

MÁRCIA MELO MEDEIROS

**PERFIL DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE PACIENTES
SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS PARA MALÁRIA *falciparum*,
DA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA, CONTRA ANTÍGENOS
POLIMÓRFICOS EXPORTADOS PARA A SUPERFÍCIE DA
HEMÁCIA INFECTADA E ANTÍGENOS EXPRESSOS
NO MEROZOÍTO**

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

São Paulo
2011

MÁRCIA MELO MEDEIROS

**PERFIL DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE PACIENTES
SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS PARA MALÁRIA *falciparum*,
DA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA, CONTRA ANTÍGENOS
POLIMÓRFICOS EXPORTADOS PARA A SUPERFÍCIE DA HEMÁCIA
INFECTADA E ANTÍGENOS EXPRESSOS NO MEROZOÍTO**

Tese apresentada ao 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
2011

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

reprodução não autorizada pelo autor

Medeiros, Márcia Melo.

Perfil da resposta imune humoral de pacientes sintomáticos e assintomáticos para malária *falciparum*, da Amazônia Ocidental Brasileira, contra antígenos polimórficos exportados para a superfície da hemácia infectada e antígenos expressos no merozoíto / Márcia Melo Medeiros. -- São Paulo, 2011.

Orientador: 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: Biologia molecular do *P. falciparum*.

Versão do título para o inglês: Humoral immune response profile of symptomatic and asymptomatic patients of *falciparum* malaria, from Western Brazilian Amazon, against polymorphic antigens exported to the surface of infected erythrocyte and merozoite expressed antigens.

Descritores: 1. Malária 2. *Plasmodium falciparum* 3. Resposta humoral 4. Proteínas do merozoíto 5. Proteínas SURFIN 6. Indivíduos assintomáticos I. Wunderlich, Gerhard II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0168/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Márcia Melo Medeiros.

Título da Tese: Perfil da resposta imune humoral de pacientes sintomáticos e assintomáticos para malária *falciparum*, da Amazônia Ocidental Brasileira, contra antígenos polimórficos exportados para a superfície da hemácia infectada e antígenos expressos no merozoíto.

Orientador(a): Gerhard Wunderlich.

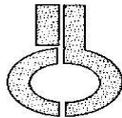
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091 7733 - telefax: (55) (011) 3091 8405

Decl. CEPESH. 041.11

DECLARAÇÃO

Em adendo ao parecer 741/CEP de 14.09.06, informo que o título do Projeto foi alterado para *"Perfil da resposta imune humoral de pacientes sintomáticos e assintomáticos para malária falciparum, da Amazônia Ocidental Brasileira, contra antígenos polimórficos exportados para a superfície da hemácia infectada e antígenos expressos no merozoíto"* não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 27 de julho de 2011.

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

Aos meus pais Tereza e Fernando, que sempre torcem por mim e apóiam as minhas escolhas, por mais incomuns que lhes pareçam,

Aos meus irmãos Júlio e Luciana pelo carinho sempre,

Aos meus sobrinhos Lê, Nina e Bia pela alegria da infância nas nossas vidas,

A minha avó Geralda, pelos exemplos de coragem, determinação e sabedoria (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gerhard Wunderlich por tudo: pela confiança, pelo apoio, pela oportunidade, pela paciência e pelos conhecimentos ensinados ao longo desses 5 anos. Muito obrigada, Gerd, com certeza nunca esquecerei!

A todos os colegas do laboratório 07, tanto os do presente quanto aqueles que já foram embora, pelos momentos científicos e pelos momentos de descontração. Estes muitas vezes, mais importantes do que os primeiros!

Aos meus pacientes ribeirinhos que me receberam muito bem, confiaram em mim e tornaram este trabalho possível.

Ao Wolf pela convivência, pelo companheirismo e por todo o auxílio técnico, sem o qual teria sido impossível trabalhar.

À amiga Dra. Fernanda Janku Cabral pela amizade, pela confiança, pelas discussões científicas, pelas risadas e pela ajuda nos experimentos de *real time* PCR.

Ao amigo Wesley Luzetti Fotoran pelas discussões científicas, por toda a ajuda na bancada, pelo apoio, pela amizade e pelas cervejas tomadas!

À amiga Dra. Catarina Castineiras pela realização do experimento de PFGE e pelas risadas e momentos de pura alegria!

À amiga MSc. Rosimeire Cristina Dalla Martha pela acolhida em Rondônia, pela enorme ajuda nos trabalhos de campo e doação inestimável da maior parte das amostras de sangue utilizadas neste estudo. Rosi, sem você eu não teria conseguido!

Ao funcionário da FUNASA Alzemar pela ajuda no trabalho de campo e acompanhamento dos pacientes.

Ao Prof. Dr. Alejandro M. Katzin e toda a equipe de seu laboratório. À Dra. Emília e aos mestres e futuros doutores Fabiana, Heloísa e Rodrigo, pelo apoio e confiança e ao Alexandre pela ajuda fundamental na formatação final desta tese! À Valnice pela ajuda na cultura de parasitas. Muito obrigada a todos vocês!

Ao Prof. Dr. Ariel M. Silber e toda a equipe de seu laboratório pela inestimável contribuição para a leitura das placas de ELISA.

Ao Márcio pela realização do seqüenciamento de todos os meus clones!

À Profa. Dra. Irene da Silva Soares pela doação das amostras de plasmas negativos utilizados nos ensaios de ELISA.

Ao Prof. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva e toda a equipe do CEPEM e do IPEPATRO pela confiança, pela iniciação na carreira científica e pela acolhida em Rondônia em um momento tão crucial na minha vida. Muito obrigada!

A todos os amigos, professores, funcionários e demais estudantes do Departamento de Parasitologia.

Aos meus amigos médicos e não-médicos: Maricota, Mari Blue, Ciça, Karina, Nuno, Itaque, Ana, Fernanda, Marcão, Pedro, Nalu, Simone, e tantos outros pela amizade e paciência em me escutarem falando, quase só de malária, nesses últimos 5 anos. Valeu pessoal!

Ao meu amigo Matheus Godoy Pires pelo amor e companheirismo e pela ajuda científica em tantos momentos da minha vida.

Ao meu querido Ahmed Lawual Adeshina pelo amor e companheirismo e pela paciência neste ano. Espero que a nossa caminhada esteja apenas começando!

Aos meus pais, pela oportunidade impagável de poder estudar, pelo incentivo a isso desde criança e pelo amor e carinho de todos os dias!

Muito obrigada por tudo!

Este trabalho recebeu apoio financeiro da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
São Paulo (FAPESP).

“Tapera de arraial. Ali, na beira do rio Pará, deixaram largado um povoado inteiro: casas, sobradinho, capela; três vendinhas, o chalé e o cemitério; e a rua, sozinha e comprida, que agora nem mais é uma estrada, de tanto que o mato a entupiu. (...)

Ela veio de longe, do São Francisco. Um dia, tomou caminho, entrou na boca aberta do Pará, e pegou a subir. Cada ano avançava um punhado de léguas, mais perto, mais perto, pertinho, fazendo medo no povo, porque era sezão da brava – da “tremedeira que não desamontava” – matando muita gente.

— Talvez que até aqui ela não chegue... Deus há-de...

Mas chegou; nem dilatou para vir. E foi um ano de tristezas.”

(trecho inicial de *Sarapalha*, em *Sagarana* de João Guimarães Rosa)

RESUMO

Medeiros MM. Perfil da resposta imune humoral de pacientes sintomáticos e assintomáticos para malária *falciparum*, da Amazônia Ocidental Brasileira, contra antígenos polimórficos exportados para a superfície da hemácia infectada e antígenos expressos no merozoíto [Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A imunidade adquirida contra sintomas da infecção por *Plasmodium falciparum* em pessoas de área endêmica é dependente de muitos fatores e a presença de anticorpos é essencial. Muitos antígenos expressos tanto pela forma invasiva – o merozoíto - quanto na hemácia infectada já foram avaliados separadamente como alvos da resposta humoral, porém, poucos estudos pesquisaram a resposta contra múltiplos antígenos de forma simultânea e ainda, utilizando antígenos oriundos de parasitas circulantes na mesma população na qual a resposta foi medida. No trabalho apresentado, obtivemos isolados de campo de *P. falciparum* do sangue de pacientes sintomáticos e assintomáticos de uma mesma área endêmica brasileira. Clonamos fragmentos de genes *surf* e dos genes das proteínas do merozoíto AMA1 e das famílias MSP e EBL. Expressamos todas as sequências diferentes encontradas fusionadas a GST. Por ELISA, testamos a positividade para IgG dos plasmas das mesmas amostras de sangue e identificamos as subclasses de IgG nos plasmas mais reativos e a duração da resposta de IgG em um subgrupo de plasmas. Os antígenos expressos pelo merozoíto foram amplamente reconhecidos pelos plasmas do estudo em comparação aos antígenos SURFIN. Assintomáticos apresentaram frequência maior de reconhecimento dos antígenos MSP5, MSP9 e dos SURFIN 1.1, 4.1, 4.2, 8.2 e 13.1 e maior intensidade de reconhecimento dos antígenos MSP4, MSP5, MSP9, EBA175 e SURFIN 1.1, 4.2 e 13.1 do que sintomáticos. A *odds ratio* conferida pela resposta humoral contra MSP5, MSP9 e SURFIN 13.1 mostrou 9 vezes menos chances para o primeiro, 8 vezes menos chances para o segundo e 3,5 vezes menos chances para o terceiro de desenvolver sintomas entre os respondedores, através da análise de tabelas de contingência. A *odds ratio* conferida pela resposta humoral mais intensa a MSP5 e EBA175 aponta respectivamente, 9,4 vezes e 5,7 vezes mais chances de desenvolvimento do perfil assintomático por regressão logística. Paralelamente, verificamos por RT-qPCR que pode ocorrer *switching* transcricional e talvez exclusão alélica na expressão de genes *surf*.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium falciparum*. Resposta humoral. Proteínas do merozoíto. Proteínas SURFIN. Indivíduos assintomáticos.

ABSTRACT

Medeiros MM. Humoral immune response profile of symptomatic and asymptomatic patients of *falciparum* malaria, from Western Brazilian Amazon, against polymorphic antigens exported to the surface of infected erythrocyte and merozoite expressed antigens [Ph. D. thesis (Biology of the Pathogen-Host Relation)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The acquired immune response against the symptoms of blood stage *Plasmodium falciparum* infection depends on multiple factors and the development of *Plasmodium* reactive antibodies is essential for immunity. Many target antigens from the invasive merozoite stage and on the surface of the infected red blood cell have been tested separately, but few studies used simultaneously multiple antigens and alleles of antigens actually in circulation in the population from whom the immune response was tested. In this work, we obtained *P. falciparum* field isolates present in the blood of symptomatic and asymptomatic patients from the same endemic area in the Western Amazon. We cloned and expressed all different sequences of *surf* genes and those encoding merozoite antigens AMA1 and members of the MSP and EBL protein families as GST fusion peptides. We identified plasmas positive for specific IgG, the IgG subclasses in the most reactive plasmas and the longevity of the response in a lot of plasmas by ELISA. We observed that plasmas from asymptomatic patients recognized more frequently and stronger the antigens MSP4, MSP5, MSP9, EBA175 and the SURFIN 1.1, 4.1, 4.2, 8.2 e 13.1 than plasmas from symptomatic patients. When we correlated ELISA values with parameters from the patients history of infection in order to establish which immune response was most responsible for evolution to the asymptomatic carrier state, we observed that individuals who presented a stronger response against MSP5 and EBA175 has 9.4 and 5.7 times, respectively, higher chance of being asymptomatic than symptomatic carriers, by logistic regression. The odds ratio conferred by antibodies against MSP5, MSP9 and SURFIN 13.1 pointed to 9 times fewer chances to the first two and 3,5 times fewer chances to the last for presence of malaria symptoms by cross tab analysis. In parallel, transcription analysis of *surf* genes in the *P. falciparum* strain 3D7 verified by RT-qPCR pointed to a mechanism reminiscent of allelic exclusion.

Key words: Malaria. *Plasmodium falciparum*. Humoral immune response. Merozoite proteins. SURFIN proteins. Asymptomatic carriers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	antes de Cristo
A.D.	<i>anno domini</i>
APC	<i>antigen present cell</i>
AMA1	<i>apical membrane antigen 1</i>
cDNA	DNA complementar
CEPEM	Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia
CHO	Células de <i>Chinese Hamster Ovary</i>
DBL	<i>Duffy binding like</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
DTT	Dithiothreitol
EBA	<i>erythrocyte binding antigen</i>
EBL	<i>erythrocyte binding ligand</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorted</i>
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
g	Aceleração da gravidade (9,8 m/s ²)
gDNA	DNA genômico
GST	glutathione-S-adenosiltransferase
IgG	Imunoglobulina G
IPEPATRO	Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais de Rondônia
IR	Índice de Reatividade
LLPC	<i>long-lived plasma cells</i>
M	molar
MAEBL	<i>merozoite adhesive erythrocytic binding protein</i>
MHCII	<i>major histocompatibility complex II</i>
MSP	<i>merozoite surface protein</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>open read frame</i>
pb	pares de base
PBS	<i>Phosphate-Buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultivo)
RT-PCR	Transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SLPC	<i>short-lived plasma cells</i>
ssrRNA	<i>small subunit ribosomal RNA</i>
surf	<i>surface associated interspersed gene</i>
TA	Temperatura ambiente
TCR	<i>T cell receptor</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
UV	ultra-violeta

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i>	35
Figura 2- Mapa mundial do risco de transmissão de malária por <i>P. vivax</i>	38
Figura 3- Mapa mundial do risco de transmissão de malária por <i>P. falciparum</i>	39
Figura 4- Número de casos de malária registrados no Brasil no período de 1960 a 2009	42
Figura 5- Áreas de transmissão de malária no Brasil em 2000 e 2008	42
Figura 6- <i>Motifs</i> conservados de proteínas de <i>Plasmodium falciparum</i> com sinal de PEXEL	52
Figura 7- Gráficos de barras da frequência dos indivíduos assintomáticos e sintomáticos por faixas das variáveis de exposição.	79
Figura 8- Gráfico de barras da frequência absoluta dos genes <i>surf</i> amplificados em gDNAs de isolados de <i>P. falciparum</i> de pacientes sintomáticos e assintomáticos	82
Figura 9- Gráfico de barras da frequência absoluta de não–amplificações e de amplificações de fragmentos humanos para cada par de oligonucleotídeos desenhado para amplificação de fragmentos de genes <i>surf</i>	83
Figura 10- Experimento de PFGE.	84
Figura 11- Eletroforese de proteínas SURFIN em gel de poliacrilamida a 8%.	85
Figura 12- Gráfico de barras da frequência em porcentagem do reconhecimento dos antígenos SURFIN recombinantes em ensaios de ELISA entre assintomáticos e sintomáticos	87
Figura 13- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR entre assintomáticos e sintomáticos para os antígenos SURFIN.	90
Figura 14- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-SURFIN 1.1, 1.2, 8.2_07 e 8.3 nos períodos T0, T30 e T60.	92
Figura 15- Gráfico de barras da média das DO (DO*) das subclasses de IgG envolvidas na resposta anti-S 1.2, S 4.2_132 e S 8.3 entre plasmas assintomáticos, sintomáticos e assintomáticos do T30 e T60.	93
Figura 16- Gráfico de barras da média das DO (DO*) das subclasses de IgG envolvidas na resposta anti-S 4.2_XXX entre assintomáticos, sintomáticos (S) e assintomáticos do T30 e T60.	95
Figura 17- Gráfico de barras da frequência de transcrição dos genes <i>surf</i> nas 3 fases do ciclo biológico do parasita da cepa 3D7 após <i>panning</i> em células CHO-CD36.	96

Figura 18- Gráfico de barras da frequência de transcrição dos genes <i>surf</i> nas 3 fases do ciclo biológico do parasita da cepa 3D7 após 20 ciclos do <i>panning</i>	97
Figura 19- Gráfico de barras da frequência de transcrição dos genes <i>surf</i> nas 3 fases do ciclo biológico do parasita da cepa 3D7 após 40 ciclos do <i>panning</i>	98
Figura 20- Gráfico de barras da frequência de sequências dos múltiplos genótipos do bloco 2 de MSP1 encontrados nos isolados do estudo	103
Figura 21- Gráfico de barras da distribuição da frequência absoluta de cada família alélica do bloco 2 de MSP1 por localidade	104
Figura 22- Gráfico de barras da distribuição da frequência absoluta dos alelos e variantes de MSP2 por localidade.	107
Figura 23- Eletroforese das proteínas MSP1-9 em gel de poliacrilamida a 8%.....	111
Figura 24- Eletroforese das proteínas MSP10, AMA1, EBAs e MAEBL em gel de poliacrilamida a 8%.....	112
Figura 25- Gráfico de barras da frequência em porcentagem do reconhecimento dos antígenos expressos pelo merozoíto entre assintomáticos e sintomáticos	113
Figura 26- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-MAD20 entre sintomáticos e assintomáticos. Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-bloco 2 entre sintomáticos e assintomáticos	116
Figura 27- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-RO33, MAD20 e K1 nos períodos T0, T30 e T60.....	119
Figura 28- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-MSP1 ₁₉ entre sintomáticos e assintomáticos e nos períodos T0, T30 e T60	120
Figura 29- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-MSP6 e MSP7 entre sintomáticos e assintomáticos e nos períodos T0, T30 e T60	121
Figura 30- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-MSP9 entre sintomáticos e assintomáticos e nos períodos T0, T30 e T60	122
Figura 31- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR entre sintomáticos e assintomáticos anti-alelos de MSP2	125
Figura 32- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR para os peptídeos MSP2 nos períodos T0, T30 e T60	126
Figura 33- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-MSP4 entre assintomáticos e sintomáticos e nos períodos T0, T30 e T60	127
Figura 34- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-MSP5 entre assintomáticos e sintomáticos e nos períodos T0, T30 e T60	128

Figura 35- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-MSP3_3D7 e MSP3_K1 entre assintomáticos e sintomáticos.....	130
Figura 36- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-MSP3 nos períodos T0, T30 e T60	131
Figura 37- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-MSP10 entre assintomáticos e sintomáticos	132
Figura 38- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-MSP10 nos períodos T0, T30 e T60.....	133
Figura 39- Gráfico de barras das médias dos valores das DOs (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP1-bloco 2_RO33.....	135
Figura 40- Gráfico de barras das médias dos valores das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP1 ₁₉	137
Figura 41- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP7	138
Figura 42- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP6	139
Figura 43- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP9	141
Figura 44- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP2-IC1_69	142
Figura 45- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP4	143
Figura 46- Gráfico de barras da distribuição das médias das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-MSP3.....	145
Figura 47- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP10_369.....	147
Figura 48- Domínios de ligação ao eritrócito de proteínas secretadas pelo merozoíto segundo a base de dados <i>PlasmoDB</i>	148
Figura 49- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-AMA1-A e AMA1-B entre sintomáticos e assintomáticos.....	154
Figura 50- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-AMA1-A e AMA1-B ao longo do tempo	155
Figura 51- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-MAEBL_XXX e MAEBL_3D7 entre sintomáticos e assintomáticos.....	156
Figura 52- Gráficos <i>Box plot</i> da distribuição dos valores dos IR anti-EBA140, EBA175 e EBA181 entre sintomáticos e assintomáticos.....	157

Figura 53- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR anti-EBA140, EBA175 e EBA181 nos períodos T0, T30 e T60..... 158

Figura 54- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-EBA175 nos plasmas assintomáticos do T0, do T30 e do T60. 160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Pares de oligonucleotídeos para diagnóstico de gênero e espécie.....	62
Tabela 2- Pares de oligonucleotídeos para amplificação de genes expressos no merozoíto...	64
Tabela 3- Pares de oligonucleotídeos para amplificação de genes <i>surf</i>	65
Tabela 4- Pares de oligonucleotídeos para genes <i>surf</i> para reações de RT–qPCR.....	66
Tabela 5- Análise descritiva das variáveis de exposição ao <i>P. falciparum</i> na amostra e entre assintomáticos e sintomáticos.....	78
Tabela 6- Padrões de amplificação por PCR e de marcação em <i>Southern Blot</i> /PFGE do gene <i>surf</i> PFA0625w em gDNAs de isolados de Rondônia.	84
Tabela 7- Frequência absoluta e em porcentagem do reconhecimento humoral de antígenos SURFIN por sintomáticos e assintomáticos	86
Tabela 8- Padrões de IR obtidos em teste de ELISA para peptídeos SURFIN expressos.....	88
Tabela 9- Análise dos valores de IR anti-SURFIN de sintomáticos e assintomáticos pelo teste de <i>Mann–Whitney (U)</i>	89
Tabela 10- Média das DO (DO*) de cada subclasse de IgG nos plasmas testados, para peptídeos SURFIN.....	93
Tabela 11- Média das DO (DO*) dos plasmas testados de cada subclasse de IgG contra o peptídeo S 4.2_XXX	94
Tabela 12- Diversidade de sequências das famílias alélicas K1 e MAD20 do bloco 2 de MSP1	101
Tabela 13- Padrões de IR obtidos em teste de ELISA para os peptídeos do complexo MSP1	114
Tabela 14- Análise da resposta imune contra o isolado infectante e a possibilidade de resposta cruzada anti-alelos e variantes do bloco 2 de MSP1	117
Tabela 15- Padrões de IR obtidos em teste de ELISA para MSP2, MSP4 e MSP5.....	124
Tabela 16- Padrões de IR obtidos em teste de ELISA para os peptídeos MSP3 3D7– <i>like</i> , MSP3 K1– <i>like</i> e para os peptídeos MSP10.....	129
Tabela 17- Média das DO (DO*) de cada subclasse de IgG em plasmas sintomáticos e assintomáticos anti-MSP1-bloco2_RO33.....	134
Tabela 18- Valores da DO de cada subclasse de IgG anti–RO33 nos plasmas assintomáticos 39 e 42 nos períodos T0, T30 e T60	136

Tabela 19- Médias dos valores das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-MSP1 ₁₉ em plasmas sintomáticos e assintomáticos dos períodos T0, T30 e T60.	137
Tabela 20- Médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP7 em plasmas sintomáticos e assintomáticos dos períodos T0, T30 e T60.	138
Tabela 21- Médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP6 nos plasmas do T30 e do T60.....	139
Tabela 22- Médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP9 em plasmas sintomático e assintomáticos dos períodos T0, T30 e T60.	140
Tabela 23- Médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP2-IC1 ₆₉ em plasmas assintomáticos dos períodos T0, T30 e T60	141
Tabela 24- Médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP4 em plasmas sintomáticos e assintomáticos dos períodos T0, T30 e T60.	143
Tabela 25- Médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP3 _{3D7-like} em plasmas sintomáticos e assintomáticos dos períodos T0, T30 e T60.	144
Tabela 26- Médias das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-MSP10 em plasmas sintomáticos e assintomáticos dos períodos T0, T30 e T60.	146
Tabela 27- Número absoluto e frequência em porcentagem de fragmentos amplificados dos genes de EBA140, EBA175 e EBA181 nos gDNAs da amostra.	150
Tabela 28- Padrões de IR obtidos em teste de ELISA para os peptídeos AMA1-A, AMA1-B, MAEBL_XXX, MAEBL_3D7, EBA140, EBA175 e EBA181	153
Tabela 29- Médias das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-AMA1-B.....	159
Tabela 30- Médias das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-EBA175.....	159
Tabela 31- Antígenos cujo reconhecimento está associado a um menor risco de sintomas..	161
Tabela 32- Coeficientes de correlação de <i>Pearson</i> entre as variáveis quantitativas do estudo	162
Tabela 33- Coeficientes de correlação parcial de <i>Pearson</i> ajustados.....	162
Tabela 34- Efeitos não-ajustados das variáveis categóricas predictoras do desenvolvimento do perfil assintomático obtidos por regressão logística.....	164
Tabela 35- Efeitos ajustados das variáveis categóricas predictoras do desenvolvimento do perfil assintomático obtidos por regressão logística.....	165
Tabela 36- Classificação dos antígenos analisados segundo a resposta humoral.....	165

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Diversidade das sequências de genes <i>surf</i> entre os gDNAs do estudo.	81
Quadro 2- Diversidade das sequências das famílias RO33, K1 e MAD20 do bloco 2 de MSP1 entre os gDNAs do estudo.	102
Quadro 3- Diversidade das sequências encontradas dos genes que codificam MSP2 a MSP10 entre os gDNAs do estudo.	110
Quadro 4- Diversidade das sequências encontradas dos genes que codificam AMA1, MAEBL e EBAs entre os gDNAs do estudo.	152

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Breve história da malária	25
1.2 A evolução dos parasitas e dos vetores	28
1.3 Ciclo de vida dos plasmódios humanos	31
1.4 Tentativas mundiais de controle da doença e distribuição geográfica atual	35
1.5 A malária no Brasil e no estado de Rondônia	39
1.6 A resposta imune contra malária e sua relação com a expressão clínica da doença ..	43
1.7 Quantificação das subclasses de IgG em crianças e adultos	49
1.8 Proteínas do merozoíto de <i>P. falciparum</i>	50
1.9 Genes <i>surf</i> e proteínas SURFIN	51
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	53
3 MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1 Localidades	57
3.2 Desenho do corte transversal	57
3.3 Coletas das amostras de sangue	58
3.4 Acompanhamento dos pacientes sem sintomas maláricos	59
3.5 Definição dos grupos clínicos	59
3.6 Amostra total do estudo	60
3.7 Microscopia de gota espessa	60
3.8 Fracionamento das amostras	60
3.9 Extração de gDNA pelo método fenol-clorofórmio	61
3.10 Identificação de <i>Plasmodium</i> e espécie	61
3.11 Congelamento de amostras com <i>glycerolyte</i>	62
3.12 Construção dos pares de oligonucleotídeos	63
3.13 Reações em cadeia da polimerase (PCR)	66
3.14 Purificação de fragmentos em gel de agarose pelo método <i>glassmilk</i>	66
3.15 Clonagem e purificação dos plasmídeos recombinantes	67
3.16 Seqüenciamento e identificação de genótipos diferentes circulantes	67
3.17 Expressão de peptídeos recombinantes fusionados a GST	68
3.18 Ensaios de ELISA (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)	69
3.19 Análises estatísticas dos dados obtidos	70
3.20 Imunizações de camundongos Balb/c com peptídeos recombinantes	73

