ALESSANDRA SAMPAIO BASSI FRATUS

CASOS ASSINTOMÁTICOS DE MALÁRIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA:
CITOADERÊNCIA, ANTICORPOS CONTRA A SUPERFÍCIE DA
HEMÁCIA INFECTADA E PROTEÇÃO EM INFECÇÕES NATURAIS POR
PLASMODIUM FALCIPARUM

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

ALESSANDRA SAMPAIO BASSI FRATUS

CASOS ASSINTOMÁTICOS DE MALÁRIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA:
CITOADERÊNCIA, ANTICORPOS CONTRA A SUPERFÍCIE DA
HEMÁCIA INFECTADA E PROTEÇÃO EM INFECÇÕES NATURAIS POR
PLASMODIUM FALCIPARUM

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador:
Prof. Dr. Gerhard Wunderlich
Versão Original.

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Fratus, Alessandra Sampaio Bassi.

Casos assintomáticos de malária na Amazônia brasileira: citoaderência, anticorpos contra a superfície da hemácia infectada e proteção em infecções naturais por *Plasmodium falciparum* / Alessandra Sampaio Bassi Fratus. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profº Dr. Gerhard Wunderlich.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Resposta imune contra antígenos variantes de *P. falciparum*.

Versão do título para o inglês: Asymptomatic cases of malaria in the Brazilian Amazon: cytoadherence, antibodies against the surface of infected red blood cells and protection in natural infections caused by *Plasmodium falciparum*.

Descritores: 1. Malária 2. Imunidade 3. *Plasmodium falciparum* 4. Imunofluorescência 5. Citometria de fluxo 6. Biologia molecular I. Wunderlich, Profº Dr. Gerhard II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB036/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alessandra Sampaio Bassi Fratus.

Título da Tese: Casos assintomáticos de malária na Amazônia brasileira: citoaderência, anticorpos contra a superfície da hemácia infectada e proteção em infecções naturais por *Plasmodium falciparum*.

Orientador(a): Profº Dr. Gerhard Wunderlich.

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:

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

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

Of. CEP SH.079.09.
PMAZ/mcgn

São Paulo, 25 de março de 2009.

Prezada Senhora,

Em adendo ao Parecer 888/CEP, de 08-abril-2009, informo a V.Sa., que o projeto intitulado: "*Casos Assintomáticos de Malária na Amazônia Brasileira: Citoaderência, anticorpos contra a superfície da hemácia infectada e proteção em infecções naturais por Plasmodium falciparum*" sob sua responsabilidade foi **referendado** pela Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB em sua 94ª Reunião realizada em 30.04.09, não apresentando restrições.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **30 de abril de 2010**.

Cordialmente,

Prof. Dr. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilma. Sra.
Alessandra Sampaio Bassi Fratus
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer muito à minha família: Sofia, mãe, pai, Bell, Gabriel, Lorenzo, Diego, vó Dorinha, que me deu apoio incondicional em todas as escolhas que já fiz até hoje, sempre me respeitando e me dando todo o suporte para aguentar os tempos difíceis, e enxergar uma luz no fim do túnel.

Todo o meu agradecimento para meu orientador Dr. Gerd Wunderlich. Muito obrigada pela oportunidade e pelos anos de convívio. Boa sorte, sempre!

Muito obrigada aos meus queridos amigos Tosca (Catarina), Wesley e Renato, por toda a ajuda, amizade e companheirismo durante esse projeto. A ajuda de vocês no laboratório e na minha vida foi essencial para que este projeto fosse terminado. Meu agradecimento à vocês será eterno.

Muito obrigada aos amigos e companheiros de departamento Thibério, André, Ursula e Jeniffer.

Muito obrigada aos incríveis doadores de sangue oficiais Ursula, André e Wesley. Sem vocês não teríamos feito nada.

Muito obrigada a Wolf, Manuel, Zezé, Zé Mário, Marcio e Erika, por muito mais do que ajuda técnica.

Meus agradecimentos para Angela, Wilma, Sabrina e Silvia, pela ajuda e simpatia de sempre.

Um muito obrigada especial para o professor Dr. Ariel Silber, que com seu jeito de ser me ensinou e me ajudou muito durante essa longa caminhada.

Muito obrigada a Stefanie Lopes, Dra. Letusa Albrecht, Dr. Fábio Costa e todo o pessoal do laboratório da UNICAMP, pela ajuda com os experimentos de reversão e inibição de citoaderência.

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

"Quem sabe concentrar-se numa coisa e insistir nela como único objetivo, obtém, ao fim e ao cabo, a capacidade de fazer qualquer coisa."

- Mahatma Gandhi

RESUMO

FRATUS, A.S.B. **Casos assintomáticos de malária na Amazônia brasileira: Citoaderência, anticorpos contra a superfície da hemácia infectada e proteção em infecções naturais por *Plasmodium falciparum*.** 2012. 106 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Um importante fator na virulência do protozoário causador da malária humana *P. falciparum* é a capacidade de aderência de eritrócitos contendo formas maduras a receptores endoteliais como CD36 e ICAM1. A citoaderência é mediada por proteínas PfEMP1, que estão relacionadas ao constante escape da resposta humoral do hospedeiro e parecem ser importantes alvos da resposta adquirida, pelo menos na África. No Brasil, a situação é especial: o número de variantes PfEMP1 é limitado, além disso, são raras as evoluções graves da doença. Ao mesmo tempo, muitos indivíduos residentes em área endêmica são portadores do parasita mas não apresentam sintomas. Estaria esta ‘proteção’ relacionada ao reconhecimento destas proteínas da superfície da hemácia infectada, assim como foi sugerido para situações de alta transmissão? E mais, existiria alguma diferença no reconhecimento de parasitas selecionados para citoaderência em diferentes receptores? Na tentativa de responder estas perguntas, 1. localizamos nos plasmas de indivíduos infectados residentes em Rondônia, anticorpos contra estruturas na membrana do eritrócito infectado (através de imunofluorescência), 2. medimos, através de citometria de fluxo, a resposta humoral destes plasmas contra a superfície de hemácias infectadas (isolados de campo selecionados para aderência a ICAM1 e CD36), sem encontrar diferenças significativas na resposta imune nos dois grupos de plasmas, tanto em frequência quanto grau de reconhecimento; 3. testamos a capacidade de inibição de citoaderência destes plasmas em condição estática, encontrando apenas diferenças significativas entre sintomáticos e assintomáticos em alguns casos pontuais, e sem correlação com índice de reatividade ou fenótipo. Através de ensaios de aglutinação mista, pudemos observar a presença de anticorpos pan-reativos, capazes de aglutinar diferentes isolados, porém sem diferenças entre os isolados selecionados para ICAM1 e CD36; e, finalmente, 5. analisamos a força de citoaderência da cepa controle 3D7 e do isolado de campo 133, selecionados tanto para ICAM1 quanto para CD36, sem encontrar nenhuma diferença entre eles. Os dados indicam que a resposta contra a superfície da hemácia infectada - ao menos dos isolados e fenótipos testados neste trabalho - não parece ser um critério decisivo para o tipo de evolução de malária sofrida pelo paciente.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium falciparum*. Variação antigênica. PfEMP1. Resposta Humoral.

ABSTRACT

FRATUS, A.S.B. **Asymptomatic cases of malaria in the Brazilian Amazon: cytoadherence, antibodies against the surface of infected red blood cells and protection in natural infections caused by *Plasmodium falciparum*.** 2012. 106 p. Ph.D. Thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

An important factor in *P. falciparum*'s virulence is the ability of mature erythrocytic forms to adhere to endothelial receptors such as CD36 and ICAM1. This adherence can lead to severe malaria forms and cause also the death of the infected individual. The cytoadherence is mediated by domains of the variant PfEMP1 proteins that are related to the constant escape from host humoral response and were described as important targets of the humoral acquired response, at least in Africa. In Brazil, the situation seems to be special: the number of PfEMP1 variants is limited, and the development of severe disease is rare. At the same time, many individuals living in endemic areas are carriers of the parasite but show no symptoms. Is this '*protection*' related to the recognition of these proteins on the surface of infected red blood cells, as was suggested for high transmission situations? Are there differences in the recognition of parasites selected for cytoadherence in different receptors? In order to answer these questions, we, 1. detected by immunofluorescence antibodies against structures in the membrane of erythrocytes using plasma of infected individuals living in Rondônia, 2. measured the antibody response of these plasmas against the surface of infected red blood cells (field isolates of *P. falciparum* selected for adhesion to receptors CD36 and ICAM1) by flow cytometry, finding only in some cases significant differences in the immune response in both groups of plasmas, both in frequency and degree of recognition 3. tested the ability to inhibit cytoadherence of these plasmas in static condition, again with no significant differences between symptomatic and asymptomatic derived plasmas. There was also no correlation between this capacity and the reactivity index or phenotype; 4. Through mixed agglutination assays, we observed the presence of pan-reactive antibodies that were capable of agglutinating different isolates, but without any difference between ICAM1 and CD36 selected isolates; and finally, 5. we analyzed the strength of cytoadherence to CD36 and ICAM1 of these isolates in flow conditions, without any difference in 3D7 (control isolate) and 133 (a field isolate). Taken together, our data indicate the the immune response against the infected red blood cell is not decisive for the outcome of Malaria suffered by the patients.

Keywords: Malaria. *Plasmodium falciparum*. antigenic variation. PfEMP1. humoral response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa de risco de infecção por <i>P. falciparum</i> .	18
Figura 2 - Gráfico que mostra a geografia dos casos clínicos de malária no mundo em 2007.	18
Figura 3 - Mapa do Risco de Transmissão de Malária no Brasil.	20
Figura 4 - Animação do ciclo de vida de <i>P. falciparum</i> (CódigoQR).	21
Figura 5 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> .	22
Figura 6 - Citoaderência de eritrócitos infectados.	24
Figura 7 - Características da citoaderência de <i>Plasmodium falciparum</i> .	25
Figura 8 - Arquitetura de uma proteína PfEMP1 e seus domínios adesivos.	28
Figura 9 - Esquema de prováveis vias de imunidade nata e adquirida contra malária.	33
Figura 10 - Cultura sincronizada de <i>P. falciparum</i> .	39
Figura 11 - Cultura de células CHO ^{ICAM1} com hemácias infectadas por <i>P. falciparum</i> .	50
Figura 12 - Cultura de células CHO ^{CD36} com hemácias infectadas por <i>P. falciparum</i> .	51
Figura 13 - Frequência das sequências encontradas nos isolados S20(A), 99(B), 106(C), 133(D), 134(E) e 3D7(F).	52
Figura 14 - Amplificação dos cDNAs codificadores do domínio DBL α dos isolados selecionados em CHO ^{ICAM1} e CHO ^{CD36} .	53
Figura 15 - Matriz de identidade entre as sequências DBL α preferencialmente transcritas pelos isolados analisados.	55
Figura 16 - Características das amostras de soros utilizadas.	57
Figura 17 - Imunofluorescência.	58
Figura 18 - Imunofluorescência.	59
Figura 19 - <i>Scatterplots</i> representando resultados de compensação.	60
Figura 20 - <i>Scatterplots</i> do número de eventos. Aquisição de 5.000 eventos x 50.000 eventos.	61
Figura 21 - Frequência de reconhecimento de isolados de campo de <i>P. falciparum</i> .	62
Figura 22 - Gráfico <i>box plot</i> com distribuição dos valores de índices de reatividade dos soros de indivíduos sintomáticos (A), e indivíduos assintomáticos (B).	63
Figura 23 - Cinza claro representa índices de reatividade de 1 a 3, cinza escuro de 3 a 5, preto maior que 5 e listrado na diagonal maior que 10.	66
Figura 24 - Aglutinação mista com plasma de indivíduo assintomático.	71
Figura 25 - Aglutinação mista com plasma de indivíduo sintomático.	71
Figura 26 - Aglutinação mista com plasma de indivíduos negativos (que nunca tiveram contato com o parasita).	72
Figura 27 - Frequência de aglutinados mistos em ensaios realizados com pares de isolados de campo selecionados para ligação em ICAM1 (A) e CD36 (B).	74
Figura 28 - Frequência de aglutinados mistos em ensaios realizados com isolados de campo e 3D7 comparando indivíduos sintomáticos X assintomáticos.	75
Figura 29 - Categorização por tamanho de aglutinado.	76
Figura 30 - Teste de inibição de citoaderência utilizando anticorpos anti-ICAM1 e anti-CD36 com isolado de campo 133 selecionado para ICAM1 e CD36.	77
Figura 31 - Especificidade de Citoaderência.	78
Figura 32 - Resultados plasma a plasma dos ensaios de inibição de citoaderência.	79
Figura 33 - Porcentagem de eritrócitos aderidos em células CHO ^{ICAM1} e CHO ^{CD36} .	82
Figura 34 - Exemplo de reversão de citoaderência em fluxo contínuo.	83
Figura 35 - Western blot de membranas purificadas.	84
Quadro 1 - Revisão bibliográfica.	27
Tabela 1 - Frequência dos grupos na sequência dos isolados selecionados.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.C.	ANTES DE CRISTO
ATS	<i>ACIDIC TERMINAL SEGMENT</i>
C2	<i>CONSTANT 2</i>
cDNA	DNA COMPLEMENTAR
CIDR	<i>CYSTEINE-RICH INTERDOMAIN REGION</i>
CHO	CÉLULAS DE <i>CHINESE HAMSTER OVARY</i>
CSA	<i>CHONDROITIN SULFATE A</i>
DBL	<i>DUFFY BINDING LIKE</i>
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
ECL	<i>ENHANCED CHEMILUMINESCENCE</i>
EDTA	ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO
FACS	<i>FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTED</i>
FCS	SORO FETAL BOVINO (<i>FETAL CALF SERUM</i>)
FUNASA	FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE
g	ACELERAÇÃO DA GRAVIDADE ($9,8 \text{ m/s}^2$)
gDNA	DNA GENÔMICO
ICAM1	<i>INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE 1</i>
Ig	IMUNOGLOBULINA
IR	ÍNDICE DE REATIVIDADE
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE
PB	PARES DE BASE
PBS	<i>PHOSPHATE-BUFFERED SALINE</i>
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>)
PfEMP1	<i>PLASMODIUM FALCIPARUM ERYTHROCYTE MEMBRANE PROTEIN 1</i>
RNA	ÁCIDO RIBONUCLÉICO
RPMI	<i>ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE</i> (MEIO DE CULTIVO)
RT-PCR	TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA POR REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE
TAE	TAMPÃO TRIS-ACETATO
TBE	TAMPÃO TRIS-BORATO
TM	TRANSMEMBRANA
Ups	<i>UPSTREAM</i>
VSA	<i>VARIANT SURFACE ANTIGENS</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Aspectos Gerais	14
1.2 História e Evolução da Malária.....	15
1.3 Distribuição Atual da Malária no Mundo	17
1.4 A Malária no Brasil	19
1.5 Ciclo de vida dos parasitas em humanos	20
1.6 <i>Plasmodium falciparum</i> , Citoaderência e Malária Grave.....	23
1.7 Proteínas PfEMP1 e genes <i>var</i>	27
1.8 Interação entre PfEMP1 e o Receptor CD36	30
1.9 Interação entre PfEMP1 e o Receptor ICAM1	30
1.10 Imunidade e Malária	32
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Isolados de <i>Plasmodium falciparum</i>	38
3.2 Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i>	38
3.3 Congelamento e descongelamento dos parasitas	39
3.4 Sincronização de parasitas com (D-) sorbitol	39
3.5 Enriquecimento dos trofozoítos maduros e esquizontes	40
3.6 Cultura de células eucarióticas.....	40
3.7 Teste para <i>Mycoplasma</i> sp.....	40
3.8 Ensaio de citoaderência de <i>P. falciparum</i> (<i>Panning</i>)	41
3.9 Purificação do RNA total dos trofozoítas.....	42
3.10 Transcrição reversa (RT)	42
3.11 Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando substratos de <i>P. falciparum</i>	43
3.12 Sequenciamento	43
3.13 Análise dos transcritos <i>var</i>	44
3.14 Amostras de Soro/Plasma Utilizadas	44
3.15 Imunofluorescência.....	45
3.16 Citometria de fluxo	45
3.17 Ensaios de Aglutinação Mista.....	46
3.18 Ensaio Estático de Inibição de citoaderência.....	47
3.19 Citoaderência em fluxo contínuo	47
3.20 Purificação De Membrana do Eritrócito Infectado Com <i>P. falciparum</i> e Western Blot Com Pool de Plasmas de Indivíduos Infectados	48
4 RESULTADOS	50
4.1 Seleção de Fenótipos Adesivos de <i>P. falciparum</i> (<i>Panning</i>)	50
4.2 Análise dos transcritos DBL α de isolados selecionados	51
4.3 Amostras de Soro/Plasma Utilizadas	56
4.4 Imunofluorescência.....	57
4.5 Citometria de Fluxo	59
4.6 Ensaios de Aglutinação Mista.....	70
4.7 Ensaio Estático de Inibição de citoaderência.....	76
4.8 Reversão de Citoaderência Por Fluxo Contínuo	81
4.9 Purificação De Membrana do Eritrócito Infectado Com <i>P. falciparum</i> e Western Blot Com Pool de Plasmas de Indivíduos Infectados	83
5 DISCUSSÃO	86
6 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

A malária, doença infecciosa causada por protozoários intracelulares pertencentes ao filo **Apicomplexa**, da ordem **Coccidiida**, subordem **Haemosporidiidea**, família **Plasmodiidae**, gênero **Plasmodium** continua representando um sério problema de saúde pública em áreas tropicais e subtropicais do globo terrestre, podendo ser considerada tanto causa quanto consequência da péssima situação econômica de diversos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, caracterizando um grave problema de dimensão político-social.

São conhecidas quase 100 espécies de plasmódios capazes de infectar aves, répteis, peixes e mamíferos (roedores e primatas superiores). Entre elas, 5 podem infectar o homem:

a) *Plasmodium falciparum*, espécie encontrada na Américas, África e Ásia, grande responsável pela alta mortalidade associada à doença;

b) *Plasmodium vivax*, encontrada principalmente na Ásia, América Latina e algumas partes da África. Essa espécie de plasmódio não costuma causar morte, mas provoca acessos febris de grande intensidade; é responsável pela recrudescência da doença devido a uma forma latente do parasita (hipnozoíto) que pode ficar alojada em células hepáticas por meses ou até mesmo anos, reativando os sintomas da doença;

c) *Plasmodium ovale*, encontrada principalmente na África e nas ilhas do Pacífico Ocidental, biológica e morfologicamente semelhante ao *P. vivax*;

d) *Plasmodium malariae*, encontrada em todo o mundo e é a única espécie do parasita da malária que tem ciclo quartã (ciclo de três dias entre uma reinvasão e outra); as outras espécies têm ciclo terçã (ciclo de dois dias);

e) *Plasmodium knowlesi*, patógeno natural de macacos, encontrada no sudeste asiático. Recentemente esta espécie é tida como a quinta espécie capaz de parasitar o homem, especialmente em regiões asiáticas ^{1, 2, 3}.

A malária é transmitida entre seres humanos por mosquitos (fêmeas) da ordem **Diptera**, família **Culicidae** e gênero *Anopheles*. Esse gênero inclui aproximadamente 400 espécies, mas apenas 60 são capazes de transmitir o parasita da malária em condições naturais.

No Brasil, o principal vetor é o *Anopheles darlingi* e na África o *Anopheles gambiae*, este último sendo considerado mais eficiente na transmissão do parasita devido a características como antropofilia, voracidade, longevidade e adaptabilidade.

Anofelinos que transmitem a malária são encontrados não apenas nas áreas endêmicas, mas também em áreas onde a malária foi eliminada, sendo, portanto, áreas que estão risco de reintrodução da doença.

1.2 História e Evolução da Malária

A malária, doença denominada de '*Mal aria*', expressão italiana que significa ar ruim, é também chamada de paludismo - do latim pântano -, impaludismo, aleita ou febres terçã e quartã, parece ter acompanhado e evoluído junto com a humanidade por toda a sua história, desde seu início na África.

Um fator importante na evolução e sucesso destes parasitas foram as adaptações dos vetores anofelinos, responsáveis pela sua transmissão. Com as mudanças no meio ambiente causadas pelo advento da agricultura nas primeiras comunidades africanas, os organismos em contato com estas mudanças evoluíram e se adaptaram. Entre eles, os anofelinos, vetores de malária humana. Ao adotar a agricultura como meio de vida, estas populações passaram de pequenas, nômades e caçadoras a populações de alta densidade organizadas em comunidades. Este novo ambiente teve consequências importantes para os anofelinos:

- a) Maior número e densidade de humanos;
- b) Geração de inúmeras coleções de água perto de populações humanas, produzindo assim novas fontes de alimento para esses anofelinos, que passaram a se alimentar primariamente de sangue humano ⁴.

Este talvez seja o fator mais importante da estabilidade e intensidade da transmissão de malária na África tropical. Fora da África, onde quer que a malária seja ou tenha sido endêmica, os vetores são mais zoofílicos que antropofílicos. O grau de preferência por sangue humano tem importantes consequências na transmissão da malária humana, possibilitando a disseminação da doença por quase todo o continente africano, e posteriormente, e em menor intensidade, outras regiões do mundo.

