants in infecting parasites that were missed during the typing procedure, (ii) by the presence of IgG antibodies generated following recent infections with other PvMSP-1 variants, which remained undetected during the follow-up, (iii) by the generation of IgM-restricted antibody responses to some PvMSP-1 domains (24), particularly during the early phase of infection, or (iv) by clonal imprinting or antigenic original sin. We next examine these hypotheses in greater detail because of their possible implications for naturally acquired immunity and malaria vaccine development.

The first hypothesis has been suggested to explain similar mismatches of antibody specificity in *P. falciparum* infections, since parasites carrying some antigenic variants may be missed by typing procedures (the so-called "hidden genotypes") because they are sequestered in deep organs or in the placenta at the time of blood collection. We argue that hidden genotypes are very unlikely to be present in our *P. vivax* isolates. First, since deep organ sequestration does not occur in *P. vivax* infection, all variants present in a given isolate are expected to circulate in the peripheral blood, being accessible to PCR amplification and subsequent DNA sequencing. Second, additional Pv*MSP-1* alleles present in our isolates would have affected the quality of DNA sequencing of uncloned PCR products. The comparison of IgG and IgM responses to individual PvMSP-1 variants lends little support to the third hypothesis, since all *P. vivax*-infected subjects who failed to generate IgG antibodies to homologous antigens (Fig. 5) also failed to produce specific IgM antibodies to the same antigens (see Fig. S4 in the supplemental material). No definitive conclusion can be drawn, from our results, about the last hypothesis, since the numbers of individuals and sequential serum samples examined are limited. However, we found no evidence for antibodies with fixed specificity to some PvMSP-1 variants being detected in sequential serum samples (Fig. 5), as it would be expected under the clonal imprinting hypothesis (34). In fact, most mismatches did not result from the persistence of preexisting heterologous antibodies since the study baseline but rather resulted from seroconversions to heterologous antigens. Therefore, it seems more parsimonious to explain the frequent mismatches between the PvMSP-1 sequence found in infecting parasites and the antigenic variants recognized by IgG antibodies as a consequence of undetected infections with other variants that occurred between the study baseline and the subsequent blood draws.

We suggest that the acquisition of IgG antibody responses to variable (blocks 2, 6, and 10) and conserved (block 13) domains of PvMSP-1 in malaria-exposed subjects may be determined by different factors. The presence of naturally acquired IgG antibodies to ICB2-5, a recombinant antigen comprising three conserved blocks (blocks 1, 3, and 5) and two variable blocks (blocks 2 and 4) of the Belém Pv*MSP-1* allele, but not the recognition of the conserved PvMSP-1_{19} domain, was recently associated with cumulative exposure to malaria in Brazil (25). Interestingly, previous analyses suggested that antibodies to the recombinant protein ICB2-5 recognize predominantly its variable domains, blocks 2 and 4 (17). A similar association between cumulative exposure to malaria and antibody levels was found for variable PvMSP-1 domains in our population. In contrast, recent, rather than cumulative, exposure to *P. vivax* was associated with IgG antibody recognition of PvMSP-1_{19} in our noninfected subjects assessed at the study baseline. These differences may be relevant for malaria vaccine development, since natural exposure to the parasite is expected to boost immune responses elicited by immunization to maintain long-term protection. Although there are persuasive data showing that antibodies to MSP-1 may confer protection against malaria, the relative contribution of different targets to antibody-mediated protection remains unclear. The conserved 19-kDa domain of *P. falciparum* MSP-1 is a major target of naturally acquired antibodies that inhibit parasite growth in vitro (26) and reduce the risk of subsequent infection (14), but antibodies to the highly polymorphic block 2 domain of MSP-1 also seem to provide clinical protection (3). Our data suggest that antibodies to the local repertoire of variable domains of PvMSP-1 are elicited after several repeated infections and require frequent boosting, while those to PvMSP-1_{19} are more frequently detected in noninfected subjects, possibly because of their longer half-life.

This study has several limitations. First, further testing of hypotheses about the development of variant-specific antibody responses to PvMSP-1 is restricted by the relatively small number of consecutive serum samples, which were obtained during most, but not all, *P. vivax* infections experienced by each subject during the follow-up. Second, these sera were tested against a panel of recombinant antigens representing a limited number of variants of only three of six variable domains of PvMSP-1; antibody responses to variants of blocks 4, 8, and 12 have not been investigated. Third, to characterize the repertoire of PvMSP-1 variants to which the study subjects have been exposed, we were able to partially sequence a relatively small number of alleles. Fourth, the study does not have enough power to test whether the presence of variant-specific antibodies conferred protection against *P. vivax* isolates carrying homologous PvMSP-1 variants. Despite these limitations, we have provided a detailed description of naturally acquired variant-specific antibody responses to PvMSP-1. The ongoing follow-up of our cohort of malaria-exposed subjects in rural Amazonia may provide further biological material and epidemiological data for additional, in-depth analyses of naturally acquired immunity and clinical protection against *P. vivax*.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant 470067/2004-7) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grants 03/09719-6 and 05/51988-0). M.D.S.-N. and E.H.E.H. were recipients of doctoral scholarships from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, while G.W. and M.U.F. are recipients of research scholarships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

We thank the population of our field site, Ramal do Granada, for their enthusiastic participation in the study; Sebastião Bocalom Rodrigues, Damaris de Oliveira, and Nésio M. Carvalho (Municipal Government of Acrelândia); Raimundo A. Costa and the malaria control team in Acrelândia for their logistic support; Adamílson Luís de Souza, Pascoal Torres Muniz, and Natal Santos da Silva for help in fieldwork; Kézia K. G. Scopel, Erika M. Braga, Natália T. Komatsu, and Rosane Rezende D'Arcádia for PCR-based malaria diagnosis; Rogério Láuria da Silva for help with recombinant protein expression; and Francisco das Chagas O. Luz (Ministry of Health, Brasília, Brazil) for reviewing malaria slides.

REFERENCES

1. **Baird, J. K.** 2004. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. Antimicrob. Agents Chemother. **48:**4075–4083.
2. **Conway, D. J.** 1997. Natural selection on polymorphic malaria antigens and the search for a vaccine. Parasitol. Today **13:**26–29.
3. **Conway, D. J., D. R. Cavanagh, K. Tanabe, C. Roper, Z. S. Mikes, N. Sakihama, K. A. Bojang, A. M. J. Oduola, P. G. Kremsner, D. E. Arnot, B. M. Greenwood, and J. S. McBride.** 2000. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. Nat. Med. **6:**689–692.
4. **da Silveira, L. A., M. L. Dorta, E. A. S. Kimura, A. M. Katzin, F. Kawamoto, K. Tanabe, and M. U. Ferreira.** 1999. Allelic diversity and antibody recognition of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 during hypoendemic malaria transmission in the Brazilian Amazon region. Infect. Immun. **67:**5906–5916.
5. **del Portillo, H. A., S. Longacre, E. Khouri, and P. H. David.** 1991. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88:**4030–4034.
6. **Ferreira, M. U., M. da Silva-Nunes, and G. Wunderlich.** 2004. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **11:**987–995.
7. **Ferreira, M. U., N. D. Karunaweera, M. da Silva-Nunes, N. S. Silva, D. F. Wirth, and D. L. Hartl.** 2007. Population structure and transmission dynamics of *Plasmodium vivax* in rural Amazonia. J. Infect. Dis. **195:**1218–1226.
8. **Filmer, D., and L. H. Pritchett.** 2001. Estimating wealth effects without expenditure data—or tears: an application to educational enrollments in states of India. Demography **38:**115–132.
9. **Freeman, R. R., and A. A. Holder.** 1983. Surface antigens of malaria merozoites. A high molecular weight precursor is processed to an 83,000 mol wt form expressed on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. J. Exp. Med. **158:**1647–1653.
10. **Gibson, H. L., J. E. Tucker, D. C. Kaslow, A. U. Krettli, W. E. Collins, M. C. Kiefer, I. C. Bathurst, and P. J. Barr.** 1992. Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. Mol. Biochem. Parasitol. **50:**325–334.
11. **Guerra, C. A., R. W. Snow, and S. L. Hay.** 2006. Mapping the global extent of malaria in 2005. Trends Parasitol. **22:**353–358.
12. **Herrera, S., G. Corradin, and M. Arévalo-Herrera.** 2007. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. Trends Parasitol. **23:**122–128.
13. **Holder, A. A., and E. M. Riley.** 1996. Human immune response to MSP-1. Parasitol. Today **12:**173–174.
14. **John, C. C., R. A. O'Donnell, P. O. Sumba, A. M. Moormann, T. F. de Koning-Ward, C. L. King, J. W. Kazura, and B. S. Crabb.** 2004. Evidence that invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of merozoite surface protein-1 (MSP-1 19) can play a protective role against blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in individuals living in a malaria endemic area. J. Immunol. **173:**666–672.
15. **Kimura, M., O. Kaneko, Q. Liu, M. Zhou, F. Kawamoto, Y. Wataya, S. Otani, Y. Yamaguchi, and K. Tanabe.** 1997. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. Parasitol. Int. **46:**91–95.
16. **Leclerc, M. C., M. Menegon, A. Cligny, J. L. Noyer, S. Mammadov, N. Aliyev, E. Gasimov, G. Majori, and C. Severini.** 2004. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* isolates from Azerbaijan. Malar. J. **3:**40.
17. **Levitus, G., F. Mertens, M. A. Sperança, L. M. A. Camargo, M. U. Ferreira, and H. A. del Portillo.** 1994. Characterization of naturally acquired human IgG responses against the N-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **51:**68–76.
18. **Lim, C. S., S. H. Kim, J. W. Song, K. J. Song, and K. N. Lee.** 2000. Analysis of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 gene sequences from resurgent Korean isolates. Am. J. Trop. Med. Hyg. **62:**261–265.
19. **Loiola, C. C., C. J. da Silva, and P. L. Tauil.** 2002. Malaria control in Brazil: 1965 to 2001. Rev. Panam. Salud Publica **11:**235–244.
20. **Mancilla, L. I., G. Levitus, K. Kirchgatter, F. Mertens, S. Herrera, and H. A. del Portillo.** 1994. *Plasmodium vivax*: dimorphic DNA sequences form the MSP-1 gene code for regions that are immunogenic in natural infections. Exp. Parasitol. **79:**148–158.
21. **Martinelli, A., S. Cheesman, P. Hunt, R. Culleton, A. Raza, M. Mackinnon, and R. Carter.** 2005. A genetic approach to the de novo identification of targets of strain-specific immunity in malaria parasites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102:**814–819.
22. **Mendis, K. N., B. J. Sina, P. Marchesini, and R. Carter.** 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. **64:**97–106.
23. **Mercereau-Puijalon, O., T. Fandeur, M. Guillotte, and S. Bonnefoy.** 1991. Parasite features impeding malaria immunity: antigenic diversity, antigenic variation and poor immunogenicity. Res. Immunol. **142:**690–697.
24. **Mertens, F., G. Levitus, L. M. A. Camargo, M. U. Ferreira, A. P. Dutra, and H. A. del Portillo.** 1993. Longitudinal study of naturally acquired humoral immune responses against the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in patients from Rondônia, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. **49:**383–392.
25. **Nogueira, P. A., F. P. Alves, C. Fernandez-Becerra, O. Pein, N. R. Santos, L. H. Pereira da Silva, E. P. Camargo, and H. A. del Portillo.** 2006. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. Infect. Immun. **74:**2726–2733.
26. **O'Donnell, R. A., T. E. de Koning-Ward, R. A. Burt, M. Bockarie, J. C. Reeder, A. F. Cowman, and B. S. Crabb.** 2001. Antibodies against merozoite surface protein (MSP-)1_{19} are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. J. Exp. Med. **193:**1403–1412.
27. **Putaporntip, C., S. Jongwutiwes, N. Sakihama, M. U. Ferreira, W.-G. Kho, A. Kaneko, H. Kanbara, T. Hattori, and K. Tanabe.** 2002. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99:**16348–16353.
28. **Putaporntip, C., S. Jongwutiwes, T. Iwasaki, H. Kanbara, and A. L. Hughes.** 2006. Ancient common ancestry of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* as inferred from its homologue in *Plasmodium knowlesi*. Mol. Biochem. Parasitol. **146:**105–108.
29. **Scopel, K. K. G., C. J. F. Fontes, M. U. Ferreira, and E. M. Braga.** 2005. *Plasmodium falciparum*: IgG subclass antibody response to merozoite surface protein-1 among Amazonian gold miners, in relation to infection status and disease expression. Exp. Parasitol. **109:**124–134.
30. **Severini, C., M. Menegon, M. Di Luca, I. Abdullaev, G. Majori, S. A. Razakov, and L. Gradoni.** 2004. Risk of *Plasmodium vivax* malaria reintroduction in Uzbekistan: genetic characterization of parasites and status of potential malaria vectors in the Surkhandarya region. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **98:**585–592.
31. **Silva-Nunes, M., R. S. Malafronte, B. A. Luz, E. A. Souza, L. C. Martins, S. G. Rodrigues, J. O. Chiang, P. F. C. Vasconcelos, P. T. Muniz, and M. U. Ferreira.** 2006. The Acre Project: the epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. Cad. Saude Publ. **22:**1325–1334.
32. **Soares, I. S., G. Levitus, J. M. Souza, H. A. del Portillo, and M. M. Rodrigues.** 1997. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. Infect. Immun. **65:**1606–1614.
33. **Soares, I. S., J. W. Barnwell, M. U. Ferreira, M. G. Cunha, J. P. Laurino, B. A. Castilho, and M. M. Rodrigues.** 1999. A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. Mol. Med. **5:**459–470.
34. **Taylor, R. R., A. Egan, D. McGuiness, A. Jepson, R. Adair, C. Drakeley, and E. Riley.** 1996. Selective recognition of malaria antigens by human serum antibodies is not genetically determined but demonstrates some features of clonal imprinting. Int. Immunol. **8:**905–915.
35. **Taylor, R. R., D. B. Smith, V. J. Robinson, J. S. McBride, and E. M. Riley.** 1995. Human antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is serogroup specific and predominantly of the immunoglobulin G3 subclass. Infect. Immun. **63:**4382–4388.
36. **Tonhosolo, R., G. Wunderlich, and M. U. Ferreira.** 2001. Differential antibody recognition of four allelic variants of the merozoite surface protein-2 (MSP-2) of *Plasmodium falciparum*. J. Eukaryot. Microbiol. **48:**556–564.
37. **Tonon, A. P., E. H. E. Hoffmann, L. A. da Silveira, A. G. Ribeiro, C. R. S. Gonçalves, P. E. M. Ribolla, G. Wunderlich, and M. U. Ferreira.** 2004.