3.21 Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i> (Pf)	73
3.22 Sincronização de parasitas com (D-) sorbitol	74
3.23 Enriquecimento de trofozoítos maduros e esquizontes	74
3.24 Coletas de RNA total da cultura da cepa 3D7 para PCR em tempo real	75
3.25 Reação de transcrição reversa (RT-PCR)	75
3.26 PCR em tempo real (RT-qPCR)	76
4 RESULTADOS	77
4.1 Análise comparativa das variáveis de exposição à <i>P. falciparum</i> entre sintomáticos e assintomáticos	78
4.2 Genes <i>surf</i> e proteínas SURFIN	80
4.2.1 <i>Diversidade das sequências dos genes surf nos isolados do estudo</i>	80
4.2.2 <i>Expressão de peptídeos SURFIN recombinantes e frequência do reconhecimento humoral dos peptídeos SURFIN expressos</i>	85
4.2.3 <i>Análise comparativa da intensidade da resposta humoral anti-SURFIN</i>	87
4.2.4 <i>Análise da longevidade da resposta imune humoral anti-SURFIN</i>	90
4.2.5 <i>Identificação das subclasses de anticorpos IgG anti-SURFIN</i>	92
4.2.6 <i>Análise da transcrição dos genes surf: exclusão alélica e switching transcricional?</i> ..	95
4.3 Genes que codificam a família das proteínas MSP (merozoite surface proteins)	98
4.3.1 <i>Diversidade das sequências gênicas da família MSP nos isolados do estudo</i>	99
4.3.1.1 <i>Genes que codificam as proteínas do complexo MSP1</i>	99
4.3.1.2 <i>Genes que codificam as proteínas MSP2, MSP4 e MSP5</i>	106
4.3.1.3 <i>Genes que codificam as proteínas MSP3 e MSP10</i>	108
4.3.2 <i>Expressão de peptídeos MSP recombinantes e frequência do reconhecimento humoral dos peptídeos MSP expressos</i>	111
4.3.3 <i>Análise comparativa entre a frequência, a intensidade e a longevidade da resposta humoral aos peptídeos MSP expressos</i>	113
4.3.3.1 <i>Resposta humoral aos peptídeos do complexo MSP1</i>	113
4.3.3.2 <i>Resposta humoral aos peptídeos MSP2, MSP4 e MSP5</i>	123
4.3.3.3 <i>Resposta humoral aos peptídeos MSP3 e MP10</i>	128
4.3.4 Isotipagem das subclasses de IgG envolvidas na resposta humoral aos peptídeos MSP	134
4.3.4.1 <i>Isotipagem de anticorpos IgG anti-complexo MSP1</i>	134
4.3.4.2 <i>Isotipagem de anticorpos IgG anti-MSP2-IC1_69 e MSP4</i>	141
4.3.4.3 <i>Isotipagem de anticorpos IgG anti-MSP3_3D7-like e MSP10</i>	144

4.4 Proteínas secretadas por organelas do merozoíto: MAEBL, EBAs e AMA1	147
<i>4.4.1 Diversidade das sequências gênicas de AMA1, MAEBL e EBAs nos isolados do estudo</i>	<i>148</i>
<i>4.4.2 Análise comparativa entre a frequência, a intensidade e a longevidade da resposta humoral aos peptídeos AMA1, MAEBL, EBA175, EBA140 e EBA181</i>	<i>153</i>
<i>4.4.3 Isotipagem das subclasses de IgG envolvidas na resposta humoral aos peptídeos AMA1 e EBA175</i>	<i>158</i>
4.5 Associação entre variáveis qualitativas e quantitativas e medidas de risco.....	160
4.6 Resumo dos resultados sobre a resposta humoral contra os antígenos de merozoíto e SURFIN	165
5 DISCUSSÃO	167
5.1 Dados epidemiológicos	168
5.2 Genes <i>surf</i> e proteínas SURFIN	171
5.3 O complexo MSP1: MSP1_bloco 2, MSP1₁₉, MSP6, MSP7 e MSP9.....	174
5.4 Proteínas MSP2, MSP4 e MSP5	184
5.5 Proteínas MSP3 e MP10.....	189
5.6 Proteínas secretadas pelo complexo apical: AMA1, EBAs e MAEBL	192
5.7 Considerações finais	198
6 CONCLUSÕES.....	199
REFERÊNCIAS	201
ANEXOS	221
ANEXO A – Mapa das localidades	222
ANEXO B - Ficha para atendimento clínico.....	223
ANEXO C - Ficha de acompanhamento	225
ANEXO D - Termo de consentimento para maiores de 18 anos.....	226
ANEXO E - Termo de consentimento para menores de 18 anos	228

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve história da malária

A doença malárica, provavelmente, acompanha o homem desde a revolução agrária neolítica que alcançou a África Central e o oeste africano há 5000 anos. A partir daquele momento, o homem abandonou os hábitos nômades e passou a viver em núcleos populacionais mais densos, próximos a regiões de floresta tropical, propiciando o desenvolvimento de hábitos antropofílicos nos vetores africanos. Posteriormente, a doença espalhou-se pelo Velho Mundo, Ásia e Novo Mundo, principalmente, através de movimentos migratórios colonizadores e atividades bélicas, que propiciaram a disseminação dos parasitas e dos seus vetores (1).

A estreita relação do homem com essa doença é retratada logo pelas primeiras formas de escrita que se tem notícia: os hieróglifos egípcios e a escrita cuneiforme suméria. O mais velho registro sobre malária encontra-se em uma tábua de escrita cuneiforme, de origem babilônica, que associa a doença ao deus Nergal, conhecido como o Deus do Inferno, na mitologia dos povos da Mesopotâmia. Ele é retratado como uma criatura alada, com cabeça de homem e corpo de touro (1).

Antigos manuscritos chineses, egípcios, romanos e hindus também fazem menção a uma doença caracterizada por febre intermitente e esplenomegalia, que pode ser reconhecida como a malária causada por *Plasmodium malariae*. A associação da doença com picadas de mosquitos já aparece em escritos hindus datados de 800 a.C. e dois dos mais antigos textos sobre a Medicina Ayurvédica discriminam a febre em cinco categorias, incluindo as febres terças e quartãs e associam a ocorrência das febres com picadas de insetos (1).

Acredita-se que o *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium malariae* eram endêmicos no Velho Mundo, Grécia, Índia e China em 500 a.C. e tenham chegado à Grécia entre o fim da última era glacial e 500 a.C.. Porém, evidências de febres causadas por *P. falciparum* aparecem restritas ao norte da Grécia, no século V a.C. (2).

Hipócrates, o Pai da Medicina, em 400 a.C., também descreveu as febres terças sugestivas de *P. vivax* e quartãs sugestivas de *P. malariae* e foi o primeiro a estabelecer associação entre a esplenomegalia decorrente da malária à ingestão de água estagnada. Hipócrates é reconhecido como o primeiro malariologista e sua teoria sobre a transmissão da doença perdurou até o século XIX, com exceção do período em que as idéias de Galeno prevaleceram.

Galeno foi o primeiro a associar o aparecimento das febres com a estação verão e com icterícia nas pessoas infectadas. Mas, a explicação dada por ele e mantida por 15 séculos, para a ocorrência de tais febres, era um desequilíbrio nos 4 humores corporais, cujo equilíbrio seria restaurado através de sangrias e purgações, esta última relacionada à provocação de vômitos e diarreias.

A malária impediu a invasão de Roma por povos bárbaros diversas vezes, porém, acredita-se que tenha sido determinante para a queda do Império Romano. A presença da doença naquela região, na metade do século V A.D., foi evidenciada através dos achados arqueológicos do pesquisador David Soren. Fósseis de 47 crianças, a mais velha com 3 anos de idade, foram encontrados na localidade de Lugnano, situada ao norte de Roma. Evidências apontam que as crianças morreram decorrentes de uma epidemia e o grande número de recém-nascidos e prematuros sugere o acometimento das mesmas na gestação. Anos mais tarde, Robert Sallares identificou em um dos fósseis coletados desse sítio arqueológico, a presença de DNA de *Plasmodium falciparum* (2).

O médico italiano Giovanni Maria Lancisi, em 1716, foi o primeiro a descrever a presença de pigmentação escurecida no cérebro e no baço de vítimas das febres episódicas letais. Porém, ele associou a doença com vapores venenosos de regiões pantanosas (teoria do “mau ar”, ou *male aria*, em italiano) ou com água estagnada. Posteriormente, a partir dele, ressurgiram as velhas teorias de Varro e Celsus sobre a existência de diminutivos vermes, invisíveis aos olhos, que infectavam o sangue das pessoas, causando as tais febres. Ele chegou a postular um possível mecanismo de inoculação desses seres, a partir das aberturas cutâneas ocasionadas pelas picadas de mosquitos existentes nos pântanos. Porém, ele abandonou essa teoria por falta de provas (1).

Posteriormente, a teoria do “mau ar” começou a perder a força. No século XIX, sob influência da teoria dos germes, o *Bacillus malariae* foi identificado a partir do solo romano, sendo a doença atribuída a ele.

Finalmente, em 6 de novembro de 1880, o médico francês Charles Louis Alphonse Laveran identificou no sangue fresco de um soldado doente, a presença de grânulos pigmentados e formas em crescente que se movimentavam freneticamente, batizando-os de *Oscillaria malariae*. Em 1884, Marchiafava e Celli, dois patologistas italianos, identificaram uma forma amebóide em anel nas hemácias de pacientes com a doença, conferindo-lhe o nome de *Plasmodium*. Os mesmos patologistas identificaram, em 1889, parasitas distintos causadores das febres terças, sendo os primeiros a identificar o *P. falciparum* por microscopia. Camilo Golgi, renomado neurofisiologista e ganhador do Prêmio Nobel de

Medicina em 1906 por seus estudos sobre a estrutura do sistema nervoso, foi o primeiro a identificar, em 1885, diferentes tipos de parasitas responsáveis pelas formas terçã e quartã da doença e também associou a ocorrência das febres com a ruptura dos merozoítos no interior das hemácias. Golgi foi o primeiro a sugerir a possibilidade de formas exoeritrocíticas do parasita no curso da doença.

Ronald Ross, orientado por Sir Patrick Manson, identificou a presença de oocistos no intestino de mosquitos em 1897. Apesar de Manson ter descoberto que a filariose era transmitida pela picada de mosquitos, ambos atribuíam à ingestão de água contaminada com ovos de mosquitos, a responsabilidade pela transmissão da doença malárica (teoria hipocrática). Um ano mais tarde, Ross descobriu formas dos parasitas nas glândulas salivares dos mosquitos que transmitiam a doença a pássaros, estabelecendo a teoria da transmissão da doença através de picadas de mosquitos infectados. No mesmo ano, um grupo de pesquisadores italianos liderado por Batista Grassi descobriu que o mosquito anofelino era o causador da malária humana. Porém, apenas em 1900, Manson demonstrou definitivamente que a doença é transmitida ao homem por picadas de mosquitos anofelinos infectados. Ronald Ross e Laveran foram agraciados com o Prêmio Nobel de Medicina em 1902 e 1907, respectivamente.

Na década de 40 do século passado, a equipe liderada pelos pesquisadores Shortt e Garnham identificou as formas teciduais hepáticas do *P. vivax*. As formas teciduais de *P. falciparum* foram identificadas em 1949 (3), assim como, as formas teciduais de *P. ovale*, em 1954 (4) e de *P. malariae*, em 1959 (5).

A primeira forma de tratamento curativo para as febres intermitentes na Europa, apenas foi possível no século XVI. Antes desse período, o que prevaleceu foi o tratamento recomendado por Galeno, associado a uma intensa mortalidade. A partir da colonização das Américas, a malária chegou ao Novo Mundo. Porém, os nativos da região do Peru desenvolveram um tratamento a partir da ingestão da infusão da casca da cinchona ou quina, para curar as febres intermitentes. Os padres jesuítas foram os primeiros a experimentar o tratamento e levaram-no para a Europa em 1632. A casca da quina ficou conhecida como a casca dos jesuítas e o princípio ativo quinino foi isolado, na França, em 1820.

Grandes avanços ocorreram no combate à malária durante a Segunda Guerra Mundial. As drogas cloroquina, primaquina, amodiaquina, proguanil e pirimetamina foram sintetizadas e o inseticida residual DDT (*difenildiclorotrietano*) passou a ser utilizado no combate vetorial. Durante a guerra do Vietnã, cientistas chineses iniciaram um projeto para isolar o princípio

ativo da artemisina, baseado nas propriedades antimaláricas da *Artemisia annua*, utilizada na China no combate a febres desde 340 A.D.. Os cientistas chineses obtiveram êxito em 1971.

O desenvolvimento de um método de cultivo de *P. falciparum in vitro* por Trager e Jansen (6) em 1975, o seqüenciamento dos genomas do *P. falciparum* (7) e *Anopheles gambiae* (8) em 2002 e do *P. vivax* (9) e *P. knowlesi* (10) em 2008 são marcos de extrema relevância para o entendimento biológico do parasita.

No final da década de 60 do século passado, as pesquisas para o desenvolvimento de uma vacina antimalária começaram a surgir, primeiramente em modelos experimentais, utilizando esporozoítos de *P. berghei* irradiados com raios X (11). Atualmente, várias formulações vacinais baseadas em antígenos sintéticos de *P. falciparum* estão sendo testadas na África (12, 13), sendo essa estratégia uma grande esperança para a eliminação da doença ou para a redução da mortalidade.

1.2 A evolução dos parasitas e dos vetores

Acredita-se que um ancestral comum dos parasitas da malária tenha surgido há 500 milhões de anos (14). Evidências sugerem que esse pré-parasita era um protozoário de vida livre, apresentava um cloroplasto e adaptou-se a viver no interior de invertebrados aquáticos. Primeiramente, ele reproduzia-se sexualmente apenas e posteriormente, adquiriu uma forma de reprodução assexuada chamada de esquizogonia, potencializando seu poder proliferativo. Entre os invertebrados aquáticos para os quais os pré-parasitas adaptaram-se, possivelmente encontram-se as larvas aquáticas dos ancestrais da ordem *Diptera*, originários dos mosquitos e que surgiram primeiramente entre 150 a 200 milhões de anos. Posteriormente, algumas linhagens de parasitas evoluíram e adaptaram-se a dois hospedeiros, invertebrado e vertebrado, sendo este último representado pelas aves, répteis e mamíferos (14).

O *P. falciparum* é intimamente relacionado com o *P. reichenowi* e os dois são mais relacionados com os plasmódios que infectam aves do que os que infectam mamíferos. Acredita-se que o ancestral comum surgiu há 130 milhões de anos e a origem das duas linhagens ocorreu entre 4 a 10 milhões de anos, simultaneamente, com a divergência da linhagem humana a partir dos grandes macacos africanos, ou seja, chimpanzés, orangotangos, gorilas e bonobos. Evidências recentes apontam que o *P. falciparum* originou-se dos parasitas que infectam gorilas, na África Central, a partir de uma única transferência mediada pelo

vetor (15, 16). As cepas letais de *P. falciparum*, possivelmente originaram-se entre 5.000 a 10.000 anos, juntamente com a co-especiação do *An. gambiae* e dos hominídeos.

Os *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* divergiram há 100 milhões de anos, acompanhando a linhagem de parasitas que infectam mamíferos. O *P. ovale* infecta apenas o homem, porém, o *P. malariae* pode infectar tanto humanos quanto chimpanzés, pois possui um ancestral comum para os dois hospedeiros. O *P. vivax* e o *P. cynomolgi* pertencem a um grupo de parasitas que infectam macacos e divergiram entre 2 a 3 milhões de anos (14).

Na classificação atualizada em clados, segundo a *International Society of Protistologists Classification* (ISPC), esses organismos pertencem, em ordem crescente de especiação, aos clados: *Eukarya*, *Chromoalveolata*, *Alveolata*, *Myzozoa*, *Apicomplexa*, *Aconoidasida*, *Haemosporidiasina*, *Chromotorida*, *Laveraniina*, *Plasmodiidae* e *Plasmodium*. Este último possui 15 subgêneros. O subgênero *Laverania* alberga 5 espécies, entre elas o *Plasmodium (Laverania) falciparum* e o *P. (L.) reichenowi*, enquanto o subgênero *Plasmodium* agrupa o *Plasmodium (Plasmodium) vivax*, *P. (P.) ovale*, *P. (P.) malariae* e *P. (P.) knowlesi*, entre outros. A seguir, algumas características dos plasmódios que infectam o homem:

Plasmodium falciparum: descrito por Welch em 1897, é responsável pela febre terçã maligna ou semiterçã, caracterizada pelos acessos febris em intervalos de 36 a 48 horas. Essa espécie é a responsável pelos casos fatais da doença, devido ao fenômeno de citoaderência dos eritrócitos infectados pelas formas maduras do parasita a outros eritrócitos e às células endoteliais da microcirculação de cérebro, pulmão, rins, baço e placenta. 85% dos casos de malária na África são decorrentes de infecções por essa espécie, assim como, a maioria das mortes entre crianças menores de 5 anos de idade .

Plasmodium vivax: descrito por Grassi e Feletti em 1890, é o agente causador da febre terçã benigna, com acessos febris em intervalos de 48 horas. Atualmente, o cenário de benignidade das infecções por *P. vivax* tem apresentado mudanças. Algumas evidências sugerem a possibilidade de citoaderência dos eritrócitos infectados pelas formas maduras do parasita às células endoteliais (17) e casos letais têm sido registrados no Amazonas (18-20). Essa espécie apresenta formas teciduais latentes, conhecidas como hipnozoítos, que permanecem alojadas nos hepatócitos, podendo reiniciar o ciclo eritrocítico meses após a primeira infecção. Essa espécie é a mais globalmente disseminada, sendo responsável por 80% dos casos na Américas do Sul e Central e por 60% dos casos nas regiões sul e sudeste do continente asiático.

Plasmodium ovale: descrito por Stephens em 1922, é responsável por outra forma de febre terçã benigna, com acessos febris em intervalos de 48 horas. Atualmente, encontra-se restrito a África tropical, Nova Guiné e Filipinas. Também possui formas hepáticas latentes.

Plasmodium malariae: descrito por Laveran em 1881, é responsável pela febre quartã, com acessos febris em intervalos de 72 horas. Essa espécie perdeu a sua importância ao longo do tempo, restringindo-se a surtos epidêmicos na África, algumas partes da Índia, oeste do Pacífico e na América do Sul. As formas sangüíneas podem persistir por décadas em infecções assintomáticas (21).

Plasmodium knowlesi: descrito por Sinton e Mulligan em 1932. Originalmente este parasita foi associado à malária em orangotangos, porém casos de infecções no homem parecem restritos a regiões asiáticas (22-25).

Os agentes transmissores da malária são os mosquitos da ordem *Diptera*, da família *Culicidae* e do gênero *Anopheles*. O gênero *Anopheles* compreende cerca de 380 espécies, porém, apenas 60 podem transmitir a doença em condições naturais (26).

No Brasil, o principal vetor é o *An. darlingii*, presente em 80% do território brasileiro (27). Os criadouros preferenciais são coleções de água limpa, quente, sombreadas e de baixo fluxo. Raramente é encontrado no ambiente florestal da Amazônia, portanto sua proliferação e disseminação é fruto dos processos de colonização humana do território nacional. As outras principais espécies incluem o *An. aquasalis*, que ocupa a faixa litorânea do norte do Amapá até o norte de São Paulo e tem como criadouro preferencial águas salobras, o *An. albitarsis*, que compreende um complexo de subespécies que ocupa tanto o litoral quanto o interior e o *An. cruzii* e o *An. bellator*, que distribuem-se do litoral sul de São Paulo até o norte do Rio Grande do Sul e têm como criadouros preferenciais a água que se acumula na base das folhas das bromélias (26, 28, 29). Evidências sugerem que o *A. darlingii* está mais presente em áreas onde a ação humana provocou grandes impactos no meio ambiente, sendo mais encontrado em fronteiras de regiões desflorestadas com regiões de floresta intacta e próximo a regiões de ocupação humana (30).

Os principais vetores africanos *An. gambiae*, *An. arabiensis* e *An. funestus* fazem parte do complexo *An. gambiae*. O *An. gambiae* distingue-se das demais espécies de anofelinos por sua intensa antropofilia, adaptabilidade aos meios urbanos e semi-urbanos e longevidade, fatos esses que o tornam o mais eficiente vetor da malária humana (31).

1.3 Ciclo de vida dos plasmódios humanos

O ciclo biológico divide-se entre o hospedeiro invertebrado e vertebrado, distinguindo-se, entre outros aspectos, pelas formas de reprodução sexuada e assexuada, respectivamente. As duas fases são semelhantes entre as espécies que parasitam o hospedeiro humano e um modelo esquemático é mostrado na Figura 1.

Ciclo no hospedeiro vertebrado ou intermediário

Durante o repasto sangüíneo, a fêmea anofelina infectada injeta formas esporozoíticas do parasita presentes nas suas glândulas salivares, juntamente com a saliva, que contém substâncias anestésicas e vasodilatadoras, sob a pele do indivíduo. Os esporozoítos lançados na derme deslizam pelo tecido, através de um movimento ativo conhecido como *gliding* (11), impulsionado por um motor submembranoso de actina–miosina, alcançando rapidamente, os capilares sanguíneos e linfáticos, sendo direcionados tanto para o fígado como para os linfonodos drenantes (32).

Após poucos minutos, os esporozoítos que atingiram a corrente sangüínea, alcançam o fígado iniciando a fase hepática ou exoeritrocítica da doença. Após atravessarem os macrófagos residentes do órgão hepático, as células de *Kupffer*, os esporozoítos chegam aos hepatócitos. Através do movimento de *gliding*, eles deslizam sobre as células e atravessam várias, até alojarem-se em alguma (33). Os hepatócitos que sofreram invasão passam a secretar um fator de crescimento do hepatócito, HGF (*hepatoocyte growth factor*), que se liga ao receptor transmembrana tirosino-quinase Met, presente na superfície do hepatócito infectado. Esse mecanismo é responsável pela sobrevivência do hepatócito infectado, evitando a apoptose celular, através da inibição da via apoptótica dependente de TNF (34). O reconhecimento dos hepatócitos pelos esporozoítos é mediado por interações entre a proteína CS (*circumsporozoite protein*) e o receptor heparansulfato (35). A proteína CS é o componente mais abundante da superfície do esporozoíto e apresenta dois estágios conformacionais importantes para a migração e para a adesão do esporozoíto ao hepatócito, no momento da invasão (36). A proteína TRAP (*trombospondine related associated protein*) é essencial para o movimento de *gliding* (11) e as proteínas AMA1 (*apical membrane antigen 1*) e MAEBL (*merozoite adhesive erythrocytic binding protein*), também expressas pelo esporozoíto, também participam nos processos de invasão (37). As duas últimas serão abordadas neste estudo.

Uma vez dentro do hepatócito, os esporozoítos transformam-se em células arredondadas chamadas criptozoítas, no interior de vacúolos. Os criptozoítas passam por uma

divisão assexuada chamada esquizogonia tecidual, originando esquizontes hepáticos ou esquizontes teciduais primários, repletos de merozoítos. A esquizogonia hepática dura seis dias para o *P. falciparum*, oito dias para *P. vivax*, nove dias para *P. ovale* e de 12 a 16 dias para *P. malariae*. Posteriormente, o hepatócito rompe-se, liberando os merozoítos diretamente nos capilares sangüíneos do fígado. O *P. falciparum* libera 40.000 merozoítos dos esquizontes teciduais, enquanto o *P. vivax* libera mais de 10.000, o *P. ovale* 15.000 e o *P. malariae* 2.000.

Em 2006, foi demonstrado no modelo murino com *P. berghei*, que os esporozoítos desse parasita podem invadir os capilares linfáticos e ser transportados até os gânglios linfáticos, iniciando o desenvolvimento das formas hepáticas naquele local, nas primeiras 24 horas (32). Recentemente, o desenvolvimento de formas hepáticas na derme dos animais foi observado (38). Nesse mesmo modelo, também foi demonstrado que a liberação dos merozoítos das células hepáticas ocorre por meio da formação de vesículas oriundas da membrana do hepatócito, chamadas de merossomos, repletas de merozoítos. Esses são liberados diretamente nos sinusóides hepáticos, driblando a possibilidade de reconhecimento pelas células de *Kupffer* (32). Outro mecanismo de escape do reconhecimento do hospedeiro é a inibição da exposição de fosfatidilserina na superfície dos hepatócitos infectados, impedindo a fagocitose dessas células por macrófagos (32).

P. vivax e *P. ovale* apresentam formas hepáticas latentes chamadas de hipnozoítos, que permanecem dormentes nas células do fígado e podem voltar ao desenvolvimento normal e originar formas eritrocíticas, até meses após o primeiro contato. Recentemente, foi demonstrado em um modelo murino de malária por *P. berghei*, a íntima relação das formas eritrocíticas com a maturação das formas hepáticas. As primeiras inibem o desenvolvimento das formas hepáticas, prevenindo a possibilidade de superinfecção, a qual poderia ser extremamente lesiva para o hospedeiro (33).