Foram encontrados relatos de malária em escritos chineses de 3000 a.C., tábuas cuneiformes mesopotâmicas de 2000 a.C., e escrituras vedas na Índia de 1800 a.C. A malária participou ativamente em guerras, matando muitas vezes mais do que o próprio combate. Foram atribuídas à doença, mortes famosas como as de Alexandre, o Grande (323 a.C.), Genghis Khan (1227), Dante Alighieri (1321), Caravaggio (1610) e lorde Byron (1824). Muitos outros sofreram com a doença, entre eles, presidentes americanos, como: George Washington, Abraham Lincoln, Roosevelt e JFK (durante a 2ª Guerra Mundial); Colombo, sir Arthur Conan Doyle, Mahatma Gandhi, Ernest Hemingway, Leon Trotsky e Madre Teresa de Calcutá também sofreram episódios maláricos durante suas vidas.

No novo mundo, como não há qualquer relato maia, asteca ou inca sobre a doença, acredita-se que a malária foi trazida com a colonização de espanhóis e portugueses e com a vinda de escravos trazidos da África ⁵. Recentemente, Yalcindag et. al ⁶ analisaram isolados de *P. falciparum* de diferentes regiões do globo, e sugeriram 2 introduções diferentes do parasita ao continente sul-americano, subdividindo as populações de *P. falciparum* sul americanas em, no mínimo dois clusters genéticos: O norte, incluindo as populações colombianas e o sul, incluindo as populações da Guiana francesa, Brasil e Bolívia, muito provavelmente essas diferenças estariam ligadas à história da colonização das Américas (colonização espanhola e portuguesa), uma vez que escravos eram trazidos para diferentes regiões das Américas.

O panorama mundial de distribuição da malária tem mudado bastante ao longo dos anos. No início do século passado a malária estava presente na maior parte do globo ⁷, porém com a aquisição de conhecimento sobre o ciclo de vida e transmissão do parasita, foi possível uma mobilização mundial para erradicação da doença. Após o controle bem sucedido dos vetores da doença por aplicação de inseticidas, tratamento de infectados em grande escala utilizando cloroquina nos anos 50 e o subsequente desenvolvimento de resistência contra basicamente todos os derivados da Quinina e contra inibidores do metabolismo de folatos (sulfadoxina/pyrimetamina), a terapia contra a malária pode enfrentar sérias complicações com a ameaça de resistência também contra artemisinina ⁸, único reagente contra qual ainda não houve relatos de resistência explícita, por isso, o desenvolvimento de novas drogas e de vacinas eficientes contra malária é considerado prioridade pela OMS.

Apesar de notáveis avanços no campo de vacinas ⁹ com destaque para a vacina RTS,S desenvolvida utilizando partes da proteína circumsporozoíta da forma infectante do plasmódio ¹⁰, não existe ainda previsão de uma vacina viável para proteger um indivíduo de forma eficiente. Primeiramente, porque não existem estruturas que sozinhas, quando vacinadas, produzam uma resposta protetora em humanos. Além disso, não existe uma clara opinião sobre qual parâmetro ou padrão de resposta imunológica de humanos contra plasmódios é, de fato, o fator protetor, o que dificulta muito a procura racional por estruturas candidatas à vacina. Um avanço significativo junto com uma mudança do paradigma de que componentes da vacina necessariamente tem que ser reconhecidos por pessoas protegidas (assintomáticas) talvez tenha sido obtido recentemente na descoberta do potencial vacinal da proteína PfRh5 do complexo apical do parasita ¹¹.

1.3 Distribuição Atual da Malária no Mundo

Segundo o “*World Malaria Report 2010*”, da OMS, foram reportados no ano de 2009, 225 milhões de casos de malária, 85% deles na África. O número global de mortes atribuídas à doença foi de 781.000 (causadas por *P. falciparum*). No continente africano, a doença é responsável por 20% de todos os casos de mortes infantis, sendo que a cada 45 segundos morre uma criança de malária na África.

Nas Américas a malária ocorre em 21 países, com 20% da população total vivendo em áreas de risco. O número de casos relatados diminuiu de 1,18 milhões em 2000, para 526.000 em 2009. Quase 90% dos casos de malária nas Américas ocorre nos 9 países amazônicos (OMS, 2010).

Figura 1 - Mapa de risco de infecção por *P. falciparum*.

Divisão em 3 classes: Cinza claro, sem risco; Cinza médio, risco instável (PfAPI – *P. falciparum* Incidência Parasitária Anual < 0,1/1000 pessoas); E cinza escuro, risco estável (PfAPI – *P. falciparum* Incidência Parasitária Anual > 0,1/1000 pessoas) em 2007. Fonte: Hay et. al ¹².

Figura 2 - Gráfico que mostra a geografia dos casos clínicos de malária no mundo em 2007.

Gráfico pizza mostra as regiões da OMS com maior quantidade de casos clínicos de malária causados por *P. falciparum* (ordem decrescente). SEARO=South-East Asia Regional Office. O mapa mostra a composição dos 87 países endêmicos para *P. falciparum*. Fonte: Ray et. al ¹³.

1.4 A Malária no Brasil

O Brasil é o país com o maior número de casos de malárias reportados no continente americano. 99,9% dos casos de malária ocorrem na Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão.

A história da malária no Brasil é cheia de altos e baixos. No início da década de 40, eram estimados cerca de 6 milhões de casos da doença no país, distribuídos por quase todo o território. Após as campanhas de combate à doença nos começos dos anos 60, este número baixou para cerca de 37.000 casos anuais, e em 1979 a maioria dos estados brasileiros extra-amazônicos estava livre da doença ¹⁴. Durante a década de 90, após um aumento no número de casos de malária em 1980, certo controle foi obtido, porém em 1999 foram reportados mais de 600.000 casos da doença (mais de 80% de casos de *P. vivax*), chamando novamente atenção para o grave problema de saúde pública que a malária representa. Com o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária do governo em 2000, o número de casos da doença na Amazônia legal foi novamente controlado. Segundo dados do ministério da saúde (SISMAL/SIVEP/SVS/MS), a incidência anual (IPA) de malária na Amazônia passou de 25,6/1000 habitantes em 2005 a 12,8/1000 habitantes em 2008. Destes casos, 15,5% são causados por *P. falciparum*.

Figura 3 - Mapa do Risco de Transmissão de Malária no Brasil.

Mapas comparativos de 1999 e 2008. Fonte: SISMAL/SIVEP/SVS/MS. Atualizado em 28.12.2009.

É interessante mencionar a existência de indivíduos assintomáticos na região amazônica. Estes indivíduos são ‘portadores’ dos parasitas, porém não apresentam sintomas. Geralmente são habitantes antigos de determinadas áreas e podem contribuir para a manutenção da transmissão da doença nessa região (mesmo que em condições baixas), assim como as mudanças ambientais que a região amazônica tem sofrido nos últimos anos, afetando a abundância do vetor da doença¹⁵.

Além disso, existem poucos relatos de malária cerebral no Brasil, fato que poderia ser motivado por um *subset* de parasitas inaptos para causar este tipo de patologia ou pelo modo diferente de infecção/transmissão nas áreas endêmicas brasileiras, com menos exposição de crianças entre 5 e 15 anos e/ou rápido acesso ao tratamento, diferente da situação africana, onde crianças são a maioria de pacientes com esta evolução.

1.5 Ciclo de vida dos parasitas em humanos

O ciclo de vida desse parasita é complexo, com reprodução assexuada (esquizogonia) no homem e sexuada no inseto vetor.

Figura 4 - Animação do ciclo de vida de *P. falciparum* (CódigoQR).

Fonte: DNATube. Download do leitor em : <http://reader.kaywa.com/phones>.

Após a picada do mosquito fêmea infectado, do gênero *Anopheles*, os esporozoítos móveis são inoculados na derme e atingem a corrente sanguínea do indivíduo. Estes esporozoítos são levados rapidamente para o fígado e lá invadem os hepatócitos, iniciando a fase hepática do ciclo do parasita. Após uma série de etapas de divisões assexuadas (esquizogonia) e diferenciação, os esquizontes hepáticos liberam os merozoítas na corrente sanguínea. A duração desta fase é espécie dependente; 6 dias no caso de *P. falciparum* e 8 dias no caso de *P. vivax*.

No caso de *P. vivax* e de *P. ovale*, podem ocorrer recaídas meses depois do primeiro ataque da doença, ou mesmo depois de tratamento eficaz. Estas recaídas se devem à presença das formas hipnozoítas, que permanecem latentes nas células do fígado.

Os merozoítas liberados invadem os eritrócitos, iniciando o ciclo intraeritrocítico.

Dentro dos eritrócitos, os parasitas se localizam dentro de um vacúolo parasitóforo, passando pelas etapas de anel (trofozoíta jovem), trofozoíta maduro e esquizonte. Estas etapas de diferenciação, crescimento e multiplicação dão origem a outros merozoítas. Os ligantes e receptores envolvidos na invasão de eritrócitos foram recentemente revisados ¹⁶.

Com o rompimento da hemácia infectada, processo estritamente regulado e dependente de proteases do parasita ¹⁷, estes merozoítas são liberados e invadem novos eritrócitos propagando o ciclo do parasita, e é durante esta etapa do desenvolvimento do parasita que aparecem, no hospedeiro, os sintomas característicos da malária.

Porém, alguns merozoítas seguem um caminho alternativo de desenvolvimento, e formam os gametócitos masculinos e femininos, as formas transmissíveis para o mosquito.

Se ingeridos pelo mosquito susceptível durante o repasto sanguíneo, estes gametócitos originarão os gametas e o ciclo sexuado ou esporogônico.

Figura 5 - Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*.

A fêmea infectada do mosquito *Anopheles* inocula os esporozoítas no hospedeiro humano. Os esporozoítas infectam as células hepáticas iniciando a fase hepática da doença. Após esquizogonia eles se transformam em esquizontes hepáticos. Os merozoítas são liberados na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos (fase eritrocítica). Estes merozoítas se desenvolvem em estágio anel, trofozoíta e esquizonte. Com a ruptura das hemácias, há a liberação de novos merozoítas, que continuarão o ciclo eritrocítico. Alguns parasitas se diferenciam em gametócitos, que podem ser ingurgitados pela fêmea do mosquito durante a alimentação iniciando a fase sexuada do ciclo que culmina na esporogonia.

Fonte: (Adaptado de <http://www.pasteur.fr>).

1.6 *Plasmodium falciparum*, Citoaderência e Malária Grave

As manifestações clínicas da malária acontecem durante a fase sanguínea do ciclo de vida do parasita. A presença do parasita, e a resposta inflamatória resultante do hospedeiro, levam a febre altas e sintomas comuns de gripe. 1-2% dos casos de malária associada a *Plasmodium falciparum*, podem evoluir para a forma grave da doença, que inclui coma, (malária cerebral), síndrome respiratória, anemia severa e falência múltipla de órgãos ¹⁸. Esta característica é causada por um sequestro dos eritrócitos infectados na microvasculatura de diversos órgãos, possibilitando um escape do parasita da sua destruição no baço e podendo levar a obstrução microvascular ^{18, 19}, perturbações no metabolismo (acidose) ²⁰ e liberação de mediadores inflamatórios como parte da resposta imune contra o parasita ^{21, 22} que podem levar à morte. Isto também explica porque apenas formas jovens do parasita (anéis) e gametócitos maduros são encontrados em sangue periférico utilizado no diagnóstico de rotina para este parasita.

A citoaderência acontece pois adesinas do parasita expressas na superfície dos eritrócitos infectados com formas maduras de *P. falciparum* (trofozoítas e esquizontes) são capazes de se ligar a uma série de receptores endoteliais ²³ como, por exemplo, **CD36** ²⁴, molécula de adesão intercelular 1 (**ICAM1**) ²⁵, molécula de adesão de células vasculares (**VCAM**), **PECAM1** e **NCAM**; Condroitina sulfato A (**CSA**, presente em sincitiotrofoblastos da placenta), **trombospondina** ²⁶, **P- e E-Selectina** ²⁷ e o receptor de complemento **CR-1** ²⁸. Além disso, o fenômeno de *rosetting* também pode acontecer. Neste caso, os eritrócitos infectados se ligam a eritrócitos não-infectados via receptores presentes na superfície da hemácia, como é o caso dos fatores sanguíneos e o receptor de complemento CR1, formando rosetas ²⁹. A aderência a plaquetas recebe o nome de *clumping* ³⁰ e envolve CD36, abundante em plaquetas.

Figura 6 - Citoaderência de eritrócitos infectados.

Fonte: Adaptado de Rowe et. al ³¹.

A maioria dos isolados de *P. falciparum* oriundos diretamente de pacientes citoadere em CD36 e ICAM1, bem como algumas cepas utilizadas em laboratório ³², ³³. Aderência em ICAM1 tem sido associada ao sequestro de eritrócitos infectados na microvasculatura cerebral ¹⁹, e mostrou uma fraca, porém não significativa (estatisticamente) associação com malária cerebral, enquanto adesão em CD36 não mostrou nenhuma associação ¹⁹, sendo muitas vezes relacionada à malária não-grave.

Outros fenótipos adesivos como *rosetting*^{20, 34} e a capacidade de se ligar a receptores expressos na placenta apresentaram de forma consistente, associação com patologia. Um dos fenótipos mais estudados é a citoaderência ao receptor endotelial CSA, presente em abundância nos sincitiotrofoblastos da placenta^{35, 36}.

Figura 7 - Características da citoaderência de *Plasmodium falciparum*.

Fonte: Adaptado de Albretch³⁷.

A tabela 1, adaptada de Rowe e colaboradores³¹ traz uma revisão dos estudos publicados relacionando (positiva ou negativamente) fenótipo e a forma grave da doença.

Quadro 1. Revisão bibliográfica de associação de determinados fenótipos a malária severa

RECEPTOR	FENÓTIPO ASSOCIADO A DOENÇA SEVERA?
CITOADERÊNCIA ENDOTELIAL	
CD36	ÁFRICA: NÃO ^{33, 38, 39, 40, 41} ÁSIA: SIM ^{42, 43,} , NÃO ⁴⁴
ICAM1 (CD54)	ÁFRICA: NÃO ^{33, 39, 41} ÁSIA: NÃO ^{43, 44}
P-selectina (CD62P)	ESTUDO NÃO REALIZADO ÁFRICA: NÃO ⁴⁵
Trombospodina	ÁSIA: ESTUDO NÃO REALIZADO ÁFRICA: NÃO ^{33, 41}
PECAM1 (CD31)	ÁSIA: ESTUDO NÃO REALIZADO ÁFRICA: NÃO ³³
E-selectina (CD62E)	ÁSIA: NÃO ⁴⁴ ÁFRICA: NÃO ³³
VCAM1 (CD106)	ÁSIA: NÃO ⁴⁴
ROSETTING	
Rosetting	ÁFRICA: SIM ^{30, 33, 41, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52} ÁSIA: NÃO ^{42, 44, 53, 54}
CLUMPING	
Clumping mediado por plaquetas	ÁFRICA: SIM ^{30, 55,} , NÃO ⁵⁶ ÁSIA: SIM ⁵⁴

Fonte: Adaptado de Rowe ³¹.

1.7. Proteínas PfEMP1 e Genes *var*

A citoaderência é mediada por proteínas de alto peso molecular (200 – 400 KDa), PfEMP1 (Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1), presentes em estruturas elétron-densas (*knobs*) na membrana dos eritrócitos infectados por *P. falciparum* ⁵⁷. Apesar de alguns relatos terem sugerido outros fatores envolvidas na citoaderência como Clag9 ⁵⁸, a família das proteínas PfEMP1 continua sendo, claramente, o mais importante ligante.

Estas proteínas são codificadas por genes da família *var*, presentes de 50 a 60 cópias no genoma haplóide ^{59, 60}, encontrados, na sua maioria, em regiões subteloméricas e centrais espalhados pelos 14 cromossomos do parasita *P. falciparum* da cepa 3D7 ⁶¹. A transcrição monoalélica destes genes faz com que uma ou poucas espécies de proteínas PfEMP1 estejam presentes na superfície da hemácia infectada ^{62, 63}, ocorrendo um *switching* da transcrição em uma parte dos parasitas após reinvasão, alterando assim o fenótipo expresso, configurando um exemplo clássico de variação antigênica ⁶⁴. Devido a mecanismos específicos de recombinação ectópica nos telômeros ⁶⁵, cepas diferentes possuem repertórios de genes *var* diferentes e expressam antígenos PfEMP1 antigenicamente diferentes, com algumas exceções, como *var1common* ^{66, 67} e *var2csa* ⁶⁸.

No estudo anteriormente citado ⁶⁵, os autores especulam que também ocorreria recombinação ectópica durante as divisões mitóticas no parasita, o que levaria a uma instabilidade dos telômeros e dos genes *var* ali presentes. Porém, estudos em nosso laboratório mostraram que o a redistribuição de genes *var* depois de múltiplos ciclos eritrocíticos aparentemente não ocorre ou ocorre em uma frequência pouco significativa (Castiñeiras, comunicação pessoal). Provavelmente, a recombinação ectópica ocorre somente em formas sexuadas do parasita, e esteja somente associada a processos meióticos Alternativamente, existe a possibilidade de ocorrer recombinação ectópica em esquizogonias hepáticas ou em na esporogonia dentro do mosquito.

Proteínas PfEMP1 são codificadas por dois *exons*: Uma porção extracelular, formada por domínios diferentes : DBL (Duffy binding like, tipos $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$), CIDRs (Cysteine rich interdomain region, tipos α, β, γ) e C2 (constant 2), além de uma pequena região transmembrana (TM) e uma porção intracelular, (C-terminal), formada pelo domínio citoplasmático ATS (*acidic terminal segment*)⁶⁹. Todas as

variantes PfEMP1 apresentam em sua estrutura um domínio N-terminal (NTS) que apresenta um motivo conservado chamado PEXEL, indicando que esta proteína é exportada para a membrana do eritrócito ^{70, 71} (Figura 8). A maioria das variantes PfEMP1 possui estrutura conservada, formada pelos domínios NTS, DBL1 α e CIDR ⁶¹.

Figura 8 - Arquitetura de uma proteína PfEMP1 e seus domínios adesivos.

Fonte: Adaptado de Rowe ³¹.

Os genes *var* podem ser divididos em *upsA*, *upsB*, *upsC* e *upsE*, classificação baseada na localização cromossômica e na sequência da região 5' upstream (Ups) promotora destes genes ⁷². Embora as proteínas PfEMP1s sejam muito variáveis, os promotores de genes *var* são bastante conservados ^{61, 72, 73}.

Os grupos UpsA e UpsE são subteloméricos e transcritos em direção ao telômero. UpsB flanqueia genes *var* subteloméricos transcritos em direção ao centrômero. O grupo UpsC abriga genes *var* localizados nas regiões centrais.

Estudos têm mostrado que determinados grupos de genes *var* estão, provavelmente, associados a determinados fenótipos. Por exemplo, PfEMP1s codificadas por genes *var* pertencentes aos grupos *upsB* e *upsC* são aderentes a CD36, porém, genes do grupo *upsA* codificam PfEMP1s que não parecem interagir

com este receptor ⁷⁴. Além disso, a transcrição de genes *var* upsA foi associado à malária grave ^{75, 76} e o grupo upsE, que possui uma sequência promotora parecida com upsA, é conservado em várias regiões do mundo e formado apenas pelo gene var2CSA, cuja expressão está associada à malária gestacional ⁷⁷.

Os genes *var*, e conseqüentemente as proteínas PfEMP1 resultantes são muito variáveis entre cepas diferentes: O repertório de genes *var* da cepa 3D7, por exemplo, compartilha muito poucos genes *var* com a cepa Dd2 ⁷⁸. Ao mesmo tempo, a cepa Dd2 compartilha muito poucos genes *var* com a cepa HB3, o que indica que diferentes cepas de *P. falciparum* contêm repertórios *var* completamente diferentes.

Em outros estudos, foi descoberto que existem determinados genes *var* que são conservados em várias cepas ^{66, 79}, com destaque para o gene var2csa, cuja proteína está claramente associada a citoaderência de parasitas a Heparansulfato e condroitina sulfato A presentes em sincitiotrofoblastos. O motivo porque estes genes são mais conservados reside, provavelmente, no fato da orientação deles ser inversa a orientação dos demais genes *var* subteloméricos ⁶¹ e uma limitada possibilidade de mudança estrutural sem perder sua funcionalidade.

Por outro lado, um estudo recente mostrou que na Amazônia brasileira e possivelmente em toda América do Sul, circulam cepas de *P. falciparum* com repertórios de genes *var* altamente redundantes ⁸⁰, muito mais que em qualquer localidade até agora analisada, mesmo analisando isolados de regiões limitadas obtidas em um curto prazo de tempo ⁸¹.

No Brasil, a redundância ocorre independente de tempo e localidade. Foram encontrados isolados de 1986 e 2004 que continham vários genes *var* compartilhados. Dentre os isolados analisados, foram identificadas várias seqüências parciais de genes *var* (domínios codificadores para DBL α), e de duas outras famílias multigênicas *rif* e *stevor* que foram encontrados na maioria dos isolados.