Plasmodium falciparum: sequence diversity and antibody recognition of the merozoite surface protein-2 (MSP-2) in Brazilian Amazonia. Exp. Parasitol. **108:**114–125.

38. **Trape, J.-F.** 1985. Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **79:**181–184.
39. **Win, T. T., K. Lin, S. Mizuno, M. Zhou, Q. Liu, M. U. Ferreira, I. S. Tantular, S. Kojima, A. Ishii, and F. Kawamoto.** 2002. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. Trop. Med. Int. Health **7:**231–239.
40. **Yang, C., W. E. Collins, J. S. Sullivan, D. C. Kaslow, L. Xiao, and A. A. Lal.** 1999. Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in *Saimiri* monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. Infect. Immun. **67:**342–349.

Antigenic Polymorphism and Naturally Acquired Antibodies to *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in Rural Amazonians
Clin. Vaccine Immunol. Bastos et al. 14: 1249

Supplemental material

Files in this Data Supplement:

- Supplemental file 1 - Fig. S1 shows a map of the state of Acre, northwestern Brazil, indicating the sites surveyed in 1999 and the site of the 2004-2005 cohort study.
  Zipped JPEG document, 1.2MB.
- Supplemental file 2 - Fig. S2 shows amino acid sequences of the variants of blocks 2, 6, and 10 and the region of block 13 corresponding to the 3□Œ portion of its gene.
  MS Word document, 66K.
- Supplemental file 3 - Fig. S3 shows Coomassie blue-stained recombinant proteins representing each PvMSP-1 variant described in Fig. 1B.
  Zipped JPEG document, 43K.
- Supplemental file 4 - Fig. S4 shows data for IgM antibodies to PvMSP-1 variants in sequential samples from malaria-exposed rural Amazonians.
  MS Word document, 32K.
- Supplemental file 5 - Table S1 provides the precise locations and GenBank sequences of PvMSP-1 gene domains.
  MS Word document, 36K.

Supplemental file 1 - Fig. S1 shows a map of the state of Acre, northwestern Brazil, indicating the sites surveyed in 1999 and the site of the 2004-2005 cohort study. Zipped JPEG document, 1.2MB

Supplemental file 2 - Fig. S2 shows amino acid sequences of the variants of blocks 2, 6, and 10 and the region of block 13 corresponding to the 3 Œ portion of its gene. MS Word document, 66K.

Block 2 antigens

Conserved flanking domains

```
       Block 1                                      Block 3
Belém  SDKELDMLKKVVLGYRKPLDNIKDDIGKLETFITKNK        EAQKLIEVLEKRVKVLKE
BP29   SDKELDMLKKVVLGYRKPLDNIKDDIGKLETFITKNK        EAQKLIAVLEKRVKVLKE
BP39   SDKELDMLKKVVLGYRKPLDNIKDDIGKLEAFITKNK        EAQKLIEVLEKRVKVLKE
BP13   SDKELDMLKKVVLGYRKPLDNIKDDIGKLETFITKNK        EAQKLIEVLEKRVKVLKE
BR07   TEKELDMLKKVVLGYRKPLDNIKDDIGKLEAFITKNK        EAQKLIEVLEKRVKVLKE
BP30   SEKELDMLKKVVLGYRKPLDNIKDDIGKLEAFITKNK        EAQKLIAVLEKRVKVLKE
```

Block 2a

```
Belém  ETISNINKLISDENAKRGGQSTNTTNGTGAQNNAAQ
BP29   ITIKNISDLIIAENKKRSGHPTTTTNGAGTQPANGSIAAASSETTQIS
BP39   ETISNINKLISDENAKRGSQSTNTTNGTGAQNNAAQ
BP13   ITIKNISDLIIAENKKRSGHPTTTTNGAGTQPANGSIAAASSETTQIS
BR07   KTIDNINKLISDENAKRGGQYTDMINGNGTQADGTQGTTGSSETTQNS
BP30   DTIKKISDLITEEHKKRGGQYTSTISGNGAQTDGHQTTTASSETSSGSSVSSVS
```

Block 2b

```
Belém  -------------------------------GSTGN
BP29   GSSNSGSSGTGSSNSGSSGTGSSNSGSSGTGSTGN
BP39   -------------------------------GSTGN
BP13   GSSNSGSTGHGSSNS----------GSSGTGSTGN
BR07   GSSGTGSSDS---------------GSSGTGSTGN
BP30   GSSNS--------------------GSSGTGSTGN
```

Block 2c

```
Belém  TETGTRSSASSNTLSGGDGTTVVGTSSPAPAAPSSTNEDYDEKKKIYQAMYNGIFYTSQLE
BP29   ------------------------GQSPPATADASSTNANYEAKKIIYQAIYNGIFYTNQLE
BP39   TETGTQSSASSNTLSGGAGTTVVGTSSPAPAAPSSTNANYEAKKIIYQAIYNGIFYTNQLE
BP13   ------------------------GQSPPATADASSTNANYEAKKIIYQAIYNGIFYTNQLE
BR07   ------------------------ISHPAAPAASSPTDENYTNKKAIFQAVYNIIFYTNLKE
BP30   ------------------------RSSSQARADSRSTDTDYNAKKIIFQAVYNTIFYTNQLQ
```

Block 6 antigens

Conserved flanking domains

```
       Block 5                                Block 7
Belém  YYLMVLKREIDKLKDFIPKIESMIATEK           TPAAAAAPAPAMSKLEYLEKLLDFLKSAYACHKH
BP39   YYLMVLKREIDKLKDFIPKIESMIATEK           TPAAAAAPAPAMSKLEYLEKLLDFLKSAYACHKH
BR07   YYLMVLKREIDKLKDFIPKIESMIATEK           TPAAAAAPAPAMSKLEYLEKLLDFLKSAYACHKH
BP01   YYLMVLKREIDKLKDFIPKIESMIATEK           TPAAAVAPAPTMSKLEYLEKLLDFLKSAYACHKH
```

Block 6

```
Belém  AKPAASAPVTSGQLLRGSSEAATEVTTNAVTSEV--------
QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQSQVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAP
BP39   NKPTVAAADIVAKGQSLRGASETGTTGNTVNAQTAVV------QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ-S-
LVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAP
BR07   AKPAASAPVTSGQLLRGSSEAATEVTTNAVTSEV----------------
QQQQQQQQQQQQQQQSQVVPAPAGDAQQVISTQPTSQSAAPGVSATPAP
BP01
       NKPTVAAADIVAKGQSLRGASETGTTGNTVNAQTAVVQQPQHQVANAVTVQPGTTGHQAQGGEAETQTNSVQAAQVQ
QTPAGAGGQVASTQTTSQAPAPTQASPEPAPAVPPS
```

Block 10 antigens

Conserved flanking domains

```
       Block 9
BP29
       LKNTEILLKYYKARAKYYIGEPFPLKTLSEESMQKEDNYLNLEKFRVLSRLEGRLGKNIELEKENISYLSSGLLHVL
TELKEIINDKKYSGKDHAKNIAEVKKALQAYQELIPKVTSQE
BP39
       LKNTEILLKYYKARAKYYIGEPFPLKTLSEESMQKEDNYLNLEKFRVLSRLEGRLGKNIELEKENISYLSSGLHHVL
TELKEIIKNKKYSGNDHTKNIAAVKEALQAYQELIPKVTTQE
BP13
       LKNTEILLKYYKARAKYYMGEPFPLKTLSEESMQKEDNYLNLEKFRVLSRLEGRLGKNIELEKENISYLSSGLLHVL
TELKEIINDKKYSGKDHAKNIAEVKKALQAYQELIPKVTSQE
BR07
       LKNTEILLKYYKARAKYYIGEPFPLKTLSEESMQKEDNYLNLEKFRVLSRLEGRLGKNIELEKENISYLSSGLHHVL
TELKEIIKNKKYSGNDHTKNIAAVKEALQAYQELIPKVTTQE
BP01
       LKNTEILLKYYKARAKYYIGEPFPLKTLSEESMQKEDNYLNLEKFRVLSRLEGRLGKNIELEKENISYLSSGLHHVL
TELKEIIKNKKYSGNDHTKNIAAVKEALQAYQELIPKVTTQE

       Block 11
BP29   AQDYAEDYDKVIA
BP39   AQDYAEDYDKVIA
BP13   AQDYAEDYDKVIA
BR07   AQDYAEDYDKVIA
BP01   AQDYAEDYDKVIA
```

Block 10

```
BP29   STSVA-----VTVPGAVVPG------
VPTAAAAGSGASGAVPPAAAAGSGASGAVPPAGGPSPPATGGVVPGVVESAEAQTKAQ
BP39   GASTTAATLPVTVPSAV-PGGLPGAGVPGAAA-GLT---PPPPAGSVPATGPGAAA-----------------
GSTEENVAAK
BP13   STSVA-----VTVPGAVVPG------VPTAAAAGSGASGAVPPAGSVPATGPGAAA-----------------
GSTEENVAAK
BR07   STSVA-----VTVPGAVVPG------VPTAAAAGSGASGAVP-----PATGPGAAA-----------------
GSTEENVAAK
BP01   GASAPAAAA-VTVPGAGVPAAAAVT-VPGAGVPAAGV---VPGA---PA---GAA-PAGAAPAGAA-----
PSAPGAQEQTQTQ
```

Block 13 antigen

Belém

```
       SSEHTCIDTNVPDNAACYRYLDGTEEWRCLLTFKEEGGKCVPASNVTCKDNNGGCAPEAECKMTDSNKIVCKCTKEG
SEPLFEGVFCSSSSFLSLSFLLLMLLFLLCMEL
```

Supplemental file 3 - Fig. S3 shows Coomassie blue-stained recombinant proteins representing each PvMSP-1 variant described in Fig. 1B. Zipped JPEG document, 43K.