Os merozoítos liberados na circulação invadem os eritrócitos, iniciando o ciclo eritrocítico da doença, responsável pelas manifestações clínicas da malária. Através de um movimento coordenado que compreende: adesão à membrana eritrocitária, reorientação do pólo apical perpendicularmente à membrana eritrocitária e formação de uma zona de contato entre a superfície do pólo apical e a superfície do eritrócito (*tight junction*), ocorre a invasão, com invaginação da membrana eritrocítica e formação da membrana do vacúolo parasitóforo. Durante o processo de invasão, proteínas presentes na superfície do merozoíto e outras secretadas pelas organelas presentes no pólo apical, róptrias e micronemas, atuam ativamente (39). Várias dessas proteínas serão abordadas neste estudo, sendo a essência do mesmo. Os merozoítos passam a habitar o vacúolo parasitóforo, no interior do eritrócito e sofrem uma

série de transformações morfológicas, originando os estágios de anel ou trofozoíto jovem, trofozoíto maduro e esquizonte. Na forma esquizonte, ocorre mais um evento de esquizogonia, dando origem a um determinado número de merozoítos por cada esquizonte, característico de cada espécie de plasmódio. Nas infecções causadas por *P. falciparum*, é rara a observação de formas maduras (trofozoíto e esquizonte) no sangue periférico. Esse fato é explicado pelo fenômeno de citoaderência dos eritrócitos infectados às células endoteliais venulares, fato responsável pela gravidade dos casos desse tipo de malária. Os eritrócitos infectados por essas formas maduras são menos deformáveis, o que contribui, também, para a citoaderência dos mesmos (40).

Com a ruptura do vacúolo parasitóforo e do eritrócito, os merozoítos são liberados na corrente sangüínea e invadem novos eritrócitos, dando continuidade ao ciclo eritrocítico. A ruptura dos eritrócitos infectados é responsável pela febre, que é contínua nos primeiros dias, porém torna-se cíclica com a perpetuação da doença, a partir do momento, que os parasitas entram em sincronia de desenvolvimento (41). A liberação dos merozoítos na corrente sangüínea passa a ocorrer ao mesmo tempo, culminando com os acessos de febre, tremores e calafrios, típicos da doença.

Evidências apontam que merozoítos de *P. falciparum* presentes no esquizonte tardio, iniciam a diferenciação para a forma sexuada em conjunto e logo no primeiro ciclo de replicação assexuada, sem a necessidade de invasão eritrocitária para uma posterior diferenciação. Porém, as formas gametocidas imaturas ficam seqüestradas no endotélio da microcirculação, atingindo a periferia após 15 dias em média. O gametócito maduro possui longevidade de 3,4 a 6,4 dias. Porém, a longevidade pode ser estimada pelo tempo máximo de seqüestro e pelo tempo máximo de circulação, podendo ser encontradas formas circulantes até 1 mês após o tratamento medicamentoso, na ausência de drogas gametocidas, em infecções naturais (42).

Ciclo no hospedeiro invertebrado ou definitivo

Enquanto os anofelinos machos se alimentam de néctar e seiva vegetal, as fêmeas necessitam de sangue em sua alimentação para o amadurecimento de seus ovos e para possibilitar a ovoposição.

Dessa maneira, após a fêmea do mosquito *Anopheles* ingerir sangue de uma pessoa infectada, contendo as formas sexuadas do parasita (gametócitos feminino e masculino), inicia-se a fase sexuada dentro de seu trato digestivo. Dois eventos são importantes para iniciar a gametogênese, *in vitro*: a diminuição da temperatura em 5°C e a alteração do pH do meio, de 7.2 para 8.0-8.2. *In vivo*, esse processo é induzido também pela diminuição da

temperatura e pela presença do ácido xanturênico, um produto do metabolismo do triptofano (43). Os gametas femininos (macrogametócitos) e masculinos (microgametócitos) diferenciam-se em macrogameta e 8 microgametas, respectivamente. Os microgametócitos sofrem um processo de exflagelação, originando os microgametas que são móveis. Após a fecundação do macrogameta pelo microgameta ocorre à formação do zigoto, que em 18 a 24 horas, torna-se alongado e móvel, passando a ser chamado de oocineto. O zigoto é a única fase diplóide no ciclo de vida do parasita. Posteriormente, o oocineto migra pela camada única de células da parede do estômago do mosquito, alojando-se entre essas células e a membrana basal do epitélio. O oocineto transforma-se em oocisto ao desenvolver uma espessa cápsula, a qual permite a passagem de nutrientes para o desenvolvimento dos esporozoítos (esporogonia). O oocisto aumenta progressivamente de tamanho e rompe-se, liberando os esporozoítos, que através da hemolinfa, migram para as glândulas salivares, invadindo-as ativamente. No momento da picada, os esporozoítos podem ser inoculados no hospedeiro vertebrado, perpetuando o ciclo.

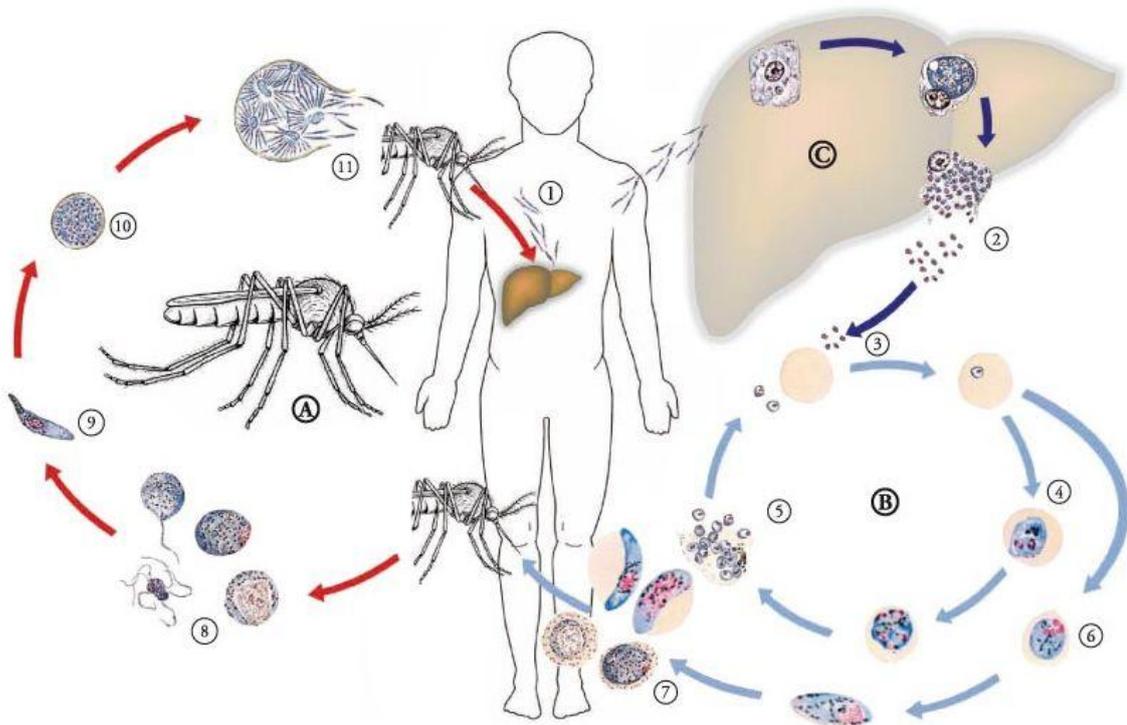


Figura 1- Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. Durante o repasto, a fêmea infectada do mosquito *Anopheles* inocula esporozoítos, presentes nas glândulas salivares, no hospedeiro humano (1). Os esporozoítos chegam ao fígado iniciando o ciclo exoeritrocítico (C). Ao invadirem os hepatócitos, os esporozoítos transformam-se em criptozoítas, que após sofrerem esquizogonia, transformam-se em esquizontes hepáticos, repletos de merozoítos. Os esquizontes hepáticos rompem-se liberando os merozoítos/merossomos na corrente sanguínea (2) que invadem os eritrócitos (3), iniciando a fase eritrocítica do ciclo (B). Após a invasão, os merozoítos desenvolvem-se nos estágios anel, trofozoítos maduros e esquizontes (4), culminando com a ruptura da hemácia e liberação de novos merozoítos (5), perpetuando o ciclo eritrocítico. Alguns merozoítos diferenciam-se em gametócitos (6) masculino e feminino (7). O ciclo no mosquito (A) inicia-se quando a fêmea, durante novo repasto, ingere os gametócitos masculino e feminino, que se diferenciam, no estômago do inseto, em microgameta e macrogameta, respectivamente (8). O macrogameta é fecundado pelo microgameta, gerando o zigoto ou oocineto, que migra para a membrana basal do epitélio estomacal do inseto. O oocineto transforma-se em oocisto (9), que sofre uma multiplicação esporogônica, gerando milhares de esporozoítos, que após a ruptura do oocisto atingirão às glândulas salivares do inseto (11), sendo liberados das mesmas, no próximo repasto.

1.4 Tentativas mundiais de controle da doença e distribuição geográfica atual

No início do século passado, a malária estava presente na maior parte do globo. Esperanças na erradicação da doença, através da eliminação do vetor anofelino, impulsionaram várias campanhas mundiais para combatê-lo. O uso de larvicidas (derivados do petróleo e verde-paris), a telagem das casas, a drenagem e aterros de coleções hídricas e o tratamento em larga escala com o quinino, fizeram com que esta doença fosse eliminada na maior parte dessas regiões (44). Porém, a falta de ações de manutenção do controle vetorial, as guerras e os movimentos migratórios humanos propiciaram o retorno dos casos.

Posteriormente, as ações para eliminar o inseto vetor ganharam um reforço com a utilização do inseticida residual DDT. Ele foi sintetizado em 1874, porém as propriedades inseticidas foram desvendadas em 1939, por Paul Müller. Ele foi utilizado, primeiramente, no combate ao vetor causador do tifo (*Pediculus humanus corporis*), durante a Segunda Guerra Mundial e ao final daquele período, passou a ser utilizado no combate ao vetor anofelino. Paul Müller recebeu o Prêmio Nobel de Medicina, em 1948, pela descoberta das propriedades do DDT (1).

A síntese de novas drogas efetivas e menos tóxicas no combate à doença, durante a Segunda Guerra Mundial, e o uso do DDT alimentaram grandes esperanças para a eliminação da malária no mundo. A malária foi eliminada dos Estados Unidos entre 1947 a 1951, basicamente através da aplicação intradomiciliar de DDT em 13 estados do sudeste americano, permitindo a eliminação do vetor anofelino.

A grande campanha de erradicação da malária, em escala mundial, coordenada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) ocorreu no período de 1957-1978. Os esforços para a erradicação concentraram-se na aplicação intradomiciliar de DDT, no tratamento dos enfermos e em ações de vigilância, devendo ocorrer em 4 etapas sucessivas: preparação, ataque, consolidação e manutenção. Na maior parte da Europa essa campanha, juntamente com novas práticas de agricultura e construção de casas, resultou na erradicação da malária. Na Índia, onde o programa de erradicação foi considerado um exemplo, houve uma redução de 75 milhões de casos em 1958, para 50 mil em 1964 (1). Porém, a maioria das nações da África sub-Sahariana foram excluídas dessas ações.

Segundo a OMS, após essa campanha de erradicação, a população mundial em risco havia sido reduzida de 70% para 41%. Entretanto, o alto custo para a manutenção do programa impediu a sua continuidade e o mesmo foi abandonado.

Desde então, começaram a ocorrer mais de 300 milhões de casos anuais da doença e mais de 1 milhão de mortes atribuídas diretamente à malária. Os principais fatores apontados como responsáveis pelo retorno dos casos de malária, em áreas onde a doença já havia sido eliminada, foram: resistência do *Plasmodium falciparum* às drogas usadas (45, 46), resistência dos anofelinos aos inseticidas (47, 48), proibição do uso do DDT pela OMS por questões tóxicas, guerras e movimentos massivos de populações, mudanças climáticas, mudanças ambientais pela interferência do homem como a construção de barragens, garimpos e desmatamentos (49), grande trânsito de pessoas de áreas com malária para áreas sem malária (50), crescimento populacional nas áreas onde a malária é endêmica e perda do interesse no desenvolvimento de novos instrumentos de controle da doença (51).

Em 1992, foi convocada a Conferência Ministerial de Malária, em Amsterdã, Holanda. Nesse encontro foi feita a “Declaração Mundial para o Controle da Malária” e apresentada uma nova estratégia global de controle da doença. A partir desse momento, não se ousou mais falar em erradicação da malária, mas em controle dos casos e diminuição dos óbitos. O objeto de interesse deixou de ser o mosquito e passou a ser os doentes. As ações foram baseadas na detecção rápida de casos, no tratamento precoce dos casos suspeitos ou confirmados de malária, no planejamento de ações preventivas, na detecção rápida de epidemias, no fortalecimento local da pesquisa básica e na adequação do controle para as necessidades de cada localidade (52).

Em 1998, um consórcio entre a OMS, o Banco Mundial, a UNICEF e o UNDP criou o programa denominado *Roll Back Malaria*, com objetivos de diminuir à metade as mortes por malária até 2010 e novamente, à metade em 2015.

Entre o período de 1945 a 2010, 79 países conseguiram eliminar a malária, porém, ela continua endêmica em 99 países distribuídos entre a faixa intertropical do planeta (53).

Dados de 2009 mostram que 2,85 bilhões de pessoas vivem em áreas com algum risco de transmissão de *P. vivax*, sendo que 57,1% dos indivíduos vivem em áreas de transmissão instável (54) (Figura 2). 91% dos casos concentram-se na Ásia central e no sudeste asiático, enquanto América e África são responsáveis por 5,5% e 3,5%, respectivamente. Dados de 2007 estimam que 2,37 bilhões de pessoas vivem em áreas com algum risco de transmissão de *P. falciparum* (55) (Figura 3). Quase um bilhão de pessoas vive em áreas de transmissão instável ou extremamente baixa, porém o continente Africano continua sendo o local mais acometido, com mais de 50% dos casos acontecendo na mesma faixa de latitude de ocorrência do vetor *An. gambiae*. É importante salientar que mesmo na África a situação é bastante heterogênea e existem regiões onde existe baixa prevalência do parasita. Regiões não-africanas foram consideradas hipoendêmicas para malária falciparum (55).

A OMS tem preconizado o tratamento combinado com artemisina para o tratamento dos casos de malária falciparum, a fim de evitar o surgimento de resistência a essa droga, quando utilizada como monoterapia (segundo as recomendações da segunda edição do manual de tratamento de malária, disponível no endereço eletrônico: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf.)

O efeito rápido dessa droga, no alívio dos sintomas e na melhoria do quadro clínico dos pacientes infectados, estimula a interrupção abrupta da mesma antes do término do tratamento, podendo selecionar cepas resistentes a ela. Nos últimos tempos, o tratamento supervisionado e a administração concomitante de outras drogas plasmodicidas têm sido

estratégias preconizadas pela OMS para driblar esse grave problema. Porém, cepas de *P. falciparum* apresentando falha terapêutica à artemisina foram identificadas no oeste do Camboja e no leste da Tailândia (56), provocando discussões sobre a forma mais adequada de tratamento da doença. A OMS sempre preconizou o tratamento baseado na detecção individual de casos sintomáticos da doença. Porém, frente a uma ameaça à estratégia de controle e eliminação da malária, entendida como a redução da incidência de casos de uma região para zero, começou-se a discutir no Programa Global de Malária de 2010, a estratégia de tratamento em massa da população, a despeito de ter ou não sintomas da doença ou de ter diagnóstico confirmado morfológico ou por PCR do parasita. Essa abordagem visa tratar o grande número de portadores assintomáticos de malária, os quais podem contribuir para a seleção de cepas resistentes a artemisina (<http://www.who.int/malaria/en/>).

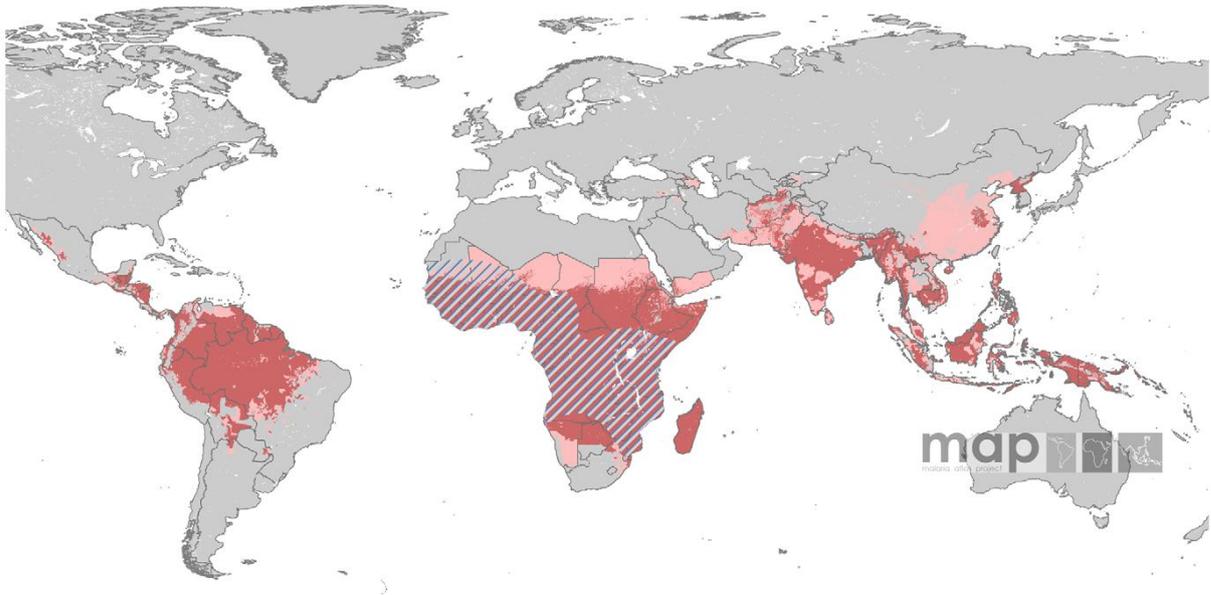


Figura 2- Mapa mundial do risco de transmissão de malária por *P. vivax* definido pela incidência anual do parasita em 2009 (54). As áreas em vermelho escuro representam áreas de transmissão estável ($IPA \geq 0,1/1000$ habitantes), as áreas em rosa, áreas de transmissão instável ($IPA < 0,1/1000$ habitantes) e as áreas em cinza, áreas livres de transmissão. A área rachurada representa regiões com fenótipo *Duffy* negativo.

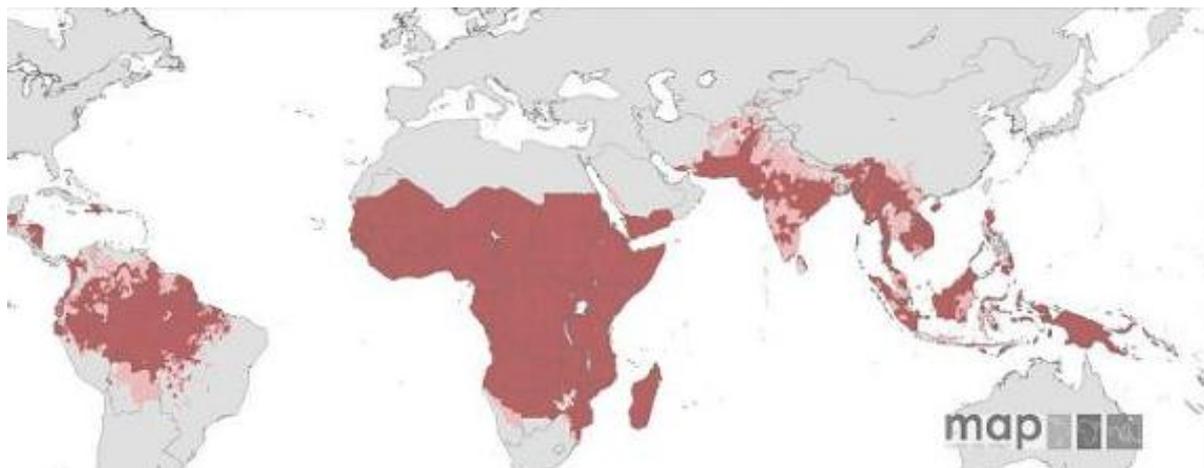


Figura 3- Mapa mundial do risco de transmissão de malária por *P. falciparum* definido pela incidência anual do parasita em 2007 (55), obedecendo aos mesmos parâmetros de cor do mapa acima.

As vacinas são apontadas como possíveis instrumentos no controle da doença. Atualmente, as pesquisas estão voltadas tanto para a descoberta de possíveis antígenos vacinais, como para a descoberta de adjuvantes e de estratégias de vacinação, buscando a potencialização e o direcionamento da resposta imune. As formulações vacinais em teste, atualmente, englobam antígenos expressos em 3 momentos distintos do ciclo e visam efeitos protetores diferentes. As vacinas elaboradas com antígenos da fase exoeritrocítica visam garantir proteção global contra a doença, pois protegem contra a infecção, o desenvolvimento dos sintomas e inibem a possibilidade de transmissão. As vacinas com antígenos expressos na fase eritrocítica visam eliminar ou atenuar os sintomas, talvez diminuindo as formas graves da doença e as vacinas elaboradas com antígenos expressos pelas formas sexuadas do parasita visam bloquear a transmissão das mesmas para o vetor, inibindo a transmissão (57).

1.5 A malária no Brasil e no estado de Rondônia

A ausência de referências a malária nos livros médicos dos Astecas e dos Maias sinaliza para a introdução dos parasitas no continente americano, a partir do século XV, com a chegada dos colonizadores europeus e dos escravos africanos. Escritos médicos brasileiros fazem inferências a ela, a partir do século XVI e ao final do século XIX, a malária estava presente em todo o território nacional, principalmente na faixa litorânea, poupando apenas alguns segmentos dos estados sulinos (58).

Em meados do século XIX, a borracha tornou-se matéria-prima de extremo valor e um grande interesse surgiu pelo látex brasileiro. Concomitantemente, uma legião de nordestinos,

castigados pela fome e por um longo período de seca intensa foi incentivada pelo governo brasileiro a dirigir-se à região Amazônica, a fim de trabalhar no extrativismo do látex. Esse foi o cenário da primeira grande epidemia de malária na Amazônia brasileira (58). Ao final do mesmo século, a assinatura do Tratado de Petrópolis pôs fim a uma grande desavença entre o Brasil e a Bolívia e a região correspondente ao estado do Acre foi transferida para o Brasil, mediante uma quantia em dinheiro e o compromisso da construção de uma ferrovia ligando Guajará-Mirim, na fronteira Brasil-Bolívia, às margens do Rio Mamoré, a Porto Velho, às margens do Rio Madeira. Em 1872, começava a construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré, chamada por alguns de “Ferrovia do Diabo”. Milhares de pessoas morreram durante a sua construção até a inauguração em 1912, a maioria vítima da malária (58).

Ao final da construção da ferrovia, a seringueira havia sido levada para a Malásia pelos ingleses, provocando queda no valor comercial da borracha e provocando a decadência da ferrovia.

Nos anos 30 do século XX, uma grande epidemia de malária atingiu a região nordeste do Brasil, provocada pela introdução e proliferação do vetor *An. gambiae*, no Rio Grande do Norte. Em vários povoados rurais e ribeirinhos, 80 a 90% da população foram atingidas, sendo registrada uma mortalidade maior do que 10% dos casos. Através de um acordo entre o governo brasileiro e a Fundação Rockefeller, uma campanha para eliminar o vetor e tratar os enfermos foi iniciada, liderada pelos pesquisadores Fred Soper, Bruce Wilson e Paulo Antunes. A campanha foi um marco na história da Saúde Pública no país, conseguindo eliminar o vetor do território nacional em 1940 (27, 58).

Durante a Segunda Guerra Mundial, o exército japonês ocupou os seringais da Malásia, abrindo espaço, novamente, para o látex brasileiro no cenário mundial. Uma nova leva de imigrantes nordestinos, conhecidos como o “Exército da Borracha” dirigiu-se, novamente, para a região Amazônica, iniciando-se uma nova grande epidemia de malária nessa região.

No início da década de 50, a situação da malária no Brasil era muito preocupante. Estimava-se que no país, para uma população de 55 milhões de habitantes, ocorriam entre 4 a 8 milhões de casos de malária por ano, resultando em cerca de 80 mil óbitos, sendo que as áreas de maior transmissão eram: Amazônia, vales do rio São Francisco e Paraná, Baixada Fluminense e a costa Sudeste e Sul do Brasil. Seguindo as determinações da grande campanha de erradicação da malária em escala mundial, coordenada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no período de 1957-1978, iniciou-se também no Brasil, uma grande campanha de combate à doença. No interior do Brasil e na Amazônia a campanha focou o controle do

mosquito e o tratamento dos casos com atebrina. Posteriormente, foram introduzidos o DDT e a cloroquina. Porém, o *P. falciparum* começou a mostrar, em pouco tempo, sinais de resistência à cloroquina, introduzida no Brasil em 1959 por Mário Pinotti, e utilizada também como um profilático da malária.