Além disso de estarem relacionadas à citoaderência., estas proteínas parecem ter, também, um importante papel no desenvolvimento de uma resposta imunológica variante-específica no hospedeiro ⁸², sendo consideradas importantes alvos da imunidade adquirida a malária ^{83, 84}.

1.8 Interação entre PfEMP1 e o Receptor CD36

Eritrócitos infectados se ligam ao receptor CD36⁸⁵, expresso nas células endoteliais e epiteliais, macrófagos, monócitos, plaquetas e adipócitos⁸⁶. Estudos utilizando anticorpos monoclonais⁸⁷ e peptídeos⁸⁸ para bloquear a ligação, sugerem que o *site* de ligação para *P. falciparum* compreende os aminoácidos 139-184 de CD36, porém, outras regiões não foram excluídas. Já do lado do parasita, os ligantes são proteínas pfEMP1^{59, 89}, codificadas principalmente por genes *var* dos grupos B e C⁷⁴, que se ligam ao CD36 através da porção N-terminal de domínios CIDR^{90, 32, 91}.

A maioria dos isolados de *P. falciparum* são capazes de se ligar a CD36⁹², porém ainda não se conhece todo seu papel na patogenia da malária. Estudos na África não encontraram diferença entre a capacidade de se ligar a CD36 entre isolados derivados de pacientes com malária severa e malária branda.^{33, 39, 40, 41} Outros estudos, analisando a genética de pacientes deficientes de CD36, mostrou resultados conflitantes, porém negativos. De modo geral, as evidências atuais parecem não suportar associação entre CD36 e malária severa na África sub-Sahariana. Já na Tailândia, 2 estudos apresentaram correlação positiva significativa entre capacidade de ligação em CD36 e malária grave^{42, 43}; que não foram confirmadas por um terceiro estudo⁴⁴.

1.9 Interação entre PfEMP1 e o Receptor ICAM1

ICAM1, ou CD54 é uma glicoproteína de membrana da superfamília das imunoglobulinas, com cerca de 80-114Kda, expressa na superfície de células endoteliais e leucócitos, em grande quantidade no endotélio dos vasos sanguíneos cerebrais⁹³. O sítio de ligação ao eritrócito em ICAM-1 foi mapeado e parece estar do lado oposto ao sítio de ligação do seu ligante natural LFA-1^{25, 94}. Já os ligantes do parasita para ICAM1 são os membros da família PfEMP1 que contêm um par de domínios encontrados apenas em algumas variantes de PfEMP1, os domínios DBL β -C2^{95, 96, 97}. Foi identificado que apenas algumas variantes PfEMP1 contendo o par de domínio DBLb-C2 são capazes de se ligar a ICAM1⁹⁸, e que apesar das sequências dos sítios de ligação para ICAM1 apresentarem certa sobreposição, em diferentes cepas de *P. falciparum*, elas não são idênticas^{25, 94, 99}.

A expressão de ICAM1 nas células endoteliais é amplamente regulada na presença de uma variedade de mediadores inflamatórios como TNF α e IL-1 β , citocinas proinflamatórias, que atingem níveis elevados durante os quadros de malária grave ^{21, 100}. Por isso, é plausível que a citoaderência a ICAM1 tenha o potencial de contribuir para o quadro de malária cerebral.

Porém, estudos com isolados de campo não encontraram nenhuma associação estatisticamente significativa entre capacidade de ligação a ICAM1 e malária grave na África ^{33, 39, 41}, embora um relativo aumento na ligação com ICAM1 tenha sido relatado em isolados derivados de pacientes com malária clínica (grave e sem complicações) em comparação com indivíduos assintomáticos ³³. Na Ásia, a capacidade de ligação a ICAM1 também não foi associada à malária grave ainda ^{43, 44}. No entanto, estudos histológicos têm demonstrado que IEs e ICAM1 colocalizam nos cérebros de pacientes que morreram de malária cerebral ¹⁰¹.

ICAM1 pode apresentar um polimorfismo na sequência promotora de seu gene *icam1* (ICAM1Kilifi), que parece reduzir a ligação entre o eritrócito infectado e ICAM1 sob condições de fluxo ¹⁰² e ocorre em alta frequência em populações africanas. Em estudo anterior no Quênia, esta mutação foi associada à severidade da doença e predisposição a malária cerebral ¹⁰³, porém, outros estudos no Gabão ¹⁰⁴ e na Tailândia ¹⁰⁵, não verificaram esta mesma associação, e sim associaram o polimorfismo de ICAM1 à proteção contra a forma grave da doença.

A aderência de determinados domínios a certos receptores moleculares, os tornariam importantes alvos na tentativa de se produzir uma vacina antiaderente contra a malária, como tentaram ¹⁰⁶, imunizando camundongos com o domínio CIDR, e, de fato, conseguindo induzir a produção de anticorpos que inibiam a citoaderência em receptor CD36.

Percebemos ainda, que a associação entre fenótipo e gravidade da doença continua sendo uma incógnita, ainda mais com tão pouca informação sobre os isolados brasileiros, o que torna ainda mais importante nossa busca por respostas.

1.10 Imunidade e Malária

Diferente da imunidade a infecções virais, geralmente adquirida após uma só infecção, e geralmente de longa duração, a imunidade adquirida à malária causada por *P. falciparum* é um processo bem mais complexo que ainda não foi totalmente compreendido. É um processo possivelmente dependente de fatores como frequência e intensidade de transmissão da doença, idade do indivíduo infectado, e tempo de exposição prévia ao parasita ¹⁰⁷, e parece depender tanto de mecanismos inatos quanto de mecanismos desenvolvidos através da adaptação do indivíduo a infecção precedente.

Entretanto, estes mecanismos, apesar de serem capazes de limitar o pico de parasitemia, prevenindo doença severa e reduzindo a carga de eritrócitos infectados circulantes, não são capazes de desenvolver uma imunidade estéril contra o parasita ^{11, 108}.

Alguns indivíduos adultos, residentes em áreas endêmicas para malária podem se tornar assintomáticos através de exposição natural ao parasita. Ou seja, estes indivíduos se tornam imunes aos sintomas da doença apesar de continuarem apresentando uma baixa e persistente parasitemia, freqüentemente abaixo do limite de detecção da microscopia, mas que pode persistir por meses e até mesmo anos.

Esta proteção clínica no indivíduo assintomático parece acontecer após repetidas infecções, porém parece condicional e temporária, uma vez que o indivíduo se afaste da região endêmica por um período longo, é comum a perda desta imunidade adquirida aos sintomas da doença ¹⁰⁷.

Tanto resposta imune humoral quanto celular estão envolvidas no processo de aquisição de imunidade contra malária, tendo como principais componentes: macrófagos, células natural killer (NK), células dendríticas, células T $\gamma\delta$, anticorpos, neutrófilos, linfócitos e monócitos ¹⁰⁹. A figura 9 é um esquema das possíveis vias de atuação das células do sistema imune humano contra a malária.

Figura 9 - Esquema de prováveis vias de imunidade nata e adquirida contra malária.

Fonte: Adaptado de Stevenson ¹⁰⁸.

As formas específicas do parasita: estágios hepáticos, gametócitos, esporozoítos e principalmente estágios intraeritrocíticos, representam grupos de importantes antígenos-alvo para o sistema imune do hospedeiro. Anticorpos específicos contra vários destes antígenos têm sido relacionados como potenciais alvos para a criação de uma vacina ou mesmo para uma terapia alternativa contra a forma severa da malária ¹¹⁰. A ruptura dos eritrócitos infectados e a exposição de antígenos do parasita ao sistema imune do hospedeiro é geralmente acompanhada por períodos de febre, náusea, cefaléia e outros sintomas, que caracterizam resposta sistêmica à liberação de citocinas pró-inflamatórias por células do próprio sistema imune do indivíduo ¹¹¹.

A aquisição de anticorpos contra um repertório variado de antígenos ligantes e variantes do parasita (VSAs), expressos na membrana do eritrócito (principalmente PfEMP1), tem sido considerada componente importante para o desenvolvimento de imunidade ao *P. falciparum* ^{112, 113}. Exemplo disso é desenvolvimento de imunidade à forma malária grave após um pequeno número de infecções mais rapidamente que a imunidade à forma moderada da doença, provavelmente devido à diversidade restrita dos antígenos responsáveis pelo quadro da forma grave da doença ¹¹⁴. Outro

exemplo ligado à aparente restrição na diversidade antigênica é uma particularidade da malária placentária: Mulheres primigrávidas são particularmente susceptíveis a este tipo de malária. Susceptibilidade esta que diminui nas gestações subseqüentes, indicando uma baixa diversidade e alta especificidade dos antígenos, neste caso PfEMP1_{CSA} (var2csa), dos parasitas presentes aderidos na placenta ¹¹⁵.

Os anticorpos são as principais moléculas envolvidas na aquisição de imunidade contra antígenos sanguíneos da malária ¹¹⁶. Eles são produzidos por linfócitos B ativados e sua atuação pode ser através de diversos mecanismos como bloqueio da transmissão do parasita, através do impedimento da invasão dos eritrócitos pelos merozoítas ou mesmo pela fagocitose do eritrócito infectado ^{117, 118}.

Estudos têm sido feitos no intuito de caracterizar a resposta anti-VSA de indivíduos assintomáticos, infectados, mas sem sintomas clínicos, e tentar, correlacionar a condição de assintomático com respostas a um repertório de antígenos específicos tanto de cepas de laboratório quanto de isolados de campo ^{84, 119, 120, 121, 122}. Porém, estes estudos têm se concentrado nos continentes africano e asiático em regiões de alta transmissão de *Plasmodium*, e com poucos resultados para áreas com menor taxa de transmissão (hipoendêmicas) como encontrado no Brasil.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Em geral, a presença de uma resposta humoral contra estruturas na superfície das hemácias infectadas parece estar relacionada ao grau de proteção observado no respectivo indivíduo. Em estudos realizados na África, utilizando apenas uma parte de proteínas PfEMP1, o domínio DBL1 α , esta correlação também foi observada ¹²³. Porém, não foi esclarecido qual função de anticorpos exerce um papel protetor (opsonizantes ou antiaderentes, ou ambos).

Neste projeto procuramos elucidar vários aspectos da citoaderência de hemácias infectadas, além de tentar correlacionar determinados fenótipos adesivos considerados importantes com a resposta imunológica em pessoas naturalmente expostas aos parasitas, residentes em região endêmica.

- Elucidar o grau de reconhecimento de hemácias infectadas com determinado fenótipo de citoaderência por soros de indivíduos apresentando infecções sintomáticas e assintomáticas.
- Elucidar a capacidade de reversão de citoaderência de um número de isolados em receptores CD36 e ICAM-1 por soros de indivíduos “suscetíveis” ou “protegidos” em sistema estático.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolados de *Plasmodium falciparum*

Os isolados de *Plasmodium falciparum* utilizados neste trabalho foram coletados entre os anos de 1987 e 2006, e são provenientes do estado de Rondônia, região endêmica de malária no Brasil. Além disso, foi também utilizado o clone 3D7, cuja linhagem parental é o isolado NF54, obtido em 1979 na Holanda a partir da amostra sanguínea de um paciente que morava próximo ao aeroporto Schiphol, perto da cidade de Amsterdam.

3.2 Cultura de *Plasmodium falciparum*

Os isolados de *Plasmodium falciparum* foram mantidos *in vitro* (em sistema *candle jar* adaptado de ¹²⁴ e cultivados em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de plasma humano A⁺ ou AB⁺.

Eritrócitos O⁻ foram adicionados à cultura para a obtenção de um hematócrito de 5%. As garrafas foram mantidas em estufa a 37 °C com trocas diárias de meio. A parasitemia foi monitorada através de microscopia de esfregaços corados com *kit* Panótico Rápido. As culturas foram regularmente sincronizadas através dos métodos de lise por sorbitol ¹²⁵ e sedimentação por plasmagel ¹²⁶. Uma cultura controle com hemácias não infectadas foi mantida sob as mesmas condições para controle negativo.

O plasma humano (tipo A⁺ ou O⁺) utilizado na cultura dos parasitas foi gentilmente cedido pelo Hemocentro do Hospital Sírio Libanês de São Paulo ou pelo Hemocentro do Hospital da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Cada lote de plasma foi previamente inativado a 56 °C por 1 hora. A fibrina presente no plasma foi precipitada por centrifugação (3.000 x g, por 15 minutos). As alíquotas de plasma foram armazenadas a -20 °C.

Figura 10 – Cultura sincronizada de *P. falciparum*

Fonte: Fratus¹⁵⁸

3.3 Congelamento e descongelamento dos parasitas

Os parasitas foram congelados em estágio de anel com parasitemias acima de 10%, como descrito em ¹²⁷. A solução contendo os parasitas mais 1,66 volumes de *Glycerolyte* foi transferida para um criotubo e armazenada a -80 °C por pelo menos dois dias antes da transferência para o Nitrogênio líquido.

Para o descongelamento a amostra de parasitas foi descongelada em TA. As hemácias infectadas foram transferidas em um tubo de 15 ml. Em seguida, cloreto de sódio 12 % (1/5 de volume das hemácias congeladas) foi adicionado lentamente sob agitação lenta. Após incubação por 1 minuto em TA, foram adicionados 10 volumes de cloreto de sódio 1,6%, novamente sobre agitação constante. Após isto, as hemácias foram centrifugadas a 800 x g por 5 minutos em TA e lavadas uma vez com meio RPMI-1640 (pH 7,2) sem plasma e depois colocadas em cultivo.

3.4 Sincronização de parasitas com (D-) sorbitol

Para obtenção de estágios de anel de *P. falciparum* (até 10 horas após a reinvasão), os parasitas foram sincronizados por tratamento com sorbitol ¹²⁵. Eritrócitos infectados por *P. falciparum* em cultura assincrônica foram centrifugados (800 x g, 5 minutos, TA) e incubados em 5 -10 volumes de sorbitol 5% por 10 minutos. Durante os 10 minutos, a solução foi agitada duas vezes. Após a centrifugação de 5 minutos a 800 x g, o sorbitol foi aspirado e as hemácias foram

lavadas uma vez com meio RPMI-1640 incompleto (centrifugação 5 minutos, 800 x g, TA). Em seguida, os parasitas foram cultivados sob condições normais.

3.5 Enriquecimento dos trofozoítos maduros e esquizontes

Pelo método de sedimentação com Plasmagel[®] (Fresenius Kabi; São Paulo, SP, Brasil), é possível enriquecer os estágios intraeritrocitários mais maduros, como trofozoítos e/ou esquizontes ¹²⁶. Cultivos de parasitas, predominantemente formas maduras, foram centrifugados em tubos de 15 ml (800 x g, 5 minutos a TA) e o precipitado foi ressuspensionado em 2,4 volumes de Plasmagel[®] e 1,4 volumes do meio completo (RPMI-1640, pH7,2 e 10% de plasma humano). A mistura foi incubada em posição vertical por 1 hora a 37 °C. Assim, formas de anel e gametócitos se encontram junto com hemácias não-infectadas no fundo do tubo enquanto formas maduras se encontram no sobrenadante. Essas formas foram retiradas e transferidas para um novo tubo, lavadas e colocadas novamente em cultivo ou os parasitas concentrados foram usados para experimentos de *panning*.

3.6 Cultura de células eucarióticas

Para os ensaios de citoaderência foram utilizadas linhagens de células CHO (*Chinese hamster ovary*) expressando constitutivamente na sua superfície ICAM1, e CD36, provenientes de cDNA humano. A linhagem CHO-K1 constitui a cepa selvagem, a qual expressa naturalmente CSA na sua superfície (todas as linhagens foram gentilmente cedidas pelo Dr. Artur Scherf, do Instituto Pasteur, em Paris).

As células foram cultivadas em garrafas de cultivo em meio RPMI-1640 acrescidas de 5% (v/v) de FCS (soro bovino fetal) a 37 °C em uma atmosfera de 5% CO₂. As células foram tripsinizadas e diluídas 1:4 a cada 3 dias, utilizando-se 0,1% tripsina-EDTA conforme descrito ¹²⁸.

3.7 Teste para *Mycoplasma* sp.

Para testar a presença de *Mycoplasma* sp. nos cultivos de *P. falciparum* ou de células mamíferas, 500 µl do sobrenadante de cultivo foram centrifugados (10.000 x g, por 5 minutos, a TA), ressuspensionado em 50 µl de TE e desnaturados por 5 min a 95°C. Um µl deste material foi utilizado como *template* na amplificação por PCR do

gene rRNA de *Mycoplasma* sp. Os oligonucleotídeos utilizados foram: MycoA(sense): 5'-ggcgaatgggtgagtaacacg-3' e MycoB(antisense): 5'-cggataacgcttgcgacctat-3'.

A reação constitui-se de 1 µl de fita molde, 2,0 µl tampão 10x PCR, 2.5 mM MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech ou Invitrogen Corporation, CA, USA), e 5 pmol de cada oligonucleotídeo em volume final de 20 µl. As condições de amplificação foram: 30 seg., 94 °C; 30 seg., 60 °C; 30 seg. 72 °C repetido em 30 ciclos; e uma polimerização final por 10 minutos a 72 °C.

O produto da PCR foi analisado por meio de gel de TAE-agarose de 1,5% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml final). No caso de contaminação com *Mycoplasma*, um produto de 400 pb é observado. Como controle, foi utilizado gDNA de *Mycoplasma* sp., cedido pelo Departamento de Microbiologia do ICB ou um plasmídeo contendo uma cópia da sequência amplificada, diluído a 0,5 ng/µl.

Os testes foram realizados mensalmente, para garantir a ausência de contaminação em nossas culturas, e quando necessário, a troca das mesmas por não contaminadas.

3.8 Ensaio de citoadesão de *P. falciparum* (Panning)

Durante a infecção de seres humanos, hemácias infectadas com *P. falciparum* possuem a capacidade de aderir a receptores de células endoteliais do hospedeiro humano. Para estudar PfEMP1s relacionadas a fenótipos característicos, parasitas foram selecionados por *panning* para os receptores ICAM-1, CD36 e CSA expressos na superfície das células CHO.

Trofozoítos maduros foram enriquecidos pelo método de Plasmagel[®] (descrito acima) e ressuspensos em meio de *binding* (RPMI-1640 pH 6,8 e 10% de plasma humano). As células CHO que expressaram o receptor desejado foram replaqueadas 2-3 dias antes do experimento (para atingir uma confluência de 80 a 100%). As células foram lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 incompleto (pH 6,8) e uma vez com meio de *binding*. Posteriormente, as hemácias parasitadas foram acrescentadas às células CHO e incubadas por 1 h a 37 °C com agitação leve intermitente, a cada 15 minutos.

As hemácias não-aderidas foram aspiradas e as células, lavadas 3 vezes com meio RPMI-1640 incompleto (pH 6,8). Os parasitas aderidos foram retirados das células com meio RPMI-1640 completo (pH 7,2) e cultivados sob condições normais. Para evitar a contaminação do cultivo com células CHO, o cultivo foi transferido um dia após o *panning* para uma nova garrafa. Para obtenção de uma população homogênea de parasitas expressando PfEMP1s relacionadas a fenótipo adesivo em questão, o experimento de aderência foi repetido cinco vezes e sempre antes de cada experimento em que estes parasitas selecionados foram utilizados.

3.9 Purificação do RNA total dos trofozoítas

Para obtenção de RNA total, os trofozoítas jovens foram purificados através de sedimentação por plasma gel (item 3.5) e lisados com 20 volumes de saponina 0,05% em PBS [1x] por 4 minutos a TA e precipitados por centrifugação (5 min, TA, 3000 x g). O precipitado foi ressuspendido em 50µl de PBS [1x], e lisado com 750 µl de Trizol LS (Invitrogen), e armazenado a – 80 °C até a sua utilização. O RNA foi extraído de acordo com as instruções do fabricante.

3.10 Transcrição reversa (RT)

Para a eliminação de DNA genômico residual, o RNA (1-5 µg) foi tratado por três vezes com a enzima DNase I (Fermentas Inc.) como descrito pelo manual do fabricante. O tratamento com DNase I consistiu de 3 x 15 minutos de incubação a 20 °C e inativação da enzima pela adição de 2,5 mM final de EDTA pH 8 e a sua incubação a 65 °C por 10 minutos.

A reação da transcriptase reversa para obtenção do cDNA foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos randômicos (hexameros, N₆). A reação foi realizada com a enzima M-MuLV (Fermentas), seguindo as instruções do fabricante. Para cada amostra de RNA, realizou-se um controle negativo na ausência da transcriptase reversa, para que, caso existisse ainda resíduos de gDNA estes seriam detectados.

3.11 Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando substratos de *P. falciparum*

Utilizamos o cDNA dos parasitas como fita molde nas reações de PCR para a investigação dos transcritos de genes *var* dos isolados de *P. falciparum*. O domínio DBL α foi amplificado utilizando oligonucleotídeos *var* universais que permitem a amplificação dos domínios de DBL1 α da maioria do repertório dos genes *var* da cepa 3D7 e de isolados de campo.