Supplemental file 4 - Fig. S4 shows data for IgM antibodies to PvMSP-1 variants in sequential samples from malaria-exposed rural Amazonians. MS Word document, 32K.

Id	Time	Sequence		Belém	BR7	BP13	BP29	BP30	BP39
326	1	T0	---						
		T1	II						
		T2	III						
395	5	T0	---						
		T1	III						
463	9	T0	---						
		T1	II						
277	10	T0	---						
		T1	II						
413	10	T0	---						
		T1	III						
		T2	III						
419	10	T0	---						
		T1	I						
		T2	III						
373	13	T0	---						
		T1	III						
347	14	T0	---						
		T1	II						
520	15	T0	---						
		T1	V						
440	17	T0	---						
		T1	I						
141	18	T0	---						
		T1	III						
405	18	T0	---						
		T1	III						
312	19	T0	---						
		T1	I						
264	20	T0	---						
		T1	I						
122	23	T0	---						
		T1	I						
291	23	T0	---						
		T1	II						
271	27	T0	---						
		T1	I						
316	27	T0	---						
		T1	II						
380	43	T0	---						
		T1	III						
		T2	IV						

Id	Time	Sequence		Belém	BR7	BP1	BP39
326	1	T0	---				
		T1	I				
		T2	VII				
		T3	VII				
424	4	T0	---				
		T1	III				
443	4	T0	---				
		T1	I				
395	5	T0	---				
		T1	VIII				
267	8	T0	---				
		T1	I				
459	9	T0	---				
		T1	XIV + V				
463	9	T0	---				
		T1	I				
413	10	T0	---				
		T1	VII				
419	10	T0	---				
		T1	V				
		T2	VII				
373	13	T0	---				
		T1	II				
61	14	T0	---				
		T1	V				
347	14	T0	---				
		T1	I				
		T2	I				
418	14	T0	---				
		T1	I				
520	15	T0	---				
		T1	I				
		T2	V				
440	17	T0	---				
		T1	V				
141	18	T0	---				
		T1	VII				
405	18	T0	---				
		T1	IX + VIII				
264	20	T0	---				
		T1	V				
122	23	T0	---				
		T1	V				
291	23	T0	---				
		T1	I				
316	27	T0	---				
		T1	I				
380	43	T0	---				
		T1	I				
		T2	VIII				

Id	Time	Sequence		BR7	BP1	BP13	BP29	BP39
326	1	T0	---					
		T1	V					
		T2	IX					
		T3	IX					
395	5	T0	---					
		T1	IX					
267	8	T0	---					
		T1	V					
463	9	T0	---					
		T1	V					
277	10	T0	---					
		T1	V					
413	10	T0	---					
		T1	IX					
		T2	IX					
419	10	T0	---					
		T1	II					
		T2	IX					
61	14	T0	---					
		T1	I					
347	14	T0	---					
		T1	V					
		T2	V					
418	14	T0	---					
		T1	V					
520	15	T0	---					
		T1	V					
		T2	V					
405	18	T0	---					
		T1	IX					
264	20	T0	---					
		T1	I					
122	23	T0	---					
		T1	I					
291	23	T0	---					
		T1	V					
271	27	T0	---					
		T1	I					
316	27	T0	---					
		T1	V					
		T2	V					
380	43	T0	---					
		T1	V					
		T2	XI					
		T3	IX					

Supplemental file 5 - Table S1 provides the precise locations and GenBank sequences of PvMSP-1 gene domains.
MS Word document, 36K.

SUPPLEMENTARY TABLE S1. PvMSP-1 domains expressed as recombinant antigens for serological analysis

PvMSP-1 block	**Variant (isolate)**	**GenBank accession number**	**Nucleotides**	**Length (base pairs)**
Block 2	Belém	AF435594	517-989	473
	BP29	AF435624	523-1052	530
	BP39	AF435627	517-989	473
	BP13	AF435623	523-1022	500
	BR07	AF435630	517-1001	480
	BP30	AF435625	523-1010	488
Block 6	Belém	AF435594	2048-2506	459
	BP39	AF435627	2048-2506	459
	BR07	AF435630	2057-2491	435
	BP01	AF435623	2108-2632	525
Block 10	BP29	AF435624	3505-4119	615
	BP39	AF435627	3382-3960	579
	BP13	AF435623	3475-4035	561
	BR07	AF435630	3364-3909	546
	BP01	AF435623	3505-4101	597
Block 13	Belém	AF435594	4908-5242	335

Plasmodium vivax isolates and their full-length *PvMSP-1* gene sequences are described in Putaporntip et al. (2002); for details, see Fig. 1B and Supplementary Fig. S2.

MATERIAL SUPLEMENTAR AO ANEXO C

C.1 Associação entre a presença de anticorpos anti-PvMSP-1 na linha de base e ocorrência de malária no seguimento longitudinal.

Calculou-se o *odds* de apresentar malária no seguimento longitudinal, comparando-se indivíduos com IgG detectável na linha de base e aqueles sem IgG anti-PvMSP-1 detectável, usando-se a estratégia de análise descrita no Anexo B, com pequenas modificações. Tanto a análise univariada como a análise ajustada foram efetuadas excluindo-se da análise os indivíduos que apresentavam malária na linha de base e aqueles não submetidos ao diagnóstico de malária nesse momento do estudo (resultando em 350 indivíduos incluídos na análise). A análise ajustada incorporou todas as variáveis constantes do modelo final descrito no anexo e também os dados do polimorfismo do receptor FcγRIIA; como não houve diferença importante no *output* dos dois modelos, é apresentado aqui somente a análise ajustada para as variáveis epidemiológicas descritas no Anexo B, excluindo-se os dados de polimorfismo genético. A análise foi feita tanto para presença/ausência de anticorpos, *log* dos níveis de anticorpos e quartis de níveis de anticorpos, sendo apresentada somente a análise com presença/ausência de anticorpos. Esta análise complementa a análise de risco de malária no seguimento longitudinal descrita na página 1251 deste anexo, uma vez que aqui são considerados todos os indivíduos e não apenas aqueles cujos isolados tiveram a variante de PvMSP-1 tipada.

Na análise não-ajustada, a presença de anticorpos contra a porção C-terminal da PvMSP-1 ($MSP\text{-}1_{19}$) na linha de base esteve associada com risco de apresentar malária no seguimento (OR=2,27, P=0,009); entretanto, quando ajustado para as variáveis epidemiológicas, esse achado deixa de ser estatisticamente significante (ORa=1,57, P=0,310). Quanto à presença de anticorpos do tipo IgG contra as regiões variáveis da PvMSP-1 e a ocorrência de malária no seguimento longitudinal, não houve nenhuma associação estatisticamente significante nas análises efetuadas, o que preclude uma interpretação mais detalhada dos resultados. Os resultados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Medida de associação entre presença de anticorpos contra antígenos recombinantes da PvMSP-1 no ínicio do estudo e ocorrência de malária *vivax* no seguimento longitudinal.

REGIÃO da PvMSP-1	ALELO	Análise univariada				Análise ajustada			
		N	OR	IC 95%	P	N	ORa	IC 95%	P
Bloco 2	Belém	334	1,86	0,74-4,25	0,153	308	2,26	0,75-7,25	0,169
	BR7	334	1,25	0,48-2,88	0,607	308	0,97	0,30-3,14	0,965
	BP13	334	1,41	0,64-2,87	0,358	308	1,05	0,40-2,77	0,909
	BP29	333	1,70	0,80-3,44	0,147	307	1,50	0,55-4,05	0,422
	BP30	333	0,96	0,31-2,42	0,938	307	1,18	0,31-4,46	0,799
	BP39	334	1,32	0,58-2,74	0,471	308	1,34	0,48-3,70	0,571
Bloco 6	Belém	334	1,03	0,29-2,86	0,950	308	0,62	0,15-2,43	0,495
	BR7	334	0,62	0,14-1,88	0,463	308	0,36	0,07-1,76	0,207
	BP1	334	1,13	0,50-2,33	0,747	308	0,87	0,30-2,48	0,797
	BP39	334	0,98	0,27-2,71	0,978	308	0,51	0,12-2,07	0,348
Bloco 10	Belém	334	0,67	0,03-3,77	0,710	308	1,28	0,04-0,96	0,965
	BR7	334	1,36	0,06-9,44	0,784	308	2,10	0,13-32,22	0,593
	BP1	333	1,81	0,08-14,50	0,608	307	2,85	0,16-48,58	0,468
	BP13	334	0,77	0,04-4,45	0,809	308	0,91	0,07-11,07	0,974
	BP29	334	0,58	0,09-2,11	0,483	308	0,47	0,08-2,77	0,405
	BP39	334	0,71	0,11-2,62	0,658	308	0,79	0,12-5,14	0,806
C-terminal	$MSP\text{-}1_{19}$	334	2,27	1,23-4,33	0,009	308	1,57	0,65-3,77	0,310
N. alelos	bloco 2	334	1,13	0,91-1,36	0,223	308	1,10	0,83-1,46	0,476
	bloco 6	334	1,00	0,75-1,29	0,959	308	0,87	0,60-1,26	0,489
	bloco 10	334	0,90	0,48-1,41	0,714	308	0,93	0,50-1,74	0,839
Qualquer alelo	bloco 2	333	1,04	0,55-1,93	0,884	307	0,65	0,27-1,53	0,327
	bloco 6	334	1,03	0,48-2,07	0,924	308	0,70	0,25-1,95	0,506
	bloco 10	334	0,72	0,16-2,18	0,606	308	0,65	0,14-2,90	0,577
	Bloco 2,6 ou10	333	1,35	0,74-2,45	0,314	307	1,15	0,48-2,73	0,746

Indivíduos com infecção plasmodial sintomática ou assintomática detectada por métodos microscópicos ou moleculares na linha de base foram excluídos da análise. Classe de referência= indivíduos com sorologia negativa para cada um dos respectivos antígenos testados. IC 95% = Intervalo de confiança de 95%; ORa = o*dds ratio* ajustado para variáveis epidemiológicas. N = número de indivíduos genotipados e incluídos na análise.

C.2 Estudo imunológico celular

Especificidade da resposta celular

A composição dos doadores do estudo celular foram similares entre o grupo exposto à malária e o grupo controle (indivíduos sãos ou não-expostos) quanto a idade e sexo. A média de idade dos indivíduos do grupo exposto à malária foi de 29,7 anos, e a do grupo controle de 30,0 anos (P=0,931, Análise de Variância); a proporção de indivíduos do sexo masculino e feminino em cada grupo foi similar (aproximadamente 50% de cada sexo em cada grupo, P=0,678, Teste do Qui-Quadrado de Pearson). O número absoluto e a proporção de doadores expostos e não-expostos, cuja resposta celular foi considerada positiva conforme parâmetros descritos anteriormente, é mostrada na Tabela 15.

Comparando-se a freqüência de respondedores em cada grupo para cada antígeno testado, apenas as respostas para o bloco 2 do alelo Belém foram similares entre os dois grupos (P=0,129, Teste do Qui-Quadrado); quanto aos demais antígenos testados a diferença foi estatisticamente significante (P entre 0,000 e 0,023, Teste do Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher). Portanto, pode-se considerar que as respostas celulares observadas no grupo de pacientes expostos à malária são específicas para a exposição testada, com exceção daquelas observadas para o bloco 2 do alelo Belém.

Tabela 15 - Proporção de respondedores ao ensaio de proliferação, grupo exposto e controle.

ANTÍGENO			DOADORES EXPOSTOS			DOADORES NÃO-EXPOSTOS			P
REGIÃO	BLOCO	ALELO	N	n	% resposta	N	n	% resposta	
N-terminal	Bloco 2	Belém	27	9	33%	26	4	15,4%	0,129[a]
		BP13	27	9	33%	26	1	3.8%	0,011[b]
		BR7	27	7	26%	26	0	0.0%	0,010[b]
		Qualquer alelo	27	14	51%	26	4	15,4%	0,004[a]
	Bloco 10	Belém	26	9	35%	26	0	0%	0,002[b]
		BP1	26	11	42%	26	0	0%	0,000[a]
		BP39	26	7	27%	26	0	0%	0,010[b]
		Qualquer alelo	26	17	65%	26	0	0%	0,000[a]
	Bloco 2 ou 10	Qualquer alelo	26	19	73%	26	4	15,4%	0,000[a]
C-terminal	PvMSP-1_{19}	Belém	27	6	22%	26	0	0%	0,023[b]

N=número de indivíduos testados; n=número de doadores positivos; % resposta= proporção de respondedores;
[a] = Teste do Qui-Quadrado; [b] = Teste Exato de Fisher.