Em 1970, a doença havia sido controlada em boa parte do país. Naquele ano, foram registrados 52 mil casos, o menor número desde o início da aplicação do DDT, porém a maioria na região Amazônica. Nos anos seguintes, o governo militar priorizou as ações de controle nas áreas de possível erradicação da doença, como as regiões Sul e Sudeste. A região Amazônica foi colocada em segundo plano.

Nas regiões de possível erradicação, os esforços para combater a doença obtiveram grande sucesso. Com o uso de DDT, larvicidas e tratamento dos doentes, a doença foi praticamente eliminada das regiões Sudeste, Sul e Nordeste, ficando restrita à região Norte do país, ao final da década de 70.

A partir da década de 80, Rondônia foi palco de um intenso fluxo migratório, patrocinado pelo plano de integração nacional do governo militar. Indivíduos das regiões Sul e Nordeste deslocaram-se para lá, atraídos pelas fronteiras agrícolas e pela descoberta de ouro nos leitos dos rios do estado. No final dessa década, a população tinha aumentado de 100 mil para mais de 1 milhão de habitantes e 300 mil casos anuais de malária, passaram a ser registrados, conferindo a Rondônia o título de “capital mundial da malária”(59). Ações de controle voltaram a ser intensificadas na região, seguindo os preceitos da Conferência Ministerial contra Malária, da OMS, de 1992. Em 1996, os casos foram controlados, sendo registrados 50 mil casos de malária. Porém, a queda na qualidade das ações de controle e a transferência da responsabilidade das ações para o nível municipal culminaram com novo aumento no número de casos, superando 100 mil casos em 2004 (59)

Em 2009, foram registrados no Brasil, aproximadamente 306 mil casos da doença, sendo que o *P. vivax* foi responsável por 83,7% dos casos e o *P. falciparum* por 16,3% dos casos. A Figura abaixo mostra o número de casos registrados no Brasil de 1960 a 2009. Podemos observar a prevalência de casos por *P. falciparum* durante o período de 1983 a 1988 e o progressivo aumento do número total de casos, a partir da década de 70 do século passado. O número de casos por *P. falciparum* apresentou queda progressiva desde 1988, enquanto os picos de incidência de casos de malária em 1999 e em 2006 foram ocasionados essencialmente pelo aumento do número de casos de *P. vivax*. A imediata presença de formas sexuadas do parasita no sangue dos indivíduos infectados, a existência das formas hipnozoíticas, o tratamento longo para eliminar tais formas, os efeitos colaterais das

medicações e evidências de cepas resistentes a cloroquina (27) são muito provavelmente as causas do aumento dos casos de *P. vivax* ao longo do tempo.

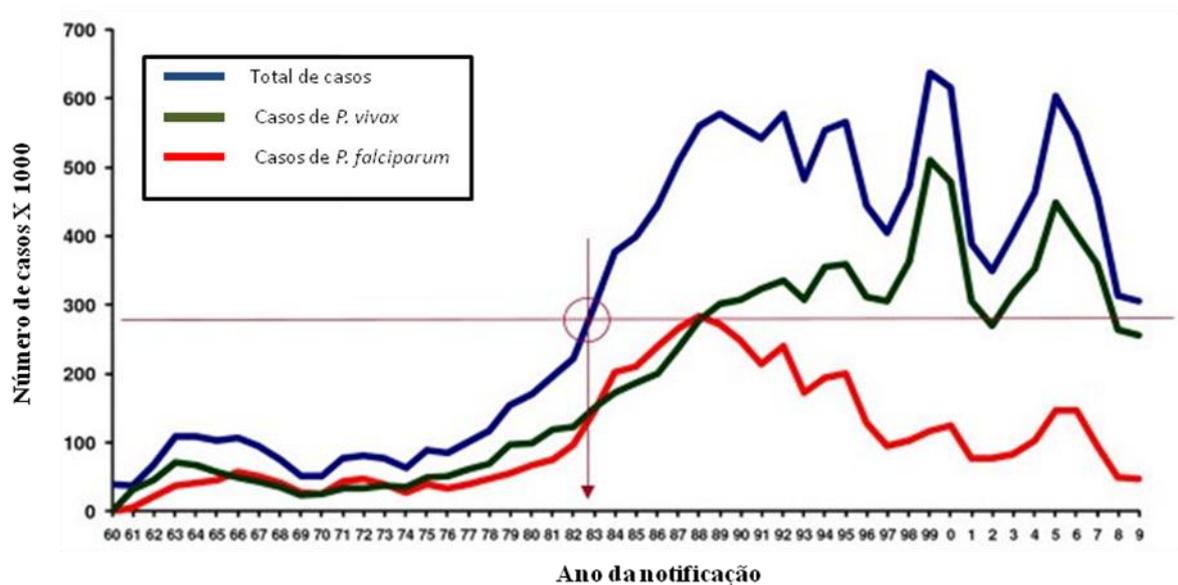


Figura 4- Número de casos de malária registrados no Brasil no período de 1960 a 2009 (27).

A Figura 5 abaixo mostra as flutuações do IPA (Índice Parasitário Anual=número de casos/mil habitantes) ao longo da Amazônia Legal, nos anos 2000 e 2008. Podemos observar níveis variados de transmissão, nas diferentes regiões, nos dois momentos. Em 2008, notamos a diminuição do número de casos no estado do Pará, a intensificação da transmissão na Amazônia Ocidental e IPA>50 na região correspondente ao município de Porto Velho.

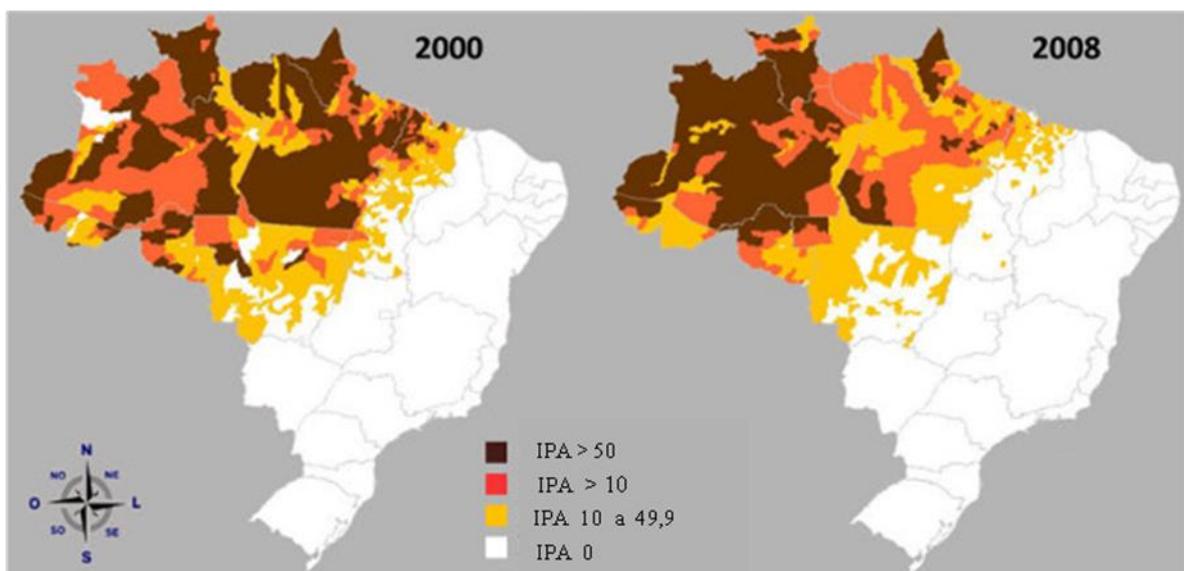


Figura 5- Áreas de transmissão de malária no Brasil segundo o IPA (Índice Parasitário Anual=número de casos/mil habitantes) em 2000 e 2008 (27).

1.6 A resposta imune contra malária e sua relação com a expressão clínica da doença

A infecção malárica possui um vasto espectro clínico nas áreas endêmicas da doença. Examinando os pólos desse espectro, encontramos indivíduos com quadros de doença assintomática, caracterizada por baixa parasitemia e ausência total de sintomas e indivíduos com quadros extremamente graves caracterizados por febre intensa, intermitente, que se repete em intervalos característicos, associada à prostração, cefaléia, sudorese e vômitos, podendo ser fatal, principalmente nas infecções por *P.falciparum*. A parasitemia nesses casos é maior do que nos quadros assintomáticos.

A fisiopatologia da malária falciparum grave assemelha-se à fisiopatologia da sépsis. Um extenso dano celular, decorrente de colapso circulatório e intensa resposta imune inflamatória, leva à falência de múltiplos órgãos. A letalidade está associada a esse comprometimento e a danos específicos causados pelo *P. falciparum*, decorrentes dos fenômenos de citoaderência, como anemia grave ($Hb < 6,9$ mg/dl) e comprometimento neurológico, placentário, pulmonar ou renal.

Porém, alguns indivíduos de áreas endêmicas apresentam quadros brandos da doença, caracterizados por menor quantidade e intensidade dos sintomas citados acima e menor quantidade de parasitemia, em relação aos indivíduos com quadro clínico mais intenso.

O que parece determinar a atenuação do quadro clínico da doença é a aquisição de resposta imune efetora humoral e celular, específica a diversos antígenos e que auxilia no *clearance* parasitário, bem como, a modulação da resposta imune inflamatória gerada.

Outros fatores, além da regulação da resposta imune, podem estar envolvidos na atenuação clínica da doença (60). A seleção de alterações genéticas do hospedeiro, as quais favorecem a sobrevivência em relação à doença e aspectos da virulência do parasita também parecem contribuir para o desfecho clínico da malária.

Os determinantes para a variação da sintomatologia compreendem vários fatores. Entre eles podemos citar os fatores genéticos associados a diferenças na susceptibilidade de cada indivíduo a doença, como os polimorfismos da hemoglobina (hemoglobinas C, S e talassemias) e a deficiência da enzima G6PD, que garantem tolerância e resistência às formas mais graves da doença (61). Outro fator importante deve residir em diferenças de virulência entre genótipos de parasitas (62) e em diferenças na qualidade e quantidade da resposta imune naturalmente adquirida à doença. Diferenças na intensidade e na frequência das infecções maláricas, existência de cepas extremamente diferentes em termos de repertório antigênico entre as áreas de transmissão da doença, existência de co-infecções por vírus, bactérias e

outros parasitas e diferenças no status nutricional entre os indivíduos, também são apontadas como determinantes para a variação da expressão clínica entre as áreas de transmissão (60).

A partir do momento que o parasita entra em contato com o indivíduo, seja como esporozoíto ou como merozoíto eritrocítico, o sistema imune passa a reconhecê-lo, primeiramente com a participação de células e fatores do sistema imune inato. Células dendríticas, fagócitos, células NK, NK-T, linfócitos B e $T\gamma\delta$ e fatores solúveis, como proteínas do sistema complemento, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são exemplos de componentes do sistema imune inato que participam ativamente do reconhecimento dos patógenos invasores. Basicamente, a ação desses atores promove a internalização dos patógenos e a liberação de citocinas e quimiocinas, que potencializam a fagocitose e contribuem para a ativação de células T_{helper} . Posteriormente, ocorre a ativação de células T_{naive} ou células T_{helper} específicas através da interação entre o complexo MHCII-antígeno e o TCR e entre moléculas co-estimulatórias na superfície das APCs e das células T-CD4+. As sucessivas exposições favorecem o desenvolvimento de células imunes de memória, T-CD4+, T-CD8+ e B, que contribuem para a abreviação dos sintomas, através do rápido controle da carga parasitária. Porém, por algumas razões que serão discutidas adiante, a imunidade naturalmente adquirida não é esterilizante, necessitando de premunição, ou seja, da persistência de carga parasitária, para a manutenção da população das células de memória ou como resultado da regulação da resposta pró-inflamatória (63).

Os esporozoítos e os merozoítos são as formas extracelulares do parasita, sendo alvos importantes do reconhecimento por anticorpos também. Os primeiros alcançam os linfonodos drenantes, através da circulação espontânea pelo sistema linfático ou através da fagocitose por células dendríticas ou macrófagos, sendo apresentados aos linfócitos T ou diretamente, aos linfócitos B da zona marginal. Vários estudos com populações de áreas endêmicas para malária apontam que a proteína CS, que recobre o esporozoíto, é um dos principais alvos de reconhecimento do sistema imune humoral, assim como, um estímulo para a produção de grandes quantidades de $\text{IFN-}\gamma$ (64, 65), a partir de macrófagos, células T-CD4+ e, possivelmente de células NK-T_CD1d, sendo um dos antígenos presentes em formulações vacinais em teste (66-68). O curto período de tempo entre a entrada do esporozoíto no indivíduo e a penetração no fígado determina que a eliminação do parasita, pelo sistema imune, seja extremamente rápida.

A fase hepática da doença é sabidamente silenciosa. O hepatócito, *per se* apresenta baixa expressão de MHC I, o que determina baixo reconhecimento antigênico nesse órgão, provavelmente, como tentativa de evitar um extenso dano tecidual, em casos de infecções, a

um órgão essencial a sobrevivência do indivíduo. Porém, o esporozoítio atravessa os macrófagos residentes do fígado sem causar ativação dos mesmos, o que sugere a presença de algum mecanismo de regulação da resposta imunológica nesse órgão, que pode incluir a participação de células T reguladoras, semelhantemente ao que ocorre na derme (Silva, HB et al; PNAS, 2010, submetido). Por outro lado, a formação dos merossomos nas membranas dos hepatócitos, na infecção murina por *P. berghei*, sugere a participação de mecanismos de evasão imunológica pelo parasita, que podem estar presentes também, na infecção pelos plasmódios humanos.

A fase eritrocítica é responsável pelos sintomas clínicos relacionados à malária, tais como febre, tremores, calafrios, sudorese, cefaléia e mialgia, e também pelos sintomas relacionados às complicações. Sabe-se que a participação da imunidade humoral nessa fase é de extrema importância no combate à doença. A transferência de anticorpos IgG de pacientes imunes africanos para pacientes tailandeses infectados por *P. falciparum* conseguiu reduzir a carga parasitária e a sintomatologia da doença (69). A presença de anticorpos citofílicos das subclasses IgG1 e IgG3 é associada com proteção ao desenvolvimento de sintomas e diminuição da carga parasitária (70, 71). Esses anticorpos atuam promovendo a opsonização do patógeno ou do eritrócito infectado, ativando a via clássica do sistema complemento ou mediando a citotoxicidade celular dependente de anticorpos, via interação com os receptores Fc da superfície de fagócitos.

Os principais alvos antigênicos do reconhecimento humoral da fase intraeritrocítica são supostamente as proteínas PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1) (72, 73), expressas na superfície do eritrócito infectado pela forma trofozoítica do parasita, a partir da família multigênica *var* (74-76). Essas proteínas promovem o seqüestro desses eritrócitos no endotélio da microcirculação venular, evitando a passagem e conseqüentemente, a eliminação dos mesmos pelo baço e a adesão a eritrócitos não-infectados, plaquetas e placenta (77). Plasmas de indivíduos imunes conseguem inibir a citoaderência desses eritrócitos através da formação de imunocomplexos, que levam à aglutinação dos eritrócitos e a pronta eliminação dos mesmos pelo baço (40). Um dos mecanismos mais importantes de evasão do sistema imune que o *P. falciparum* apresenta é a variação na expressão das proteínas PfEMP1, através do mecanismo de exclusão alélica (78) e *switching* transcricional dos genes *var*. Esse mecanismo é controlado em parte, por modificações epigenéticas, tais como a acetilação e metilação das histonas da região dos promotores dos genes *var* (79-81) Plasmas de indivíduos adultos imunes de áreas endêmicas conseguem aglutinar eritrócitos infectados, da maioria das crianças da mesma região. Quando esses plasmas são adicionados a

culturas de eritrócitos infectados por diferentes cepas de *P. falciparum*, a formação de aglutinação é restrita a um número reduzido de cepas, o que indica que os anticorpos adquiridos reconhecem um repertório de domínios variantes e não, os domínios conservados dessas proteínas (82).

As proteínas presentes na superfície dos merozoítos ou secretadas por eles atuam direta ou indiretamente na invasão eritrocítica ou no egresso do parasita do interior do eritrócito. Várias dessas proteínas são alvos do sistema imune humoral, e, constantemente, são relacionadas com proteção ao desenvolvimento de sintomas da doença, estando presentes em grande parte das formulações vacinais em teste (12, 83-85). A atuação desses anticorpos, no bloqueio da invasão, deve ser extremamente rápida, pois o tempo entre sair de um eritrócito e invadir outro é de, aproximadamente, 30 segundos (86). Estudos apontam o predomínio das subclasses citofílicas de IgG na resposta gerada. Além de estarem envolvidos no bloqueio da invasão, esses anticorpos participam de mecanismos de citotoxicidade celular dependente de anticorpos, como fagocitose, inibição celular e *burst* respiratório, com liberação de NO (óxido nítrico) por neutrófilos (87, 88).

Atualmente, o pensamento corrente admite que a resposta imune ideal contra malária deva ser inicialmente, rápida, intensa e mediada por componentes pró-inflamatórios, a fim de eliminar ou controlar, substancialmente, a população de eritrócitos infectados. Porém, essa resposta deve ser rapidamente suprimida por componentes antiinflamatórios, evitando danos ocasionados pela própria resposta imune, a partir do momento em que a carga parasitária esteja controlada. Admite-se também, que o *clearance* dos parasitas remanescentes e a prevenção de reinfecções ou recrudescências da doença, sejam essencialmente mediados por anticorpos (60).

Um fato marcante na doença malárica é que a falha do sistema imune em eliminar o parasita, não está necessariamente associada à doença clínica. Isso se torna mais evidente, em regiões hiperendêmicas da África sub-Sahariana, onde após 1 ou 2 episódios clínicos de malária por *P. falciparum*, o risco das crianças de desenvolver formas graves da doença é bastante reduzido, apesar das crianças continuarem a ser infectadas (89). Quadro semelhante é observado em indivíduos adultos da região Amazônica, nos quais são encontrados parasitas causadores de malária, na ausência de manifestação clínica da doença. Porém, esses indivíduos servem de reservatórios para infectar os mosquitos (90, 91). Apesar de um grande número de evidências sugerir que a aquisição de imunidade está associada ao número de exposições do indivíduo ao parasita, alguns estudos com populações de migrantes mostram o efeito da maturação natural do sistema imune na aquisição de imunidade. Indivíduos adultos,

migrantes de uma região não-endêmica para uma região endêmica de malária, apresentaram prevalência de infecções idêntica a de crianças, durante o primeiro ano no local. Porém, 20 meses depois, os adultos apresentaram diminuição importante na prevalência das infecções, enquanto as crianças permaneceram com a mesma taxa de infecção (92).

A resposta naturalmente adquirida contra a malária confere resistência à doença, basicamente, pelo incremento no *clearance* parasitário. Porém, alguns fatores podem determinar tolerância à doença, minimizando a gravidade do quadro clínico, a despeito da manutenção da carga parasitária. Esse fato foi observado em indivíduos heterozigotos ou homozigotos para α -talassemia, infectados com *P. falciparum*. Comparativamente aos indivíduos com HbA, os indivíduos talassêmicos não apresentaram diferença entre as cargas parasitárias, mas o grau de anemia apresentado por eles foi reduzido, com diminuição da mortalidade relacionada à doença (93).

No modelo de infecção por *P. chabaudi chabaudi*, camundongos Balb/c, eficientes na expressão da enzima heme-oxigenase 1 (HO-1), sobreviveram à infecção, através da supressão dos efeitos pró-oxidantes do grupo heme, presente na hemoglobina e liberado pela ruptura dos eritrócitos. A enzima inibe a sensibilização dos hepatócitos e a conseqüente apoptose dessas células, via TNF (94). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou proteção contra o desenvolvimento de malária cerebral, no modelo de infecção por *P. berghei* ANKA, em camundongos C57BL/6 heterozigotos para HbS. A HbS induz a expressão da enzima HO-1, que cataboliza o grupo heme em biliverdina, ferro e monóxido de carbono (CO). O CO liga-se a hemoglobina livre, inibindo a oxidação dessa última e prevenindo a liberação do grupo heme da hemoglobina oxidada. Dessa forma, indivíduos portadores de traço falciforme podem ter vantagens contra o desenvolvimento de formas graves da doença (95).

Um grande número de evidências aponta a participação determinante de células T reguladoras (T reg) na supressão do efeito das células T efectoras-específicas, no curso das doenças infecciosas. O resultado dessa interação parece diminuir os danos causados pela ativação do sistema imune, a despeito da falência em eliminar o patógeno, levando à cronicidade da infecção e a um quadro de tolerância imunológica.

As células T reg originam-se naturalmente no timo, a partir da ontogenia das células T, ou podem ser induzidas periféricamente, a partir de células T *naive* expostas a TGF- β . A função supressora é exercida de várias maneiras: pelo contato célula a célula, através da interação das moléculas de superfície da membrana, como GITR (receptor de TNF induzido por glicocorticóide), CTLA-4 (antígeno 4 de linfócito T citotóxico, que interage com CD28, induzindo a apoptose de células dendríticas) e TGF- β , pelo aumento da expressão da cadeia α

do receptor da IL-2 (CD25), pela ação do fator de transcrição Foxp3, que atua suprimindo genes expressos durante a ativação da resposta imune e ativa genes relacionados à modulação da resposta imune nas células alvos e pela secreção de IL10 (96).

Estudos com modelos murinos apontam papéis importantes de IL-10 e TGF- β , no controle da resposta Th1. Porém, o momento, durante o curso da infecção, para essas citocinas atuarem é determinante para a sobrevivência dos animais. A indução de TGF- β nas primeiras 24 horas pós-infecção, é associada com falência da resposta Th1 e do controle da proliferação do parasita, em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa letal de *P. yoelii* (YM/17XL). Por outro lado, a neutralização de IL-10 e TGF- β , neste modelo, induz a produção de citocinas de padrão Th1, aumentando a chances de sobrevivência (97). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que moléculas trombospondina-like e metaloproteases, presentes em extratos de *P. yoelii* 17XL, são capazes de transformar TGF- β na forma ativa, favorecendo a diferenciação de células T *naive*, para um fenótipo T reg (CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺). Isso pode ser entendido como um mecanismo de evasão imune e um componente de virulência desse parasita (98).

Um estudo com crianças apresentando malária grave e malária não-complicada, na Gâmbia, não observou diferenças no número ou função de células T reg entre os grupos. Porém, a atividade dessas células foi inversamente correlacionada com a presença de células Th1 de memória específicas, 28 dias depois da fase aguda da doença. Esse evento pode atenuar a resposta Th1 em infecções subsequentes, corroborando com a rápida aquisição de imunidade contra malária grave, observada nas crianças africanas (99).

A expressão clínica da doença pode também ser modulada pela expressão dos alelos do complexo Natural Killer, localizados no cromossomo 6, em camundongos e no cromossomo 12, em humanos. As células NK-T_CD1d interagem com o ligante natural GPI (*glicosil phosphatidil inositol*), que promove o ancoramento na membrana celular das proteínas de superfície do merozoíto: MSP1, MSP2, MSP4, MSP5, MSP8 e MSP10 e da proteína CS, entre outras. Dependendo da expressão dos alelos do complexo Natural Killer, essas células podem secretar níveis diferentes de IL-4 ou IFN- γ , favorecendo uma resposta antiinflamatória ou pró-inflamatória, respectivamente (60).

Finalmente, as co-infecções com helmintos, altamente prevalentes em várias partes do mundo, incluindo nas áreas endêmicas para malária, podem influenciar a aquisição de imunidade protetora contra malária, tanto em camundongos quanto em humanos, submetidos à vacinação experimental ou durante o curso da infecção natural. (100-103). No modelo murino de co-infecção e vacinação foi observado diminuição de anticorpos citofílicos,

diminuição dos níveis de IFN- γ e aumento dos níveis de IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- β , este último, podendo direcionar a diferenciação de células T_{naive} para um fenótipo T reg. Como já discutido acima, dependendo do momento, durante a infecção, em que isso ocorre, os danos podem ser fatais.

1.7 Quantificação das subclasses de IgG em crianças e adultos

As referências sobre as concentrações das subclasses de IgG no sangue de indivíduos não-doentes baseiam-se em informações coletadas a partir de população adulta e caucasiana. Sabe-se que alguns haplótipos relacionados aos genes que codificam a cadeia pesada (haplótipos Gm) podem ocasionar aumento das concentrações das subclasses. Um alto nível de IgG2 é relacionado ao haplótipo Gm(n) e um baixo nível de IgG3 é relacionado à ausência do haplótipo Gm(b) (104).

Dessa forma, em adultos os níveis séricos médios de IgG total e das subclasses são: IgG_{total} (6,0-14,0 mg/ml), IgG1 (9 mg/ml), IgG2 (3 mg/ml), IgG3 (1 mg/ml) e IgG4 (0,5 mg/ml) (105).

Um estudo de 1975 comparou as concentrações das subclasses de IgG em crianças de 4 a 12 anos, com as de adultos. Crianças, a partir dos 4 anos e adultos apresentaram níveis semelhantes das subclasses IgG1 e IgG3. O nível de IgG2 foi menor em crianças, sofreu aumento gradativo com a idade, porém as crianças de 12 anos ainda apresentaram níveis menores do que os adultos. O nível de IgG4 sofreu o mesmo processo, porém ocorreu equivalência do nível em crianças e adultos, mais precocemente do que IgG2 (104).