Para reações de PCR foi utilizado Taq DNA-polimerase (Fermentas). Polimerases, tampões e DNA foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

Produtos de PCR amplificados foram analisados em géis de TAE-agarose, corados com brometo de etídio como descrito acima e purificados utilizando sílica. Os fragmentos purificados foram ligados em vetor de clonagem pGEM T easy (Promega), transformados em *E. Coli* DH10B e plasmídeos recombinantes foram preparados para posterior análise e sequenciamento.

3.12 Sequenciamento

Os plasmídeos obtidos foram seqüenciados por meio do seqüenciamento de uma ou das duas fitas de DNA utilizando *BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit* (PerkinElmer, MA, USA), em um volume final de 6 μ l, contendo 200-300 ng de plasmídeo, 5 pmol de oligonucleotídeo *sense* e/ou *antisense* (de acordo com cada plasmídeo utilizado), 4 μ l de *Big Dye Mix*. As reações foram submetidas a 25 ciclos de: 10s a 96 °C, 5s a 50 °C e 4 min a 60 °C. Após a reação de *Cycle Sequencing*, as amostras foram precipitadas com isopropanol 75%, lavadas com etanol 70%, ressuspendidas em formamida e aplicadas em um seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems, CA, USA). A análise e o alinhamento das seqüências foram conduzidos utilizando-se os *softwares* ClustalX1.83 e BLAST¹²⁹.

3.13 Análise dos transcritos *var*

As seqüências dos domínios DBL α foram alinhadas utilizando o programa ClustalX 1.83. Após o alinhamento foi gerado uma matriz de identidade (MI) e a partir desta foram formados grupos de seqüências, onde seqüências com mais de 98% de identidade foram consideradas idênticas.

As seqüências nucleotídicas foram traduzidas e a busca por peptídeos conservados no domínio DBL α e sua classificação no sistema *Distinct sequence Identifier* (DSID), que revela o tipo de gene *var* analisado (upsA, B, C) foi realizada de acordo com Bull e colaboradores ¹³⁰.

3.14 Amostras de Soro/Plasma Utilizadas

Foram utilizadas neste estudo amostras de soros coletadas de indivíduos residentes do estado de Rondônia, região norte do Brasil. A prevalência de infecções causadas por plasmódios caracteriza nossa área de estudo como região hipoendêmica para malária. Nesta região, o parasita *P. falciparum* foi responsável por 25% das infecções em 2006 (Sivep-Malária, Sinan/SVS/MS, 2006), e a taxa de inoculação entomológica é de 2-5 infectivas por pessoa por ano, valores correspondentes a algumas áreas endêmicas na África ¹³¹.

Analizamos 100 amostras de soro/plasma que incluem: soros de indivíduos sintomáticos do Gabão (amostras gentilmente cedidas pelo Dr. Michael Ramharter), amostras de soros de indivíduos sintomáticos com alta parasitemia de Porto Velho, e soros de indivíduos assintomáticos moradores de Santo Antônio, Engenho Velho, Bate Estaca e Vila Candelária, comunidades ribeirinhas às margens do rio Madeira. Soros de indivíduos negativos nunca expostos ao parasita foram utilizados como controles.

O diagnóstico de malária foi realizado através de microscopia ótica e reações de *nested* PCR pela equipe do CEPEM em Rondônia. Indivíduos que apresentaram pelo menos um sintoma clínico da doença e tiveram a presença do parasita confirmada por PCR foram considerados sintomáticos. Indivíduos com lâmina e/ou reação de PCR positivos e não apresentaram sintomas por 30 dias após exame de sangue foram considerados assintomáticos. Tanto os indivíduos sintomáticos que procuraram auxílio no CEPEM quanto os ribeirinhos assintomáticos foram tratados.

Os últimos – quando apresentaram lâmina negativa - foram tratados apenas após confirmação da infecção por PCR.

Todos os participantes foram entrevistados e examinados clinicamente.

O uso de todos os plasmas/soros utilizados nas análises foi aprovado na comissão de ética para estudos envolvendo humanos do ICB-USP.

3.15 Imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados utilizando culturas sincronizadas de *P. falciparum* (em estágio maduro) e plasmas de pacientes sintomático, assintomático e negativo (indivíduos que nunca tiveram contato com o parasita). Os parasitas foram incubados com 40µg/ml de DAPI (azul) e o marcador celular HCS CellMask (vermelho), em um volume de 100µl por 1 hora a 37 °C, seguido por incubação com os plasma em diluição 1:25, com posterior incubação com anticorpo anti-IgG marcado com AlexaFluor 488 (1:200)(verde). Entre cada etapa de incubação foram realizadas 3 lavagens com RPMI pH 7,2. As amostras foram visualizadas em microscópio de fluorescência.

Utilizamos também, como controle em alguns ensaios, anticorpo monoclonal anti-Glicoforina A humana diluído 1:1000 com posterior incubação com anticorpo secundário anti-IgG mouse marcado com AlexaFluor 594.

3.16 Citometria de fluxo

Trofozoítas maduros derivados de culturas sincronizadas de *Plasmodium falciparum* foram ressuspensos em tampão RPMI-S (meio RPMI pH7,2 contendo 2% de FCS). 100 µL do mesmo tampão foram adicionados, por poço, em placa 96 well, durante meia hora.

5×10^6 parasitas (25 µl) foram incubados por 30 minutos com soro de paciente sintomático, assintomático ou soro de doador nunca exposto ao parasita (1:10), em RPMI-S, seguidos de incubação com anticorpo de carneiro anti-IgG humano conjugado com AlexaFluor 488 (diluído a 1:200 em RPMI-S) por outros 30 minutos.

Em seguida, os parasitas foram incubados com brometo de etídeo (100µg/ml em PBS[1x]) por 20 minutos, para a marcação dos eritrócitos parasitados. Entre cada um dos passos de incubação, os parasitas foram lavados duas vezes com

RPMI-S. A última lavagem foi realizada com PBS[1X]. As células foram ressuspendidas em PBS[1X] calculando-se no máximo 500 células/ μ l.

Na seqüência, estas preparações foram analisados em citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mini (GE).

Antes de cada experimento, realizamos uma compensação, excluindo o sinal do brometo de etídeo do canal verde e o sinal do anti-IgG conjugado com AlexaFluor 488 do canal vermelho, utilizando preparações de amostras marcadas com cada um dos fluorocromos individualmente.

Após definido o padrão normal das hemácias, tanto infectadas quanto não infectadas, marcamos o gate M2, com a população de hemácias infectadas, levando em conta a características da fluorescência destas células no canal vermelho (brometo de etídeo). Analisando os sinais em cada um dos canais, podemos estimar em termos de porcentagem de células marcadas com cada um dos marcadores e as médias de intensidade de fluorescência (MFI) dos eritrócitos infectados, valores estes relativo às médias geométricas do *gate* M2. Para cada uma das reações foram analisados 10.000 eventos. Estes dados foram captados e analisados no programa Guava EasySoft.

Os índices de reatividade foram calculados dividindo os valores de MFI de cada par isolado/soro pelo cutoff de cada um dos isolados (média dos valores de MFI de 20 soros de indivíduos nunca expostos mais 2 desvios padrão). Soros com índices de reatividade maiores que 1 são considerados positivos.

3.17 Ensaios de Aglutinação Mista

Os ensaios de aglutinação mista foram feitos a partir de uma adaptação do protocolo da imunofluorescência. Hemácias infectadas pelo mesmo parasita selecionados para fenótipos diferentes (ICAM1 e CD36) foram marcadas em tubos individuais com marcadores celulares de cores diferentes (HSC Cell Mask verde e vermelho) e posteriormente incubadas em um mesmo tubo com soro de indivíduo sintomático, assintomático e controle negativo para verificar os níveis de aglutinação em cada uma das combinações. As amostras foram visualizadas em microscópio de fluorescência e alguns campos foram escolhidos para serem fotografados (100X).

Também marcamos hemácias infectadas por cepas diferentes de parasitas selecionados para um mesmo fenótipo (ligação a ICAM1 ou CD36) com marcadores

HSC Cell Mask de cores diferentes. As amostras foram visualizadas em microscópio de fluorescência. A contagem dos níveis de aglutinação foi feita através de observação de 20 campos (40x). Foram contados aglutinados com mais de 3 hemácias (com pelo menos 1 hemácia de cada cor).

3.18 Ensaio Estático de Inibição de citoaderência

Neste ensaio incubamos a adesão entre células CHO e parasitas foi feita em lâminas Labteks (BD e Nunc) 8 wells, com 5×10^5 células CHO^{ICAM} ou CHO^{CD36} após 2 dias de cultivo (para confluência), 5×10^5 trofozoítas maduros de *P. falciparum* (culturas com parasitemias superiores a 10%) e plasmas em diluição 1:25. Foram selecionados 10 plasmas de indivíduos sintomáticos e 10 plasmas de assintomáticos, utilizando como critério de seleção seus índices de reatividade contra aquele isolado^{fenótipo} e um indivíduo negativo (que nunca teve contato com o parasita). Como controle positivo, em um dos poços das *Labteks*, incubamos apenas células e parasitas, sem plasma. A citoaderência foi avaliada pela contagem de hemácias infectadas aderentes em 200 células¹³². Os ensaios foram conduzidos em duplicatas biológicas e em volumes de 100 µl. O cálculo da porcentagem de inibição foi baseado nos valores de citoaderência (quantos parasitas/células) do controle positivo, sem a presença de plasma.

3.19 CITOADERÊNCIA EM FLUXO CONTÍNUO

Para adesão em células CHO antes do ensaio, utilizamos 5×10^5 células/Labtec poço único (6,9 cm²), dois dias antes do ensaio, para confluência. Parasitas em estágio maduro com parasitemia superior a 5% foram enriquecidos através do método de sedimentação por *Plasmagel* e ajustados para 5×10^5 parasitas/ml em meio RPMI pH 6.8. Após 1 hora de adesão, a Labtec foi lavada 10 vezes em meio pH 6.8 e a lâmina foi então acoplada ao sistema de fluxo contínuo.

- a) Fluxo 1: 0.09 Pa (velocidade 0.31 ml/min) por 10 min.
- b) Fluxo 2: 0.36 Pa (velocidade 1.22 ml/min) por 5 min.
- c) Fluxo 3: 1.44 Pa (velocidade 4.89 ml/min) por 2.5 min.

Foram visualizados 30 campos após passagem de cada um dos fluxos e 30 campos em tempo zero.

Os ensaios de citoaderência em fluxo contínuo foram conduzidos no laboratório do Dr. Fábio Costa na UNICAMP, com orientação e ajuda da pós-graduanda Stefanie Lopes.

3.20 Purificação De Membrana do Eritrócito Infectado Com *P. falciparum* e Western Blot Com Pool de Plasmas de Indivíduos Infectados

Trofozoítas maduros derivados de culturas sincronizadas de *Plasmodium falciparum* foram peletados e ressuspensos em solução hipotônica (0,2x RPMI + coquetel inibidor de proteases) em um volume 40 vezes maior que o *pellet* de eritrócitos infectados. Após 30 minutos de centrifugação a 15000 rpm, o material foi transferido para outro tubo contendo a solução hipotônica (com coquetel de inibidores de protease), para mais uma lavagem, até se obter um sobrenadante claro e translúcido.

Para o *blot*, este material incubado com clorofórmio na tentativa de deslipidificar esta amostra, e em seguida as proteínas presentes na membrana deslipidificada foram resolvidas por SDS-PAGE através de transferência por eletroforese para membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham-Pharmacia, NJ, EUA), que foram bloqueadas durante 1 hora em temperatura ambiente com 5% leite e PBS-Tween 0,1% (PBS-T). Após 4 lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas em temperatura ambiente com pool de plasmas de indivíduos sintomáticos e assintomáticos para malária causada por *P. falciparum* e com pool de plasmas de indivíduos controles que nunca tiveram contato com o parasita, diluídos em proporção 1:20 em PBS-T+ Leite 1%. Após cinco lavagens com PBS-T, a membrana previamente incubada com soro humano foi incubada com anticorpo de carneiro anti-IgG humano (Amersham-Pharmacia) diluído em 1:2500. Estas incubações foram realizadas por 1 hora sob leve agitação. As membranas foram, então, lavadas 5 vezes com PBS-T, e reveladas por quimioluminescência (kit SuperSignal, Pierce), logo em seguida foram expostas ao filme *Hyperfilm*, seguindo as instruções do fabricante.

4 RESULTADOS

4.1 Seleção de Fenótipos Adesivos de *P. falciparum* (*Panning*)

Os isolados de *P. falciparum* utilizados neste projeto foram coletados em 1986 em Ariquemes (S20) e entre 2001 e 2006 em Porto Velho (99, 106, 133, e 134), Rondônia, e foram caracterizados por seu conteúdo de genes *var* por nosso grupo⁸⁰. Descobrimos que a diversidade destes isolados em termos de repertórios de genes *var* reflete provavelmente a maioria dos isolados existentes na bacia amazônica¹³³. Além deles, utilizamos a cepa 3D7 como controle.

A figura 11A mostra um típico resultado de uma seleção por citoaderência, no caso, uma cultura de células CHO^{ICAM1} (25 cm²) foi incubada com aproximadamente 2x10⁷ hemácias infectadas por *P. falciparum* (isolado 134) e após três lavagens com meio RPMI pH 6.8 tem numerosas hemácias aderidas. A figura 11B mostra esta mesma cultura de células após lavagem com meio RPMI pH 7.6 para retirada dos parasitas, que são colocados em cultivo novamente.

Figura 11 - Cultura de células CHO^{ICAM1} com hemácias infectadas por *P. falciparum*

P. falciparum (isolado 134, 5-10% parasitemia) aderidas nas condições descritas acima logo após *panning* (A) e após lavagem com meio RPMI pH 7.6 (B).

Fonte: Fratus¹⁵⁸

A figura 12A mostra um típico resultado de uma seleção por citoaderência, no caso, uma cultura de células CHO^{CD36} (25 cm²) foi incubada com aproximadamente 2x10⁷ hemácias infectadas por *P. falciparum* (isolado 133) e após três lavagens com meio RPMI pH 6.8 tem numerosas hemácias aderidas. A figura 12B mostra esta mesma cultura de células após lavagem com meio RPMI pH 7.6 para retirada dos parasitas, que são colocados em cultivo novamente.

Figura 12 - Cultura de células CHO^{CD36} com hemácias infectadas por *P. falciparum*

P. falciparum (isolado 133, 5-10% parasitemia) aderidas logo após *panning* (A) e após lavagem com meio RPMI pH 7.6 (B).
Fonte: Fratus¹⁵⁸

4.2 Análise dos transcritos DBL α de isolados selecionados

Para verificar através de métodos moleculares quais foram os genes *var* transcritos nos diferentes isolados/cepas, foram conduzidos RT-PCRs e clonagens do produto de amplificação codificadora de DBL α , conforme descrito por Warimwe e colegas⁷⁶. 50 clones de cada um dos isolados foram seqüenciados e os resultados mostram que todas as cepas/isolados diferentes transcrevem genes *var* diferentes quando selecionados em receptores diferentes.

Foram encontradas entre 6 a 16 seqüências diferentes por isolado (isolado 106^{ICAM1} e 99^{ICAM1}) e todos os isolados apresentaram uma seqüência predominantemente transcrita.

A figura 13 mostra a frequência das sequências encontradas nos isolados S20(A), 99(B), 106(C), 133(D), 134(E) e 3D7(F). As barras pretas correspondem aos isolados selecionados em receptor ICAM1 e as brancas em receptor CD36.

Figura 13 - Frequência das sequências encontradas nos isolados S20(A), 99(B), 106(C), 133(D), 134(E) e 3D7(F).

As barras pretas correspondem ao isolado selecionado em receptor ICAM1 e as brancas em receptor CD36.
Fonte: Fratus¹⁵⁸

A figura 14 mostra os produtos amplificados dos cDNAs codificadores do DBL α dos isolados selecionados para ligação com ICAM1 e CD36. Como podemos ver no gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, apenas fragmentos de um mesmo tamanho esperado foram amplificados em cada um dos isolados selecionados. As bandas foram cortadas e purificadas do gel, e cada produto foi

clonado em vetor AT *cloning* e depois teve 50 clones sequenciados para análises por bioinformática.

O gel da figura 14 foi feito apenas para ilustração, o gel utilizado para a purificação sofreu o mínimo contato com luz UV para evitar deterioração do produto).

Figura 14 - Amplificação dos cDNAs codificadores do domínio DBL α dos isolados selecionados em CHO^{ICAM1} e CHO^{CD36}.

RT- corresponde ao controle negativo da reação, onde a reação de RT-PCR foi conduzida na ausência de transcriptase reversa e RT+ corresponde ao produto amplificado a partir do cDNA de cada isolado. O controle positivo corresponde ao produto amplificado a partir de gDNA. O produto amplificado possui aproximadamente 400 pb, em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo.

Fonte: Fratus¹⁵⁸

A partir das seqüências peptídicas encontradas para cada um dos isolados selecionados, utilizamos o *Perl script SequenceClassifier2.pl*, na tentativa de identificar características associadas aos diferentes fenótipos de citoaderência. Analisamos as seqüências peptídicas dos domínios DBL α à procura de tetrapeptídeos semiconservados, descritos por Bull, 2007¹³⁰. Estes tetrapeptídeos conservados denominados de PoLVs (PoLVs1-4) junto com cisteínas conservadas foram agrupadas em seis grupos distintos, de acordo com a classificação DSID proposta por estes autores¹³⁰.

Enquanto os grupos 1-3 estão sempre presentes em genes *var* com 5'UTR do tipo upsA associados a malárias com evolução grave ⁷⁶, genes *var* com DBL α classificável nos grupos 4-6 são precedidos por 5' UTR upsB e upsC ¹³⁰ e não possuem uma associação clara com evolução específica de malária.

Das 600 sequências analisadas, 53,5% são do grupo 4, a maioria, analisando tanto os isolados selecionados para ICAM1 quanto os selecionados para CD36. 15,7% pertencem ao grupo 6, 13% ao grupo 3, 9% ao grupo 1, 6,5% ao grupo 2 e apenas 1,4% ao grupo 5. A tabela 2 mostra em detalhes as frequências (em porcentagem) de sequências de cada um dos grupos (1-6) em cada um dos isolados selecionados analisados.

Tabela 1. Frequência dos grupos na sequência dos isolados selecionados

	1	2	3	4	5	6
S20 ^{ICAM}	0	0	8	92	0	0
S20 ^{CD36}	0	0	58	30	8	4
99 ^{ICAM}	4	6	12	76	0	2
99 ^{CD36}	12	2	8	18	0	48
106 ^{ICAM}	0	0	6	92	0	2
106 ^{CD36}	20	62	4	14	0	0
133 ^{ICAM}	46	2	14	20	4	14
133 ^{CD36}	20	0	44	24	4	8
134 ^{ICAM}	4	0	0	92	0	4
134 ^{CD36}	2	2	2	78	0	16
3D7 ^{ICAM}	0	4	0	20	0	76
3D7 ^{CD36}	0	0	0	86	0	14
TOTAL	9%	6,5%	13%	53,5%	1,4%	15,7%

Fonte: Fratus¹⁵⁸

Analisando os transcritos do isolado 3D7 selecionado em CHO^{CD36} observamos o *var* transcrito (PFD0615c), mesma sequência descrita anteriormente ¹³². Porém, não observamos expressão de um gene *var* do tipo upsA neste mesmo isolado selecionado em CHO^{ICAM1} e sim em outro *var* ativado (PFL1970w), antes não observado em experimentos anteriores por nós ¹³² ou outros ¹³⁴ utilizando o mesmo sistema de oligonucleotídeos e clonagem. No trabalho publicado por nosso grupo

em 2008, foram encontrados os transcritos var PFD1000c e PFF0845c em 3D7^{ICAM1}. Porém, foi utilizado um oligonucleotídeo forward levemente diferente (GCACGMAGTTTTYGC em vez de GCACGMAGTTTTTGC). É importante lembrar que este é um método semi-quantitativo, e apesar deste método ser a única alternativa para estudos com isolados de campo de *P. falciparum*, com genomas desconhecidos, é possível não identificar transcritos importantes.

A figura 15 é a matriz de identidade obtida a partir do alinhamento das sequências preferencialmente transcritas (isto é, as sequências que foram encontrados em maior numero no determinado isolado) em cada um dos isolados selecionados. Elas nos mostra um grupo de isolados (106^{ICAM1}, S20^{ICAM1} e 99^{ICAM1}) com sequências DBL α preferencialmente transcritas de alta identidade, praticamente idênticas. As outras sequências se apresentaram diferentes (<98% similaridade), com índices variando de 37% (3D7 selecionado para diferentes receptores) e 80% (3D7^{CD36} e 99^{CD36}).

Figura 15 - Matriz de identidade entre as sequências DBL α preferencialmente transcritas pelos isolados analisados.