Características clínicas dos doadores expostos à malária classificados conforme o tipo de resposta celular

As características clínicas dos doadores com resposta celular positiva (respondedores) e resposta celular negativa (não-respondedores) do grupo exposto foram comparadas (Tabela 16), sendo que:

(a) A idade não se associou ao tipo de resposta celular contra os antígenos testados;

(b) O número de episódios pregressos de malária referida foi discretamente maior naqueles indivíduos que reconheceram o bloco 10 dos alelos BP1 e BP39 e o bloco 13, porém sem alcançar significância estatística;

(c) O intervalo de tempo entre o último episódio de malária confirmada e o experimento de proliferação celular não influiu no reconhecimento celular das regiões variáveis e conservada;

(d) Em geral, o tempo de residência em Acrelândia foi maior entre os indivíduos que reconheceram a região N-terminal da PvMSP-1 do que entre aqueles que não reconheceram, sugerindo que a resposta celular depende de exposição cumulativa ao *Plasmodium,* embora não se tenha obtido significância estatística devido ao pequeno número de indivíduos testados. Por outro lado, o reconhecimento celular da porção C-terminal não se associou ao tempo de residência em Acrelândia.

Esses dados sugerem que a imunidade celular contra a porção variável N-terminal da PvMSP-1 leva tempo para ser adquirida, e está relacionada à exposição cumulativa ao *Plasmodium* (indicado pelo tempo de moradia em área endêmica e número de malária prévias mas não pela idade, visto que esta é uma população migrante). A resposta celular, uma vez adquirida, parece ser duradoura e não varia em função do tempo decorrido desde o último estímulo antigênico (medido pelo intervalo de tempo entre o episódio de malária e a realização dos experimentos).

Os mecanismos que levam ao reconhecimento celular da porção C-terminal (ou que mantêm essa resposta celular) parecem ser distintos daqueles que agem no reconhecimento das regiões variáveis da PvMSP-1, uma vez que a resposta não parece estar associada com exposição cumulativa ao parasita. Esses dados sugerem que o aparecimento de linfócitos T de memória contra a região conservada da PvMSP-1 seja um evento mais comum do que a criação dessas mesmas células contra as regiões variáveis; a memória celular, uma vez desencadeada, parece ser facilmente mantida tanto para a porção N-terminal quanto para a

porção C-terminal (até 300 dias neste estudo). Obviamente, estas hipóteses não são conclusivas devido à falta de significância estatística e necessitam ser confirmadas com estudos adicionais com maior número de doadores.

Tabela 16 - Características clínicas de 27 indivíduos expostos ao *Plasmodium vivax* conforme tipo de resposta celular a antígenos recombinantes da PvMSP-1; valores expressos como mediana, seguido de valores mínimos e máximos.

Região	Alelo	Resposta celular	n	Idade em anos	P*	N. episódios pregressos de malária**	P*	Intervalo entre última malária e proliferação (dias)	P*	Tempo de Acrelândia (anos)	P*
Bloco 2	Belém	Positiva	09	35,0 (12-58)	0,877	10,0 (1-20)	0,357	55,0 (15-300)	0,979	9,00 (4,00-22)	0,119
		Negativa	18	24,5 (12-65)		5,0 (0-45)		58,5 (12-210)		6,00 (0,01-15)	
	BP13	Positiva	09	25,0 (12-65)	0,797	10,0 (1-30)	0,402	79,0 (12-300)	0,150	5,00 (0,01-22)	0,568
		Negativa	18	26,5 (12-50)		6,5 (0-45)		55,5 (15-210)		9,00 (0,02-15)	
	BR7	Positiva	07	35,0(12-65)	0,193	9,0 (2-30)	0,523	55,0 (12-150)	0,524	9,00 (0,02-22)	0,759
		Negativa	20	23,5 (12-48)		8,0 (0-45)		61,5 (15-300)		8,50 (0,01-15)	
	Qualquer	Positiva	13	35,0 (12-65)	0,369	10,0 (1-30)	0,409	56,0 (12-300)	0,923	8,50 (0,01-22)	0,864
		Negativa	14	23,0 (12-48)		5,0 (0-45)		60,0 (15-210)		9,00 (0,16-15)	
Bloco 10***	Belém	Positiva	09	35,0 (12-65)	0,571	10,0 (1-30)	0,669	63,0 (12-150)	0,957	7,00 (1,00-22)	0,430
		Negativa	17	24,0 (12-50)		8,5 (0-45)		57,0 (15-300)		9,00 (0,01-15)	
	BP1	Positiva	11	32,0 (12-65)	1,000	10,0 (2-45)	0,123	57,0 (12-300)	0,452	9,00 (0,02-15)	0,432
		Negativa	15	25,0 (12-58)		3,50 (0-30)		60,0 (15-120)		7,00 (0,01-22)	
	BP39	Positiva	07	19,0 (12-65)	0,728	10,0 (1-30)	0,224	54,0 (12-300)	0,908	9,00 (4,00-14)	0,321
		Negativa	19	29,0 (12-58)		6,5 (0-45)		60,0 (15-210)		7,00 (0,01-22)	
	Qualquer	Positiva	17	25,0 (12-65)	0,978	9,0 (1-45)	0,412	57,0 (12-300)	0,553	9,00 (0,02-22)	0,134
		Negativa	9	29,0 (12-48)		7,0 (0-30)		60,0 (15-80)		1,33 (0,01-13)	
Blocos 2 ou 10	Qualquer	Positiva	19	25,0 (12-65)	0,954	9,5 (1-45)	0,287	57,0 (12-300)	0,686	9,00 (0,01-22)	0,280
		Negativa	7	29,0 (12-48)		5,0 (0-30)		60,0 (15-80)		1,33 (0,16-13)	
Bloco 13	$MSP\text{-}1_{19}$	Positiva	06	24,0 (13-50)	0,559	9,5 (2-45)	0,169	88,5 (52-300)	0,109	8,50 (0,02-11)	0,798
		Negativa	21	25,0 (12-65)		5,0 (0-30)		57,0 (12-150)		9,00 (0,01-22)	

n= número de doadores em cada categoria; * = teste de Mann-Whitney, ** = 26 indivíduos com número de malárias pregressas conhecido, *** = 26 indivíduos testados.

*Resposta humoral contra a Pv*MSP-1 *nos doadores expostos submetidos à proliferação celular.*

A resposta humoral (quantificação de IgG e IgM, Tabela 17) dos indivíduos expostos à malária contra os mesmos antígenos recombinantes da PvMSP-1 usados no estudo celular, foi efetuada para se comparar ambos os tipos de resposta imune no mesmo grupo de indivíduos.

Quanto à imunogenicidade das regiões variáveis e conservada, observamos na Tabela 16 que anticorpos do tipo IgG foram mais freqüentemente detectados contra a região C-terminal (77,8%) do que contra a região N-terminal (44,4%); entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significante (P=0,182, Teste Exato de Fisher). Quanto aos anticorpos do tipo IgM a diferença (29,6% para a PvMSP-1_{19} e 11,1% para a porção N-terminal) também não foi estatisticamente significante (P=0,201, Teste Exato de Fisher).

Observamos na Tabela 16 que os anticorpos do tipo IgG foram mais freqüentemente detectados nos doadores expostos do que os anticorpos do tipo IgM contra as regiões e alelos testados (com exceção do alelo BP1). Em relação à presença simultânea de anticorpos IgG e IgM no mesmo indivíduo, houve concordância entre os exames para o bloco 2 (todo e qualquer alelo testado). Para o bloco 10 e a porção C-terminal não houve concordância entre a presença de IgG e IgM, ou seja, os anticorpos do tipo IgG foram mais freqüentemente detectados (P = 0,006 e P=0,001, respectivamente, Teste de McNemar) do que os anticorpos do tipo IgM para o mesmo indivíduo (com exceção do alelo BP1).

Tabela 17 - Freqüência de anticorpos do tipo IgG e IgM contra a PvMSP-1 no soro de indivíduos expostos à malária conforme a região, bloco e alelo testados.

Antígeno da PvMSP-1			DOADORES EXPOSTOS				P *
			IgG (N=27)		IgM (N=27)		
REGIÃO	BLOCO	ALELO	n	% resposta	n	% resposta	
N-terminal	bloco 2	Belém	5	18,5%	1	03,7%	0,125
		BP13	4	14,8%	0	00,0%	0,125
		BR7	2	07,4%	3	11,1%	1,000
		Qualquer alelo	6	22,2%	3	11,1%	0,453
	bloco 10**	Belém	6	22,2%	0	00,0%	0,031
		BP1	1	03,7%	1	03,7%	1,000
		BP39	9	33,3%	0	00,0%	0,004
		Qualquer alelo	11	40,7%	1	03,7%	0,006
	Bloco 2 ou 10	Qualquer alelo	12	44,4%	3	11,1%	0,012
C-terminal	PvMSP-1_{19}	conservada	21	77,8%	8	29,6%	0,001

* = Teste de McNemar, ** = somente 26 indivíduos testados, N= total de indivíduos testados, n = número de indivídos testados para anticorpos contra cada alelo.

Características clínicas dos doadores expostos à malária conforme tipo de resposta humoral

Não houve associação entre idade e número de episódios pregressos de malária e a presença de anticorpos do tipo IgG no soro coletado no dia do experimento de proliferação celular (Tabela 18). O intervalo de tempo decorrido entre o último episódio de malária e a coleta de sangue não se associou com a presença de anticorpos contra as regiões variáveis, mas sim contra a região conservada (P = 0,009, teste de Mann-Whitney, Tabela 18), enquanto o tempo de residência em Acrelândia só se associou com a presença de anticorpos contra o bloco 10, alelo Belém (P limítrofe de 0,064, teste de Mann-Whitney, Tabela 18). Para anticorpos do tipo IgM, a única associação significante foi que indivíduos com IgM detectável tinham menor intervalo de tempo decorrido entre o último episódio de malária e a coleta de sangue (30,50 dias) do que indivíduos sem anticorpos IgM detectáveis (68 dias, P = 0,05, teste de Mann-Whitney, dados não-mostrados).

Entretanto, ao calcular o coeficiente de correlação de Spearman (r_S) entre os níveis de anticorpos e as variáveis clínicas (Tabela 19), os resultados são um pouco diferentes: o intervalo de tempo entre a coleta de sangue e o último episódio de malária *vivax* teve uma correlação negativa com os níveis de anticorpos do tipo IgG contra a maioria dos antígenos testados, embora somente tenha atingido significância estatística para o bloco 10, alelo BP39 (r_S =-0,503, P=0,01) e a MSP-1_{19} (r_S=-0,661, P = 0,01). Em outras palavras, os anticorpos detectáveis do tipo IgG diminuem com o passar do tempo, sendo em geral detectáveis até 80 dias após a exposição ao *Plasmodium.* O número de episódios pregressos de malária teve correlação negativa significante para o bloco 10 alelo BP1 (r_S=-0,417, P=0,05); para os demais antígenos testados houve discreta associação negativa não-significante. Já idade e tempo de residência em Acrelândia não se correlacionaram com os níveis de anticorpos do tipo IgG. Quanto aos níveis de IgM, somente houve associação estatisticamente significante entre os níveis de IgM-anti-MSP-1_{19} e o tempo decorrido após a infecção, e níveis de IgM contra o bloco 10 do alelo BP1 e tempo de residência em Acrelândia.