IgG1 e IgG3 em humanos têm alta afinidade por receptores Fc presentes na superfície de fagócitos, assim como, possuem alta afinidade por proteínas do sistema complemento, ativando a via clássica desse sistema. Anticorpos IgG2 e IgG4 atuam na neutralização de toxinas, impedindo a interação dessas com receptores. Possuem baixa afinidade por receptores Fc e proteínas do sistema complemento. Porém patógenos, principalmente helmintos e parasitas extracelulares podem direcionar a diferenciação dos linfócitos T para um padrão Th2, através da sinalização de IL-4 e IL-6, e conseqüentemente, estimular a diferenciação de linfócitos B secretores de IgG2 e IgG4 (105).

1.8 Proteínas do merozoíto de *P. falciparum*

O merozoíto é a forma infectante do parasita para os eritrócitos durante o ciclo eritrocítico. Sua função invasora é exercida através de uma série de antígenos existentes ao longo da sua superfície e de outros presentes nas organelas do complexo apical, como as róptrias, micronemas e grânulos densos.

Vários antígenos apresentam uma função bem estabelecida no processo de invasão eritrocitária, como os antígenos da superfície do merozoíto (*merozoite surface proteins*): MSP1, MSP6, MSP7 e MSP9, importantes para a adesão inicial do merozoíto à membrana do eritrócito, através da interação com o fator eritrocítico proteína banda 3 (106, 107). Os antígenos secretados pelos micronemas, EBA175, EBA140 e EBA181 (*erythrocyte binding antigens*), ligam-se às glicoforinas A, C e ao receptor W da superfície do eritrócito, respectivamente, garantindo a adesão irreversível do pólo apical à membrana do eritrócito (108, 109). AMA1 (*apical membrane antigen 1*), também secretada pelos micronemas, é importante tanto para a reorientação do pólo apical quanto para a adesão irreversível do pólo apical à membrana do eritrócito e indiretamente, participa da formação do vacúolo parasitóforo (110, 111). MAEBL (*merozoite-adhesin erythrocyte binding ligand*) é encontrada na superfície do merozoíto, no pólo apical e nas róptrias, podendo ser importante tanto para a adesão inicial, quanto para os eventos posteriores do processo de invasão (112). AMA1 e MAEBL também são expressas pelo esporozoíto e participam das etapas de invasão do hepatócito, sendo que a última, também participa das etapas de invasão da glândula salivar do mosquito (113). As proteínas da família PfRh (*reticulocyte-binding homologue family*) também estão implicadas no processo de invasão. A PfRh5 localiza-se nas róptrias, sendo secretada durante a formação da zona de contato (114). Outras proteínas pertencentes às róptrias também são implicadas no processo de invasão (39).

Porém, a função da maioria das proteínas expressas nessa fase ainda é desconhecida, como a função das proteínas da superfície do merozoíto MSP2, MSP3, MSP4, MSP5, MSP8, MSP10 e MSP11. Os receptores da superfície do eritrócito que interagem com essas proteínas também são desconhecidos.

Vários antígenos de merozoíto são alvos da resposta imune humoral de pacientes de áreas endêmicas para malária. Alguns são implicados em proteção contra o desenvolvimento de sintomas clínicos ou infecções, como MSP1, MSP2, MSP3, AMA1 e EBA175 (70, 84, 85, 115-118). Todos esses antígenos estão, atualmente, em várias formulações vacinais em teste (12). Algumas dessas formulações são construções quiméricas, com dois ou três antígenos,

que diferem pelos adjuvantes utilizados e pela forma como os antígenos são disponibilizados. Algumas formulações contêm antígenos recombinantes, outras contêm antígenos sintéticos e outras são vacinas de DNA (12).

Enquanto muitos estudos já investiram na medição da resposta humoral de populações expostas nas mais diversas situações, nenhum estudo mediu a resposta simultânea contra muitos antígenos, oriundos de parasitas do mesmo local de origem dos indivíduos infectados. A medição da resposta humoral contra antígenos expressos durante a infecção sofrida pelo indivíduo e a caracterização da resposta humoral gerada, também nunca foi conduzida, anteriormente. Potencialmente, o perfil da resposta humoral em infecções sintomáticas ou assintomáticas pode apontar para antígenos importantes ou desnecessários na resposta.

1.9 Genes *surf* e proteínas SURFIN

Os genes *surf* (*surface associated interspersed genes*) compreendem uma família de 10 genes, dispostos na região subtelomérica dos cromossomos 1, 4, 8, 13 e 14 ou próximos a ela. Assemelham-se estruturalmente pela presença de dois ou três éxons, pelo intenso polimorfismo da região N-terminal e pela região C-terminal, repleta de domínios codificadores de triptofano (119).

As proteínas SURFIN caracterizam-se por apresentarem na região N-terminal, um sinal de exportação para além do vacúolo parasitóforo conhecido como PEXEL (*Plasmodium Export Element*). Este sinal é composto por duas partes, separadas por 10 a 30 aminoácidos: uma sequência conservada de aminoácidos hidrofóbicos e outra sequência conservada do tipo K/R x L x E/Q/D, como pode ser observado na Figura 6. O mesmo sinal foi identificado em 400 proteínas de *P. falciparum*, direcionadas para o eritrócito, sendo que 225 parecem estar envolvidas na virulência do parasita e 160, no remodelamento do eritrócito (120).

MESA	-----MEVICRNLCDKKNMMEGKVKVYNNSSLKKYMKFCLCTIICVFL	50
STEVOR	-----MKMYLKMLLFTFLINTLILPHY	23
PfEMP3	-----MATIKKYHIRGRKNILIFLLKIFLFSPLIWIILYSE	36
11.1	MKKESYRFLNISINNGSDKKKSNFFVKIKNGTDLKDTKKDRIRFHFYFYPFIVKIILLSLLIWTVIYSNN	71
HRPII	-----MVSFSKNKVLAAVFAVLLLDN	23
R45	----MNYFSKYKVIESNRLLYTSNVKYDNYFININKKNQVKKNESYSFIKLLFRKCIIFFIYFLFIIP	67
RESA	-----MRPFHAYSWIFSQQYMDTKNVKEKNPTIYSFDDEEKRRENKSFVLKVLCSKRGVLPITIGILYIILN	65
GBP130	-----MRLSKVSDIKSTGVSNYKNFNFSKNSSKYSLMEVSKKNEKKNSLGAFHSHKILLIFGIYVLLNA	65
RIFIN	-----MKLHYTKILLFFFPYIL	18
KAHRP	-----MKSFKNKNTLRRKKAFPVFTKILLVSLVWVLRCSNN	37
MESA	DIYTNCESPTYSYSSIKNNNDRYVILLSETEPPMSLEEIM	90 (1434)
STEVOR	ENYLNNDYVNSFIQNNTKRTTIKSELLAQTIHNPHYHND	63 (297)
PfEMP3	-YFTVVKYNYKIDNVYNI FEIRLKRSLAQVLGNTRLSSRG	75 (2441)
11.1	--CSNGKYKSTLYIVGNHLRFRGFRILAENEYEMTKYKT	109 (1948)
HRPII	---NNSAFNNLCSKNAKGLNLKLLIYETQAHVDDAHA	60 (305)
R45	----NEVIYNYDYSSKSIQHYCIENLSECFRGKSALND	103 (1222)
RESA	----GNLGYNGSSSSGVQFTDRCSNLYGETLPVNPYADS	101 (1085)
GBP130	-----YICGDKYEKAVDYGFRESILAEGEDTCARKEKT	99 (824)
RIFIN	-----VYSKNKPSITPHHTQTNRLCECDTQSTNYND	51 (336)
KAHRP	-----CNNGNGSGDSFDFRNKRTLAQKQHEHHHHHH	69 (654)

Figura 6- Motifs conservados de proteínas de *Plasmodium falciparum* com sinal de PEXEL. Aminoácidos (aa) em azul (porção superior) correspondem à sequência conservada hidrofóbica e aa em cores (porção inferior) correspondem ao sinal de PEXEL (120).

Evidências apontam a expressão de duas dessas proteínas (SURFIN 4.1 e SURFIN 4.2) em momentos distintos do ciclo do parasita: no merozoíto e no trofozoíto (119, 121). SURFIN 4.2 foi encontrada tanto na superfície do merozoíto, quanto do eritrócito infectado pelo trofozoíto, sendo cotransportada para a superfície, juntamente com as proteínas PfEMP1 e RIFIN (119). Nada se sabe sobre a função dessas e das outras proteínas SURFIN, porém, a localização dessas duas acima possibilita a participação, das mesmas, nos processos de invasão do eritrócito, no transporte de proteínas, no remodelamento do eritrócito ou em citoaderência.

A localização dos genes *surf*, próximos às famílias gênicas envolvidas em virulência, *var*, *rif* e *stevor*, sugere para estes genes tanto a participação em processos de virulência, como a existência de mecanismos de transcrição semelhantes. Os genes PFA0725w, PFD0100c, MAL8P1.162 e PF14_0747, semelhantemente às famílias multigênicas *var*, *rif* e *stevor*, também apresentam a trimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9me3), quando silenciados (122). Entretanto, o mecanismo de regulação da transcrição dos genes *surf* é desconhecido e não se sabe se ocorre transcrição de genes *surf*, de forma semelhante ao verificado nos ensaios de *microarray* (123) ao longo do tempo, ou se há intensificação ou silenciamento da transcrição em determinados genes *surf*.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Conseguir estabelecer medidas efetivas de controle da doença, ou mesmo, propor formulações vacinais mais adequadas à população e aos antígenos expressos pelas cepas em circulação exige o conhecimento sobre a realidade local, sobre os genótipos dos parasitas circulantes e sobre quais antígenos são importantes para a aquisição de um fenótipo resistente à malária sintomática.

Assim, a partir de um trabalho de campo realizado em 4 localidades ribeirinhas do Rio Madeira, em Rondônia, um estado que tem a sua história marcada por epidemias de malária e que possui um grande número de portadores assintomáticos para a doença, propusemos identificar diferenças na resposta humoral de pacientes sintomáticos e assintomáticos, para malária falciparum, frente a antígenos do merozoíto e aos antígenos SURFIN, expressos sob a forma de peptídeos recombinantes. Todos os antígenos foram expressos, após amplificação dos seus respectivos genes, a partir de gDNA dos parasitas presentes no sangue dos próprios pacientes.

Os antígenos escolhidos para serem testados representam os principais antígenos de merozoíto, sabidamente envolvidos no processo de invasão eritrocitária e alguns deles já estão presentes nas formulações vacinais, atualmente, em teste. Em 2006, quando o projeto desse estudo foi iniciado, os antígenos SURFIN eram pouco caracterizados quanto à localização subcelular, ao modo de transcrição e ao reconhecimento pela resposta humoral. A existência do sinal de exportação PEXEL e o intenso polimorfismo da região N-terminal entre alelos SURFIN falavam a favor da possível expressão desses antígenos, na superfície celular de eritrócitos infectados e merozoítos, expostos, portanto, ao reconhecimento imune do hospedeiro.

O reconhecimento imunológico de vários desses antígenos nunca havia sido testado, utilizando plasmas humanos e plasmas de pacientes da Amazônia Brasileira. A estratégia utilizada por nós, através da expressão de peptídeos recombinantes, a partir dos genótipos diferentes circulantes, identificados nos parasitas presentes no sangue dos próprios pacientes, também nunca havia sido realizada. A relativa escassez de alelos diferentes de genes *var*, entre os genótipos de parasitas circulantes na Amazônia Brasileira, possibilita a ocorrência do mesmo fenômeno para outros genes, facilitando a busca pela maioria dos genótipos circulantes diferentes nas localidades escolhidas (124).

O objetivo principal desse estudo, a partir da coleta de sangue dos pacientes sintomáticos e assintomáticos para malária falciparum, foi:

- Encontrar parâmetros de proteção na resposta humoral, associados ao fenótipo assintomático, na população exposta e com infecção malárica.

Os objetivos específicos foram:

1. Identificar todos os genótipos diferentes circulantes dos genes expressos pelo merozoíto em isolados de campo, que codificam as proteínas da família MSP (MSP1_bloco 2, MSP2, MSP3, MSP4, MSP5, MSP6, MSP7, MSP8, MSP9 e MSP10), as proteínas AMA1, MAEBL, EBA175, EBA140 e EBA181;
2. Identificar todos os alelos diferentes circulantes dos genes *surf* em isolados de campo: PFA0625w, PFA0650w, PFA0725w, PFD0100c, PFD1160w, MAL8P1.1, PF08_0002, MAL8P1.162, PF13_0075 e PF14_0747;
3. Verificar a resposta humoral dos plasmas dos pacientes frente aos peptídeos recombinantes expressos em ensaios imunoenzimáticos;
4. Identificar as classes de anticorpos IgG envolvidas na resposta contra os antígenos expressos, em plasmas reativos sintomáticos e assintomáticos;
5. Verificar o modo de transcrição dos genes *surf*, em relação à existência dos mecanismos de exclusão alélica e *switching* transcricional, através da técnica de PCR em tempo real.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

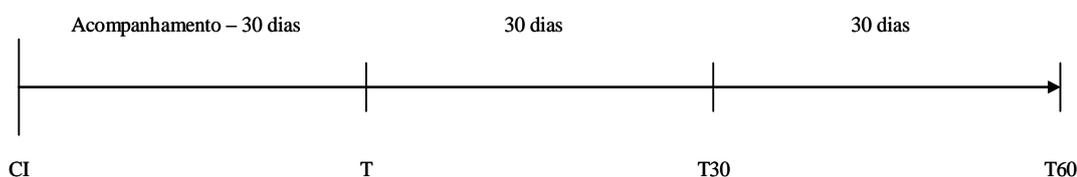
3.1 Localidades

As amostras de sangue utilizadas no desenvolvimento dos experimentos laboratoriais foram coletadas, por busca ativa e passiva, nas localidades ribeirinhas de Vila Candelária, Bate–Estaca, Santo Antônio e Engenho Velho. As 3 primeiras estão localizadas, consecutivamente, na margem direita do Rio Madeira, enquanto Engenho Velho ocupa a margem esquerda, no mesmo ponto do rio. Todas estão situadas na zona urbana do município de Porto Velho, estado de Rondônia. O mapa com a localização das localidades, por satélite, é mostrado no anexo A.

3.2 Desenho do corte transversal

A identificação de pacientes portadores assintomáticos de *P. falciparum* foi realizada através de busca ativa, em um corte transversal com observação posterior, nas 3 últimas localidades citadas acima, no período de 15/07/2006 a 19/09/2006. O estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Todos os moradores das localidades, a partir de 1 ano de idade, foram convidados a participar do estudo. A aceitação atingiu mais do que 50% da população de cada localidade, totalizando 612 indivíduos. A linha do tempo desenhada abaixo descreve o trabalho feito nas localidades, incluindo a coleta de sangue inicial (CI) no corte, o acompanhamento dos indivíduos sem sintomas por 30 dias, após a coleta inicial até o tratamento (T) e as duas coletas nos períodos de 30 (T30) e 60 (T60) dias pós–tratamento, em um subgrupo da amostra.



Durante o corte e o período de acompanhamento, moradores das 4 localidades, que apresentaram sintomas de malária e lâmina positiva para *P. falciparum*, também foram convidados a participar. Isso foi possível, devido à presença de postos de diagnóstico de malária por microscopia, em Engenho Velho, Santo Antônio e Vila Candelária. Porém, o período do corte representa o período anual de menor transmissão de malária, devido ao baixo

índice pluviométrico e a conseqüente diminuição dos criadouros naturais do vetor *Anopheles*. Dessa forma, poucos casos sintomáticos de malária foram registrados naquele momento. Como os postos são permanentes, indivíduos das 4 localidades que apresentaram sintomas e lâmina positiva para *P. falciparum*, nos meses posteriores, foram incluídos no estudo.

3.3 Coletas das amostras de sangue

Primeiramente, os participantes foram orientados sobre o motivo da pesquisa e os procedimentos que iriam ser realizados. Após a assinatura do termo de consentimento específico, todos os participantes foram examinados por um médico, a fim de verificar sinais e sintomas relacionados à malária, e responderam a um questionário contendo dados epidemiológicos. Os parâmetros clínicos verificados foram febre, cefaléia, tremores, prostração, náuseas, vômitos, palidez e icterícia. A ausência total dos parâmetros classificava o indivíduo em assintomático e a presença de qualquer um deles, em sintomático. Posteriormente, com a coleta de sangue, seria verificada a positividade de infecção por *P. falciparum*. Nenhum dos indivíduos sintomáticos apresentou sintomas relacionados à malária grave, tais como, rebaixamento do nível de consciência, dificuldade respiratória, alterações urinárias ou anemia grave. As fichas de atendimento clínico, de acompanhamento e os termos de consentimento específico para maiores e menores de 18 anos encontram-se nos anexos B, C, D e E, respectivamente.

Um volume de 5,0 ml de sangue venoso periférico foi coletado de cada participante, em tubo estéril contendo EDTA. Posteriormente, cada amostra foi fracionada em lâminas para gota espessa, hemácias compactadas para experimentos de PCR, plasmas para ensaios imunológicos e amostras congeladas de isolados de campo. Novas coletas de sangue foram realizadas em um subgrupo de indivíduos assintomáticos (n=10) e sintomáticos (n=3) da amostra, nos períodos de 30 e 60 dias pós-tratamento.

Previamente ao corte transversal, todas as casas das comunidades receberam aplicação de inseticida para controle vetorial.

3.4 Acompanhamento dos pacientes sem sintomas maláricos

Os pacientes sintomáticos ou com resultado positivo em PCR, apenas para *P. vivax*, foram prontamente tratados, segundo as recomendações do Ministério da Saúde e desvinculados do estudo. Não foram excluídos pacientes assintomáticos com infecção mista.

Os pacientes positivos para *P. falciparum*, que não apresentaram sintomas no momento da coleta, foram acompanhados por 30 dias para verificar a presença dos sintomas de malária descritos acima. Esses indivíduos foram visitados três dias por semana, durante quatro semanas e questionados sobre o aparecimento de sintomas. A verificação da temperatura axilar foi realizada em todas as visitas, buscando sempre respeitar o mesmo período do dia. Ao término do período, os pacientes foram tratados, de acordo com o tratamento recomendado pelo Ministério da Saúde. Todos os pacientes assintomáticos apresentaram parasitemia positiva para *P. falciparum*, diagnosticada apenas por PCR.

Todos os pacientes sintomáticos para *P. falciparum* foram tratados, após a coleta inicial de sangue, segundo as recomendações do Ministério da Saúde. Os tratamentos recomendados pelo Ministério da Saúde, para tratamento das malárias vivax e falciparum, podem ser visualizados no endereço eletrônico abaixo: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_pratico_tratamento_malaria_brasil_2602.pdf.

3.5 Definição dos grupos clínicos

Ao término do período de acompanhamento, dois grupos foram formados: o grupo de pacientes sintomáticos (sintomas presentes e parasitemia por *Plasmodium falciparum* suficiente para diagnóstico por gota espessa, n=2) e o grupo de pacientes assintomáticos para malária falciparum (ausência de sintomas por 30 dias, baixa parasitemia, apenas diagnosticada por PCR, n=10). Os únicos critérios determinantes para remanejar um paciente assintomático para o grupo sintomático foram o aparecimento de sintomas e a presença de *P. falciparum* em gota espessa.

3.6 Amostra total do estudo

Amostras de sangue total, coletadas em cortes anteriores nas mesmas localidades, pelo laboratório de epidemiologia molecular do CEPEM (Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia), foram acrescentadas à amostra. Amostras de sangue de pacientes sintomáticos das localidades, coletadas posteriormente ao corte, também foram inclusas. Ao todo, foram analisadas nesse estudo, 25 amostras de pacientes assintomáticos, 27 de pacientes sintomáticos e amostras de gDNA de 6 isolados de campo de Porto Velho, previamente doadas, de 1 isolado Africano e das cepas FCR3 e 3D7.

Plasmas de um subgrupo de indivíduos que participaram do corte e do acompanhamento foram coletados nos períodos de 30 e 60 dias pós-tratamento. Esses plasmas, 10 oriundos de pacientes assintomáticos e 3 de pacientes sintomáticos, foram utilizados para medir a longevidade da resposta humoral na ausência da parasitemia. Não foram realizados novos testes de identificação de parasitemia por *Plasmodium falciparum* nessas amostras. Os pacientes apenas foram interrogados sobre a presença de sintomas, porém, as coletas ocorreram no período de baixa transmissão e após controle vetorial realizado nas localidades.

3.7 Microscopia de gota espessa

As lâminas para identificação de parasitemia, por análise de gota espessa, foram confeccionadas durante as coletas de campo. As lâminas foram coradas com *Giemsa* e submetidas à microscopia óptica comum. 100 a 200 campos/lâmina foram observados, por técnicos treinados do CEPEM e da FUNASA.

Nenhum dos indivíduos sintomáticos apresentou parasitemia maior do que 2+ (2 a 20 parasitas/campo).

3.8 Fracionamento das amostras

As amostras foram coletadas em tubos estéreis, contendo EDTA, e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min, a TA. Todo o plasma foi recolhido em microtubo estéril contendo glicerol (v/v) e mantido a -80 °C. 250 µl de hemácias compactadas foram submetidas à

extração de gDNA, 500–750 µl foram congeladas a -80 °C e o restante foi congelado com *glycerolyte*, para preservação dos parasitas.

3.9 Extração de gDNA pelo método fenol-clorofórmio

Um volume de 250 µl de hemácias compactadas foi submetido à extração de gDNA pelo método utilizando fenol e clorofórmio. Brevemente, 10 a 20 volumes de PBS 1X e saponina (0,1% final) foram acrescentados às hemácias, em tubo Falcon de 15 ml. Após a lise, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 2800 rpm, a TA. Essa sequência foi repetida até a lise total das hemácias. O sobrenadante foi descartado e o pellet escuro foi dissolvido em 200 µl de solução TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 e 1 mM EDTA pH 8.0), em microtubo. Geralmente, as amostras dos pacientes assintomáticos não apresentam pellet visível. 200 µl de tampão de lise (40 mM de Tris-HCl pH 8.0, 80 mM de EDTA pH 8.0 e 2% de SDS a 0,1 mg/ml) e 200 µg de proteinase K foram acrescentados e a solução foi incubada por 4 a 16 horas, a 37 °C. O mesmo volume da amostra (400 µl) de fenol pH 8.0, fenol e clorofórmio a 50% e clorofórmio a 100%, foram adicionados, consecutivamente, intercalados por agitação vigorosa e centrifugação por 5 minutos a 6000 rpm, a TA, sempre, recolhendo-se as fases aquosas e transferindo-as para um novo tubo. A última fase aquosa foi transferida para um microtubo contendo 45 µl de acetato de sódio 3 M pH 5.0. Após agitação lenta, no vórtex, 2 volumes de etanol a 100%, gelado, foram acrescentados e o tubo foi incubado, overnight, a -20° C. Após centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm, a TA, o sobrenadante foi delicadamente removido sem prejudicar o pellet, invisível na maioria das vezes, e 1 ml de etanol a 70% foram acrescentados. O tubo foi submetido à nova centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm, colocado para secar a TA e posteriormente, ressuspendido em 50 a 100 µl de TE.

3.10 Identificação de *Plasmodium* e espécie

O diagnóstico de gênero e espécie foi baseado, respectivamente, na amplificação de domínios conservados e de domínios espécie-específicos do gene que codifica *ssrRNA* (*small subunit ribossomal RNA*), pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme descrito anteriormente (125).

Três pares de oligonucleotídeos foram usados nessa etapa e o produto da primeira reação foi o substrato das outras duas (*nested PCR*). Infecções por *P. malariae* não foram pesquisadas neste estudo. A Tabela 1 apresenta os pares de oligonucleotídeos utilizados nas reações.

Tabela 1- Pares de oligonucleotídeos para diagnóstico de gênero e espécie (125).

Reações/especificidade	Oligos	Sequências dos pares de oligonucleotídeos	Extensão
Nested 1/<i>Plasmodium</i>	rPLU5 rPLU6	5'CTTGTTGTTGCCTTAAACTTC3' 5'TTAAATGTTGCAGTTAAAACG3'	~1,2 kb
Nested 2/<i>P. falciparum</i>	rFAL1 rFAL2	5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT3' 5'ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC3'	205 pb
Nested 2/<i>P. vivax</i>	rVIV1 rVIV2	5'GGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC3' 5'ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA3'	120 pb

Reação Nested 1

Um volume de 0,5 a 1,0 µl do gDNA extraído de cada amostra foi acrescentado a uma solução de 20 µl, contendo tampão para a enzima Taq Polimerase (10 mM de Tris-HCl pH 8.8, 2,5 mM de MgCl₂ e 50 mM de KCl), 1 mM de dNTPs, 0,5 pmol/µl de cada par do oligonucleotídeo, 0,05 U/µl de Taq Polimerase (Fermentas)) e H₂O. O gDNA da cepa 3D7 foi utilizado como controle positivo das reações. A solução de amplificação, sem DNA, foi utilizada como controle negativo da reação. A amostra foi colocada no termociclador e submetida a 95 °C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguida por 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto (desnaturação), 58 °C por 2 minutos (*annealing*), 72 °C por 2 minutos (extensão), e extensão final, no último ciclo, por 5 minutos. A reação foi interrompida a 20 °C.

Reação Nested 2

Um volume de 0,5 a 1,0 µl do DNA amplificado na reação anterior foi colocado em soluções de amplificação, contendo os pares de oligonucleotídeos para *P. falciparum* e *P. vivax*, separadamente. Os mesmos parâmetros foram utilizados, porém por 30 ciclos. Os fragmentos amplificados, em cada reação, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Brometo de Etídio (0,5–1,0 µg/ml) e visualizado sob luz UV.