	106 ^{ICAM}	S20 ^{ICAM}	99 ^{ICAM}	133 ^{ICAM}	133 ^{CD36}	S20 ^{CD36}	106 ^{CD36}	3D7 ^{ICAM}	134 ^{ICAM}	134 ^{CD36}	3D7 ^{CD36}	99 ^{CD36}
106 ^{ICAM}	100	100	98	62	65	64	63	68	68	64	70	69
S20 ^{ICAM}		100	98	62	65	64	63	68	68	64	70	69
99 ^{ICAM}			100	61	64	64	63	68	66	65	69	69
133 ^{ICAM}				100	74	72	67	64	56	56	62	62
133 ^{CD36}					100	68	67	69	63	60	62	62
S20 ^{CD36}						100	64	65	59	58	62	64
106 ^{CD36}							100	63	59	55	60	63
3D7 ^{ICAM}								100	69	66	37	79
134 ^{ICAM}									100	73	76	73
134 ^{CD36}										100	73	73
3D7 ^{CD36}											100	80
99 ^{CD36}												100

Fonte: Fratus¹⁵⁸

4.3 Amostras de Soro/Plasma Utilizadas

Para tentar correlacionar determinados fenótipos adesivos considerados importantes com a resposta imunológica em pessoas naturalmente expostas aos parasitas, residentes em região endêmica, utilizamos um painel de soros de indivíduos sintomáticos com alta parasitemia de Porto Velho, de indivíduos assintomáticos moradores de Santo Antônio, Engenho Velho, Bate Estaca e Vila Candelária, comunidades ribeirinhas às margens do rio Madeira, e alguns soros de crianças sintomáticas do Gabão contra isolados de campo de *P. falciparum* selecionados para os receptores CD36 e ICAM1.

Foram utilizados 44 soros de indivíduos sintomáticos, 45 soros de indivíduos assintomáticos e 8 soros de crianças africanas. A figura 16 mostra a frequência de indivíduos do sexo feminino e masculino na amostra total (A), a distribuição das idades destes indivíduos (B) e a frequência de episódios prévios de malária nos indivíduos desta amostra (C).

Figura 16 - Características das amostras de soros utilizadas.

A. Frequência de indivíduos do sexo feminino e masculino na amostra total. **B.** Distribuição dos indivíduos da amostra total segundo suas idades. **C.** Distribuição do número de episódios prévios de malária. Este número foi relatado por cada um dos indivíduos ao responder questionário durante a doação da amostra de soro/plasma.

Fonte: Fratus¹⁵⁸

4.4 Imunofluorescência

Para confirmar a presença/especificidade pela membrana dos anticorpos nos plasmas testados, realizamos ensaios de imunofluorescência utilizando culturas sincronizadas de *P. falciparum* e plasmas de pacientes sintomáticos, assintomáticos e de indivíduos sem histórico e infecção malárica. Realizamos estes ensaios com isolados de campo e com a cepa 3D7. A marcação verde indica a presença de anticorpos específicos contra proteínas na superfície da hemácia infectada (infecção confirmada pela marcação azul do DAPI). Como controle, foi utilizado anticorpo monoclonal anti-Glicoforina A (proteína presente na superfície das hemácias) e anti-IgG mouse marcado com AlexaFluor 594 (vermelho).

Observamos que a reação é específica, uma vez que tanto o pool de plasmas de indivíduos sintomáticos (17B) quanto assintomáticos (17C) reagiram, e o pool de plasmas de indivíduos que nunca tiveram contato com o parasita (17A) não. Em todos os casos foi atestada a presença de glicoforina A, proteína presente na superfície de hemácias.

Figura 17 - Imunofluorescência.

A. Pool de plasmas de indivíduos que nunca tiveram contato com o parasita (negativos). **B.** Pool de plasmas de indivíduos sintomáticos. **C.** Pool de plasmas de indivíduos assintomáticos.

Fonte: Fratus¹⁵⁸

Já que estas proteínas estão na superfície da hemácia infectada, o que aconteceria na presença de tripsina? A figura 18 mostra o resultado deste experimento: Um isolado de *P. falciparum* (99) foi incubado com um pool de plasmas de indivíduos assintomáticos, e anticorpo anti-igG conjugado com AlexaFluor 488 (verde) e marcador celular vermelho (HSC Mask) para marcação de membrana. Na presença de tripsina (18B), houve a perda de sinal no canal verde, indicando que a reação dos soros (e consequente marcação verde), é sensível à tripsina, que provavelmente eliminou a proteína/estrutura alvo da membrana do eritrócito infectado. O controle positivo, sem tripsina pode ser visto na figura 18A.

Figura 18 - Imunofluorescência.

A. Pool de indivíduos assintomáticos (sem tripsina). **B.** Pool de plasmas de indivíduos assintomáticos (utilizando uma solução de tripsina-EDTA 0,1% por 30 minutos).

Fonte: Fratus¹⁵⁸

4.5 Citometria de Fluxo

Nossos experimentos de citometria de fluxo foram realizados no citômetro Guava EasyCyte Mini (GE). Neste sistema, a passagem das amostras pelo *laser* ocorre através de um capilar que é regulado por uma bomba de fluído, funcionando com uma concentração baixa de células (no máximo 500 células/ μ l). Todas as amostras foram diluídas em PBS [1X], levando-se em consideração este limite. Todas as amostras foram testadas em duplicatas biológicas.

Os experimentos foram planejados de forma que cada um dos isolados selecionados são testados contra um painel de soros (sintomáticos, assintomáticos e negativos – indivíduos que nunca foram expostos ao parasita –).

A compensação da reação foi feita utilizando amostras de hemácias infectadas marcadas, individualmente por brometo de etídeo (figura 19A) e anticorpo anti-IgG conjugado com AlexaFluor 488 (figura 19B). Assim estava garantido que o sinal captado em ambos os canais estejam livres da interferência do outro marcador.

Figura 19 - *Scatterplots* representando resultados de compensação.

A. Hemácias infectadas incubadas apenas com brometo (canal vermelho). **B.** Hemácias infectadas incubadas apenas com anti-IgG conjugado com AlexaFluor 488 (e soro positivo controle como anticorpo primário).
Fonte: Fratus¹⁵⁸

Após a compensação, pudemos determinar as porcentagens de reconhecimento ou as médias de intensidade de fluorescência, baseadas nas características de cada um dos marcadores. A parte inferior esquerda dos *scatterplots* na figura 19 representa a população que não reagiu com o anticorpo anti-IgG conjugado com AlexaFluor 488 (canal verde, eixo x) e não foi marcada pelo brometo de etídeo (hemácias não-infectadas). A parte inferior esquerda do gráfico representa a população de hemácias não-infectadas marcadas pelo AlexaFluor 488, possivelmente devido a ligações inespecíficas, e níveis de anticorpos contra certos grupos sanguíneos, presentes em diferentes combinações soro/hemácia. A parte superior esquerda do *scatterplot* representa as hemácias infectadas que não reagiram contra o anticorpo anti-IgG e a parte superior direita representa a população duplo positiva, ou seja, marcadas tanto pelo brometo (indicando presença de parasita) quanto pelo AlexaFluor 488 (reação com o anticorpo anti-IgG).

Durante o processo de padronização, nos deparamos com alguns problemas, como lise das amostras após incubação com alguns soros; e valores de parasitemias menores na citometria que na observação em lâmina. Tais fenômenos parecem estar relacionados à aglutinação de hemácias infectadas quando em contato com soros imunes, e com a perda de células durante as lavagens. A literatura mostra o mesmo problema, principalmente em análises utilizando

parasitemias maiores que 5%.¹³⁵. Na tentativa de minimizar a formação destes aglutinados também utilizamos baixas parasitemias (1%)¹³⁵, que pareceu resolver nossos problemas.

Além da reprodutibilidade dos experimentos, ensaios feitos em dias diferentes com a mesma combinação soro/isolado, testamos a aquisição, de uma mesma amostra controle de soro contra um isolado de campo de *P. falciparum* com 5.000 eventos e com 50.000 eventos. As médias de intensidade de fluorescência (MFI) quase idênticas (8,32 em 5.000 eventos (Figura 20A) e 8,34 em 50.000 eventos (20B) mostram que a média de fluorescência das hemácias infectadas pode ser observada com no mínimo, 5000 eventos (hemácias).

Figura 20 - Scatterplots do número de eventos. Aquisição de 5.000 eventos x 50.000 eventos.

Fonte: Fratus¹⁵⁸

Os resultados das análises através da citometria de fluxo foram expressos em índices de reatividade (Média Geométrica da reatividade de cada isolado^{fenótipo}/cutoff). O cutoff foi calculado a partir das médias geométricas de um grupo de 20 plasmas de pessoas que nunca tiveram contato com o parasita.

Tanto indivíduos assintomáticos quanto sintomáticos parecem, em sua maioria reconhecer a maior parte dos isolados utilizados (Figura 21). Como os plasmas e isolados foram coletados na mesma região, era de se esperar que a maioria dos indivíduos reconhecessem um, ou até mesmo alguns isolados.

Figura 21 - Frequência de reconhecimento de isolados de campo de *P. falciparum*.

Frequência de reconhecimento de isolados de campo de *P. falciparum* selecionados para receptores ICAM1 e CD36, reconhecidos por soros de indivíduos sintomáticos e assintomáticos. (Foram considerados positivos os indivíduos com índice de reatividade maior que 1).

Fonte: Fratus¹⁵⁸

Analisando as frequências de reconhecimento de cada um dos isolados selecionados, observamos que a probabilidade de um indivíduo assintomático ter índice de reatividade maior que um é significativamente maior para o isolado 3D7, selecionado tanto para ICAM1 ou CD36 ($p=0,003$ e $p=0,002$, respectivamente; teste exato de Fisher: $p=0,006$ e $p=0,004$). Esta probabilidade é maior no caso de indivíduos sintomáticos para os isolados^{fenótipos} 99^{CD36} e 133^{CD36} ($p=0,002$ e $p=0,010$; teste exato de Fisher: $p=0,005$ e $p=0,016$). Em todos os outros isolados^{fenótipos} a diferença entre os grupos sintomático e assintomático em relação à frequência de reconhecimento não foi significativa (S20^{ICAM}: $p=0,063$; S20^{CD36}: $p=0,095$; 99^{ICAM}: $p=0,338$; 106^{ICAM}: $p=0,066$; 106^{CD36}: $p=0,749$; 133^{ICAM}: $p=0,062$; 13^{4ICAM}: $p=0,438$; 134^{CD36}: $p=0,145$).

A figura 22 é a representação gráfica os valores de índices de reatividade dos plasmas de indivíduos sintomáticos (A), e assintomáticos (B) residentes em Rondônia.

Figura 22 - Gráfico *box plot* com distribuição dos valores de índices de reatividade dos soros de indivíduos sintomáticos (A), e indivíduos assintomáticos (B).

Fonte: Fratus¹⁵⁸

Levando em consideração as médias dos índices de reatividade, pudemos observar que os indivíduos assintomáticos tiveram índices de reatividade maiores que os sintomáticos para o isolado 3D7, tanto CD36 quanto ICAM1 ($p=0,022$ e $p=0,034$, respectivamente), para o isolado 133^{ICAM} ($p=0,015$) e S20^{CD36} ($p=0,031$). Os índices de reatividade do grupo sintomático são significantemente maiores que os dos assintomáticos para o isolado 133^{CD36} ($p=0,048$). Para todos os outros isolados, testados através de ANOVA utilizando intervalos de confiança de Tukey, as médias dos índices de reatividade de sintomáticos e assintomáticos parece não ser estatisticamente diferentes (S20^{ICAM} : $p=0,745$; 99^{ICAM} : $p=0,975$; 99^{CD36} : $p=0,842$; 106^{ICAM} : $p=0,745$; 106^{CD36} : $p=0,830$; 134^{ICAM} : $p=0,052$; 134^{CD36} : $p=0,563$).

Além disso, assintomáticos e sintomáticos parecem reconhecer o mesmo número de isolados selecionados para CD36 e ICAM1 ($p=0,537$ e $p=0,697$). O número de episódios anteriores de malária também parece ser igual ($p=0,567$).

A escolha de testes estatísticos descritivos paramétricos baseou-se no fato de que o grande número de indivíduos presentes na amostra normaliza nossos dados; sendo complementar a análise não-paramétrica para a validação dos mesmos. Em ambos os casos, as análises mantêm graus similares de significância, com 95% de confiança, ou "p" menor ou igual a 0,05.

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis confirma o resultado acima. Assintomáticos com índices de reatividade maiores para isolado 3D7, tanto CD36 quanto ICAM1 ($p=0,007$ e $p=0,034$, respectivamente), para o isolado 133^{ICAM} ($p=0,007$) e S20^{CD36} ($p=0,045$). Os índices de reatividade do grupo sintomático parecem ser significantemente maiores que os dos assintomáticos para o isolado 133^{CD36} ($p=0,024$). Os demais isolados são reconhecidos da mesma maneira (S20^{ICAM} : $p=0,790$; 99^{ICAM} : $p=0,796$; 99^{CD36} : $p=0,842$; 106^{ICAM} : $p=0,745$; 106^{CD36} : $p=0,830$; 134^{ICAM} : $p=0,067$; 134^{CD36} : $p=0,875$).

Ao modificar a análise, e observando pares de um mesmo isolado, ou seja mesmo genótipo e fenótipo diferente (seleção com ICAM1 e CD36) através do teste não-paramétrico de Wilcoxon, observamos para todos os isolados, índices de reatividade maiores nos selecionados para ICAM1: S20($p=0,011$), 99($p=0,006$), 106($p=0,044$), 133($p=0,001$), 134($p=0,048$) e 3D7($p=0,002$). Esta diferença pode estar relacionada ao fato de não termos, no Brasil, quadros de malária grave. Índices de reatividade mais altos para isolados selecionados para ICAM1 podem representar

anticorpos de proteção contra a forma severa da doença, impedindo, por exemplo, a citoaderência.

A figura 23 mostra, em detalhes, o perfil de cada um dos soros utilizados em relação a índices de reatividade e as diversas variáveis citadas acima, como idade (representada em anos, sexo, número de episódios anteriores de malária, e número de domínios DBL α recombinantes reconhecidos através de ELISA. O índice de reatividade da proteína recombinante MSP1₁₉ também foi calculado à partir de ELISA.

Índices de reatividade de 1 a 3 são representados pela cor cinza claro, de 3 a 5 pelo cinza escuro, maiores que 5 pela cor preta e maiores que 10 por listras diagonais.

Figura 23 - Cinza claro representa índices de reatividade de 1 a 3, cinza escuro de 3 a 5, preto maior que 5 e listrado na diagonal maior que 10.

	3D7 _{ICAM}	3D7 _{CD36}	S20 _{ICAM}	S20 _{CD36}	99 _{ICAM}	99 _{CD36}	106 _{ICAM}	106 _{CD36}	133 _{ICAM}	133 _{CD36}	134 _{ICAM}	134 _{CD36}	IDADE	Nº	MALÁRIAS	DBLα RECONHECIDO	MSP1 _{1,19}
AF1													-	-	-	0	
AF2													-	-	-	0	
AF3													-	-	-	1	
AF4													-	-	-	1	
AF5													-	-	-	0	
AF6													-	-	-	0	
AF7													-	-	-	0	
AF8													-	-	-	2	
S1													27	3	2	2	
S2													37	2	0	0	
S3													15	5	1	1	
S4													18	30	0	0	
S5													40	20	0	0	
S6													31	20	0	0	
S7													28	1	1	1	
S8													33	1	0	0	
S9													-	-	-	3	
S10													-	-	-	2	
S11													-	-	-	1	
S12													-	-	-	2	
S13													-	-	-	2	
S14													-	-	-	6	
S15													46			1	
S16													21	4	1	1	
S17													18	21	8	8	
S18													33	0	1	1	
S19													26	4	0	0	
S20													41	3	0	0	

Figura 23 - Cinza claro representa índices de reatividade de 1 a 3, cinza escuro de 3 a 5, preto maior que 5 e listrado na diagonal maior que 10.

	3D7 _{ICAM}	3D7 _{ICD36}	S20 _{ICAM}	S20 _{ICD36}	99 _{ICAM}	99 _{ICD36}	106 _{ICAM}	106 _{ICD36}	133 _{ICAM}	133 _{ICD36}	134 _{ICAM}	134 _{ICD36}	IDADE	Nº	MALÁRIAS	DBL α	RECONHECIDO	MSP1 _{1,19}
S21													18	1	2			
S22													23	8	1			
S23													21	3	8			
S24													38	1	1			
S25													44	6	0			
S26													20	1	0			
S27													57	4	7			
S28													42	1	3			
S29													37	5	2			
S30													39	2	7			
S31													54	3	3			
S32													23	-	4			
S33													47	-	4			
S34													22	1	2			
S35													51	20	4			
S36													16	7	0			
S37													17	-	0			
S38													27	-	0			
S39													24	1	0			
S40													18	4	1			
S41													26	3	1			
S42													33	8	0			
S43													30	1	0			
S44													34	1	0			

Figura 23 - Cinza claro representa índices de reatividade de 1 a 3, cinza escuro de 3 a 5, preto maior que 5 e listrado na diagonal maior que 10.

	3D7 _{ICAM}	3D7 _{ICD36}	S20 _{ICAM}	S20 _{ICD36}	99 _{ICAM}	99 _{ICD36}	106 _{ICAM}	106 _{ICD36}	133 _{ICAM}	133 _{ICD36}	134 _{ICAM}	134 _{ICD36}	IDADE	Nº	MALÁRIAS	DBL α	RECONHECIDO	MSP1 ₁₉
AS1													53	4	3			
AS2													27	8	3			
AS3													22	3	0			
AS4													78	20	2			
AS5													19	15	1			
AS6													10	1	0			
AS7													29	5	3			
AS8													56	1	2			
AS9													49	5	0			
AS10													6	0	2			
AS11													45	8	5			
AS12													84	30	0			
AS13													4	1	0			
AS14													39	5	3			
AS15													17	5	0			
AS16													28	4	0			
AS17													13	4	0			
AS18													66	0	2			
AS19													53	7	0			
AS20													16	4	0			
AS21													27	0	1			
AS22													39	1	0			
AS23													20	5	0			
AS24													37	15	2			
AS25													15	2	0			
AS26													-	0	1			
AS27													32	8	3			
AS28													66	1	0			

Figura 23 - Cinza claro representa índices de reatividade de 1 a 3, cinza escuro de 3 a 5, preto maior que 5 e listrado na diagonal maior que 10.

	3D7 _{ICAM}	3D7 _{ICD36}	S20 _{ICAM}	S20 _{ICD36}	99 _{ICAM}	99 _{ICD36}	106 _{ICAM}	106 _{ICD36}	133 _{ICAM}	133 _{ICD36}	134 _{ICAM}	134 _{ICD36}	IDADE	Nº	MALÁRIAS	DBLα	RECONHECIDO	MSP1 ₁₉
AS29													57	1	7			
AS30													48	3	0			
AS31													14	2	0			
AS32													43	30	1			
AS33													60	18	0			
AS34													10	2	0			
AS35													81	20	5			
AS36													62	8	2			
AS37													-	-	0			
AS38													-	-	0			
AS39													79	1	0			
AS40													12	-	6			
AS41													33	2	0			
AS42													25	-	0			
AS43													47	20	2			
AS44													12	5	0			
AS45													41	4	0			

(AF1-8, soros de crianças africanas, S1-44 soros de indivíduos sintomáticos, e AS1-45 soros de indivíduos assintomáticos).

Fonte: Fratus¹⁵⁸

4.6 Ensaios de Aglutinação Mista

Pra caracterizar se antígenos parecidos estão presentes nos isolados selecionados para um ou outro receptor ou mesmo em dois isolados diferentes, realizamos também ensaios de aglutinação mista. Para isso adaptamos o protocolo da imunofluorescência, onde tanto hemácias infectadas pelo mesmo parasita selecionados para fenótipos diferentes (ICAM1 e CD36) quanto parasitas diferentes selecionados para os mesmos fenótipos (ICAM1 e CD36) foram marcadas com marcadores celulares de cores diferentes (HSC Cell Mask verde e vermelho). Posteriormente estes isolados foram incubados em um mesmo tubo com plasma de indivíduo sintomático, assintomático e um controle negativo para tentar analisar a presença de um suposto anticorpo comum, capaz de reagir – e aglutinar – diferentes parasitas e/ou fenótipos.

Através de visualização por microscópio de fluorescência, pudemos observar aglutinados mistos em todos os isolados quando analisamos um mesmo isolado selecionado para diferentes receptores, apesar de aparentemente expressarem (todos os pares) PfEMP1s diferentes. Os isolados foram incubados com plasmas de de indivíduos assintomático (Figura 24) e sintomáticos (Figura 25), sem diferença geral nos perfis de aglutinação de sintomáticos e assintomáticos, com exceção do ensaio com o isolado 3D7 e plasma assintomático, que não apresentou aglutinados. A aglutinação parece específica, já que não acontece quando são os isolados são incubados com pool de plasmas de indivíduos que nunca tiveram contato com o parasita (negativos) (Figura 26).