Em resumo, não houve associação importante entre exposição cumulativa e reconhecimento humoral das regiões variáveis e conservada; entretanto, a resposta humoral varia em função do tempo decorrido desde o estímulo antigênico. A interpretação desses resultados é limitada, entretanto, pelo pequeno número de indivíduos testados. Além disso, o intervalo de tempo entre a última malária e o experimento celular e dosagem de IgG foi maior no grupo de respondedores às custas de dois indivíduos cujo intervalo de tempo foi de 120 e 300 dias. É possível que nesse período tenha ocorrido uma exposição ao *Plasmodium* que tenha sido assintomática, e portanto não identificada, confundindo dessa forma a análise.

Tabela 18 - Características clínicas de 27 indivíduos expostos ao *Plasmodium vivax* conforme tipo de resposta humoral (presença de IgG detectável) contra antígenos recombinantes da PvMSP-1.

Região	Alelo	Resposta humoral (IgG)	n	Idade em anos	P*	N. episódios pregressos de malária**	P*	Intervalo entre última malária e proliferação (dias)	P*	Tempo de Acrelândia (anos)	P*
Bloco 2	Belém	Positiva	5	35,0 (19-58)	0,111	2,0 (1-30)	0,844	57,0 (26- 81)	0,779	9,00 (0,02-22)	0,550
		Negativa	22	23,5 (12-65)		9,0 (0-45)		60,0 (12-300)		8,50 (0,01-15)	
	BP13	Positiva	4	32,0 (19-58)	0,393	1,5 (0-10)	0,143	62,5 (26- 81)	0,891	7,00 (0,50-22)	0,809
		Negativa	23	24,0 (12-65)		9,0 (0-45)		57,0 (12-300)		9,00 (0,01-15)	
	BR7	Positiva	2	27,0 (19-35)	0,963	5,5 (1-10)	0,699	63,0 (45- 81)	0,781	7,00 (5,00-09)	0,963
		Negativa	25	25,0 (12-65)		8,5 (0-45)		57,0 (12-300)		9,00 (0,01-20)	
	Qualquer	Positiva	6	35,0 (19-58)	0,122	2,0 (0-30)	0,375	58,5 (26- 81)	0,884	7,00 (0,02-22)	0,970
		Negativa	21	23,0 (12-65)		9,0 (0-45)		57,0 (12-300)		9,00 (0,01-15)	
Bloco 10**	Belém	Positiva	6	32,0 (16-47)	0,599	1,0 (0-20)	0,124	51,0 (15- 80)	0,521	0,33 (0,01-14)	0,064
		Negativa	21	24,0 (12-65)		9,0 (0-45)		60,0 (12-300)		9,00 (0,25-22)	
	BP1	Positiva	1	16	0,403	--	--	79	0,441	0,01	0,092
		Negativa	26	27,0 (12-65)		8,5 (0-45)		57,0 (12-300)		9,00 (0,02-22)	
	BP39	Positiva	9	35,0 (12-58)	0,354	3,5 (0-30)	0,485	37,0 (15- 79)	0,076	1,33 (0,01-22)	0,659
		Negativa	18	24,0 (12-65)		9,5 (0-45)		70,0 (12-300)		9,00 (0,50-14)	
	Qualquer	Positiva	6	29,0 (12-58)	0,474	2,0 (0-30)	0,090	45,0 (15- 80)	0,109	1,33 (0,01-22)	0,470
		Negativa	21	24,0 (12-65)		10,0 (0-45)		70,0 (12-300)		9,00 (1,00-14)	
Blocos 2 ou 10	Qualquer	Positiva	12	32,0 (12-58)	0,366	2,0 (0-30)	0,144	51,0 (15- 81)	0,232	3,16 (0,01-22)	0,375
		Negativa	15	23,0 (12-65)		10,0 (0-45)		63,0 (12-300)		9,00 (1,00-14)	
Bloco 13	$MSP\text{-}1_{19}$	Positiva	6	22,0 (12-44)	0,293	7,5 (1-45)	0,783	125,5 (45-300)	0,009	9,00 (1,00-11)	0,480
		Negativa	21	29,0 (12-65)		8,5 (0-30)		55,0 (12- 120)		7,00 (0,01-22)	

Valores expressos como mediana (mínimo - máximo). n= número de doadores em cada categoria; * = teste de Mann-Whitney, ** = somente 26 indivíduos com número de malárias pregressas conhecido, *** = somente 26 indivíduos testados.

Tabela 19- Coeficiente de correlação entre características clínicas de 27 indivíduos expostos ao *Plasmodium vivax*, e níveis de anticorpos do tipo IgG e IgM, para diferentes regiões da PvMSP-1.

Tipo de anticorpo	**Região da PvMSP-1**	**Alelo**	**Média IR (DP)**	**Variação IR**	**idade**		**N. episódios pregressos de malária***		**Intervalo entre última malária e coleta (dias)**		**Tempo em Acrelândia (anos)**	
					r_S	P	r_S	P	r_S	P	r_S	P
IgG	Bloco 2	Belém	0,52 (0.63)	0,00-2,69	0,203	NS	-0,137	NS	-0,064	NS	-0,013	NS
		BP13	0,52 (0.50)	0,00-1,83	0,175	NS	-0,146	NS	-0,190	NS	-0,115	NS
		BR7	0,38 (0.32)	0,00-1,13	0,085	NS	-0,351	NS	-0,100	NS	-0,057	NS
	Bloco 10**	Belém	0,81 (0.61)	0,00-3,42	0,094	NS	-0,300	NS	-0,020	NS	-0,327	NS
		BP1	0,29 (0.37)	0,00-1,72	0,011	NS	-0,417	0,05	-0,205	NS	-0,207	NS
		BP39	0,86 (0.67)	0,19-2,43	0,371	NS	0,008	NS	-0,503	0.01	-0,068	NS
	C-terminal	$MSP\text{-}1_{19}$	20,40 (18.19)	0,00-55,88	0,323	NS	-0,187	NS	-0,661	0,01	-0,131	NS
IgM	Bloco 2	Belém	0,04 (0.07)	0,00-0,31	0,026	NS	-0,129	NS	-0,224	NS	0,064	NS
		BP13	0,19 (0.26)	0,00-1,13	-0,057	NS	-0,102	NS	-0,086	NS	0,196	NS
		BR7	0,27 (0.47)	0,00-1,82	-0,256	NS	-0,123	NS	0,173	NS	0,004	NS
	Bloco 10**	Belém	0,17 (0.22)	0,00-1,10	-0,007	NS	0,142	NS	0,069	NS	0,185	NS
		BP1	0,31 (0.31)	0,00-1,60	-0,012	NS	-0,018	NS	0,059	NS	-0,453	0,05
		BP39	0,19 (0.20)	0,00-0,66	0,059	NS	-0,147	NS	-0,004	NS	-0,239	NS
	C-terminal	$MSP\text{-}1_{19}$	2,14 (4,54)	0,00-16,97	0,201	NS	-0,133	NS	-0,563	0,01	0,151	NS

IR= Índice de Reatividade, DP= Desvio Padrão, r_S = Coeficiente de Correlação de Spearman, NS = não significante, * = somente 26 indivíduos com número de malárias pregressas conhecido, ** = somente 26 indivíduos testados.

*Comparação das repostas celular e humoral contra os antígenos recombinantes da Pv*MSP-1

Quando comparamos a concordância da resposta celular com a resposta humoral (IgG) obtida dentro do grupo exposto (Tabela 20), vemos que as respostas celular e humoral para cada um dos alelos testados para o bloco 2 (P entre 0,180 e 0,239; Teste de McNemar) são concordantes entre si no mesmo indivíduo, bem como as respostas contra o bloco 10 dos alelos Belém e BP39 (P= 0.581 e 0,791, respectivamente; Teste de McNemar), indicando que um mesmo indivíduo freqüentemente apresenta concomitantemente reconhecimento humoral e celular daquela região testada. As respostas contra o bloco 10 do alelo BP39 e a PvMSP-1_{19} são discordantes entre si para um mesmo indivíduo; o alelo BP1 induziu resposta celular em 42% dos indivíduos testados e resposta humoral somente em 3,7% dos doadores testados (P=0,006, Teste de McNemar), enquanto anticorpos anti-MSP-1_{19} foram detectados em 77,8% dos doadores testados, mas somente 22% deles tiveram resposta celular contra essa porção da molécula (P=0,001, Teste de McNemar) . A Figura 29 mostra uma representação esquemática da resposta celular, humoral do tipo IgG e humoral do tipo IgM, para cada doador exposto testado.

Tabela 20 – Comparação entre a proporção de resposta celular e humoral positiva em 27 doadores expostos para cada região, bloco e alelos testados.

Antígeno da PvMSP-1			Doadores expostos		
REGIÃO	BLOCO	ALELO	Resposta celular positiva (%)	Resposta humoral positiva (%)	P *
N-terminal	bloco 2	Belém	33%	18,5%	0,289
		BP13	33%	14,8%	0,180
		BR7	26%	07,4%	0,180
	bloco 10**	Belém	35%	22,2%	0,581
		BP1	42%	03,7%	0,006
		BP39	27%	33,3%	0,791
C-terminal	PvMSP-1_{19}	conservada	22%	77,8%	0,000

Resposta celular positiva = Índice de estimulação celular >=2; Resposta humoral positiva = Índice de reatividade > 1; * = Teste de McNemar; ** = somente 26 indivíduos testados.

Registro	Resposta	Belém-2	BP13-2	BR7-2	Belém-10	BP1-10	BP39-10	MSP-119
40	Celular							
	IgG							
	IgM							
61	Celular				NR	NR	NR	
	IgG							
	IgM							
220	Celular							
	IgG							
	IgM							
265	Celular							
	IgG							
	IgM							
277	Celular							
	IgG							
	IgM							
279	Celular							
	IgG							
	IgM							
290	Celular							
	IgG							
	IgM							
312	Celular							
	IgG							
	IgM							
326	Celular							
	IgG							
	IgM							
356	Celular							
	IgG							
	IgM							
372	Celular							
	IgG							
	IgM							
373	Celular							
	IgG							
	IgM							
380	Celular							
	IgG							
	IgM							

Figura 29- Representação esquemática da resposta celular e humoral contra antígenos recombinantes da PvMSP-1 em 27 indivíduos expostos a malária (NR= não- realizado) (continua na próxima página).

Registro	Resposta	Belém-2	BP13-2	BR7-2	Belém-10	BP1-10	BP39-10	MSP-119
417	Celular							
	IgG							
	IgM							
419	Celular							
	IgG							
	IgM							
459	Celular							
	IgG							
	IgM							
460	Celular							
	IgG							
	IgM							
461	Celular							
	IgG							
	IgM							
463	Celular							
	IgG							
	IgM							
464	Celular							
	IgG							
	IgM							
491	Celular							
	IgG							
	IgM							
493	Celular							
	IgG							
	IgM							
498	Celular							
	IgG							
	IgM							
499	Celular							
	IgG							
	IgM							
520	Celular							
	IgG							
	IgM							
529	Celular							
	IgG							
	IgM							
601	Celular							
	IgG							
	IgM							

Figura 29- Representação esquemática da resposta celular e humoral contra antígenos recombinantes da PvMSP-1 em 27 indivíduos expostos a malária (conclusão).

Em suma, esse conjunto de dados indica que:

a) Indivíduos expostos ao *Plasmodium vivax* apresentam resposta celular específica aos antígenos das regiões variáveis da PvMSP-1, o que indica a presença de epítopos de células T nessas regiões da proteína.

b) A resposta celular específica é mais freqüente contra antígenos que representam as regiões variáveis do que contra a região conservada da proteína, enquanto a resposta humoral específica tem comportamento inverso (é maior contra a região conservada do que contra as regiões variáveis).

c) A resposta celular contra as regiões variáveis parece estar relacionada à exposição cumulativa (indicado pelo tempo de moradia em área endêmica e número de malária prévias) mas não varia significantemente em função do tempo decorrido do estímulo. A resposta celular contra a região C-terminal e a resposta humoral contra ambas as regiões C-terminal e N- terminal variam em função do tempo decorrido do estímulo antigênico (e portanto exposição recente) mas não em função da exposição cumulativa, como já foi demonstrado na página 1255 deste anexo. A importância desses resultados é limitada, entretanto, pelo pequeno número de indivíduos testados.

d) A falta de concordância entre o reconhecimento celular e humoral das diferentes regiões testadas indica que provavelmente mecanismos imunológicos distintos são desencadeados por regiões variáveis e conservada da PvMSP-1.