3.11 Congelamento de amostras com *glycerolyte*

O congelamento de amostras de isolados de campo foi realizado utilizando solução de *glycerolyte* (57% de glicerol USP, 16 g/l de lactato de sódio, 300 mg/l de KCl USP, 25 mM

de fosfato de sódio, pH 6.8). Primeiramente, os eritrócitos foram lavados com meio RPMI incompleto (sem plasma) pH 7.2 e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos, a TA. No fluxo laminar, o volume do pellet foi estimado e um volume de *glycerolyte* igual a 1,66x o volume do pellet foi adicionado, gota a gota, sob agitação lenta e contínua. Em seguida, o volume foi transferido para um crio tubo e congelado a -80 °C. Amostras congeladas de plasmas, de hemácias compactadas e de isolados de campo foram trazidas para São Paulo, armazenadas em gelo seco.

3.12 Construção dos pares de oligonucleotídeos

- **Oligonucleotídeos para amplificação dos genes a serem expressos**

O genoma da cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum*, disponível na base de dados *PlasmoDB*, foi utilizado como molde para a construção dos pares de oligonucleotídeos.

Os pares foram desenhados, buscando-se amplificar regiões dos ectodomínios dos genes que codificam as proteínas MSP4, MSP5, MSP6, MSP7, MSP9, MSP10, EBA 175, 140 e 181, AMA1 e proteínas SURFIN. Cada extremidade 5' do oligo sense (F) recebeu um sítio de restrição de *Bam*H1. Não foi incluído o sinal de PEXEL nas sequências dos genes *surf*.

Pares de oligonucleotídeos, publicados anteriormente, foram utilizados para amplificar as sequências de MSP1_bloco 2 (126), MSP2 (127), MSP3_3D7 e MSP3_K1 (117), MSP8 (128) e MAEBL (129). O peptídeo MSP1₁₉ foi expresso a partir de um fragmento amplificado do isolado S20 utilizando os pares de oligonucleotídeos descritos na tabela abaixo. O par *forward* contém um sítio de *Bam*H1 na extremidade 5' e o par *reverse* contém um sítio de *Bg*III na extremidade 3'. O fragmento foi inserido posteriormente em um vetor pGEX3X cortado com *Bam*H1.

A Tabela 2 mostra os pares desenhados e utilizados para amplificar fragmentos dos genes expressos no merozoíto. Todas as regiões expressas são polimórficas e os epítomos imunes presentes nos fragmentos expressos, segundo as informações da base de dados *IEDB*, são assinalados na tabela. Não existem epítomos imunes descritos para as sequências de MSP5 e MSP7 (sinal de interrogação na tabela) e os epítomos imunes descritos para MSP10, não estão presentes nos fragmentos expressos.

Tabela 2- Pares de oligonucleotídeos para genes expressos no merozoíto. Sítios de *Bam*H1 (G↓GATCC) e *Bg*III (A↓GATCT) em negrito.

Gene	Proteína	Oligos	Localização	Epitopos imunes	Característica do fragmento
PFI1475w	MSP1	CIF_GGATCCCTAGAAGCTTTAGAAGATGCAG C3R_ACATATGATTGGTTAAATCAAAGAG	Bloco 2 (N-terminal)	B	P
		F_GGATCCCCTAATAACAATAATATAAAATTAATTG R_AGAGGAACTGCAGAAAATACC_AGATCT	C-terminal	B e T	Domínios EGF-like
PFB0300c	MSP2	F_GGATCCAAGGTAATTAACACATTGTC R_GAGGGATGTTGCTGCTCCACAG	Total sem GPI	B e T	C e P
PF10_0345	MSP3_3D7	F_GGATCCACTGGTAATGATTTTAGTGGTGG R_AACGCCTCCTCCAAATCCCAAC	Central	B	P
	MSP3_K1	F_GGATCCGGAGGTTTTACTGCAGATGATG R_CGCCTCCTCCAAATCCCAACC	Central	B	P
PFB0310c	MSP4	F_GGATCCGGGGAAGAAAAACCAATGTGG R_CTACCTTTTAGGGATAGCTC	Éxon 1	B e T	C e P
PFB0305	MSP5	F_GGATCCCGAAAAAGGAGAAGGTGGTTTTAC R_GGAGGTTCTTGACCTATTTCCTG	Éxon 2	?	C e P
PF10_0346	MSP6	F_GGATCCAGTAATAGTACTACAACCTCTC R_CTACACTTTCTTCATCTATGTC	C-terminal	B	C e P
PF13_0197	MSP7	F_GGATCCATGAATGATGACACATTCTTAGG R_CACTTACAATATCCGTTTTGCC	C-terminal	?	C e P
PFE0120c	MSP8	F_GGATCCGAAGTAGATGCACTTTTGA AAAATG R_AGGTAGACATCTACAGGTTTCTTC	C-terminal	T	P e domínios EGF-like
PFL1385c	MSP9	F_GGATCCGCTACCTACTCTTTTGTTAATAC R_TCATCCATACCAGATACAGTTTC	N-terminal	B e T	P
PF0995c	MSP10	F_GGATCCACATCCAGAAAGAAAATTACATAG R_CTGAATTCATGATAGTAATTTTC	N-terminal	-	P
MAL13P1.60	EBA140	F_GGATCCAGTAAAAACAAAATGGAGGTTTTG R_GTTTGTCTTCTGGGGGGTTCAC	N-terminal	B (NKND)	D. <i>Duffy</i> F1 e F2
MAL7P1.176	EBA175	F_GGATCCTGTGAGAAGGAATGTATTGATCC R_GTTTCCAAGACATAAATCTTGCC	N-terminal	B (NKND)	D. <i>Duffy</i> F1 e F2
PFA0125c	EBA181	F_GGATCCTATGGTAGGAAAGGGGAATATTG CACCAAGCAGTAGGATTAAGTAC	N-terminal	T	D. <i>Duffy</i> F1
PF11_0344	AMA1A	F_GGATCCACACCGGTAGCTACGGGAAATC CAATTTCCATCGACCATAATCCG	N-terminal	T	D. PAN1 e RID
	AMA1B	F_GGATCCAACACCGGTAGCTACGGGAAATC AGCAGTAGTAGCAATGTATGATG	N-terminal	B e T	D. PAN1 e PAN2
PF11_0486	MAEBL	F_GGATCCAGAAGTCCATCTATAGGAG GTCATATTCATTTCCCTTATA	N-terminal	T	D. PAN2

A Tabela 3 mostra os pares de oligos para genes *surf* desenhados em 2007, após reanotação dos genes e a localização genômica dos fragmentos amplificados e expressos. Todos os fragmentos exibem polimorfismos.

Tabela 3- Pares de oligonucleotídeos para amplificação de genes *surf*. Sítios de *Bam*H1 em negrito. Não existem informações sobre epítomos imunes, na base de dados *IEDB*, para as proteínas SURFIN das células com sinal de interrogação. As células com traços representam proteínas SURFIN que possuem epítomos imunes descritos, mas não estão presentes nos fragmentos expressos. Apenas a sequência expressa do S 14.1 apresenta epítomos imunes descritos.

Genes	Proteína	Oligos	Localização	Epítomos imunes
PFA0625w	S 1.1	F_GGATCCC CAGATATTAATGAAGAGGTTG R_TAAAGTGGGGCCCTCTTTATGC	Éxon 1	-
PFA0650w	S 1.2	F_GGATCC ACTATTGAAGTAAGACAAGGTG R_CATCATCGGTTTCAGATACAGGG	Éxon 1	-
PFA0725w	S 1.3	F_GGATCC AGGATAAAAAGAAGGGATGTAC R_AGATCTTCATCATCAGAGTAC	Éxon 1	?
PF0100c	S 4.1	F_GGATCC GCAGTTGAAACAATAATGTCCC R_GTCCTGACACAACATATGTCC	Éxon 1	?
PF01160w	S 4.2	F_GGATCC GGTACTGGGTCTGTATTTTATTC R_GATCTTCCATCTGAACCAGAACG	Éxon 1	-
MAL8P1.1	S 8.1	F_GGATCC TGCTTAGAATTTAATGAATGGG R_CCTTTTCAGATGGATATACAGG	Éxon 1	?
PF08_0002	S 8.2	F_GGATCC CAGATGCCCTTTAAATTATCATG R_GCTTTAGGTGTCATCGTACTTC	Éxon 1	?
MAL8P1.162	S 8.3	F_GGATCC TATTGTGAAGAAAGGGATAAAAAG R_TGTCTAAACATTCCAGATTCCG	Éxon 1	?
PF13_0075	S 13.1	F_GGATCC CATGGATATTGATATTCCTCATG R_CATCTTCTTGAGGTCCATCTTG	Éxon 1	?
PF14_0747	S 14.1	F_GGATCC GATCATACGCAATCTTGTGGG R_CTATGATCATTAGGTTTCCCG	Éxon 1	B

- **Oligonucleotídeos para análise de transcrição de genes *surf***

Pares de oligonucleotídeos para os 10 genes *surf*, específicos para amplificação por PCR em tempo real (RT-qPCR), a partir de cDNA, foram desenhados, utilizando como molde o genoma da cepa 3D7. Os pares foram construídos utilizando o software *Primer3*, ajustados para terem a mesma temperatura de *melting* (60°C) dos pares de oligonucleotídeos utilizados para amplificação de transcritos do gene PF07_0073, que codifica para *seryl-tRNA-synthetase*. Esse gene constitutivo é transcrito durante todo o ciclo biológico do parasita e é utilizado como controle da transcrição, em cada fase do ciclo eritrocítico (130, 131). Os pares são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Pares de oligonucleotídeos para genes *surf* para reações de RT-qPCR.

Genes	Oligos
PFA0625w	F_GAAGAATGGAAAATGACCAAGG R_TCGAAATCGTCCTCTTCGTT
PFA0650w	F_CCCCTGTATCTGAACCGATG R_CGTTTGAGCAAGATGGGAAT
PFA0725w	F_AAAATTCCGGAACAAGACCA R_ATTCCAGATTCCGCATGAAC
PFD0100c	F_ACACTTGCACAAAACAAACAGG R_CCATCAACTTGCGTTTTCAATA
PFD1160w	F_TCACGAACGCTTGATAGTGC R_TTGCTTTGACCTTCACTTCG
MAL8P1.1	F_TGCCATTTGATGAACCAGAA R_GCATGTCGTTCAACCCATCT
PF08_0002	F_ACCTCGAGCGATGGAGATAA R_CTCATTGGGTGATCCATCCT
MAL8P1.162	F_AAAATTCCGGAACAAGACCA R_ATTCCAGATTCCGCATGAAC
PF13_0075	F_TCCCTCATTCTTCAGTTCC R_TTTGCAAAGGGTGGAGTAGC
PF14_0747	F_GAAGGGGGTGATAATGGTGA R_TGAACAATGAGGGAAAACAG

3.13 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

DNA extraído pelo método fenol-clorofórmio foi utilizado nas reações de PCR para amplificar os fragmentos de cada um dos genes das Tabelas 3 e 4. As amostras foram colocadas no termociclador e submetidas a 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto (desnaturação), temperatura de *annealing* específica de cada oligo por 1 minuto (*annealing*), 72 °C por 1 minuto (extensão) e extensão final, no último ciclo, de 72 °C por 10 minutos. Posteriormente, a reação foi incubada a 15 °C, no termociclador ou congelada a -20 °C até análise. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Brometo de Etídio (0,5–1,0 µg/ml) e visualizado sob luz UV.

3.14 Purificação de fragmentos em gel de agarose pelo método *glassmilk* (132)

Os fragmentos amplificados foram recortados do gel, colocados em microtubos estéreis e purificados, através de cromatografia de afinidade, utilizando solução de sílica a 100 mg/ml em 3 M de NaI (*glass milk*).

Primeiramente, 300 µl de solução contendo 6 M de NaI e 50 mM de Tris-HCl pH 6.8 foram adicionados a cada tubo e os tubos foram incubados a 37 °C, em banho-maria, até solubilização do gel. 5 µl de *glass milk* foram adicionados aos tubos e nova incubação por 10 minutos, a TA, foi realizada. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 1 minuto e o

pellet foi lavado 1x com 1 ml de tampão *new wash* (20 mM de Tris-HCl pH 7.5, 0,01 M de NaCl, 2 mM de EDTA pH 8.0 e 70% (v/v) de etanol). Nova centrifugação foi realizada. O *pellet* completamente seco foi incubado com 20 µl de solução *low TE* (5 mM de Tris-HCl pH 8.0 e 0,05 mM de EDTA pH 8.0) por 15 minutos, centrifugado e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril. O fragmento purificado, pronto para uso, foi mantido a -20 °C.

3.15 Clonagem e purificação dos plasmídeos recombinantes

Os fragmentos de DNA amplificados e purificados foram inseridos nos vetores pTZ57R-T ou pGEM-T *easy*, conforme as orientações dos fabricantes Fermentas (Vilnius, Lituânia) ou Promega (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), respectivamente.

Os plasmídeos ligados foram introduzidos em bactérias *E. coli* DH10B quimiocompetentes, através da técnica de transformação por choque térmico (133). Após crescimento *overnight* a 37 °C em placas de Petri, contendo meio LB-Ágar suplementado com ampicilina, X-Galactose e IPTG, cada colônia branca foi inoculada em 1,5 ml de meio LB líquido, suplementado com ampicilina e colocada para crescer *overnight*, a 37 °C, sob agitação contínua. Os plasmídeos recombinantes foram extraídos, conforme descrito anteriormente e submetidos à análise por enzimas de restrição, segundo as orientações dos fabricantes.

3.16 Seqüenciamento e identificação de genótipos diferentes circulantes

Os plasmídeos obtidos foram seqüenciados utilizando *BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), em um volume final de 6 µl, contendo 200-300 ng de plasmídeo, 5 µmol de oligonucleotídeo *sense* e/ou *antisense* (de acordo com cada plasmídeo utilizado) e 4 µl de *Big Dye Mix*. As reações foram submetidas a 25 ciclos de 10 s a 96 °C, 5 s a 50 °C e 4 min a 60 °C. Após a reação de *Cycle Sequencing*, as amostras foram precipitadas com isopropanol a 75%, lavadas com etanol a 70%, ressuspendidas em formamida e aplicadas em um seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Completado o seqüenciamento, as seqüências foram conferidas no programa *BLAST/nucleotide* quanto à indentidade e orientação no vetor de clonagem,

principalmente no vetor pTZ57R-T. Em seguida, as sequências foram carregadas no programa *Clustal X* (versão 1.83) e alinhadas. Após o alinhamento foi gerada uma matriz de identidade (MI), que foi analisada mediante um script *PERL*, onde sequências com mais de 95% de identidade foram consideradas idênticas. Representantes de cada grupo de sequências definidas como idênticas foram escolhidos para serem expressos. Dados de sequências gênicas, relativas ao bloco 2 de MSP1 (134) e MSP2 (135), anteriormente publicados, foram utilizados para classificar as sequências desses fragmentos nos grupos alélicos descritos.

3.17 Expressão de peptídeos recombinantes fusionados a GST

Os fragmentos clonados em pTZ57R-T foram subclonados em vetor de expressão pGEX2T digerido com *Bam*HI ou com *Bam*HI e *Eco*RI e os fragmentos clonados em pGEM-T *easy* foram subclonados em vetor pGEX2T digerido com *Bam*HI e *Eco*RI. Os clones obtidos em pGEX2T_*Bam*HI foram novamente sequenciados para verificar a orientação no vetor.

Os clones com o inserto, na orientação correta, foram re-transformados em bactérias *E.coli* BL21-RIL e plaqueados em placas LB-Ágar suplementado com Ampicilina (100 µg/ml) e Cloranfenicol (34 µg/ml). O pré-inóculo foi preparado *overnight* a 37 °C sob agitação contínua, em 5,0 ml de meio LB líquido suplementado com ampicilina, cloranfenicol e 0,8% de glicose. Posteriormente, o pré-inóculo foi transferido para 50 a 100 ml de meio LB suplementado com os antibióticos supracitados, a 37 °C, sob agitação contínua, até atingir a densidade óptica (DO) maior ou igual a 0,6, a 600 nm. A indução da transcrição da sequência de GST e do fragmento fusionado foi feita pela adição de 0,1 mM de IPTG (*isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*), um indutor do promotor *lac*. Após 3 horas de crescimento a 37 °C, sob agitação contínua, o material foi submetido à purificação protéica. A cultura foi transferida para tubos Falcon de 50 ml, centrifugados por 20 minutos a 4 °C, a 2342,4 g (Sorvall RT7 Refrigerated Benchtop centrifuge). Os pellets foram dissolvidos em 2,0 ml de solução PBS 1X pH 7.4 acrescido de 0,1% de TritonX100 e transferidos para um tubo único de 50 ml. Lisozima foi acrescentada a 0,1 mg/ml, o material foi incubado por 5 minutos, a TA e em seguida congelado. Posteriormente, o material foi sonicado (5 ciclos de 30 segundos, força 40 a 4 °C, intercalados por 30 segundos de pausa, a 4 °C). e 3 ml de PBS 1X pH 7.4 acrescido de 0,1% de TritonX100 foram adicionados. Nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições acima por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon

de 15 ml e incubado com 100-200 µl de resina *Glutathiona-sepharose*, pré-lavada com PBS 1X. Após 1 hora de incubação, a TA, sob agitação contínua, a resina foi lavada 4 vezes (uma vez com 15 ml de PBS 1X pH 7.4 acrescido de 0,1% de TritonX100 e mais três vezes com PBS 1X pH 7.4), intercaladas com centrifugações de 1-2 minutos, a TA, a 1255 g, em centrífuga Sorvall RT7. 500 a 750 µl de tampão de eluição (0,1 M de Tris-HCl pH 8.0, 0,12 M de NaCl e 10 mM de glutathiona reduzida) foram acrescentados e a resina foi transferida para microtubos de 1,5 ml e incubada por 45 minutos, a TA, sob agitação contínua. O sobrenadante foi recolhido após centrifugação por 1 minuto a 12.000 rpm. Uma alíquota do peptídeo recombinante foi submetida à eletroforese em gel de pliacrilamida a 8% em tampão de SDS-PAGE (136-138) e a quantificação foi obtida pela curva de *Bradford*.

Alguns peptídeos foram obtidos em temperaturas diferentes de indução, em relação ao protocolo padrão. Os peptídeos SURFIN 4.1 e MAEBL foram obtidos a 28 °C e os peptídeos SURFIN 8.1 e 13.1 foram obtidos a 25 °C.

3.18 Ensaio de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Placas de 96 poços, fundo chato, próprias para reações de ELISA, foram sensibilizadas com 50 µl/poço de peptídeo diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6, a uma concentração de 125 ou 200 ng/poço para placas *medium binding* e *low binding*, respectivamente. As placas foram testadas, previamente, quanto à adesão do peptídeo nos poços, através da sensibilização dos poços com proteína GST recombinante e reconhecimento por plasmas de camundongos imunizados com GST. As placas também foram testadas, previamente, quanto à quantidade de peptídeo usada na sensibilização, a fim de serem gerados resultados semelhantes, nos dois tipos de placas utilizadas.

Os plasmas dos pacientes foram testados em duplicata, tanto para o peptídeo fusionado a GST, como para GST isoladamente. Plasmas de indivíduos nunca expostos à malária foram utilizados como controles negativos, em cada placa testada. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas com solução de bloqueio por 2 horas, a 37 °C e lavadas 3 vezes com solução de lavagem. Em seguida, os plasmas dos pacientes foram acrescentados, diluídos 1/200 em solução de incubação, por 1 hora, a 37 °C. Após 5 a 7 lavagens, anticorpo secundário de ovelha anti-IgG humana, acoplado a enzima peroxidase (KPL) e diluído 1/1500 em solução de incubação, foi acrescentado, por 1 hora, a 37 °C. Novo ciclo de lavagens foi realizado e 50 µl/ poço do substrato TMB (KPL) foram acrescentados. Após 5 a 10 minutos, a

reação colorígena foi interrompida com 50 µl/poço de HCl a 1 M. As densidades ópticas (DOs) foram determinadas em espectrofotômetro, a 450 nm de comprimento de onda (referência 595 nm).

O valor da média das DOs anti-GST foi subtraído da média das DOs anti-peptídeo fusionado, para cada plasma, chegando-se a um valor de DO final. O *cutoff* da reação, para cada antígeno testado, foi estabelecido, calculando-se a média das DOs finais do grupo controle e somando dois desvios padrões (DP) da média a esse valor. Os plasmas com DOs maiores do que o *cutoff* foram considerados positivos. Índices de Reatividade (IR) de cada plasma positivo, para cada antígeno, foram obtidos dividindo-se o valor das DOs finais pelo *cutoff* da reação.

As reações para identificação das subclasses de IgG foram realizadas como descrito acima. Plasmas com Índice de Reatividade (IR) maior do que 10 para cada antígeno foram selecionados para a isotipagem. A mesma diluição primária foi mantida (1/200) e os anticorpos monoclonais de camundongo, anti-subclasses de IgG humanas (anti-IgG1 (2C11, ab1927), anti-IgG2 (3C7, ab1935), anti-IgG3 (5G12, ab1928) e anti-IgG4 (5C7, ab1930), Abcam, Inc., Cambridge, Massachusetts, USA) foram adicionados, posteriormente, na diluição 1/3000 em solução de incubação. Posteriormente, um anticorpo secundário de ovelha anti-IgG de camundongo, acoplado a enzima peroxidase (KPL) e diluído 1/2500 em solução de incubação, foi acrescentado.

A diluição primária dos plasmas foi mantida, a fim de preservar parâmetros observados nas reações de ELISA para detecção de IgG total. A diluição dos anticorpos monoclonais foi estabelecida, a partir de um teste envolvendo os antígenos recombinantes MSP1₁₉ e MSP3, dois plasmas de indivíduos da amostra com IR>10 aos antígenos e dois plasmas de indivíduos da amostra, não-reativos aos antígenos recombinantes. Os monoclonais foram utilizados, para cada uma das situações, nas diluições 1/1500 e 1/5000. Não foram observadas diferenças entre as subclasses de IgG nos plasmas reativos aos antígenos, nas duas diluições, assim como, não foram detectadas diferenças entre os plasmas não-reativos, nas duas diluições. Dessa forma, optou-se por utilizar os monoclonais na diluição 1/3000.

3.19 Análises estatísticas dos dados obtidos

Os softwares *Microsoft Excel* e *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)*, versão 15.0 foram utilizados para as análises estatísticas.

As frequências de reconhecimento dos peptídeos testados pelos plasmas dos sintomáticos e assintomáticos foram comparadas, em planilhas do *Excel*, pelo teste do X^2 de *Pearson*, a partir de tabelas de contingência 2x2, com 1 grau de liberdade, assumindo significância estatística para valores de $p < 0,05$.

Testes não-paramétricos foram usados para comparar os valores de IR obtidos nos ensaios de ELISA com os plasmas sintomáticos, assintomáticos e com aqueles coletados no T30 e no T60, para cada antígeno testado. Os valores das variáveis que medem exposição à malária e à malária falciparum discriminadas adiante, também foram comparados por teste não-paramétrico. Esses testes são utilizados para comparar médias de variáveis quantitativas, através da comparação das posições (postos, *ranks*) que os valores das variáveis ocupam, quando ordenados em forma crescente.

O teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* (U teste) foi usado para comparações entre dois grupos independentes e o teste não-paramétrico de *Wilcoxon*, para comparações entre dois grupos relacionados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes, para a rejeição da hipótese nula de não-diferença entre as variáveis.

A verificação de associação entre as variáveis qualitativas dicotômicas “sintomas” (sim-sintomático ou não-assintomático) e “resposta aos antígenos” (responde ou não-responde) foi realizada pelo teste do X^2 de *Pearson*, a partir de tabelas de contingência 2x2, com 1 grau de liberdade. A força da associação foi traduzida pelo coeficiente V de *Cramér*, que assume valores entre 0 e 1, expressando a intensidade da associação desde nula (0) até perfeita (1). Valores de *odds ratio* (razão de chances) foram calculados, a partir de tabelas que demonstraram associação verdadeira entre as variáveis, ou seja, com nível de significância $p < 0,05$ para o teste do X^2 . Os valores das *odds* representam as chances dos indivíduos que não-respondem a um antígeno em apresentar um perfil assintomático, em relação aos indivíduos que respondem a esse antígeno. Todos os valores foram menores do que 1 indicando que o grupo de pessoas que responde ao antígeno tem mais chances de não apresentar sintomas do que o grupo que não-responde.

Tentativas de predição do perfil assintomático e de um maior período livre de doença, a partir do efeito da intensidade do reconhecimento imune de certos antígenos e da contínua exposição ao *P. falciparum*, foram realizadas através de regressão logística e regressão linear múltipla, respectivamente.

Primeiramente, para análise por regressão linear múltipla, coeficientes de correlação de *Pearson* (r_p) foram determinados entre as variáveis explanatórias e a variável resposta. As variáveis explanatórias para cada indivíduo da amostra, cujo plasma foi testado, foram: IR

para cada antígeno, idade, TVAE (tempo de vida em área endêmica), TVEA (tempo de vida no endereço atual), NEPF (números de episódios prévios de falciparum) e NAR (número de antígenos recombinantes reconhecidos). A variável resposta foi considerada como o TUES. Nesse tipo de análise, as variáveis que estão associadas, independentemente, com a variável resposta são escolhidas para entrar no modelo de regressão múltipla. O valor de r_P varia de +1 a -1. Os valores próximos a 0 (zero) ou 0 indicam associação fraca a ausente entre as variáveis, enquanto valores próximos aos pólos +1 ou -1 indicam associação forte. O sinal + ou - indica a direção da associação, direta ou indireta. Em seguida, coeficientes de correlação parcial foram determinados para cada variável explanatória que apresentou correlação positiva com a variável resposta, tentando eliminar o efeito das demais variáveis explanatórias, na associação da primeira com a variável resposta, pois a maioria delas correlacionou-se entre si.