Figura 24 - Aglutinação mista com plasma de indivíduo assintomático

A. Isolado 134. **B.** Isolado S20. **C.** Isolado 99. **D.** Isolado 133. **E.** Isolado 3D7.
Fonte: Fratus¹⁵⁸

Figura 25 - Aglutinação mista com plasma de indivíduo sintomático

A. Isolado 134. **B.** Isolado S20. **C.** Isolado 99. **D.** Isolado 133. **E.** Isolado 3D7
Fonte: Fratus¹⁵⁸

Figura 26 - Aglutinação mista com plasma de indivíduos negativos (que nunca tiveram contato com o parasita).

A. Isolado 134. **B.** Isolado S20. **C.** Isolado 99. **D.** Isolado 133. **E.** Isolado 3D7
Fonte: Fratus¹⁵⁸

Entretanto, estes resultados apenas indicam a presença qualitativa de aglutinação, uma vez que apesar de apresentarem transcritos DBL α diferentes e fenótipos diferentes, existem diversas estruturas do parasita expressas na superfície da hemácia que poderiam ser similares por se tratar geneticamente do mesmo isolado.

O que encontraríamos se analisássemos diferentes parasitas selecionados para um mesmo fenótipo? Seriam estes anticorpos específicos para uma estrutura comum encontrada em parasitas geneticamente diferentes porém com o mesmo fenótipo?

Para responder essas perguntas, resolvemos também fazer uma análise quantitativa da aglutinação mista. Seria o grau de aglutinação maior em isolados com maior identidade (analisando os transcritos DBL α) , ou com mesmo fenótipo?

Para isso realizamos os testes de aglutinação mista como descrito acima, porém foram observados e fotografados 20 campos microscópicos (aumento 40x) de cada um dos pares de isolados incubados com um pool de plasmas de indivíduos sintomáticos e assintomáticos.

Quando analisamos o perfil de aglutinação dos isolados 133 e S20 observamos a formação de muitos aglutinados com mais de 10 hemácias, tanto no caso destes isolados selecionados para ICAM1 (Figura 27A) quanto para CD36 (Figura 27B). Estes isolados tem 62% e 68% de similaridade entre suas sequências DBL α preferencialmente transcritas (ICAM1 e CD36 respectivamente). Comparado a outra combinação um pouco menos similar entre si, 133 e 134 (56%^{ICAM1} e 60%^{CD36}) e apresentou um número menor de aglutinados menores. O perfil de aglutinação foi diferente entre as combinações de isolados mas não foi, em modo geral, tão diferente entre os fenótipos, indicando uma possível ausência de relação entre especificidade de fenótipo e capacidade de aglutinação. A similaridade entre as sequências DBL α pode ser um fator na capacidade de aglutinação mas nossos resultados são mais favoráveis à hipótese de haver mais antígenos não-PfEMP1 idênticos nas superfícies das hemácias infectadas.

Figura 27 - Frequência de aglutinados mistos em ensaios realizados com pares de isolados de campo selecionados para ligação em ICAM1 (A) e CD36 (B).

Fonte: Fratus¹⁵⁸

Analizamos então se existiria alguma diferença na aglutinação mista incubando os isolados com plasmas de indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Utilizamos *pools* de plasma dos dois grupos, e analisamos os isolados 99, 133 e 134 com a cepa 3D7^{CD36}, com baixa reatividade nas análises por citometria.

De acordo com a figura 28, o isolado 133, que possui 62% de similaridade, e baixa aglutinação pelo pool de sintomáticos, o isolado 99, com sequência 80% similar ao transcrito DBL α do 3D7, apresentou um número maior de aglutinados menores, de 3, 4 hemácias tanto pelo pool de sintomáticos quanto de assintomáticos. O isolado 134, com 73% de similaridade DBL α apresentou mais aglutinados grandes (com mais de 10 hemácias) pelo pool de indivíduos assintomáticos.

Figura 28 - Frequência de aglutinados mistos em ensaios realizados com isolados de campo e 3D7 comparando indivíduos sintomáticos X assintomáticos.

Fonte: Fratus¹⁵⁸

A figura 29 é a representação gráfica da categorização da aglutinação em alta e baixa, tendo como parâmetro a quantidade de aglutinados com mais que 5 eritrócitos (AA), e 5 ou menos eritrócitos por aglutinado (BA). A análise foi feita utilizando o plasma de um indivíduo com índices de reatividade maiores ou iguais a 1 para os isolados^{fenótipos}.

Figura 29 – Categorização por tamanho de aglutinado.

Categorização de aglutinação em formação de pequenos aglutinados, formados por 5 ou menos eritrócitos (BA) e formação de grandes aglutinados, formados por mais de 5 eritrócitos (AA).

Fonte: Fratus¹⁵⁸

Quando analisamos a formação de pequenos aglutinados (BA), aparentemente não existe diferença geral significativa entre sintomáticos e assintomáticos (ANOVA com intervalo de confiança de Tukey), porém os indivíduos sintomáticos parecem apresentar aglutinados maiores, com mais de 5 eritrócitos ($p=0,031$). O teste não-paramétrico de Mann-Whitney confirma resultado acima utilizando 10% de intervalo de confiança devido ao pequeno número de amostras ($p=0,080$).

4.7 ENSAIO ESTÁTICO DE INIBIÇÃO DE CITOADERÊNCIA

Avaliamos então, se estes anticorpos, presentes nos plasmas analisados realmente seriam capazes de inibir a citoaderência, realizamos ensaios estáticos de inibição de citoaderência.

Para garantir a especificidade da seleção, testamos a inibição de citoaderência com anticorpos monoclonais anti-CD36 e anti-ICAM1, utilizando o

mesmo protocolo dos testes com os plasmas. Foram utilizados o isolado 133^{ICAM1} nos testes com CHO^{ICAM1} e 133^{CD36} nos testes com CHO^{CD36}.

Observando a figura 30, podemos ver que a inibição foi específica, quando células CHO^{CD36} foram incubadas o parasita e anticorpo anti-CD36 houve quase 80% de inibição na adesão entre parasita e célula; Com anticorpo anti-ICAM1 esse número não chegou a 20%. O mesmo foi válido para os ensaios com células CHO^{ICAM1} e parasita selecionado; Quando incubados com anticorpo anti-ICAM1, a inibição chegou a quase 80% e com anti-CD36 foi de apenas 20%. Dado a existência de um suposto receptor que pode ser reconhecido por isolados selecionados em células CHO^{132, 136}, este ensaio também mostra a solidez do ensaio de seleção para CD36 ou ICAM1.

Figura 30 - Teste de inibição de citoaderência utilizando anticorpos anti-ICAM1 e anti-CD36 com isolado de campo 133 selecionado para ICAM1 e CD36.

Fonte: Fratus¹⁵⁸

Também analisamos a citoaderência dos isolados 3D7^{ICAM1}, 3D7^{CD36}, 99^{CD36} e 106^{CD36} em células CHO^{ICAM1} e CHO^{CD36} em condição estática em uma mesma rodada de ensaios para nos certificarmos da especificidade da citoaderência. O gráfico da figura 31 confirma a especificidade da ligação, uma vez que nos isolados selecionados para ligação em CD36, a quantidade de eritrócitos infectados citoaderidos foi maior quando utilizando células CHO^{CD36}. O isolado 3D7 selecionado para ligação em ICAM1 também se ligou mais às células CHO^{ICAM1}.

Figura 31 - Especificidade de Citoaderência

Número de eritrócitos infectados (de 4 isolados diferentes, 1 selecionado para ligação em ICAM1 e os outros 3 para ligação em CD36) capazes de citoaderência em células CHO expressando ICAM1 e CD36 em sua superfície.

Fonte: Fratus¹⁵⁸

A figura 32 é a representação plasma a plasma das análises realizadas. Células com fundo branco representam plasmas com índices de reatividade menores que 1 para cada isolado^{fenótipo} (não reativos), células cinza claro representam plasmas com índices de reatividade de 1 a 3, cinza escuro de 3 a 5, pretas maiores que 5 e listradas maiores que 10. As porcentagens expressas em cada uma das células representa a porcentagem de inibição de citoaderência de cada plasma quando incubado com cada isolado^{fenótipo} (valor médio das duplicatas biológicas). Estes valores foram calculados à partir de um controle positivo, sem plasma, que representou a capacidade total de citoaderência daquele isolado^{fenótipo}.

O soro sintomático S12 tem índices de reatividade altos para o isolado 133^{CD36} e 133^{ICAM1}, representando altos títulos de anticorpos contra a superfície da hemácia infectada, porém com baixa inibição de citoaderência, o que poderia indicar presença de anticorpos relacionados à fagocitose de macrófagos e neutrófilos (citofílicos). Todavia, tanto o plasma dos indivíduos sintomáticos S29, com índices de reatividade maior que 10 para os isolados S20^{ICAM1}, foi capaz de inibir a citoaderência em quase 70%, além de ter apresentado altas porcentagens de inibição de citoaderência para outros isolados^{fenótipos}.

Analisando os indivíduos assintomáticos, o AS45 parece inibir de maneira muito específica a citoaderência, pois apesar de índice de reatividade menor que 3, é capaz de inibir em 90% a citoaderência do isolado 99 em CHO^{ICAM1}.

Figura 32 - Resultados plasma a plasma dos ensaios de inibição de citoaderência.

	S20 ^{ICAM}	S20 ^{CD36}	99 ^{ICAM}	99 ^{CD36}	133 ^{ICAM}	133 ^{CD36}	134 ^{ICAM}	134 ^{CD36}	3D7 ^{ICAM1}	3D7 ^{CD36}
-16	23,7%	19,4%	10,6%	9,3%	23%	25,2%	19,6%	21,1%	27%	16%
S2					55,7%					
S3	30,5%									
S4				34,6%						
S5	47,8%									
S6		44,6%								
S9	46,3%							36,7%		33,1%
S10	64%						19,6%	53,3%		39,63%
S12					33,3%	19,5%				43%
S15	68%			53,5%	22,2%					
S18			89%			27,2%		19%		
S19			37,6%							
S20			26%				12,5%			
S21						30,3%			56,4%	
S22						15%			59,4%	
S23					56%	34%		30%	46,3%	
S24	32,5%	3,8%					10,7%		70,8%	63%
S25			14%	42,1%						43,5%
S26		4,3%							63,5%	34,2%
S27	52,2%			82,2%		10%				
S28		32,6%	29,7%	51%	39,5%		37,5%	34,8%		
S29	65,3%			58%			12,5%	56,7%	79%	
S30		38,3%			51,4%					
S31				62,2%						
S32			29,4%							
S33		29,6%				34%	14,3%		57%	
S34				37%					31,4%	
S35					58,2%	38%			69%	68,2%
S37				74%						45,3%

Células cinza claro representam plasmas com índices de reatividade de 1 a 3, cinza escuras de 3 a 5, pretas maiores que 5 e listradas maiores que 10. As porcentagens nas células representam os valores de inibição de citoaderência de cada plasma para cada um dos isolados/fenótipos (S2-43: soros de indivíduos sintomáticos, e AS26-45: soros de indivíduos assintomáticos).

Figura 32 - Resultados plasma a plasma dos ensaios de inibição de citoaderência.

	S20 ^{ICAM}	S20 ^{CD36}	99 ^{ICAM}	99 ^{CD36}	133 ^{ICAM}	133 ^{CD36}	134 ^{ICAM}	134 ^{CD36}	3D7 ^{ICAM1}	3D7 ^{CD36}
S38				46,7%	40,3%	35,5%	31,2%			23,5%
S39		48,8%				31,6%	60%			
S40	57,2%	27,3%	29,4%		38,8%		82,7%	64%		
S41	35,3%	23%	27,4%		17,5%					39,6%
S42			32,3%				52,7%	62%		
S43		46,2%	17%						32,5%	
AS26	71,8%	43,3%	30,5%		59%	35,3%		46%		86,1%
AS27	84,7%				37,5%	30,4%		25,8%	77,5%	62%
AS28		24,7%	34,3%	30,5%	57,4%		31,5%		75,1%	76%
AS29						66%	74,5%	20,2%	40,3%	46,5%
AS30			39,2%	33,3%	70,7%		77%	82,3%		
AS31	70,5%		18%	7%	35,2%	63,4%	23%			
AS32		55,8%	22%			47%	57,2%	63,5%	35%	48,4%
AS33	42,3%		9,7%	17,2%	9%			37,6%		
AS34	42,2%		16%			30,4%			17,7%	
AS35	61%	44,7%	18,6%				29,2%	29,2%		82,6%
AS36		20,5%				41%		22,3%		
AS37				21,5%		15,8%	87,2%			
AS38					34,7%		27,2%		60,6%	
AS39		57,6%			81%		15,4%	65,8%	85%	61,7%
AS40		9,3%					46,1%			
AS41	49,3%	39%		17,7%	76%			46%		49,3%
AS42		58,1%	9%	33,4%	7%	54%	54,5%		17,5%	
AS43	63,1%			28%					45,2%	
AS44	11,7%	40,7%		23%		25,7%			12,5%	50%
AS45	62%		90%	38%		63,6%				50,6%

Células cinza claro representam plasmas com índices de reatividade de 1 a 3, cinza escuras de 3 a 5, pretas maiores que 5 e listradas maiores que 10. As porcentagens nas células representam os valores de inibição de citoaderência de cada plasma para cada um dos isolados/fenótipos (S2-43: soros de indivíduos sintomáticos, e AS26-45: soros de indivíduos assintomáticos).

Hipotetizamos inicialmente que anticorpos encontrados no plasma de indivíduos assintomáticos pudessem ser mais 'eficientes' na inibição da citoaderência, porém, parece não haver correlação entre capacidade de inibição de citoaderência e presença ou ausência de sintomas (correlação de Spearman). Além disso, utilizando o teste de Kruskal-Wallis, indivíduos sintomáticos e assintomáticos parecem possuir capacidades semelhantes de inibição de citoaderência ($3D7^{ICAM}$: $p=0,650$; $3D7^{CD36}$: $p=1,000$; $S20^{ICAM}$: $p=0,880$; $S20^{CD36}$: $p=0,597$; 99^{ICAM} : $p=0,821$; 99^{CD36} : $p=0,880$; 133^{ICAM} : $p=0,545$; 133^{CD36} : $p=1,000$; 134^{ICAM} : $p=0,490$; 134^{CD36} : $p=0,496$).

As diferenças na capacidade de inibição de citoaderência parecem estar mais relacionadas a especificidade isolado^{fenótipo} e plasma do que fenótipo em comum. Também não encontramos correlação entre índices de reatividade e capacidade de inibição em nenhum dos isolados (índices de correlação de Spearman).

Além disso, analisamos estes dados levando em consideração os dois fenótipos diferentes. Testamos as porcentagens de inibição de citoaderência em isolados selecionados para CD36 e ICAM1 através do teste não paramétrico de Wilcoxon, e pudemos observar que apenas o isolado S20 selecionado para ICAM1 parece ter capacidade 'inibitória' diferenciada (maior) do que seu par, selecionado para CD36 ($p=0,003$). O fenótipo parece não influenciar na capacidade de citoaderência dos outros isolados. (S20, $p=0,03$; 99, $p=0,100$; 133, $p=0,093$; 134, $p=0,562$ e 3D7, $p=0,370$).

Já no caso dos isolados selecionados para CD36, podemos observar que sintomáticos parecem inibir a adesão entre o isolado 99 e CHO^{CD36} melhor que os assintomáticos, e os assintomáticos parecem inibir melhor a adesão entre 3D7 e CHO^{CD36} .

4.8 Reversão de Citoaderência Por Fluxo Contínuo

Alguns trabalhos na literatura mostram que as propriedades dinâmicas de ligação do eritrócito infectado a ICAM1 e CD36 são bastante diferentes. Sob fluxo, a ligação com CD36 e CSA têm um caráter estável, enquanto a ligação com ICAM1 tem caráter transitório (*rolling adhesion*), e a trombospondina (TSP), sozinha, não é capaz de formar ligações estáveis sob condições de fluxo¹³⁷.

Em estudo recente ¹³⁸, analisando interações célula-célula, comparando os receptores CD36 e TSP (anteriormente qualificado como ligante mais fraco¹³⁷), ficou claro que a ligação com CD36 persiste mesmo com taxas elevadas de fluxo, valores de 10 até 1.000 pN/s, equivalentes a valores encontrados em situação de estresse fisiológico experimentado pela célula na circulação pós-capilar ^{139, 140}. Tanto clones de laboratório quanto isolados de campo parecem possuir ligação estável com CD36 purificado ou expresso na superfície de células sob condições de fluxo ^{137, 141, 142}.

O gráfico da figura 33 mostra os resultados de nossas análises baseadas na reversão de citoaderência por fluxo contínuo (após citoaderência estática de trofozoítos de *P. falciparum* em células CHO^{ICAM1} ou CHO^{CD36}), dos isolados 3D7 e 133.

Após adesão dos confluentes em lâminas Labtec poço único, analisamos (através de análise fotográfica) 30 campos em tempo 0, 30 campos após 10 minutos do Fluxo 1 0.09 Pa (velocidade 0.31 ml/min), e assim sucessivamente tanto para o Fluxo 2, 0.36 Pa (velocidade 1.22 ml/min) por 5 minutos e Fluxo 3, 1.44 Pa (velocidade 4.89 ml/min) por 2.5 minutos.

Figura 33 - Porcentagem de eritrócitos aderidos em células CHO^{ICAM1} e CHO^{CD36}

F0. tempo 0, sem fluxo, **F1.** após 10 minutos de fluxo 1 (0,09 Pa) **F2.** após 5 minutos de fluxo 2 (0,36 Pa) e **F3.** após 2,5 minutos de fluxo 3 (4,89 Pa).

O vídeo representado pelo código QR da figura 34 mostra um exemplo, ao vivo, de reversão de citoaderência por fluxo contínuo do isolado 133 em CHO^{ICAM1}.

Figura 34 - Exemplo de reversão de citoaderência em fluxo contínuo.

Código QR – Download do leitor em : <http://reader.kaywa.com/phones>.

4.9 Purificação De Membrana do Eritrócito Infectado Com *P. falciparum* e Western Blot Com Pool de Plasmas de Indivíduos Infectados

Como um experimento paralelo, para gerar outra forma de visualização das diferenças entre as características imunológicas de plasmas de indivíduos sintomáticos e assintomáticos, purificamos as membranas de eritrócitos infectados com trofozoítas dos isolados 3D7^{ICAM}, 134^{ICAM1} e membranas – controle - de eritrócitos não-infectados (mantidos em cultura sob as mesmas condições dos parasitas durante no mínimo 2 dias).

Após purificação das membranas e delipidação destas amostras, realizamos um *western blot* com este material e plasmas de indivíduo sintomático, assintomático e indivíduo controle que nunca teve contato com o parasita.

A figura 35 é o resultado deste *blot*. Como podemos ver, tanto no caso do 3D7 quanto no caso do isolado de campo 134, o perfil de resposta de assintomáticos e sintomáticos contra a membrana do eritrócito infectado purificada é semelhante, mas possui algumas diferenças. Além disso, a reação parece específica duplamente: Primeiro, parece haver especificidade de indivíduos infectados, uma vez que não aparecem muitas bandas no ensaio com soro de indivíduo negativo. Segundo, parece ser específica também contra estruturas do parasita na superfície da hemácia, uma vez que não aparecem bandas nos ensaios com membranas de

eritrócitos não infectados (testados tanto com plasmas assintomático quando sintomático).

Este resultado não acrescenta muito aos nossos dados, mas é mais uma comprovação de que existem sim diferenças no padrão de reconhecimento de proteínas de *P. falciparum* por indivíduos sintomáticos e assintomáticos, e que estas estruturas podem, e serão encontradas.

Figura 35 - Western blot de membranas purificadas.

As membranas dos eritrócitos infectados por trofozoítas maduros de *P. falciparum* foram purificadas e testadas contra plasmas de indivíduos assintomáticos, sintomáticos e controles negativos que nunca tiveram contato com o parasita. Também testamos eritrócitos não infectados (Eritrócitos NI) para descartar reações inespecíficas.

5 DISCUSSÃO

Neste projeto tentamos correlacionar a resposta humoral de pacientes assintomáticos e sintomáticos contra a hemácia infectada. Medimos o grau de reconhecimento de estruturas aparentemente protéicas, a especificidade dos anticorpos nos soros (hemaglutinação) e seu potencial na inibição da citoaderência. Para medir esta resposta utilizamos 5 isolados “típicos” da região amazônica, que em testes prévios comprovaram possuir a maioria do genes *var* existentes na região amazônica em seu repertório ¹³³. Ainda utilizando estes isolados, selecionamos os fenótipos supostamente mais aderentes - assumindo, artificialmente, que a força da adesão esteja correlacionada com a virulência - em CHO^{CD36} e CHO^{ICAM1}, dois receptores importantes na patogenia da malária por *P. falciparum*.