Portanto, podemos concluir que as regiões variáveis e conservadas da PvMSP-1 diferem quanto a sua imunogenicidade celular e humoral, com implicações importantes no design de vacinas. Obviamente, estas hipóteses não são conclusivas devido à falta de significância estatística e necessitam ser confirmadas com estudos adicionais. Outra limitação do estudo é que o instrumento de avaliação da resposta celular não inclui a verificação da resposta efetora (produção de citocinas) e nem a investigação dos fenótipos celulares para definição das subpopulações de células T ativadas e/ou suprimidas.

ANEXO D - ESPECTRO CLÍNICO DA MALÁRIA NÃO- COMPLICADA EM INDIVÍDUOS SEMI-IMUNES

Este anexo contém um artigo publicado sobre a expressão clínica da infecção pelo *Plasmodium* em 326 episódios de malária não-complicada em indivíduos semi-imunes com idade superior a 5 anos, pertencentes à coorte, correspondendo ao Objetivo 5. A referência completa do artigo é:

da Silva-Nunes M, Ferreira MU. Clinical spectrum of uncomplicated malaria in semi-immune Amazonians: beyond the "symptomatic" vs "asymptomatic"dichotomy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102:341-7.

Estes dados são importantes por mostrarem que o espectro clínico da malária não-complicada em áreas endêmicas ,inclui uma pluralidade de sintomas que podem estar presentes em maior ou menor grau, dependendo da interação entre o hospedeiro e o parasita, não sendo portanto dicotômico como sugerem vários textos de Parasitologia.

Minha participação neste artigo ocorreu em várias etapas, como a elaboração do questionário de sintomas, entrevistas em campo, análise dos dados e redação do artigo.

Clinical spectrum of uncomplicated malaria in semi-immune Amazonians: beyond the "symptomatic" vs "asymptomatic" dichotomy

Mônica da Silva-Nunes+, Marcelo U Ferreira

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900 São Paulo, SP, Brasil

We analyzed prospectively 326 laboratory-confirmed, uncomplicated malarial infections (46.3% due to Plasmodium vivax*, 35.3% due to* P. falciparum*, and 18.4% mixed-species infections) diagnosed in 162 rural Amazonians aged 5-73 years. Thirteen symptoms (fever, chills, sweating, headache, myalgia, arthralgia, abdominal pain, nausea, vomiting, dizziness, cough, dyspnea, and diarrhea) were scored using a structured questionnaire. Headache (59.8%), fever (57.1%), and myalgia (48.4%) were the most frequent symptoms. Ninety-six (29.4%) episodes, all of them diagnosed during cross-sectional surveys of the whole study population (96.9% by molecular technique only), were asymptomatic. Of 93 symptom-less infections left untreated, only 10 became symptomatic over the next two months following diagnosis. Fever was perceived as "intense" in 52.6% of 230 symptomatic malaria episodes, with no fever reported in 19.1% episodes although other symptoms were present. We found significant differences in the prevalence and perceived intensity of fever and other clinical symptoms in relation to parasite load at the time of diagnosis and patient's age, cumulative exposure to malaria, recent malaria morbidity, and species of malaria parasite. These factors are all likely to affect the effectiveness of malaria control strategies based on active or passive detection of febrile subjects in semi-immune populations.*

Key words: malaria - clinical manifestations - clinical immunity - Amazonia

Despite several decades of intensive control efforts, malaria remains a leading cause of morbidity in Brazil (Loiola et al. 2002), with over 600,000 slide-confirmed cases recorded countrywide in 2005 (Ministry of Health of Brazil, unpublished data). Across the country's main endemic area, the Amazon Basin, a widespread network of outposts provides free malaria diagnosis (based on thick smear microscopy) and free treatment of slide-confirmed malaria episodes (with standardized drug regimens). Nearly all infected subjects are identified through either active or passive case detection (ACD and PCD, respectively).

Both ACD and PCD rely on the presence of symptoms – more specifically, of fever – to diagnose malarial infections. Cases are found through PCD when febrile subjects attending any health facility have a blood sample tested positive for malaria parasites; ACD implies periodic visits to households in endemic areas, with collection of thick blood smears from every person having had fever since the last visit (Nájera 2001). Aggressive active case detection (AACD), which relies on mass surveys of the whole population of a given endemic area, irrespective of any clinical symptoms, is currently limited to a few settings of very high endemicity in Brazil, such as the Yanomami Indian Reservation (Macauley 2005).

A major limitation of ACD- and PCD-based control strategies is that *asymptomatic* infections go undetected and untreated (Macauley 2005, Coura et al. 2006) and may represent a significant source of gametocytes for local vectors (Alves et al. 2005). There is another major limitation, however, that has been rarely addressed: the variation in the clinical expression of *symptomatic* malaria in semi-immune populations, ranging from a very mild, oligosymptomatic illness to the full-blown disease with periodic paroxysms described in textbooks (Fairhust & Wellems 2005). After years of exposure to malaria, many subjects tend to have milder symptoms when infected, although sterilizing immunity is rarely observed (Fairhust & Wellems 2005). Nearly all nonimmune travelers with malaria attending infectious disease clinics in Germany (Jelinek et al. 1994) and Australia (Elliot et al. 2004) report fever, but its prevalence in semi-immune Amazonians under ACD- or PCD-based surveillance remains unknown. Here we describe the clinical expression of uncomplicated malaria episodes diagnosed during a 15-month prospective cohort study in rural Amazonia that combined ACD, PCD, and AACD.

SUBJECTS AND METHODS

Study area and population - We studied prospectively 326 malaria episodes diagnosed through AACD, ACD, and PCD during the first 15 months of follow-up (March 2004-May 2005) of an ongoing, population-based descriptive cohort study in Ramal do Granada (9°41-9°49'S, 67°05W-67°07'W), in the eastern part of the state of Acre, Northwestern Brazil (Silva-Nunes et al. 2006). Both *P. falciparum* and *P. vivax* are transmitted year-round. All households in the area were visited by our research team; because only subjects aged five years or older were eligible for blood collection during cross-sectional surveys and could provide more accurate informa-

Financial support: Fapesp, grants 03/09719-6 and 04/00373-2, CNPq, grant 470067/2004-7. MdSN and MUF are Fapesp and CNPq research fellows, respectively.
+Corresponding author: msnunes1@yahoo.com.br
Received 16 February 2007
Accepted 16 April 2007

tion about clinical symptoms, this analysis is restricted to subjects in this age group (83.5% of the study population).

Baseline information - A baseline questionnaire was applied to all study participants at enrolment, to obtain demographic, clinical, and socioeconomic information and to assess their cumulative exposure to malaria. Since most adults were migrants from malaria-free areas, their ages do not necessarily correlate with exposure to malaria; this was estimated as the length of residence in malaria-endemic areas, either in Acre or elsewhere in Amazonia. The number of slide-confirmed malaria episodes recorded in local malaria diagnosis outposts between January 2001 and March 2004 was used as a proxy of recent malaria morbidity.

AACD - Three cross-sectional surveys of the whole study population aged five years or older were carried in March-April 2004, September-October 2004, and February-March 2005. Subjects were enrolled for clinical examination and blood collection irrespective of any clinical symptoms. Of 405 eligible subjects present in the study area during the first mass survey, 388 (95.8%) and 386 (95.3%) were examined for malaria parasites by thick smear microscopy and polymerase chain reaction (PCR), respectively. Of 411 subjects eligible for the second mass survey, 378 (92.0%) and 379 (92.2%) were examined for malaria parasites by thick-smear microscopy and PCR, respectively. Finally, 329 (86.6%) and 328 (86.3%) of 380 eligible subjects were examined for malaria parasites by thick-smear microscopy and PCR, respectively, during the last survey.

ACD and PCD - Both ACD- and PCD-based surveillance of symptomatic malaria were performed in the study area between March 2004 and May 2005. For ACD, a study clinician visited the area five days/week (Monday-Friday) and examined all study participants reporting recent fever, headache or any other symptom that they thought as being possibly associated with malaria. Venous or finger-prick blood samples were obtained for malaria diagnosis by microscopy and PCR. For PCD, all new patient charts kept at the three local malaria diagnosis outposts were examined daily to detect additional malaria episodes among study participants who reported directly to these facilities. Whenever possible, pre-treatment venous or finger-prick blood samples were obtained from PCD patients to confirm microscopy results and to perform PCR. A minimum interval of 28 days between two or more consecutive samples was required to count the second positive slide or PCR result as a new malaria episode; when different species were detected in samples obtained less than 28 days apart, the subject was considered to have a single episode of mixed-species infection.

Laboratory diagnosis of malaria - Thick blood smears were stained with Giemsa, and at least 100 fields were examined under 700× magnification for malaria parasites by two experienced local microscopists. Three sets of slides were sent for review by an expert microscopist at the National Reference Laboratory of the Ministry of Health of Brazil: (a) all positive slides, (b) those with discordant results, and (c) those collected from febrile subjects, but with negative results. After review, parasite loads were stratified into three levels: (a) negative slide, (b) ≤ 100 parasites in 100 fields (roughly corresponding to 1-300 parasites/µl of blood), and (c) > 100 parasites in 100 fields (> 300 parasites/µl of blood). Blood samples collected through AACD, ACD, and PCD were also examined by nested PCR-based amplification of a species-specific segment of the *18S rRNA* gene of human malaria parasites, as described by Kimura et al. (1997) with the modifications introduced by Win et al. (2002). DNA templates for PCR amplification were isolated from 200 µl of whole venous blood, when available, using GFX genomic blood DNA purification kits (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, US). DNA templates from finger-prick blood samples spotted onto FTA Micro Cards (Whatman, Clifton, US) were prepared as recommended by the manufacturer, using the FTA Purification Reagent (Whatman). Subjects with positive PCR results but negative thick-smear microscopy were considered to harbor subpatent parasitemias (< 10 parasites/µl of blood).

Clinical assessment - Symptoms associated with malaria episodes, confirmed by microscopy or PCR in our cohort subjects aged five years or more, were prospectively assessed as described by Karunaweera et al. (1998). Briefly, a semiquantitative structured questionnaire addressing 13 common symptoms (fever, chills, sweating, headache, myalgia, arthralgia, abdominal pain, nausea, vomiting, dizziness, cough, dyspnea, and diarrhea) was applied to all patients. The same medical doctor (MdSN) assessed all infections, to minimize interobserver variation. According to the patient's perception, each clinical manifestation (except for fever) was considered to be absent, mild, moderate or severe; fever was classified as absent, mild or severe. Numerical scores of 0, 1, 2 or 3 were assigned to symptoms reported to be absent, mild, moderate or severe, respectively. To minimize recall bias, patients were interviewed during the acute malaria episode or up to one week after treatment. Severe malaria episodes, according to the definition of the World Health Organization (2000), were not diagnosed in our study population during the follow-up, although three patients (0.9%) required hospitalization to receive intravenous antimalarial drugs.

Treatment of malaria episodes - Malaria infections diagnosed by onsite microscopy were treated according to the current malaria therapy guidelines in Brazil (Fundação Nacional de Saúde 2001). *P. vivax* episodes were treated with chloroquine (25 mg/kg of base over three days; maximum adult dose, 1.5 g over three days) plus primaquine (0.5 mg/kg/day of base for seven days; maximum adult dose, 30 mg/day). Primaquine was not given to infants ≤ 6 months of age, pregnant and breastfeeding women or subjects with severe glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, which was diagnosed using the colorimetric method of Tantular and Kawamoto (2003). *P. falciparum* episodes were treated with mefloquine (15 mg/kg of base, single dose; maximum adult dose, 1000 mg) or quinine (30 mg/kg/day of salt for three days; maximum adult dose, 2000 mg/day) plus doxycycline (3.3 mg/kg/day of salt, for 7 days, maximum adult dose, 200 mg/day).

Statistical analysis - Symptom scores were compared across groups with the nonparametric tests of Mann-Whitney (two groups) and Kruskal-Wallis (more than two groups). We used the Somers' *d* statistic (Somers 1962) to test for a dose-response relationship between symptom scores and other ordinal variables (levels of parasitemia, age, time of residence in Amazonia, and number of recent malaria episodes); the last three variables were stratified into quartiles for this purpose. Analyses were made with SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, US). Statistical significance was defined at the 5% level.