A predição do perfil assintomático, a partir da intensidade do reconhecimento humoral dos antígenos foi realizada através de regressão logística. A variável resposta “sintoma” foi categorizada em sim: (0)-sintomático e não: (1)-assintomático. Em regressão logística, o valor esperado da variável resposta (1 ou 0), sob a forma de logaritmo da razão de chances de ser 1, pode ser escrito como a função linear das variáveis explanatórias: $\ln(p/1-p) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_q x_q$. Os coeficientes de regressão (β) fornecem a mudança estimada no logaritmo da razão de chances (*log-odds*), decorrente da mudança em uma unidade, da respectiva variável explanatória, condicional à constância das demais variáveis explanatórias da equação.

Primeiramente, cada variável explanatória foi analisada no modelo univariado, a fim de testar a associação positiva com a variável resposta, pelo teste *likelihood ratio* (LR) *test*. A força da associação é fornecida pelo teste de *Wald*, com o cálculo do valor exponencial do *log-odds* ou *odds ratio* (OR). O valor da OR vai indicar quantas vezes aquela variável explanatória oferece de chances para a variável resposta assumir o valor 1 ou o perfil assintomático, nesse caso. Se a OR de cada variável estiver dentro do Intervalo de Confiança (IC) de 95% com valor de p significativo, a variável é analisada no modelo de análise multivariada pelo teste da razão de verossimilhança parcial (LX). Esse teste estabelece, para x variáveis explanatórias hipotéticas, como hipótese nula (H_0), que todos os coeficientes de regressão (β) são iguais a 0 e como hipótese alternativa (H_a), que existe, pelo menos, um $\beta \neq 0$. O método escolhido para entrar no modelo foi o *forward stepwise*. As variáveis identificadas na análise univariada com menor valor de p ou, em caso de empates do valor de p , com a maior OR entram, sucessivamente, no modelo. A variável que perde a significância ao entrar no modelo, ou que provoca um aumento grande no valor da OR e do respectivo

intervalo de confiança (IC) das variáveis adicionadas anteriormente, processo chamado de *over fitting*, é retirada do modelo. Dessa forma, conseguimos estimar as chances que o reconhecimento mais intenso de cada variável explanatória independente fornece ao desenvolvimento do perfil assintomático.

3.20 Imunizações de camundongos Balb/c com peptídeos recombinantes

Antígenos SURFIN e MSP3_3D7 expressos foram utilizados para imunizar camundongos Balb/c de 4 a 6 semanas de vida, em colaboração com o mestrando do laboratório Wesley Luzetti Fotoran. Os animais foram submetidos a uma primeira dose inicial, intraperitoneal, de 50 µg do peptídeo recombinante emulsificado com adjuvante de Freund completo (óleos e DNA de micobactérias), seguida de mais duas doses com intervalos de 3 semanas, com a mesma concentração inicial do peptídeo, emulsificado em adjuvante de Freund incompleto. Dez dias após a última dose, uma pequena amostra de sangue foi coletada da região peri-orbitária dos camundongos. O soro foi separado por precipitação de hemácias, a 37 °C, por 30 minutos, seguida de incubação, a 4 °C, por 30 minutos e centrifugação, a 1500 rpm, por 5 minutos, a TA.

Glicerol a 50% (v/v) foi adicionado aos soros e posteriormente, a concentração de anticorpos IgG em mg/ml de cada soro extraído foi determinada através de espectrofotômetro a 280 nm de comprimento de onda, no aparelho Nanodrop. Esse comprimento de onda é específico para quantificação de anticorpos IgG.

3.21 Cultura de *Plasmodium falciparum* (Pf)

A cultura da cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* foi utilizada nos experimentos de análise de transcrição de genes *surf* pela técnica de PCR em tempo real (*real time* PCR).

A cultura foi estabelecida conforme o método descrito por Trager & Jensen (6), com algumas modificações. Os parasitos foram cultivados em meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Atena, Campinas) pH 7.2, suplementado com 25 mM de HEPES, 21 mM de NaHCO₃, 370 µM de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 µg/ml de gentamicina e 10% de plasma humano.

A cultura foi alimentada com eritrócitos lavados, totalizando um hematócrito de 5%. As garrafas foram mantidas em estufa, a 37 °C, em atmosfera *candle jar*, com trocas diárias de meio. A parasitemia foi monitorada mediante microscopia de esfregaços corados com *kit* Panótico Rápido (Laborclin, São Paulo, SP, Brasil). O plasma humano 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 descomplementado a 56 °C, por 30 minutos. O plasma foi centrifugado a 2342,4 g, por 15 minutos, a 4 °C para precipitar a fibrina e guardado em alíquotas a -20 °C.

3.22 Sincronização de parasitas com (D-) sorbitol (139)

Para obtenção de estágios de anel (até 10 h após a reinvasão) de *P. falciparum*, os parasitas em cultura foram sincronizados por tratamento com sorbitol. Eritrócitos infectados por *P. falciparum* em cultura assincrônica foram centrifugados a 1500 rpm, por 5 minutos a TA e incubados em 20 volumes do precipitado das hemácias infectadas, de sorbitol a 5%, por 10 minutos. Durante os 10 minutos, a solução foi agitada três vezes. Após nova centrifugação, o sorbitol foi aspirado e as hemácias foram lavadas uma vez com meio RPMI-1640 incompleto (sem plasma, pH 6.8). Em seguida, os parasitas foram cultivados a 37 °C, sob condições normais.

3.23 Enriquecimento de trofozoítos maduros e esquizontes (140)

Cultivos de parasitas, predominantemente formas maduras, foram centrifugados em tubos Falcon de 15 ml a 1500 rpm, por 5 minutos e o precipitado foi ressuspenso em 2,4 volumes de Voluven 6% (Fresenius Kabi; São Paulo, SP, Brasil) e 1,4 volumes do meio completo (RPMI-1640, pH 7.2 e 10% de plasma humano). A solução foi incubada em posição vertical, por 20 minutos, a 37 °C. As formas de anel e gametócitos precipitam-se, junto com eritrócitos não-infectados, no fundo do tubo, enquanto as formas maduras encontram-se no sobrenadante. Essas formas foram retiradas e transferidas para um novo tubo, lavadas e colocadas novamente em cultivo.

3.24 Coletas de RNA total da cultura da cepa 3D7 para PCR em tempo real

Três experimentos consecutivos de PCR em tempo real (RT-qPCR) foram realizados, a partir de transcritos da cultura sincronizada da cepa 3D7, previamente selecionada para um fenótipo de citoaderência, após *panning* em células CHO-CD36 (141). Os transcritos foram coletados em 3 fases do ciclo (anel, trofozoíto e esquizonte), a cada 20 gerações ou 10 ciclos de vida do parasita. A cultura foi tratada com sorbitol e enriquecida com estágios maduros, ao longo do tempo, para manter a sincronização.

Após 20 gerações, RNA das fases de anel (4-6 horas), trofozoíto (19-23 horas) e esquizonte (27-33 horas), de um mesmo ciclo, foram coletados, para cada um dos 3 experimentos. As parasitemias dos 3 ciclos em que houve coleta variaram de 8% a 2,5%.

As hemácias foram recolhidas da cultura, centrifugadas a 1500 rpm, a TA, por 5 minutos e posteriormente, lisadas em solução de PBS 1X e saponina a 0,1%. Após centrifugação a 2800 rpm, a TA, por 15 minutos, o pellet de parasitas foi ressuspensionado em 250 µl de PBS 1X, lisado com 750 µl de Trizol LS (Invitrogen, Life Technologies) e armazenado a -80 °C até a sua utilização. O RNA foi extraído de acordo com as instruções dos fabricantes dos reagentes utilizados.

3.25 Reação de transcrição reversa (RT-PCR)

O RNA extraído (1-5 µg) foi tratado por três vezes com a enzima DNase I (Fermentas), como descrito pelo manual do fabricante, a fim de eliminar qualquer contaminação residual de gDNA. O tratamento com DNase I consistiu de 3 incubações de 15 minutos, a 20 °C e inativação da enzima pela adição de 2,5 mM de EDTA e incubação a 65 °C, por 10 minutos. A qualidade do RNA purificado foi determinada por análise em gel de agarose.

A reação da transcriptase reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos randômicos. 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, este fosse detectado.

3.26 PCR em tempo real (RT-qPCR)

Os experimentos foram conduzidos utilizando o kit da Promega (SYBR® Green I) e o termociclador Realplex2/2 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

Primeiramente, foi testada a eficiência de cada par de oligonucleotídeos, utilizando gDNA como substrato, nas diluições 1:100, 1:1.000 e 1:10.000. As diluições foram testadas em triplicata e os respectivos ΔC_t (número de ciclos, a partir do quais, há transcritos amplificados) foram comparados, com aqueles obtidos nas ampliações do gene PF07_0073, utilizando também as mesmas diluições de gDNA. Eficiência semelhante a melhor foi obtida com os pares de oligonucleotídeos para genes *surf*, comparativamente, com o par de oligonucleotídeos para o gene constitutivo, nas 3 diluições de gDNA.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos serão mostrados na seguinte ordem:

1. Dados epidemiológicos sobre os indivíduos da amostra, comparando as variáveis que medem exposição à malária entre sintomáticos e assintomáticos,
2. Resultados sobre a amplificação de fragmentos dos genes *surf* e a resposta humoral dos indivíduos contra proteínas SURFIN expressas,
3. Resultados sobre a amplificação dos genes das proteínas da família das MSP e a resposta humoral contra essas proteínas expressas, pelos dois grupos clínicos,
4. Resultados sobre a amplificação dos genes de algumas proteínas secretadas pelas organelas do complexo apical, assim como, a resposta humoral contra elas,
5. Análises sobre a associação entre a resposta humoral contra alguns antígenos e o desenvolvimento do perfil assintomático.

4.1 Análise comparativa das variáveis de exposição à *P. falciparum* entre sintomáticos e assintomáticos

Tabela 5- Análise descritiva das variáveis de exposição ao *P. falciparum* na amostra e entre assintomáticos (A) e sintomáticos (S).

Variáveis	N (A/S)	Variação	Média	DP	Média A	Média S
Idade	51 (24/27)	4-84	29,94	19,190	34,54	25,85
TVAE	51 (24/27)	4-83	28,41	19,042	32,88	24,44
TVEA	51 (24/27)	0-60	15,59	14,767	19, 15	12,43
NEPF	47 (23/24)	0-30	5,11	5,768	6, 43	3,83
NAR	51 (24/27)	0-26	12,27	5,963	13, 8	11,30
TUES	48 (24/24)	0-30	4,26	7,816	7,09	1,42

A tabela acima mostra os valores das variáveis que quantificam exposição à malária e à malária falciparum, na amostra total e nos grupos clínicos. As médias dos valores das variáveis quantitativas: idade, TVAЕ (tempo de vida em área endêmica), TVEA (tempo de vida no endereço atual), NAR (número de antígenos recombinantes reconhecidos), NEPF (número de episódios prévios de falciparum) e TUES (tempo transcorrido desde o último episódio sintomático) são maiores entre o grupo de assintomáticos do que em sintomáticos.

Porém, comparando esses valores pelo teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* não foi encontrada diferença entre as variáveis, segundo o perfil clínico. A única variável com tendência de valores significativamente maiores entre assintomáticos foi TUES (*Mann-*

Whitney (U)=197,5, $p<0,062$). Gráficos de barras da distribuição dos assintomáticos e sintomáticos, por faixas dessas variáveis, são apresentados abaixo.

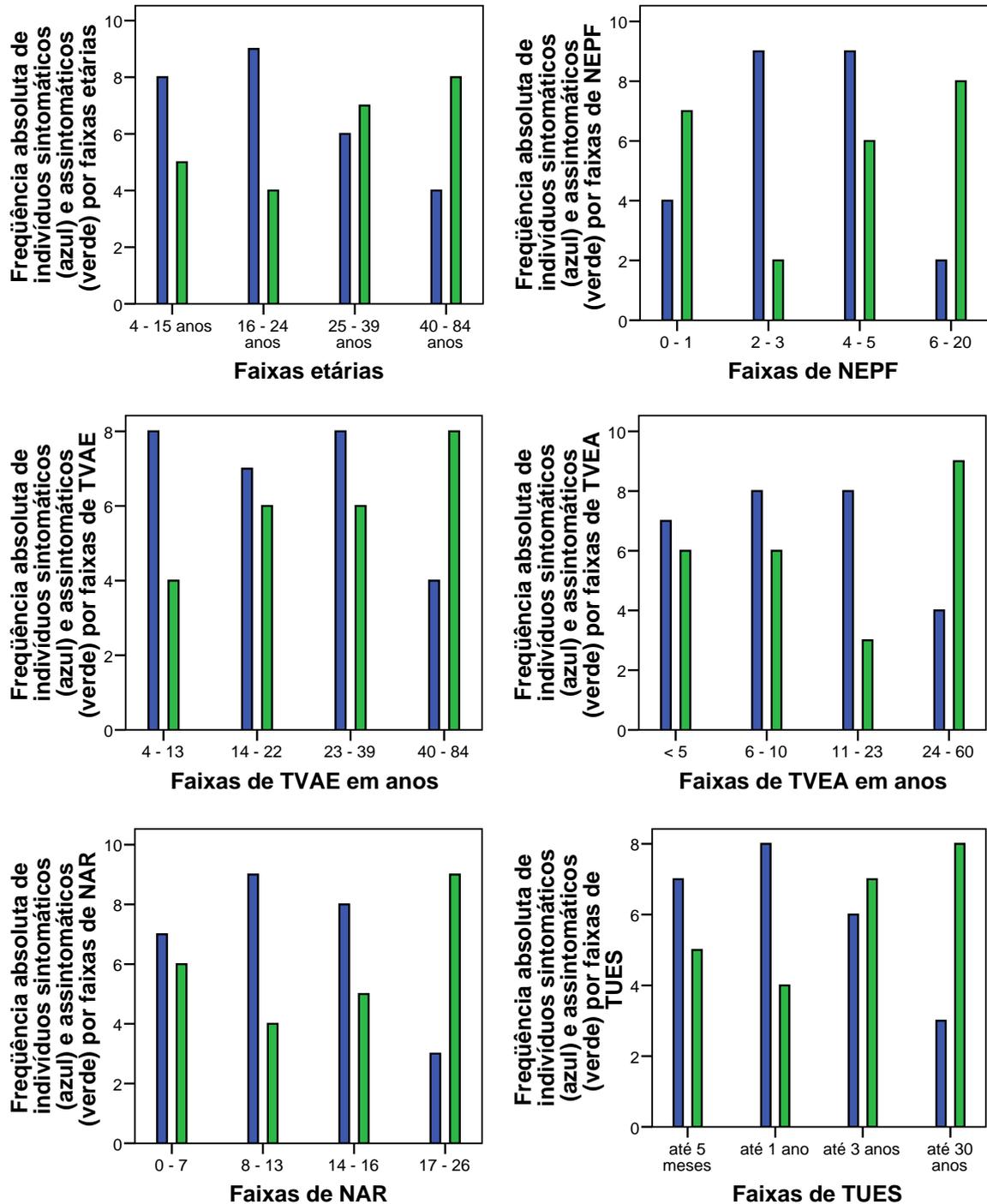


Figura 7- Gráficos de barras da frequência dos indivíduos assintomáticos (em verde) e sintomáticos (em azul) por faixas das variáveis de exposição.

4.2 Genes *surf* e proteínas SURFIN

Os resultados apresentados nessa parte abordarão os seguintes aspectos sobre os genes *surf* e as proteínas SURFIN expressas:

- Análise da diversidade de sequências dos genes *surf*, encontradas nos isolados da amostra,
- Identificação de plasmas de indivíduos assintomáticos e sintomáticos positivos para anticorpos IgG reativos aos diversos peptídeos SURFIN expressos,
- Análises estatísticas da frequência, intensidade e longevidade da resposta humoral entre sintomáticos e assintomáticos, para cada antígeno expresso,
- Identificação das subclasses de IgG dos plasmas reativos de assintomáticos e sintomáticos, que apresentaram IR>10 para cada antígeno expresso,
- Análise da transcrição dos genes *surf* da cepa 3D7.

4.2.1 Diversidade das sequências dos genes *surf* nos isolados do estudo

Os genes *surf* foram descritos em 2005 (119), porém, poucas informações sobre eles acumularam-se na literatura desde então. (121). Baseado em evidências que sinalizam maior diferença de genes *surf* entre alelos diferentes do que entre cepas diferentes (119), a confecção dos oligonucleotídeos foi conduzida a partir do genoma publicado da cepa 3D7, presente no banco de dados *PlasmoDB*.

Após clonagem, seqüenciamento e alinhamento de fragmentos dos 10 genes *surf* observamos que os fragmentos gênicos amplificados de gDNA de isolados de campo, a maioria de infecções sintomáticas, possuem 91% a 98% de identidade com sequências da cepa 3D7 e de isolados, depositadas na base de dados *GenBank*. A filtragem das sequências alinhadas pelo *script* PERL, o qual considerou idênticas, sequências com mais de 95% de identidade, permitiu evidenciar duas sequências diferentes para os genes PFD1160w e PF08_0002. Uma delas oriunda de um isolado de infecção sintomática e a outra de um isolado de infecção assintomática. A diversidade das sequências encontradas pode ser visualizada no Quadro 1.

Quadro 1- Diversidade de seqüências de genes *surf* entre os gDNAs do estudo. Sequências idênticas compartilham identidade superior a 95%, entre si, segundo o *script PERL*.

gDNAs	Genes <i>surf</i>									
	PFA0625w	PFA0650w	PFA0725w	PFD0100c	PFD1160w	MAL8P1.1	PF08_0002	MAL8P1.162	PF13_0075	PF14_0747
Isolados de infecções Assintomáticas										
Isolados de infecções Sintomáticas										
Isolados do laboratório										
FCR3										
3D7										
Códigos	3D7-like									

A Figura 8 mostra a frequência absoluta de fragmentos amplificados de cada gene *surf*, a partir de gDNA dos isolados encontrados em pacientes sintomáticos e assintomáticos. Foi observada maior prevalência de amplificação de fragmentos, a partir de isolados de infecções sintomáticas. Não foram amplificados fragmentos dos genes PFA0650w e PF13_0075 em gDNAs de isolados de infecções assintomáticas e o número de fragmentos amplificados em isolados de infecções sintomáticas, para os dois genes, foi bastante inferior,

comparativamente, aos demais genes. Não foram amplificadas sequências do gene PF13_0075 em gDNAs dos isolados coletados no corte de 2006.

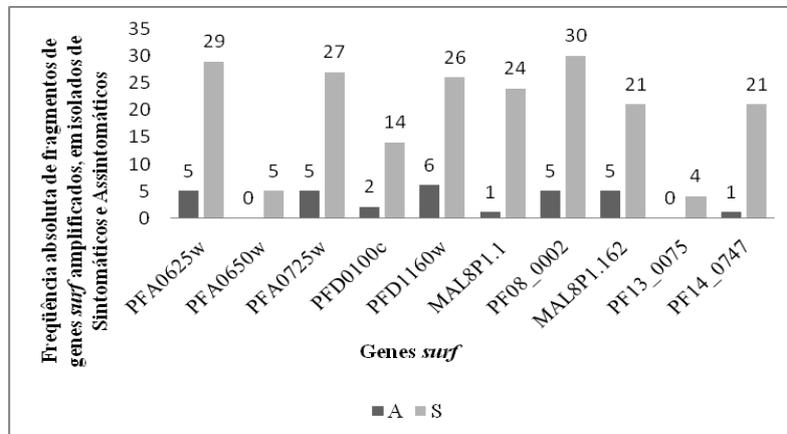


Figura 8- Gráfico de barras da frequência absoluta dos genes *surf* amplificados em gDNAs de isolados de *P. falciparum* de pacientes sintomáticos (S) e assintomáticos (A).

A Figura 9 mostra a frequência de não-amplificações (resultados negativos) ou de amplificações de fragmentos humanos, para cada par de oligonucleotídeos, desenhados para amplificar fragmentos dos genes *surf*. O intenso polimorfismo encontrado no éxon 1 dos genes *surf*, local de hibridação dos pares de oligonucleotídeos, com presença maciça de mutações pontuais (*single nucleotide polymorphism-SNP*), como mostrado no *PlasmoDB*, explicam, em parte, a pequena quantidade de sequências amplificadas, principalmente nos gDNAs dos isolados de infecções assintomáticas. Um maior polimorfismo pode explicar o maior número de resultados negativos em gDNAs de isolados de infecções assintomáticas do que em isolados de infecções sintomáticas. Porém, dificuldades técnicas como a pequena quantidade de gDNA obtida, devido à parasitemia escassa apresentada por esse indivíduos, podem gerar resultados semelhantes.

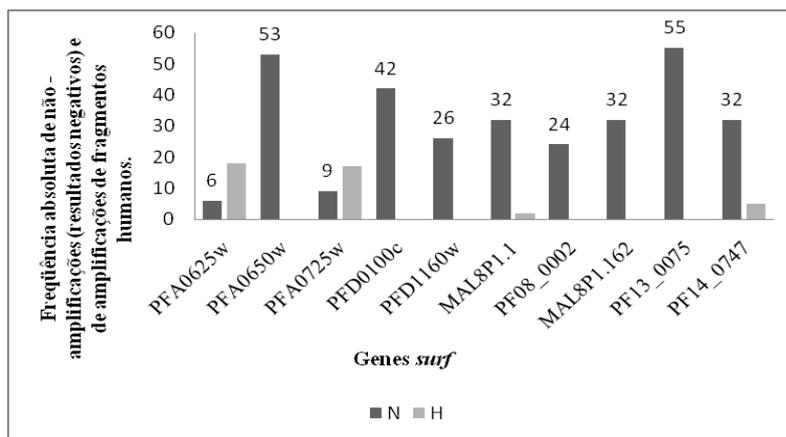


Figura 9- Gráfico de barras da frequência absoluta de não- amplificações (N) e de amplificações de fragmentos humanos (H) para cada par de oligonucleotídeos desenhado para amplificação de fragmentos de genes *surf*.

Existem três hipóteses para explicar porque não obtivemos amplificação em tantos gDNAs de isolados de infecções assintomáticas. Primeiro, o sitio de ligação dos oligonucleotídeos é degenerado devido a SNPs. Segundo, o gene *surf* em questão está ausente no respectivo genoma ou terceiro, o material genômico é escasso, pela baixa parasitemia das infecções assintomáticas.

Através da colaboração da colega do laboratório Dra. Catarina Castineiras, foi avaliada por *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), seguido por *Southern blot*, se a sequência de um determinado gene *surf* está presente ou não em outros genomas de isolados de campo de Rondônia ou se existem polimorfismos nos locais de hibridação dos pares de oligonucleotídeos.

Primeiramente, os 10 genes *surf* foram amplificados por PCR, a partir do gDNA dos isolados presentes no laboratório, anteriormente à coleta de 2006. Esses isolados já estão adaptados à cultura e a presença de grande quantidade de gDNA disponível permitiu utilizá-los nesses experimentos. O mesmo resultado obtido, anteriormente, repetiu-se, ou seja, nem todos os gDNAs apresentaram amplificação (Figura 10, parte A).

Em seguida, material genômico desses isolados foi preparado para análise em PFGE. O gel contendo os 14 cromossomos, de cada gDNA, empilhados em ordem decrescente de peso molecular foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Um fragmento clonado do gene *surf* PFA0625w proveniente de outro isolado de infecção sintomática foi utilizado como sonda para hibridação no *Southern Blot*. Foram observados quatro padrões para o gene *surf* PFA0625w evidenciados na Figura 10. Os gDNAs de cada padrão são mostrados na Tabela 6 abaixo.