Parece evidente, após todas as análises realizadas durante este projeto, que não exista uma simples relação entre título de anticorpos circulantes contra a superfície da hemácia infectada (especificamente contra domínios da proteína PfEMP1) e imunidade clínica para malária no Brasil. Estudo anterior realizado na África, utilizando isolados não deliberadamente selecionados para algum tipo de citoaderência, mas oriundos de diferentes casos de malária assintomática ou sintomática mostraram que plasmas/soros de indivíduos “protegidos” (sem sintomas) reconheceram mais fortemente hemácias infectadas neste mesmo tipo de ensaio que indivíduos não protegidos na posterior época de transmissão ¹⁴³. Porém, ainda se sabe muito pouco sobre as características antigênicas dos isolados de *P. falciparum* da Amazônia brasileira. A alta redundância do repertório de genes *var* entre as cepas brasileiras ⁸⁰, muito mais que em qualquer outra localidade, juntamente com a observada ausência da forma grave da doença no país, são fatores importantíssimos que caracterizam a situação da malária no Brasil como única. Essa redundância de genes variantes ocorre independente de tempo e localidade, sendo encontrados genes *var* compartilhados em isolados de 1986 e 2004; e poderia facilitar o encontro de estruturas alvo que seriam compartilhados pela maioria dos isolados da região amazônica e que poderiam eventualmente ser incluídos em formulações de vacinas.

Através de imunofluorescências (Figura 18), confirmamos a presença de anticorpos direcionados contra a superfície do eritrócito infectado com isolados de campo brasileiros de *P. falciparum* tanto em plasmas de indivíduos assintomáticos quanto sintomáticos residentes em Rondônia. Esta reação parece específica, pois não foi observada em plasmas de indivíduos que nunca tiveram contato com o

parasita. Além disso, ela parece não existir quando estes eritrócitos sofrem ação da tripsina (Figura 19), o que confirma, também, a especificidade da reação destes anticorpos contra proteínas do parasita sensíveis a esta protease e expressas na superfície da membrana no eritrócito infectado.

Porém, os perfis de reconhecimento dos plasmas de indivíduos assintomáticos e sintomáticos, apesar de semelhantes, apresentam algumas diferenças, que podem ser vistas em termos gerais, pelos diferentes perfis de bandas, resultado de western blot feito com membranas de eritrócitos infectados purificadas e plasmas de indivíduos sintomáticos e assintomáticos (Figura 37).

Onde estaria esta diferença? Quais seriam os fatores responsáveis pela proteção clínica destes indivíduos assintomáticos no momento em qual o plasma deles foi retirado? Uma resposta imune humoral eficiente contra as proteínas de membrana PfEMP1, seria mesmo tão importante para a condição de assintomático (proteção clínica da doença) como postulado por outros autores⁸⁴?

Analisando as médias de reconhecimento dos dois grupos para 5 isolados de campo brasileiros de *P. falciparum* e cepa 3D7, observamos diferenças significativas entre os grupos de sintomáticos e assintomáticos apenas em alguns casos. Segundo nossas análises por citometria de fluxo, indivíduos assintomáticos parecem responder mais para os isolados 3D7 (selecionado tanto para ICAM1 quanto para CD36), S20^{CD36} e 133^{ICAM1}. Já os indivíduos sintomáticos parecem responder mais e em maior frequência para o isolado 133^{CD36}. O isolado 133 foi reconhecido em maior intensidade pelos dois grupos tanto selecionado para ligação com ICAM1 quanto para CD36. As sequências preferencialmente transcritas nestes isolados - e no isolado S20^{CD36} - foram classificadas como sendo sequências *var* UpsA. Apenas 1 isolado selecionado para ICAM1 apresentou transcrito *var* dominante UpsA, contra 3 isolados selecionados para ligação em CD36.

Em 2009, Warimwe et al.⁷⁶ relataram associação entre transcrição de genes *var* do tipo upsA (DSID grupos 1-3) e quadros graves da doença, o que sugere, porém não prova que genes *var* expressos em parasitas adesivos em ICAM1 possuam genes *var* codificando DSID 1-3 (upsA), uma vez que ainda existem muitas dúvidas sobre essa questão, e resultados conflitantes. Mesmo assim, devido à ausência virtual de casos graves de malária no Brasil, no nosso caso essa associação não parece válida.

Todos os isolados de campo que utilizamos neste projeto foram coletados de

indivíduos sintomáticos que apresentaram altas parasitemias (3-4 cruces), de 1986 a 2006, sendo o isolado S20 o mais antigo (1986), seguido do 99 e 106 (2001) e 133 e 134 (2006).

Como o isolado 133 foi um dos últimos a ser coletado, ele pode ser o isolado mais comum no momento da coleta dos plasmas naquela região, com resposta mais evidente no grupo de sintomáticos, causada pelo *boosting* da infecção aguda neste plasmas, com um aumento na titulação de anticorpos devido à presença massiva do parasita. Em relação ao isolado S20^{CD36}, a alta resposta por indivíduos assintomáticos, pode representar a memória contra a proteína expressa por esse isolado, que só se mantém nos casos assintomáticos, e por ser um isolado relativamente antigo, em comparação aos outros, pode ter sido responsável por infecções prévias em um ou mais indivíduos, que após episódios anteriores de malária, podem ter desenvolvido um repertório de anticorpos suficiente, em intensidade e quantidade de variantes diferentes, necessários para alcançar proteção clínica. Uma possibilidade para testar essa teoria seria utilizar células B isoladas de pacientes assintomáticos e sintomáticos e estimular essas células com epítomos relacionados a diferentes genes *var*, observando a possível expansão destas células relacionando fenótipos de memória, utilizando marcadores como CD19 e CD21 e fenótipos efetivos (mudança de IgM para IgG).

Em relação à raridade de quadros de malária grave no Brasil, esperávamos encontrar na nossa população (tanto em sintomáticos quanto em assintomáticos), altos títulos de anticorpos contra parasitas selecionados para ICAM1 (relacionado a malária cerebral), o que tornaria esta população 'imune' à forma grave da doença. E foi o que de fato encontramos. Entre todos os isolados testados, os que foram selecionados para ligação em ICAM1 apresentaram maior reatividade quando comparados a seus pares, selecionados para CD36.

Uma explicação para tal fato é que provavelmente, de uma maneira geral, as variantes que se ligam a ICAM1 sejam reconhecidas mais rapidamente, ou em maior intensidade (mais imunogênicas) tanto em sintomáticos quanto assintomáticos, evitando quadros severos da doença. Sem esquecer que a citoaderência em ICAM1 não é fator único relacionado ao desenvolvimento de quadros graves da doença; a

resposta 'inadequada' do indivíduo contra outros componentes pró-inflamatórios já descritos, como: hemozoína (produto insolúvel da quebra da hemoglobina que se acumula dentro das hemácias infectadas), micropartículas derivadas da membrana do parasita, complexos proteína-DNA e ácido úrico^{34, 144} parece ser, também, muito importante no desenvolvimento dos quadros graves de malária.

Uma outra possibilidade seria a de que as variantes de isolados brasileiros, que se ligam a ICAM1 poderiam ter sofrido atenuação de suas características virulentas (como capacidade e força de citoaderência), ao longo do tempo, para obter uma melhor adaptação da relação parasita-hospedeiro no novo continente, o que explicaria a ausência virtual de quadros graves da doença no Brasil. Tal hipótese poderia ser testada comparando cepas africanas e brasileiras de tempos distintos (mais antigos e mais atuais), analisando possíveis alterações evolutivas nas PfEMP1s que se ligam a ICAM1. Quanto maior as alterações encontradas, maior seria frequência desse gene e maior seria a pressão evolutiva sobre o mesmo. Utilizando testes funcionais, poderíamos também analisar parâmetros como força de aderência, imunogenecidade de epítomos presentes nestas proteínas, procurando uma possível adaptação temporal/geográfica dessas proteínas nas diferentes cepas. Tais resultados poderiam associar o perfil a genética destes parasitas a quadros de doenças tanto aqui quanto lá.

A situação é um pouco diferente com ligantes de CD36. Uma vez que o quadro de citoaderência por este receptor não parece estar associado a quadros graves da doença, e mesmo assim ele parece ser o fenótipo mais prevalente, é razoável hipotetizar que somente indivíduos com respostas imunes humorais com alto grau de refinamento (altos valores de afinidade e avides para anticorpos produzidos contra essas proteínas), tenham altos títulos de anticorpos contra essas proteínas, e que talvez, em pacientes com exposição prévia a malária, os parasitas que se ligam a CD36 possam "*manipular*" tanto as respostas imune inata quanto adaptiva, através de interação com monócitos e células dendríticas^{92, 145, 146, 147}, o que faria da resposta imune contra este fenótipo um componente muito importante na definição de assintomático. Seu efeito lesivo está ligado a condições multifatoriais como produção de TNF e sequestro de eritrócitos, gerando trombos.

Fizemos ensaios de aglutinação mista, mostrando que os anticorpos presentes nestas amostras de plasmas são pan-reativos, capazes de aglutinar isolados diferentes, em diferentes graus. Quando caracterizamos a aglutinação em

tamanho/quantidade de aglutinados presentes em cada amostra, vimos que plasmas de indivíduos assintomáticos não produziram grandes trombos (com mais de 5 eritrócitos infectados), diferente de indivíduos sintomáticos. Este fato contribui com a idéia de que os assintomáticos provavelmente tem resposta mais refinada contra estes antígenos, são mais adaptados e não formam grandes aglutinados, conseguindo manter o *clearance* constante do parasita sem nenhum agravamento do quadro clínico para o indivíduo. Já o *burst* presente no caso dos sintomáticos, decorrentes da parasitemia massiva, acarreta em um aumento dos anticorpos contra antígenos de membrana, desenvolvendo paralelamente alta aglutinação e possível um agravamento no quadro clínico, evidenciado pelos sintomas.

Vale lembrar que a aglutinação de hemácias tem servido como fator de gravidade em diversos quadros maláricos. como no estudo, realizado na Índia ¹⁴⁸, que mostrou freqüente ocorrência de aglutinados mistos em ensaios utilizando isolados diferentes e plasmas de pacientes em fase convalescente.

Além disso, a maior geração de aglutinações gera maior degradação de eritrócitos intactos, afetando o metabolismo de grupos heme, podendo representar um importante componente de proteção contra formas graves da doença ¹⁴⁹. Portanto, a própria capacidade de aglutinação dos isolados/plasmas brasileiros, produzindo hemólise poderia explicar a proteção contra formas graves da doença no país.

Analisando a capacidade de inibição de citoaderência dos isolados selecionados, parece não existir correlação linear entre índices de reatividade e capacidade de inibição, indicativo de que uma alta titulação de anticorpos não significa, necessariamente, alta capacidade de inibição de citoaderência. As diferenças na capacidade de inibição de citoaderência parecem estar mais relacionadas a especificidade isolado^{fenótipo} e plasma do que fenótipo em comum, uma vez que alguns indivíduos com baixos índices de reatividade (menor título de anticorpo) parecem ter anticorpos neutralizantes específicos, capazes de inibir a citoaderência. Outra situação que parece acontecer é a de indivíduos com altos índices de reatividade e baixa capacidade de inibição; neste caso, talvez estejam envolvidos anticorpos relacionados à fagocitose de macrófagos e neutrófilos (citofílicos). O próximo passo seria a caracterização da resposta humoral através de ELISA ou citometria de fluxo. Realizamos alguns testes iniciais para avaliar o uso de membranas de eritrócitos infectados purificadas e deslipidificadas como antígenos

para a caracterização de subclasses de IgG presentes nos plasmas. O resultado destes testes conseguiria classificar os anticorpos em citofílicos (IgG1, resposta TH1) ou neutralizantes (IgG2, resposta TH2).

Realizamos também ensaios de reversão de citoaderência por fluxo, fazendo a citoaderência *in vitro* dos isolados 3D7 e 133 em células CHO^{ICAM1} e CHO^{CD36}, após seleção destes isolados para ligação a ICAM1 e CD36.

Estudo recente ¹³⁸ comparou a capacidade e força de citoaderência de eritrócitos infectados aos receptores CD36 e TSP (trombospondina), utilizando intensidades de fluxo diferentes. Estes pesquisadores mostraram que ligações formadas sob condições de fluxo mais intensas possuem menor duração e maior força, ao contrário do que foi observado em condições de fluxo moderadas (maior duração e menor força). A força de ligação com TSP se manteve alta em fluxos intensos, mas decaiu rapidamente quando o fluxo foi reduzido. Em contraste, a ligação com CD36 manteve níveis consideráveis de força mesmo com fluxos baixos, o que poderia confirmar o comportamento de ligante transitório de TSP (e ICAM1), e o de ligante permanente de CD36.

Em nossos ensaios, realizamos a citoaderência em condição estática, sem pressão atuante, provavelmente "privilegiando" a ligação com CD36, constante, independente de taxas de fluxo ¹³⁸. Isto explicaria porque após o 1º fluxo, houve uma redução de quase 50% da citoaderência nos isolados selecionados para ICAM1 (que formariam ligações mais fortes apenas sob condições de fluxo intenso), enquanto isolados selecionados para ligação em CD36 tiveram seus índices de citoaderência reduzidos a 50% (3D7) e 73% (133) somente após o 3º fluxo (Figura 35).

Isto pode ser importante para interpretação das funções *in vivo* destas duas proteínas (TSP – ou ICAM1, que também parece ser um ligante transitório - e CD36): TSP, ou ICAM1 podem iniciar a captura de eritrócitos infectados da circulação, formando com o eritrócito infectado uma ligação forte, de curta duração sob fluxo intenso, o que geralmente ocorre após o primeiro contato de uma célula da circulação com o endotélio. Por outro lado, é provável que a ligação com CD36 seja persistente, e de longa duração, formada em um segundo momento, após a captura das células da circulação, e se mantenha forte mesmo em condições de fluxo moderado, sendo insensível a mudanças no fluxo durante estresse fisiológico¹³⁸.

Seria interessante testar estes isolados promovendo a citoaderência em fluxo contínuo em temperatura fisiológica, testando assim a capacidade e força de citoaderência dos isolados brasileiros em condições fisiológicas. Da mesma forma seria interessante testar a reversão de citoaderência em fluxo na presença de plasmas, o que envolveria um planejamento maior de coleta de plasma suficiente para a realização do experimento.

Alternativamente, outro estudo ¹⁵⁰ procurou relacionar a expressão de receptores de adesão, como ICAM1, *in vitro*, em linhagens isogênicas de células com comportamentos semelhantes às células do endotélio cerebral, em resposta ao contato com eritrócitos infectados por *P. falciparum*. A expressão aumentada de ICAM1 parece ser responsável, pelo menos em parte, por um aumento na adesividade dos eritrócitos infectados, mediada por moléculas de superfície no eritrócito infectado (PfEMP-1). Estes resultados seguem a mesma linha de estudos anteriores ^{151, 152, 153, 154, 155}, e sugerem que talvez certos parasitas expressem ligantes de alta avidéz, que têm a capacidade de modular o endotélio, e produzir um estado pró-adesivo, que antecederia a resposta pró-inflamatória sistêmica do hospedeiro, disparando rotas de sinalização específicas, podendo levar a disfunção localizada no endotélio cerebral, causando quadros graves da doença. A indução de moléculas de adesão poderia criar um ambiente vascular que favoreceria eventos de aderência, aumentando transitoriamente a microcirculação e o recrutamento concomitante de eritrócitos infectados, plaquetas e (potencialmente) outras células sanguíneas para se ligar ao endotélio dos microvasos, levando ao bloqueio dos vasos sanguíneos, como pode ser visto na retina de pacientes com malária cerebral ¹⁵⁶. Todos estes estudos têm confirmado que o contato célula-célula é um passo crítico para a ativação de células endoteliais, podendo ocorrer de 30 a 60 minutos ¹⁵⁷. Estas respostas poderiam produzir um aumento no estado pró-adesivo, aumentando a citoaderência dos eritrócitos infectados durante os estágios iniciais da infecção. Sendo assim, a capacidade do parasita de modular o ambiente no hospedeiro, para aumentar a eficácia da citoaderência seria de grande benefício para sua sobrevivência e transmissão.

6 CONCLUSÕES

- Confirmamos a presença de anticorpos direcionados contra a superfície do eritrócito infectado com isolados de campo brasileiros de *P. falciparum* tanto em plasmas de indivíduos assintomáticos quanto sintomáticos, sensível à ação da tripsina, o que também confirmaria a especificidade da reação destes anticorpos contra proteínas do parasita sensíveis a esta protease e expressas na superfície da membrana no eritrócito infectado.
- Parece não haver simples relação entre título de anticorpos circulantes contra a superfície da hemácia infectada (especificamente contra domínios da proteína PfEMP1) e proteção contra os sintomas clínicos da doença.
- Indivíduos assintomáticos parecem responder mais para os isolados 3D7 (selecionado tanto para ICAM1 quanto para CD36), S20^{CD36} e 133^{ICAM1}. Já os indivíduos sintomáticos parecem responder mais e em maior frequência para o isolado 133^{CD36}. O isolado 133 foi reconhecido em maior intensidade pelos dois grupos tanto selecionado para ligação com ICAM1 quanto para CD36.
- Apenas 1 isolado selecionado para ICAM1 apresentou transcrito *var* dominante UpsA, contra 3 isolados selecionados para ligação em CD36.
- Entre todos os isolados testados, os que foram selecionados para ligação em ICAM1 apresentaram maior reatividade quando comparados a seus pares, selecionados para CD36.
- Anticorpos presentes nestas amostras de plasmas são pan-reativos, capazes de aglutinar isolados diferentes, em diferentes graus. Quando caracterizamos a aglutinação em tamanho/quantidade de aglutinados presentes em cada amostra, vimos que plasmas de indivíduos assintomáticos não produziram grandes trombos (com mais de 5 eritrócitos infectados), diferente de indivíduos sintomáticos.
- Analisando a capacidade de inibição de citoaderência dos isolados selecionados, parece não existir correlação linear entre índices de reatividade e capacidade de inibição, indicativo de que uma alta titulação de anticorpos não significa, necessariamente, alta capacidade de inibição de citoaderência.

REFERÊNCIAS*

1. WHITE, N. J. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 2, p. 172-173, 2008.
2. LUCHAVEZ, J. et al. Human Infections with Plasmodium knowlesi, the Philippines. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 5, p. 811-813, 2008.
3. NG, O. T. et al. Naturally acquired human Plasmodium knowlesi infection, Singapore. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 5, p. 814-816, 2008.
4. CARTER, R.; MENDIS, K. N. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. **Clin Microbiol Rev**, City, v. 15, n. 4, p. 564-594, 2002.
5. SCHLAGENHAUF, P. Malaria: from prehistory to present. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 18, n. 2, p. 189-205, 2004.
6. YALCINDAG, E. et al. Multiple independent introductions of Plasmodium falciparum in South America. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 109, n. 2, p. 511-516, 2012.
7. SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 680-685, 2002.
8. JAMBOU, R. et al. Resistance of Plasmodium falciparum field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. **Lancet**, v. 366, n. 9501, p. 1960-1963, 2005.
9. WIPASA, J. et al. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. **Immunol. Cell Biol.**, v. 80, n. 5, p. 401-414, 2002.
10. STOUTE, J. A. et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against Plasmodium falciparum malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 336, n. 2, p. 86-91, 1997.
11. DOUGLAS, A. D. et al. The blood-stage malaria antigen PfRH5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. **Nat. Commun.**, v. 2, p. 601, 2011.
12. HAY, S. I. et al. A world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2007. **PLoS Med**, v. 6, n. 3, 2009.
13. HAY, S. I. et al. Estimating the global clinical burden of Plasmodium falciparum malaria in 2007. **PLoS Med.**, v. 7, n. 6, 2010.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

14. LOIOLA, C. C.; DA SILVA, C. J.; TAUIL, P. L. [Malaria control in Brazil: 1965 to 2001]. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 11, n. 4, p. 235-244, 2002.
15. DA SILVA-NUNES, M. et al. Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. **Acta Trop.**, 2011.
16. COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755-766, 2006.
17. GOLDBERG, D. E.; COWMAN, A. F. Moving in and renovating: exporting proteins from Plasmodium into host erythrocytes. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 617-621, 2010.
18. MARSH, K. et al. Indicators of life-threatening malaria in African children. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, n. 21, p. 1399-1404, 1995.
19. DONDORP, A. M.; PONGPONRATN, E.; WHITE, N. J. Reduced microcirculatory flow in severe falciparum malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. **Acta Trop.**, v. 89, n. 3, p. 309-317, 2004.
20. PLANCHE, T.; KRISHNA, S. Severe malaria: metabolic complications. **Curr. Mol. Med.**, v. 6, n. 2, p. 141-153, 2006.
21. KWIATKOWSKI, D. et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. **Lancet**, v. 336, n. 8725, p. 1201-1204, 1990.
22. MANGANO, V. D. et al. Interferon regulatory factor-1 polymorphisms are associated with the control of Plasmodium falciparum infection. **Genes Immun.**, v. 9, n. 2, p. 122-129, 2008.
23. MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673-679, 2002.
24. BARNWELL, J. W. et al. A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **J Clin Invest**, v. 84, n. 3, p. 765-772, 1989.
25. BERENDT, A. R. et al. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for Plasmodium falciparum. **Nature**, v. 341, n. 6237, p. 57-59, 1989.
26. ROBERTS, D. D. et al. Thrombospondin binds falciparum malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. **Nature**, v. 318, n. 6041, p. 64-66, 1985.
27. OCKENHOUSE, C. F. et al. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. **J. Exp. Med.**, v. 176, n. 4, p. 1183-1189, 1992.
28. SHERMAN, I. W.; EDA, S.; WINOGRAD, E. Cytoadherence and sequestration in Plasmodium falciparum: defining the ties that bind. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 10, p. 897-909, 2003.