Ethical clearance - Approval of the study protocol was obtained from the Ethical Review Board of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, Brazil (318/2002 and 538/2004). All study participants provided written informed consent.

RESULTS

Five hundred and nine residents (98.5% of the eligible population), with ages ranging between one day and 90 years, were enrolled between March and September 2004. The mean incidence of symptomatic *P. falciparum* and *P. vivax* episodes confirmed by microscopy was 1.39/100 person-months at risk and 2.67/100 person-months at risk, respectively, during the follow-up.

The prevalence and perceived severity of 13 symptoms were analyzed in 326 consecutive malaria episodes (found through AACD, ACD, and PCD and confirmed by thick-smear microscopy and/or PCR). Such episodes occurred in 162 subjects aged 5-73 years [mean, 24.4 years; standard deviation (SD), 16.3 years] (Fig. 1A), with an average of 2.0 (SD, 1.1) episodes per subject (range, 1-6 episodes). This sample includes 151 *P. vivax* infections (46.3%), 115 *P. falciparum* infections (35.3%), and 60 mixed-species (*P. vivax* and *P. falciparum*) infections (18.4%); parasites in 135 (41.4%) episodes were found by PCR only. Only 14 (8.6%) subjects reported no previous slide-confirmed malaria episode, suggesting that most of them had already developed some degree of clinical immunity to malaria parasites. Headache (59.8%), fever (57.1%), and myalgia (48.5%) were the most frequent symptoms reported; 96 (29.4%) episodes were asymptomatic at the time of blood collection.

Fig. 1B shows the perceived symptom severity assessed during 230 symptomatic malaria episodes diagnosed in 129 subjects. This sample includes 122 *P. vivax* infections, 73 *P. falciparum* infections, and 35 mixed-species infections; 34 (14.8%) episodes were diagnosed during the cross-sectional surveys and the remaining through ACD- and PCD-based surveillance; 42 (18.3%) were diagnosed by PCR only. Again, headache (84.8%), fever (80.9%), and myalgia (68.7%) were the most frequent symptoms.

Ninety-nine study participants (61.1%) reported symptoms during all infections diagnosed during the follow-up (range, 1-6 symptomatic episodes per subject), while 30 subjects (18.5%) had both symptomatic and asymptomatic infections and 33 (20.4%) had only asymptomatic infections. All symptom-less infections (29 with *P. vivax*, 42 with *P. falciparum,* and 25 with

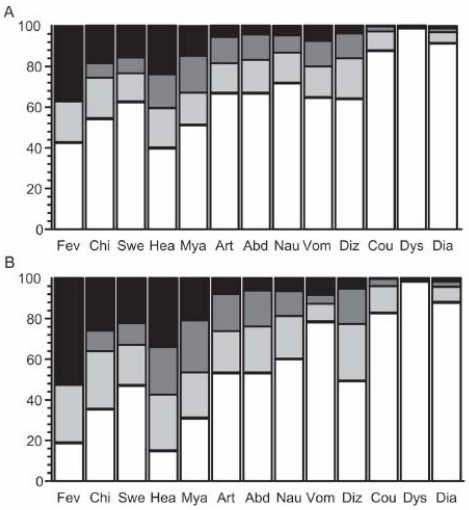


Fig. 1: perceived severity of 13 symptoms during 326 uncomplicated malarial infections in 162 rural Amazonians, 2004-2005. Symptoms are abbreviated as follows: fever: Fev, chills: Chi, sweating: Swe, headache: Hea, myalgia: Mya, arthralgia: Art, abdominal pain: Abd, nausea: Nau, vomiting: Vom, dizziness: Diz, cough: Cou, dyspnea: Dys, diarrhea: Dia. The shading pattern of each bar segment indicates the proportion of patients reporting a given symptom as absent (no shading), mild (light gray), moderate (dark gray) or severe (black). Numbers on y-axis are percentages. A: results for all 326 episodes, irrespective of the presence of symptoms at the time of blood collection; B: results for 230 episodes, observed in 129 subjects, during which at least one of the above mentioned symptoms was reported at the time of blood collection. All infections were laboratory-confirmed (thick-smear microscopy or polymerase chain reaction).

both species) were detected by AACD during three cross-sectional surveys carried out at six-month intervals; with three exceptions (one *P. falciparum* and two mixed-species infections detected by microscopy and therefore treated), all other asymptomatic infections were missed by conventional thick-smear microscopy onsite and were left untreated because PCR results were not available timely. Subjects who had only symptom-less infections (n = 33) did not differ significantly from those with symptomatic infections only (n = 99) according to age (mean, 27.3 vs 22.8 years, $P = 0.405$, Mann-Whitney test) or time of residence in Amazonia (mean, 16.2 vs 12.4 years, $P = 0.098$, Mann-Whitney test), but had a lower number of slide-confirmed symptomatic malaria episodes documented between January 2001 and March 2004 (mean, 0.36 vs 0.66 episodes, $P = 0.003$, Mann-Whitney test).

To determine whether asymptomatic infections detected by PCR only will eventually result, if untreated, in symptomatic disease detectable by ACD or PCD, we reviewed all symptomatic malaria episodes diagnosed in our cohort during two months following each cross-sectional survey to check for the occurrence of symptoms in a subject with a previous diagnosis of asymp-

tomatic malaria. Only 10 (10.7%) of the 93 symptomless infections detected by PCR only became symptomatic over the subsequent two months of follow-up.

Most symptoms were more frequent and severe with increasing parasite loads (Fig. 2). There was a significant dose-response relationship between symptom scores and levels of parasitemia, except for cough and dyspnea (that were relatively infrequent in the patient population); *P* values of the Somers' *d* statistic ranged between 0.044 (diarrhea) and < 0.0001 (other symptoms). We next compared symptom scores in infections with low (1-300 parasites/µl of blood; n = 53) or moderate to high (> 300 parasites/µl of blood, n = 138) parasitemias detected by thick-smear microscopy (Figs 2B,C respectively). Fever ($P = 0.002$), chills ($P < 0.0001$), sweating ($P = 0.002$), and myalgia ($P = 0.032$) were significantly more severe in infections with moderate to high parasitemia when compared with those with low parasitemia (Mann-Whitney test).

Data shown in Fig. 3 suggest that most symptoms tend to be more severe in *P. vivax*-only infections than in *P. falciparum* or mixed-species infections. In fact, Kruskal-Wallis tests detected significant differences in the scores of fever ($P = 0.005$), chills ($P < 0.0001$), sweating ($P = 0.034$), headache ($P < 0.001$), myalgia ($P = 0.001$), arthralgia ($P = 0.026$), nausea ($P = 0.024$), and dizziness ($P = 0.023$), when comparing *P. vivax* (n = 151), *P. falciparum* (n = 115) and mixed-species infections (n = 60). Pair-wise comparisons with the Mann-Whitney test revealed that these differences were due to higher scores in the *P. vivax* group.

To explore these findings, we next compared symptom scores in *P. vivax*-only and *P. falciparum*-only infections after stratifying the infections into two levels

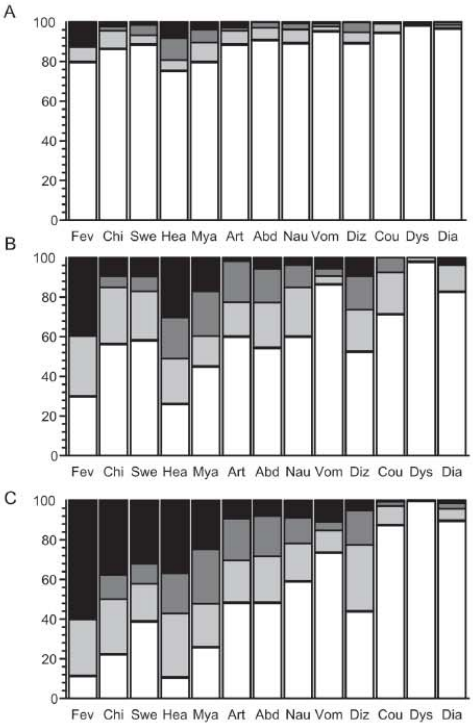


Fig. 2: perceived severity of 13 symptoms during 326 uncomplicated malaria episodes (either symptomatic or not) in 162 rural Amazonians, according to the parasite loads at the time of diagnosis. Symptoms abbreviations and bar shading patterns are as in Fig. 1. Numbers on y-axis are percentagens. A: results for infections with subpatent parasitemias (< 10 parasites/µl of blood) detected only by polymerase chain reaction (n = 135); B: results for infections with low but patent parasitemias (10-300 parasites/µl of blood) (n = 53); C: results for infections with the highest parasite burdens (> 300 parasites/µl of blood) (n = 138). The proportion of asymptomatic infections at the time of blood collection was 62.2% in plot A, 7.5% in B, and 0.0% in C ($P < 0.0001$, χ^2 test for trend).

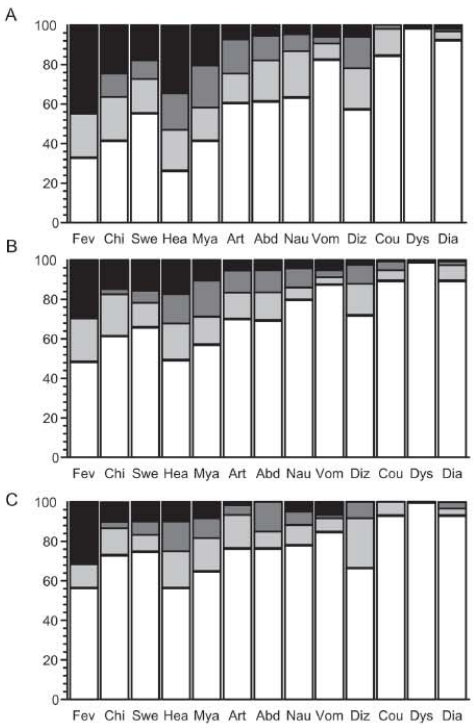


Fig. 3: perceived severity of 13 symptoms during 336 uncomplicated malaria episodes in 162 rural Amazonians, according to the species of infecting parasites. Symptoms abbreviations and bar shading patterns are as in Fig. 1. Numbers on y-axis are percentagens. A: results for infections with *Plasmodium vivax* only (n = 151); B: results for infections with *P. falciparum* only (n = 115); C: results for mixed-species infections (n = 60). The proportion of asymptomatic infections at the time of blood collection are 18.5% in plot A, 37.4% in B, and 41.7% in C ($P < 0.0001$, χ^2 test). All infections were laboratory-confirmed (thick-smear microscopy or polymerase chain reaction).

of parasitemia (1-300 parasites/µl and > 300 parasites/µl); episodes with low parasitemias detected only by PCR were excluded, because 62.2% of them were asymptomatic. Stratification revealed that most differences were likely to be due to confounding, since *P. falciparum* infections in our sample were often associated with very low parasitemias. In other words, *P. falciparum* infections are overrepresented in the group with light parasite burdens that tend to be less symptomatic. Within each level of parasitemia, however, symptom scores were quite similar between species; significant differences (Mann-Whitney test) were found only for headache (more severe in *P. vivax* than in *P. falciparum* infections, among those with 1-300 parasites/µl of blood, $P = 0.017$) and diarrhea (more severe in *P. falciparum* than in *P. vivax* infections, among those with > 300 parasites/µl of blood, $P = 0.025$) (Fig. 4).