29. CHEN, Q. et al. The semiconserved head structure of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 1, p. 1-10, 2000.
30. PAIN, A. et al. Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, n. 4, p. 1805-1810, 2001.
31. ROWE, J. A. et al. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Expert Rev. Mol. Med.**, v. 11, p. 16, 2009.
32. BARUCH, D. I. et al. Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. **Blood**, v. 90, n. 9, p. 3766-3775, 1997.
33. NEWBOLD, C. et al. Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, n. 4, p. 389-398, 1997.
34. VAN DER HEYDE, H. C. et al. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 11, p. 503-508, 2006.
35. DUFFY, P. E. Maternal immunization and malaria in pregnancy. **Vaccine**, v. 21, n. 24, p. 3358-3361, 2003.
36. GAMAIN, B. et al. Pregnancy-associated malaria: parasite binding, natural immunity and vaccine development. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, n. 3-4, p. 273-283, 2007.
37. ALBRECHT, L. **Análise do Repertório de Genes Variantes de *Plasmodium falciparum* da Amazônia e Identificação de Genes Variantes Relacionados ao Fenótipo de Citoaderência a ICAM1 de Isolados de Rondônia.** 2008. 145 (Doutorado em Parasitologia).instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.
38. KYRIACOU, H. M. et al. Differential var gene transcription in *Plasmodium falciparum* isolates from patients with cerebral malaria compared to hyperparasitaemia. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 150, n. 2, p. 211-218, 2006.
39. ROGERSON, S. J. et al. Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from Malawian children with severe and uncomplicated malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 3, p. 467-472, 1999.
40. MARSH, K. et al. *Plasmodium falciparum*: the behavior of clinical isolates in an in vitro model of infected red blood cell sequestration. **Exp. Parasitol.**, v. 65, n. 2, p. 202-208, 1988.
41. HEDDINI, A. et al. Binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to soluble platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): frequent recognition by clinical isolates. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 1, p. 47-51, 2001.
42. HO, M. et al. Clinical correlates of in vitro *Plasmodium falciparum* cytoadherence. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 3, p. 873-878, 1991.

43. OCKENHOUSE, C. F. et al. Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1. **J. Infect. Dis.**, v. 164, n. 1, p. 163-169, 1991.
44. UDOMSANGPETCH, R. et al. Receptor specificity of clinical *Plasmodium falciparum* isolates: nonadherence to cell-bound E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. **Blood**, v. 88, n. 7, p. 2754-2760, 1996.
45. HEDDINI, A. et al. Fresh isolates from children with severe *Plasmodium falciparum* malaria bind to multiple receptors. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 9, p. 5849-5856, 2001.
46. DEANS, A. M. et al. Low multiplication rates of African *Plasmodium falciparum* isolates and lack of association of multiplication rate and red blood cell selectivity with malaria virulence. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, n. 4, p. 554-563, 2006.
47. CARLSON, J. et al. Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. **Lancet**, v. 336, n. 8729, p. 1457-1460, 1990.
48. TREUTIGER, C. J. et al. Rosette formation in *Plasmodium falciparum* isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 46, n. 5, p. 503-510, 1992.
49. RINGWALD, P. et al. Parasite virulence factors during *falciparum* malaria: rosetting, cytoadherence, and modulation of cytoadherence by cytokines. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 12, p. 5198-5204, 1993.
50. ROWE, A. et al. *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 6, p. 2323-2326, 1995.
51. KUN, J. F. et al. Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambarene, Gabon. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, n. 1, p. 110-114, 1998.
52. ROWE, J. A. et al. Nonimmune IgM, but not IgG binds to the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and correlates with rosetting and severe malaria. **Am J Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 6, p. 692-699, 2002.
53. ANGKASEKWINAI, P.; LOOAREESUWAN, S.; CHAIYAROJ, S. C. Lack of significant association between rosette formation and parasitized erythrocyte adherence to purified CD36. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 29, n. 1, p. 41-45, 1998.
54. CHOTIVANICH, K. et al. Platelet-induced autoagglutination of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells and disease severity in Thailand. **J. Infect. Dis.**, v. 189, n. 6, p. 1052-1055, 2004.
55. WASSMER, S. C. et al. Platelet-induced clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from Malawian patients with cerebral malaria-possible modulation in vivo by thrombocytopenia. **J. Infect. Dis.**, v. 197, n. 1, p. 72-78, 2008.
56. ARMAN, M. et al. Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes is associated with high parasitemia but not severe clinical manifestations of malaria in African children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 5, p. 943-946, 2007.

57. LEECH, J. H. et al. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **J Exp Med**, v. 159, n. 6, p. 1567-1575, 1984.
58. TRENHOLME, K. R. et al. Malaria: A new gene family (clag) involved in adhesion - reply. **Parasitol Today**, v. 16, n. 9, p. 405, 2000.
59. BARUCH, D. I. et al. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. **Cell**, v. 82, n. 1, p. 77-87, 1995.
60. SU, X. Z. et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Cell**, v. 82, n. 1, p. 89-100, 1995.
61. GARDNER, M. J. et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 498-511, 2002.
62. SCHERF, A. et al. Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. **Embo J.**, v. 17, n. 18, p. 5418-5426, 1998.
63. JOERGENSEN, L. et al. Surface co-expression of two different PfEMP1 antigens on single *plasmodium falciparum*-infected erythrocytes facilitates binding to ICAM1 and PECAM1. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 9, p. 100-108, 2010.
64. ROBERTS, D. J. et al. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. **Nature**, v. 357, n. 6380, p. 689-692, 1992.
65. FREITAS-JUNIOR, L. H. et al. Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. **Nature**, v. 407, n. 6807, p. 1018-1022, 2000.
66. WINTER, G. et al. The 3D7var5.2 (var COMMON) type var gene family is commonly expressed in non-placental *Plasmodium falciparum* malaria. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 127, n. 2, p. 179-191, 2003.
67. KYES, S. A.; KRAEMER, S. M.; SMITH, J. D. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: gene organization and regulation of the var multigene family. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 9, p. 1511-1520, 2007.
68. MAGISTRADO, P. A. et al. CD36 selection of 3D7 *Plasmodium falciparum* associated with severe childhood malaria results in reduced VAR4 expression. **Malar. J.**, v. 7, p. 204, 2008.
69. KRAEMER, S. M.; SMITH, J. D. Evidence for the importance of genetic structuring to the structural and functional specialization of the *Plasmodium falciparum* var gene family. **Mol. Microbiol.**, v. 50, n. 5, p. 1527-1538, 2003.
70. MARTI, M. et al. Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. **J. Cell Biol.**, v. 171, n. 4, p. 587-592, 2005.

71. HILLER, N. L. et al. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. **Science**, v. 306, n. 5703, p. 1934-1937, 2004.
72. LAVSTSEN, T. et al. Sub-grouping of Plasmodium falciparum 3D7 var genes based on sequence analysis of coding and non-coding regions. **Malar. J.**, v. 2, p. 27, 2003.
73. KRAEMER, S. M. et al. Patterns of gene recombination shape var gene repertoires in Plasmodium falciparum: comparisons of geographically diverse isolates. **BMC Genomics**, v. 8, p. 45, 2007.
74. ROBINSON, B. A.; WELCH, T. L.; SMITH, J. D. Widespread functional specialization of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome. **Mol Microbiol**, v. 47, n. 5, p. 1265-78, Mar 2003.
75. TRIMNELL, A. R. et al. Global genetic diversity and evolution of var genes associated with placental and severe childhood malaria. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 148, n. 2, p. 169-180, 2006.
76. WARIMWE, G. M. et al. Plasmodium falciparum var gene expression is modified by host immunity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 106, n. 51, p. 21801-21806, 2009.
77. JENSEN, A. T. et al. Plasmodium falciparum associated with severe childhood malaria preferentially expresses PfEMP1 encoded by group A var genes. **J. Exp. Med.**, v. 199, n. 9, p. 1179-1190, 2004.
78. FOWLER, E. V. et al. Genetic diversity of the DBLalpha region in Plasmodium falciparum var genes among Asia-Pacific isolates. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, n. 1, p. 117-126, 2002.
79. TUIKUE NDAM, N. G. et al. High level of var2csa transcription by Plasmodium falciparum isolated from the placenta. **J. Infect. Dis.**, v. 192, n. 2, p. 331-335, 2005.
80. ALBRECHT, L. et al. Extense variant gene family repertoire overlap in Western Amazon Plasmodium falciparum isolates. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 150, n. 2, p. 157-165, 2006.
81. BARRY, A. E. et al. Population genomics of the immune evasion (var) genes of Plasmodium falciparum. **PLoS Pathog.**, v. 3, n. 3, p. e34, 2007.
82. MARSH, K.; HOWARD, R. J. Antigens induced on erythrocytes by P. falciparum: expression of diverse and conserved determinants. **Science**, v. 231, n. 4734, p. 150-3, Jan 10 1986.
83. DEITSCH, K. W.; HVIID, L. Variant surface antigens, virulence genes and the pathogenesis of malaria. **Trends Parasitol.**, v. 20, n. 12, p. 562-566, 2004.
84. BULL, P. C. et al. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. **Nat. Med.**, v. 4, n. 3, p. 358-360, 1998.
85. OQUENDO, P. et al. CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. **Cell**, v. 58, n. 1, p. 95-101, 1989.

86. GREENWALT, D. E. et al. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. **Blood**, v. 80, n. 5, p. 1105-1115, 1992.
87. DAVIET, L. et al. Characterization of two vaccinia CD36 recombinant-virus-generated monoclonal antibodies (10/5, 13/10): effects on malarial cytoadherence and platelet functions. **Eur. J. Biochem.**, v. 243, n. 1-2, p. 344-349, 1997.
88. BARUCH, D. I. et al. CD36 peptides that block cytoadherence define the CD36 binding region for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Blood**, v. 94, n. 6, p. 2121-2127, 1999.
89. BARUCH, D. I. et al. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, n. 8, p. 3497-34502, 1996.
90. MILLER, L. H. et al. Definition of the minimal domain of CIDR1alpha of *Plasmodium falciparum* PfEMP1 for binding CD36. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, n. 2, p. 321-323, 2002.
91. SMITH, J. D. et al. Analysis of adhesive domains from the A4VAR *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 identifies a CD36 binding domain. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 97, n. 1-2, p. 133-148, 1998.
92. SERGHIDES, L. et al. CD36 and malaria: friends or foes? **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 10, p. 461-469, 2003.
93. MILLER, J. et al. Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. **J. Exp. Med.**, v. 182, n. 5, p. 1231-1241, 1995.
94. OCKENHOUSE, C. F. et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1, and human rhinovirus. **Cell**, v. 68, n. 1, p. 63-69, 1992.
95. SMITH, J. D. et al. Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. **Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, n. 4, p. 1766-1771, 2000.
96. CHATTOPADHYAY, R. et al. Molecular analysis of the cytoadherence phenotype of a *Plasmodium falciparum* field isolate that binds intercellular adhesion molecule-1. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 133, n. 2, p. 255-265, 2004.
97. SPRINGER, A. L. et al. Functional interdependence of the DBLbeta domain and c2 region for binding of the *Plasmodium falciparum* variant antigen to ICAM-1. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 137, n. 1, p. 55-64, 2004.
98. HOWELL, D. P. et al. Mapping a common interaction site used by *Plasmodium falciparum* Duffy binding-like domains to bind diverse host receptors. **Mol. Microbiol.**, v. 67, n. 1, p. 78-87, 2008.
99. TSE, M. T. et al. Divergent binding sites on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) for variant *Plasmodium falciparum* isolates. **Mol. Microbiol.**, v. 51, n. 4, p. 1039-1049, 2004.

100. MAZIER, D.; NITCHEU, J.; IDRISSE-BOUBOU, M. Cerebral malaria and immunogenetics. **Parasite Immunol.**, v. 22, n. 12, p. 613-623, 2000.
101. TURNER, G. D. et al. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. **Am. J. Pathol.**, v. 145, n. 5, p. 1057-1069, 1994.
102. CRAIG, A. et al. A functional analysis of a natural variant of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1Kilifi). **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 4, p. 525-30, Mar 1 2000.
103. FERNANDEZ-REYES, D. et al. A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. **Hum. Mol. Genet.**, v. 6, n. 8, p. 1357-1360, 1997.
104. KUN, J. F. et al. Association of the ICAM-1Kilifi mutation with protection against severe malaria in Lambarene, Gabon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 5, p. 776-779, 1999.
105. OHASHI, J. et al. Absence of association between the allele coding methionine at position 29 in the N-terminal domain of ICAM-1 (ICAM-1(Kilifi)) and severe malaria in the northwest of Thailand. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 54, n. 3, p. 114-116, 2001.
106. BARUCH, D. I. Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. **Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, v. 12, n. 4, p. 747-761, 1999.
107. STRUIK, S. S.; RILEY, E. M. Does malaria suffer from lack of memory? **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 268-290, 2004.
108. STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 169-180, 2004.
109. ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; TONGREN, J. E.; RILEY, E. M. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 133, n. 2, p. 145-152, 2003.
110. PLEASS, R. J.; HOLDER, A. A. Opinion: antibody-based therapies for malaria. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 11, p. 893-9, Nov 2005.
111. HEDDINI, A. Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces. **Int J. Parasitol.**, v. 32, n. 13, p. 1587-98, Dec 4 2002.
112. MARSH, K. Malaria--a neglected disease? **Parasitology**, v. 104 Suppl, p. S53-69, 1992.
113. BULL, P. C.; MARSH, K. The role of antibodies to Plasmodium falciparum-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. **Trends Microbiol.**, v. 10, n. 2, p. 55-58, 2002.
114. GUPTA, S. et al. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. **Nat. Med.**, v. 5, n. 3, p. 340-343, 1999.
115. BEESON, J. G. et al. Parasite adhesion and immune evasion in placental malaria. **Trends Parasitol.**, v. 17, n. 7, p. 331-337, 2001.

116. MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunol.**, v. 28, n. 1-2, p. 51-60, 2006.
117. O'DONNELL, R. A. et al. 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.**, v. 193, n. 12, p. 1403-1412, 2001.
118. BOUHAROUN-TAYOUN, H. et al. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **J. Exp. Med.**, v. 182, n. 2, p. 409-418, 1995.
119. LUSINGU, J. P. et al. Levels of plasma immunoglobulin G with specificity against the cysteine-rich interdomain regions of a semiconserved *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1, VAR4, predict protection against malarial anemia and febrile episodes. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 5, p. 2867-2875, 2006.
120. GIHA, H. A. et al. Nine-year longitudinal study of antibodies to variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 8, p. 4092-4098, 1999.
121. STAALSO, T. et al. Antibody reactivity to conserved linear epitopes of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). **Immunol. Lett.**, v. 60, n. 2-3, p. 121-126, 1998.
122. HVIID, L.; STAALSOE, T. Malaria immunity in infants: a special case of a general phenomenon? **Trends Parasitol.**, v. 20, n. 2, p. 66-72, 2004.
123. OGUARIRI, R. M. et al. High prevalence of human antibodies to recombinant Duffy binding-like alpha domains of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte membrane protein 1 in semi-immune adults compared to that in nonimmune children. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 12, p. 7603-7609, 2001.
124. TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976.
125. LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **J. Parasitol.**, v. 65, n. 3, p. 418-420, 1979.
126. LELIEVRE, J.; BERRY, A.; BENOIT-VICAL, F. An alternative method for *Plasmodium* culture synchronization. **Exp. Parasitol.**, v. 109, n. 3, p. 195-197, 2005.
127. MOLL, K. et al. **Methods in malaria research**. 2008. Virginia: Manassas.300p.
128. AUSBEL, F. M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. 1987. New York: Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, 200p.
129. ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
130. BULL, P. C. et al. An approach to classifying sequence tags sampled from *Plasmodium falciparum* var genes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 154, n. 1, p. 98-102, 2007.

131. GIL, L. H. et al. Urban and suburban malaria in Rondonia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 271-276, Jun 2007.
132. GOLNITZ, U.; ALBRECHT, L.; WUNDERLICH, G. Var transcription profiling of *Plasmodium falciparum* 3D7: assignment of cytoadherent phenotypes to dominant transcripts. **Malar. J.**, v. 7, p. 14, 2008.
133. ALBRECHT, L. et al. The South American *Plasmodium falciparum* var gene repertoire is limited, highly shared and possibly lacks several antigenic types. **Gene**, v. 453, n. 1-2, p. 37-44, 2010.
134. OLEINIKOV, A. V. et al. High throughput functional assays of the variant antigen PfEMP1 reveal a single domain in the 3D7 *Plasmodium falciparum* genome that binds ICAM1 with high affinity and is targeted by naturally acquired neutralizing antibodies. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 4, p. 281-286, 2009.
135. WILLIAMS, T. N.; NEWBOLD, C. I. Reevaluation of flow cytometry for investigating antibody binding to the surface of *Plasmodium falciparum* trophozoite-infected red blood cells. **Cytometry A**, v. 56, n. 2, p. 96-103, 2003.
136. ANDREWS, K. T. et al. Adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CHO-745 cells and inhibition of binding by protein A in the presence of human serum. **Int J. Parasitol.**, v. 35, n. 10, p. 1127-1134, 2005.
137. COOKE, B. M. et al. Rolling and stationary cytoadhesion of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*: separate roles for ICAM-1, CD36 and thrombospondin. **Br. J. Haematol.**, v. 87, n. 1, p. 162-170, 1994.
138. LI, A. et al. Molecular mechanistic insights into the endothelial receptor mediated cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. 169-229, 2011.
139. BENOIT, M. et al. Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, n. 6, p. 313-317, 2000.
140. CHEN, S.; SPRINGER, T. A. An automatic braking system that stabilizes leukocyte rolling by an increase in selectin bond number with shear. **J. Cell Biol.**, v. 144, n. 1, p. 185-200, 1999.
141. HO, M.; WHITE, N. J. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n. 6 Pt 1, p. C1231-C1242, 1999.
142. YIPP, B. G. et al. Differential roles of CD36, ICAM-1, and P-selectin in *Plasmodium falciparum* cytoadherence in vivo. **Microcirculation**, v. 14, n. 6, p. 593-602, Aug 2007.
143. DODOO, D. et al. Antibodies to variant antigens on the surfaces of infected erythrocytes are associated with protection from malaria in Ghanaian children. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 6, p. 3713-3718, 2001.
144. DE SOUZA, J. B. et al. Neutralization of malaria glycosylphosphatidylinositol in vitro by serum IgG from malaria-exposed individuals. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 9, p. 3920-3929, 1998.

145. URBAN, B. C. et al. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature**, v. 400, n. 6739, p. 73-7, 1999.
146. URBAN, B. C.; ROBERTS, D. J. Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, n. 4, p. 458-465, 2002.
147. PATEL, S. N. et al. Disruption of CD36 impairs cytokine response to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol and confers susceptibility to severe and fatal malaria in vivo. **J. Immunol.**, v. 178, n. 6, p. 3954-3961, 2007.
148. CHATTOPADHYAY, R. et al. Plasmodium falciparum infection elicits both variant-specific and cross-reactive antibodies against variant surface antigens. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 2, p. 597-604, 2003.
149. FERREIRA, A. et al. Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 398-409, 2011.
150. WU, Y. et al. Amplification of P. falciparum Cytoadherence through induction of a pro-adhesive state in host endothelium. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. 247-249, 2011.
151. TRIPATHI, A. K. et al. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce NF-kappaB regulated inflammatory pathways in human cerebral endothelium. **Blood**, v. 114, n. 19, p. 4243-52, 2009.
152. OCKENHOUSE, C. F. et al. Common and divergent immune response signaling pathways discovered in peripheral blood mononuclear cell gene expression patterns in presymptomatic and clinically apparent malaria. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 10, p. 5561-73, 2006.
153. UDEINYA, I. J. et al. Falciparum malaria-infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells. **Science**, v. 213, n. 4507, p. 555-7, Jul 31 1981.
154. CHAKRAVORTY, S. J. et al. Altered phenotype and gene transcription in endothelial cells, induced by Plasmodium falciparum-infected red blood cells: pathogenic or protective? **Int. J. Parasitol.**, v. 37, n. 8-9, p. 975-987, 2007.
155. PINO, P. et al. Plasmodium falciparum--infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 187, n. 8, p. 1283-1290, Apr 15 2003.
156. WHITE, V. A. et al. Retinal pathology of pediatric cerebral malaria in Malawi. **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. e431, 2009.
157. TRIPATHI, A. K.; SULLIVAN, D. J.; STINS, M. F. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF-kappaB. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 6, p. 3262-3270, 2006.
158. FRATUS, A.S.B. **Casos assintomáticos de malária na Amazônia brasileira: Citoaderência, anticorpos contra a superfície da hemácia infectada e proteção em infecções naturais por Plasmodium falciparum.** 2012. 106 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.