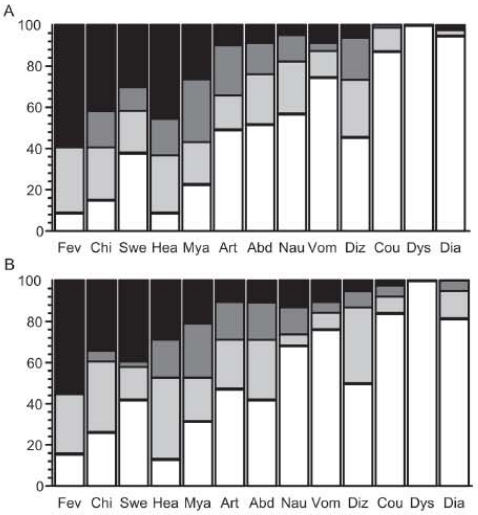


Fig. 4: perceived severity of 13 symptoms during 117 uncomplicated malaria episodes with the highest parasite burdens (parasitemia > 300 parasites/µl of blood), according to the species of infecting parasites, 2004-2005. Symptoms abbreviations and bar shading patterns are as in Fig. 1. Numbers on y-axis are percentagens. A: results for infections with *Plasmodium vivax* only (n = 79); B: results for infections with *P. falciparum* only (n = 38).

We next examined whether some malaria symptoms tended to become milder with increasing age and levels of cumulative exposure to malaria. Ninety-two (56.8%) of our 162 patients had more than one malarial infection diagnosed between March 2004 and May 2005; in these cases, we considered only the symptoms associated with the first episode occurring during the follow-up. Only fever became less frequent and less severe with increasing age and time of residence in Amazonia (Table). Subjects with a greater number of recent slide-confirmed symptomatic malaria episodes (recorded during the 39 months preceding the study) had infections that were significantly more symptomatic during the cohort follow-up (Table).

DISCUSSION

Asymptomatic malarial infection and full-blown illness with typical febrile paroxysms are extreme points in the wide spectrum of clinical disease caused by malaria parasites. Naturally acquired clinical immunity, parasite load and virulence, and host's age and genetic factors are all likely to modulate, in different ways, the clinical expression of malaria. This originates intermediate levels of disease severity that do not fit into dichotomic ("all-or-nothing") categories such as "asymptomatic" vs "symptomatic" infection. Therefore, ACD- and PCD-based strategies of malaria control, such as those currently used in Brazil, must deal with a heterogeneous disease in which high fever and cyclical paroxysms with chills and profuse sweating, the hallmark of textbook malaria, are not necessarily prominent features. For example, only 52.6% of 230 episodes of laboratory-confirmed *symptomatic* malaria diagnosed during our prospective study in rural Amazonia were associated with fever perceived as "intense"; no fever was reported in 19.1% of such episodes, although other symptoms were present (Fig. 1B) and most subjects felt ill enough to seek malaria diagnosis through ACD or PCD. In fact, most afebrile patients and those with low parasitemia had thick smears examined because of either persistent or intermittent headache or myalgia, which highlights the importance of a broader clinical surveillance.

TABLE

Variation in the perceived intensity of symptoms during 162 malaria episodes diagnosed in a cohort of rural Amazonians, according to increasing age, cumulative exposure to malaria and recent morbidity, 2004-2005

Variable (stratified into quartiles)	Change in symptom intensity scores (*P* value, Somers' *d* test for ordinal variables)
Age	↓ fever ($P = 0.035$), ↑ myalgia ($P = 0.009$), ↑ arthralgia ($P < 0.0001$)
Time of residence in Amazonia	↓ fever ($P = 0.014$), ↑ abdominal pain ($P = 0.021$)
No. of recent slide-confirmed malaria episodes[a]	↑ chills ($P = 0.004$), ↑ sweating ($P = 0.020$), ↑ headache ($P = 0.031$), ↑ arthralgia ($P < 0.0001$), ↑ dizziness ($P = 0.016$)

A single episode was analyzed per subject; for those with more than one malaria episode between March 2004 and May 2005, only the first episode diagnosed during the follow-up was considered. Only significant results (Somers' *d* statistic, $P < 0.05$) are shown; *a*: malaria episodes diagnosed through active and passive case detection between January 2001 and March 2004.

Are clinical manifestations different in nonimmune and semi-immune patients with symptomatic but uncomplicated disease? Although the clinical presentation of imported malaria has been described in detail in several recent studies (reviewed by Elliot et al. 2004), most case series include heterogeneous mixtures of nonimmune travelers and semi-immune expatriates and foreign visitors, with varying age and geographic origin, precluding meaningful comparisons. Not surprisingly, nearly all nonimmune travelers report fever (Jelinek et al. 1994, Elliot et al. 2004), while this symptom tends to be less prevalent (79-98%) in case series including putatively semi-immune expatriates and foreign visitors, in addition to nonimmune travelers (Svenson et al. 1995, Dorsey et al. 2000, Sanchez et al. 2000). However, comparisons of semi-immune and nonimmune patients in the same case series found no significant differences in the prevalence of selected symptoms (Svenson et al. 1995) and hospitalization rates (Dorsey et al. 2000), although no attempt was made to quantify the perceived severity of symptoms in a standardized way. Further comparisons across studies are hampered by the use of different ways of determining and reporting the prevalence and intensity of each symptom or sign and by the inclusion of subjects with different ages who were infected with different malaria parasite species.

Is there any association between the prevalence or perceived intensity of symptoms and the malaria parasite species found in uncomplicated disease? Diarrhea was found to be significantly more frequent in *P. falciparum* than in *P. vivax* infections in two large case series (Svenson et al. 1995, Robinson et al. 2001), and in the semi-immune Amazonians in this study with the highest parasitemias (Fig. 4). Temperatures greater than 39°C (Svenson et al. 1995) and rigors (Robinson et al. 2000) have been reported to occur more commonly in *P. vivax* infections, while drowsiness was found more frequently in *P. falciparum* infections (Robinson et al. 2000), but these differences have not been independently confirmed in other populations.

We found significant differences in the prevalence and perceived intensity of fever and other clinical symptoms in relation to parasite load at the time of diagnosis and patient's age and levels of cumulative exposure to malaria and recent malaria morbidity, all of which may affect the sensitivity of ACD and PCD strategies in semi-immune populations. As a consequence, infections may remain undetected in a substantial proportion of subjects with absent or atypical clinical manifestations (such as exclusive mild to moderate headache). These undetected infections have been suggested to represent a significant source of parasites for local mosquitoes, maintaining residual malaria transmission (Coura et al. 2006).

Although fever may become less intense with increasing age and time of residence in Amazonia, myalgia and arthralgia are perceived as more severe by older subjects, while abdominal pain is perceived as more severe by subjects with a longer stay in endemic areas (Table). Whether increased abdominal pain is due to hepatosplenomegaly or other abdominal changes could not be assessed in this study.

Finally, are subjects presenting with symptomatic malaria more susceptible to disease or just unlucky enough to have met a more virulent parasite? We found that subjects with more episodes of symptomatic malaria documented up to 39 months before the baseline evaluation reported more intense symptoms during subsequent infections (Table). These subjects may be either more susceptible to disease manifestations or more likely to perceive their symptoms as severe and seek treatment. However, 30 (23.3%) subjects who had laboratory-confirmed symptomatic malaria diagnosed through ACD or PCD during the follow-up were also found, during cross-sectional surveys, to be asymptomatic carriers of parasites. These findings suggest that the presence or absence of symptoms does not correspond to stable phenotypes and necessarily indicate absence or presence of clinical immunity; not surprisingly at all, a considerable proportion of current asymptomatic parasite carriers may later become ill when exposed to parasites that are intrinsically more virulent or express novel antigenic variants. To address this issue, we are currently testing whether asymptomatic parasite carriers found through AACD differ from the cohort participants with either symptomatic disease or no infection at all in the incidence of malaria morbidity during the subsequent months of follow-up.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the inhabitants of Ramal do Granada for their enthusiastic participation in the study; Sebastião Bocalom Rodrigues (Mayor of Acrelândia), Damaris de Oliveira, and Nésio M Carvalho (Municipal Government of Acrelândia), Raimundo A Costa and the malaria control team in Acrelândia and in the Ramal do Granada, and Dr Pascoal T Muniz (Federal University of Acre) for their logistic support; Adamílson L de Souza, Dr Rosely S Malafronte, Natal S da Silva, Camila Juncansen, Carlos E Cavasini, and Kézia KG Scopel for their help in fieldwork; Estéfano A de Souza and Bruna A Luz for data management, Natália T Komatsu, Rosane R D'Arcádia, Kézia K G Scopel, and Érika M Braga for PCR-based malaria diagnosis, and Francisco das Chagas O Luz (Ministry of Health, Brasília, Brazil) for reviewing all malaria slides.

REFERENCES

Alves FP, Gil LHS, Marrelli MT, Ribolla PEM, Camargo EP, Silva LHP 2005. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol 42*: 777-779.

Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S 2006. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz 101*: 229-237.

Dorsey G, Gandhi M, Oyugi J, Rosenthal PJ 2000. Difficulties in the prevention, diagnosis, and treatment of imported malaria. *Arch Intern Med 160*: 2505-2510.

Elliot JH, O' Brien D, Leder K, Kitchener S, Schwartz E, Weld L, Brown GV, Kain KC, Torresi J 2004. Imported *Plasmodium vivax* malaria: demographic and clinical features in nonimmune travelers. *J Travel Med 11*: 213-219.

Fairhust RM, Wellems TE 2005. *Plasmodium* species (malaria). In GL Mandell, JE Bennett, R Dolin (eds), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases,* Elsevier Churcill Livingstone, Philadelphia, p. 3121-3144.

Fundação Nacional de Saúde 2001. *Manual de Terapêutica da Malária,* Ministério da Saúde, Brasília, 104 pp.

Jelinek T, Nothdurft HD, Löscher T 1994. Malaria in nonimmune travelers: a synopsis of history, symptoms, and treatment in 160 patients. *J Travel Med 1*: 199-202.

Karunaweera ND, Carter R, Grau GE, Mendis K 1998. Demonstration of anti-disease immunity to *Plasmodium vivax* malaria in Sri Lanka using a quantitative method to assess clinical disease. *Am J Trop Med Hyg 58*: 204-210.

Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, Otani S, Yamaguchi Y, Tanabe K 1997. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Int 46*: 91-95.

Loiola CC, da Silva CJ, Tauil PL 2002. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. *Rev Panam Salud Pública 11*: 235-244.

Macauley C 2005. Aggresive active case detection: a malaria control strategy based on the Brazilian model. *Soc Sci Med 60*: 563-573.

Nájera JA 2001. Malaria control: achievements, problems, and strategies. *Parassitologia 43*: 1-89.

Robinson P, Jenney AW, Tachado M, Yung A, Manitta J, Taylor K, Biggs BA 2001. Imported malaria treated in Melbourne, Australia: epidemiology and clinical features in 246 patients. *J Travel Med 8*: 76-81.

Sanchez JL, Bendet I, Grogl M, Lima JBP, Pang LW, Guimarães R, Guedes RH, Milhous WK, Green MD, Todd GD 2000. Malaria in Brazilian military personnel deployed to Angola. *J Travel Med 7*: 275-282.

Silva-Nunes M, Malafronte RS, Luz BA, Souza EA, Martins LC, Rodrigues SG, Chiang JO, Vasconcelos PFC, Muniz PT, Ferreira MU 2006. The Acre Project: the epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. *Cad Saúde Públ 22*: 1325-1334.

Somers RH 1962. A new asymmetric measure of association for ordinal variables. *Am Sociol Revi 27*: 799-811.

Svenson JE, MacLean JD, Gyorkos TW, Keystone J 1995. Imported malaria: clinical presentation and examination of symptomatic travelers. *Arch Intern Med 155*: 861-868.

Tantular IS, Kawamoto F 2003. An improved, simple screening method for detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trop Med Int Health 8*: 569-574.

Win TT, Lin K, Mizuno S, Zhou M, Liu Q, Ferreira MU, Tantular IS, Kojima S, Ishii A, Kawamoto F 2002. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. *Trop Med Int Health 7*: 231-239.

World Health Organization 2000. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg 94* (Suppl. 1): S1-S90.

APÊNDICE - FOTOS DA ÁREA E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Figura 30 – Equipe de campo

Figura 33 – Visita às casas

Figura 31 – Coleta de material

Figura 34 – Linha 14 gleba Q

Figura 32 – Equipe da SESACRE

Figura 35 – Entrevista com agente de saúde

Figura 36 – Reserva da Linha 14

Figura 39 – Moradia típica do local

Figura 37 – Floresta parcialmente queimada

Figura 40 – Coleção de água temporária

Figura 38 – Linha 14 gleba Q

Figura 41 – Toras de madeira no local