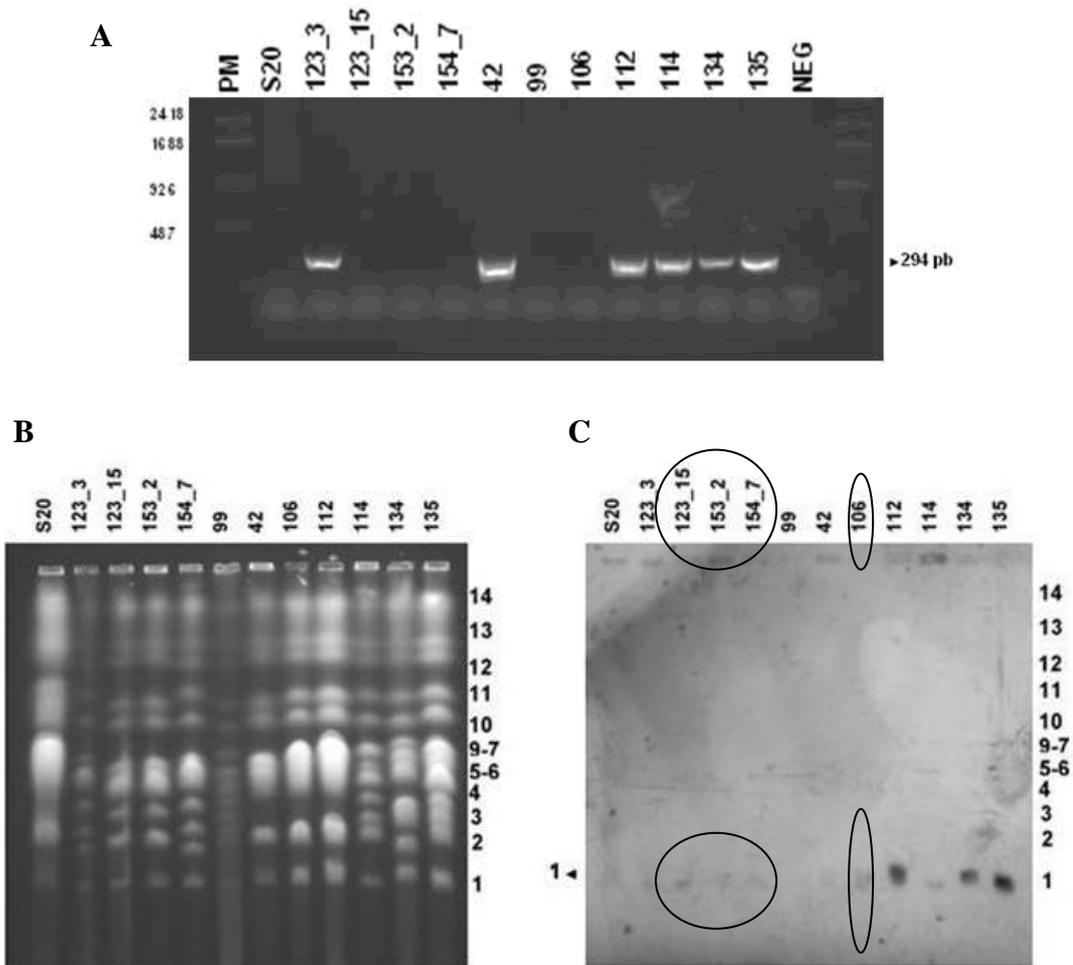


Figura 10- Experimento de PFGE. A. Gel de agarose a 1% com os resultados das amplificações por PCR do gene PFA0625w (fragmento de 294 pares de bases), a partir de gDNA dos isolados assinalados no topo das canaletas. PM=Peso Molecular. B. PFGE, após 36 horas, a partir de gDNA dos mesmos isolados anteriores. Numeração à direita do gel, correspondente às alturas dos 14 cromossomos. C. Southern Blot, a partir do gel mostrado em B. As bandas destacadas estão ausentes do gel de PCR mostrado em A. Sonda utilizada, a partir do isolado 116. Cabe ressaltar que as condições de hibridação/lavagem foram estridentes (lavagem a 68°C).

Tabela 6- Padrões de amplificação por PCR e de marcação em *Southern Blot*/PFGE do gene *surf* PFA0625w, em gDNAs de isolados de Rondônia.

Amplificação do gene PFA0625w por PCR	Força do sinal de hibridação no <i>Southern Blot</i> /PFGE		
	Forte	Fraco	Ausente
Positiva	112, 134 e 135	123_3, 42 e 114	
Negativa		106, 123_15, 153_2 e 154_7	99 e S20

Isso significa que existem polimorfismos do gene PFA0625w tanto na região de hibridação do par de oligonucleotídeos, quanto na região amplificada ou nas duas, e ainda é possível que esse gene esteja ausente do genoma de alguns isolados (99 e S20). O mesmo resultado pode ser válido para os demais genes *surf* de isolados de campo da Amazônia, pois

resultado semelhante foi visto para o gene PFD0100c em isolados de campo de Uganda. Dois pares de oligonucleotídeos relativos a regiões diferentes desse gene foram utilizados, porém em alguns isolados não houve amplificação (121).

4.2.2 Expressão de peptídeos SURFIN recombinantes e frequência do reconhecimento humoral dos peptídeos SURFIN expressos

A partir de fragmentos clonados dos 10 genes *surf*, domínios das proteínas SURFIN, supostamente expostos ao reconhecimento imune, foram expressos em sistema recombinante, fusionados à proteína GST. Além de sequências 3D7-like, foram encontradas entre os gDNAs da amostra sequências diferentes dos genes *surf* PFD1160w e PF08_0002. Todas as sequências diferentes de cada gene foram expressas, totalizando 12 peptídeos SURFIN. Em seguida, o reconhecimento imune destes domínios foi testado por plasmas dos indivíduos sintomáticos e assintomáticos e por um grupo de plasmas de indivíduos assintomáticos e sintomáticos, coletados nos períodos de 30 e 60 dias, pós-tratamento. A Figura 11 apresenta o resultado da eletroforese de peptídeos SURFIN em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 8%, em condições redutoras.

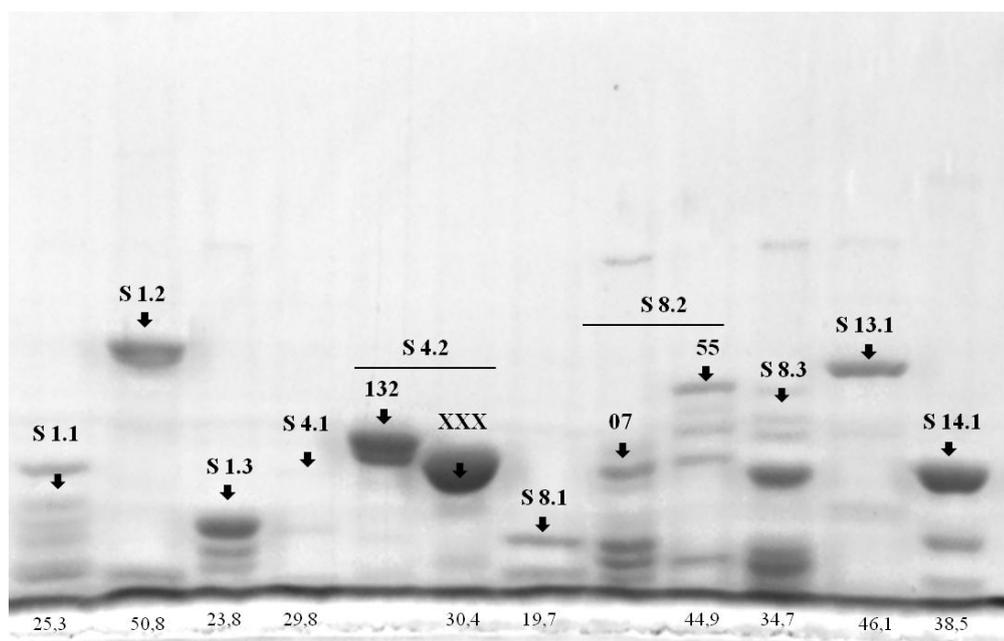


Figura 11- Eletroforese de proteínas SURFIN (S) recombinantes em gel de poliacrilamida a 8%. As alturas das bandas (flechas) correspondem às proteínas fusionadas a GST (PM=26 kDa). A numeração abaixo das canaletas corresponde ao PM esperado, em kDa, do peptídeo fusionado. As proteínas estão a 0,2 µg/µl e 40 mM de DTT foram adicionados às amostras.

A Tabela 7 apresenta 5 antígenos, em destaque, que apresentaram maior frequência de reconhecimento humoral nos ensaios de ELISA, por plasmas de indivíduos assintomáticos do que por sintomáticos, com valores de $p < 0,05$, pelo teste do X^2 de *Pearson*.

Tabela 7- Frequência absoluta (n) e em porcentagem (%) do reconhecimento humoral de antígenos SURFIN por Sintomáticos (S) e Assintomáticos (A). Em destaque (#), $p < 0,05$.

Peptídeos SURFIN (S)	S (27)		A (24)		Valor de $p <$
	n	%	n	%	
S 1.1 #	1	3,70	6	25	0,02
S 1.2	19	70,37	15	62,50	0,55
S 1.3	2	7,40	2	8,33	0,90
S 4.1 #	2	7,40	6	25	0,02
S 4.2_132 #	1	3,70	6	25	0,02
S 4.2_XXX	6	22,22	8	33,33	0,37
S 8.1	6	22,22	8	33,33	0,37
S 8.2_07	0	0	2	8,33	0,12
S 8.2_55 #	2	7,40	7	29,16	0,019
S 8.3	9	33,33	5	20,83	0,31
S 13.1 #	11	40,74	17	70,83	0,03
S 14.1	2	7,40	4	16,66	0,30

O antígeno com maior frequência de reconhecimento, tanto por sintomáticos quanto por assintomáticos foi o SURFIN 1.2, seguido pelo SURFIN 13.1. O SURFIN 8.2_07 não foi reconhecido por nenhum dos pacientes sintomáticos. Os resultados dispostos na Tabela 7 encontram-se exemplificados no gráfico de barras da Figura 12.

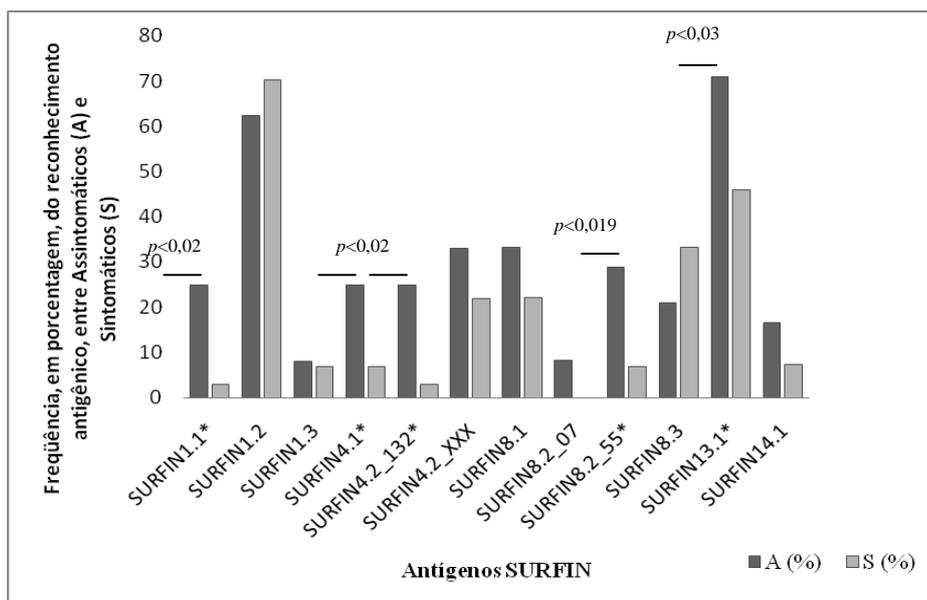


Figura 12- Gráfico de barras da frequência em porcentagem do reconhecimento dos antígenos SURFIN recombinantes em ensaios de ELISA, entre assintomáticos (A) e sintomáticos (S). Antígenos com asterisco (*) apresentaram frequência de reconhecimento diferencial entre os perfis clínicos, para $p < 0,05$ pelo teste do X^2 de Pearson.

4.2.3 Análise comparativa da intensidade da resposta humoral anti-SURFIN

A Tabela 8 mostra, em padrões de cor, os valores dos Índices de Reatividade (IR) obtidos em reações de ELISA, utilizando os plasmas dos pacientes e os peptídeos SURFIN recombinantes.

Podemos observar um predomínio de valores de IR entre 1 a 4,9. O SURFIN 4.2_XXX, canaleta F da tabela, expresso pelo gene PFD1160w é o responsável pelos maiores valores de IR e todos os indivíduos assintomáticos reconheceram pelo menos uma proteína SURFIN, enquanto 5 pacientes sintomáticos não reconheceram nenhuma. Um dos pacientes era primoinfectado para malária falciparum e outro apresentou apenas 2 infecções maláricas prévias, porém, não residia nas localidades onde os isolados foram coletados. O SURFIN 1.2 (canaleta B), codificado pelo gene PFA0650w, categorizado como pseudogene na base de dados *PlasmoDB* foi um dos mais reconhecidos, juntamente com o SURFIN 13.1 (canaleta L), codificado pelo gene PF13_0075. Não houve reconhecimento por sintomáticos do SURFIN 8.2_07 (canaleta H).

Apesar de fragmentos do gene PF13_0075 ter sido amplificado apenas nos isolados presentes anteriormente no laboratório, plasmas de ambos os grupos foram reativos a ele.

Tabela 9- Análise dos valores de IR anti-SURFIN de sintomáticos (S) e assintomáticos (A), pelo teste de *Mann-Whitney (U)*. Antígenos com reconhecimento diferencial ($p < 0,05$) ou limítrofe, em destaque (*).

<i>Peptídeos SURFIN (S)</i>	<i>Mann-Whitney (U) teste</i>			
	Soma dos Postos		Valor de U	Valor de $p <$
	S (27)	A (24)		
S 1.1*	631	695	253	0,025
S 1.2	713	613	313	0,832
S 1.3	701	625	323	0,968
S 4.1	643	683	265	0,079
S 4.2_132*	635	691	257	0,035
S 4.2_XXX	662	664	284	0,337
S 8.1	673	653	295	0,486
S 8.2_07	-	-	-	-
S 8.2_55*	633,50	692,50	255,5	0,052
S 8.3	733,50	592,50	292,5	0,449
S 13.1*	596	730	218	0,036
S 14.1	669,50	656,50	291,5	0,273

Os antígenos destacados na tabela acima apresentaram reconhecimento imune diferencial, apresentando maiores valores de IR por pacientes assintomáticos do que por pacientes sintomáticos. Esses antígenos também apresentaram maior frequência de reconhecimento por assintomáticos do que por sintomáticos, como mostrado anteriormente, na Figura 12. A Figura 13 apresenta os gráficos *Box plot* com a distribuição dos valores dos IR entre assintomáticos e sintomáticos, para os antígenos SURFIN que apresentaram reconhecimento diferencial ou limítrofe.

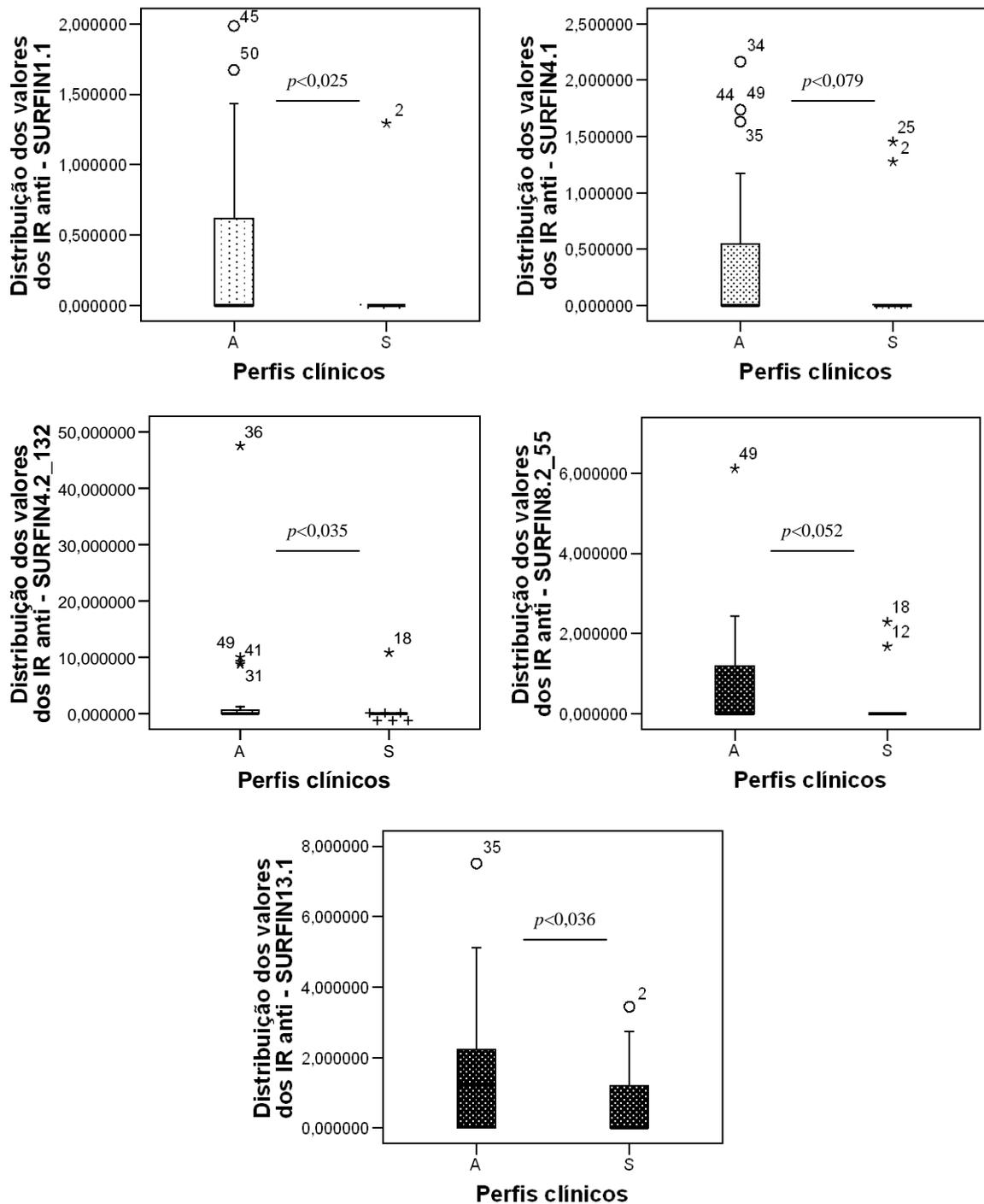


Figura 13- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR entre assintomáticos (A) e sintomáticos (S), para os antígenos SURFIN. Reconhecimento diferencial, pelo teste de *Mann-Whitney* com $p < 0,05$, para os SURFIN 1.1, 4.2_132 e 13.1. Reconhecimento limítrofe para SURFIN 4.1 e 8.2_55.

4.2.4 Análise da longevidade da resposta imune humoral anti-SURFIN

Plasmas de um subgrupo de pacientes da amostra foram coletados nos períodos de 30 e 60 dias pós-tratamento, totalizando 10 plasmas de pacientes assintomáticos e 3 plasmas de

pacientes sintomáticos. Devido ao pequeno número de plasmas nessa amostra, eles foram analisados em conjunto, não havendo distinção entre plasmas assintomáticos e sintomáticos.

Os valores dos IR coletados nos tempos T0 (período do corte), T30 (30 dias pós-tratamento) e T60 (60 dias pós-tratamento) foram comparados dois a dois, pelo teste não-paramétrico de *Wilcoxon*.

Não houve diferença, ao longo do tempo, nos valores dos IR contra os antígenos S 1.3, S 4.1, S 4.2_132, S 4.2_XXX, S 8.1, S 13.1 e S 14.1.

Houve intensificação da resposta anti-S 1.1, no período T30 e manutenção no período posterior (IRT30>IR T0 ($p<0,043$)). O mesmo comportamento foi observado para o S 8.2_07 (IR T30>IR T0 ($p<0,043$)) e S 8.3 (IR T30>IR T0 ($p<0,041$)). Esses dois últimos apresentaram aumento importante na frequência de plasmas reativos, em T30 e T60, enquanto a frequência de plasmas reativos ao primeiro permaneceu inalterada.

A resposta contra o S 1.2 apresentou diminuição progressiva, ao longo do tempo (IR T0>IR T30 ($p<0,003$), IR T0>IR T60 ($p<0,003$)), porém não houve diferença entre os valores do T30 e T60 ($p<0,273$). A frequência de plasmas reativos diminuiu, ao longo do tempo.

O teste de *Wilcoxon* mostrou diferença limítrofe entre a resposta em T0 e T30 para o S 8.2_55, sinalizando um possível aumento da resposta em T30 (IR T0<IR T30, $p<0,068$). Porém, não houve diferença entre os valores dos IR entre T0 e T60 ($p<0,144$) e entre T30 e T60 ($p<0,465$). A frequência de plasmas reativos permaneceu inalterada.

A seguir, gráficos *Box plot* com a distribuição dos valores dos IR, ao longo do tempo, para os antígenos SURFIN que apresentaram flutuações no reconhecimento imune, pelos plasmas utilizados.

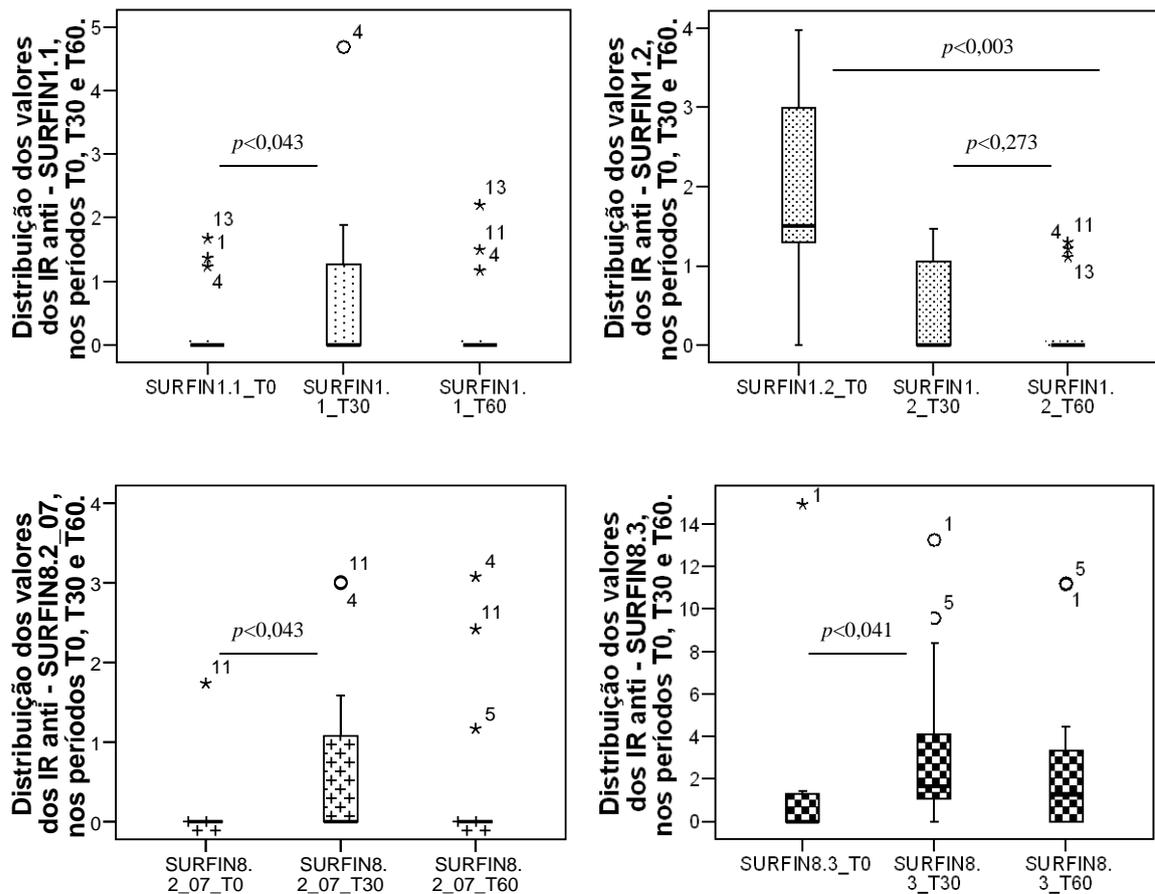


Figura 14- Gráficos *Box plot* com a distribuição dos valores dos IR anti-SURFIN 1.1, 1.2, 8.2_07 e 8.3 nos períodos T0, T30 e T60. Valores de p obtidos pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon.

4.2.5 Identificação das subclasses de anticorpos IgG anti-SURFIN

A identificação das subclasses de anticorpos IgG envolvidas na resposta imune humoral anti-SURFIN foi realizada em ensaios de ELISA, conforme descrito no item 3.18 dos Materiais e Métodos. Apenas os plasmas que haviam apresentado $IR > 10$, na reação de ELISA anterior na diluição 1/200, foram considerados. A mesma diluição dos plasmas foi utilizada na reação de identificação das subclasses.

Dessa forma, somente os peptídeos codificados pelos genes *surf* PFA0650w (S 1.2), PFD1160w_132 (S 4.2_132), MAL8P1.162 (S 8.3) e PFD1160w_XXX (S 4.2_XXX) foram utilizados nesses ensaios. Nesse grupo, o SURFIN 4.2_132 foi o único que apresentou reconhecimento diferencial entre assintomáticos e sintomáticos. Os resultados para os 3 primeiros são mostrados na Tabela 10, assim como o número de plasmas testados. Os

resultados para o SURFIN 4.2_XXX são mostrados separadamente, na Tabela 11. Os plasmas coletados em T30 e T60 utilizados na isotipagem são de pacientes assintomáticos.

Tabela 10- Médias das DOs (DO*) de cada subclasse de IgG anti-SURFIN. A=Assintomático, S=Sintomático, T30 e T60=plasmas coletados 30 dias e 60 dias pós-tratamento.

Plasmas/ Total de plasmas	SURFIN (S)	Subclasses de IgG			
		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
		DO*	DO*	DO*	DO*
A/2	1.2	0,103	0,056	0,050	0,049
A/3_S/1	4.2_132	0,049/0,047	0,045/0,042	0,048/0,041	0,050/0,040
AT30/2	8.3	0,124	0,051	0,054	0,055
AT60/2	8.3	0,115	0,053	0,052	0,055

Podemos observar na tabela acima o predomínio da resposta de IgG1 contra S 1.2 entre os plasmas assintomáticos iniciais testados. Não houve plasmas iniciais com IR>10 anti-S 8.3, mas 2 plasmas assintomáticos apresentaram IR>10 em T30 e T60. Nesses plasmas houve predomínio da subclasse IgG1, sem flutuação dos valores ao longo do tempo. Não foi possível observar nenhum predomínio de alguma das subclasses na resposta anti-S 4.2_132. A seguir, o gráfico em barras desses resultados.

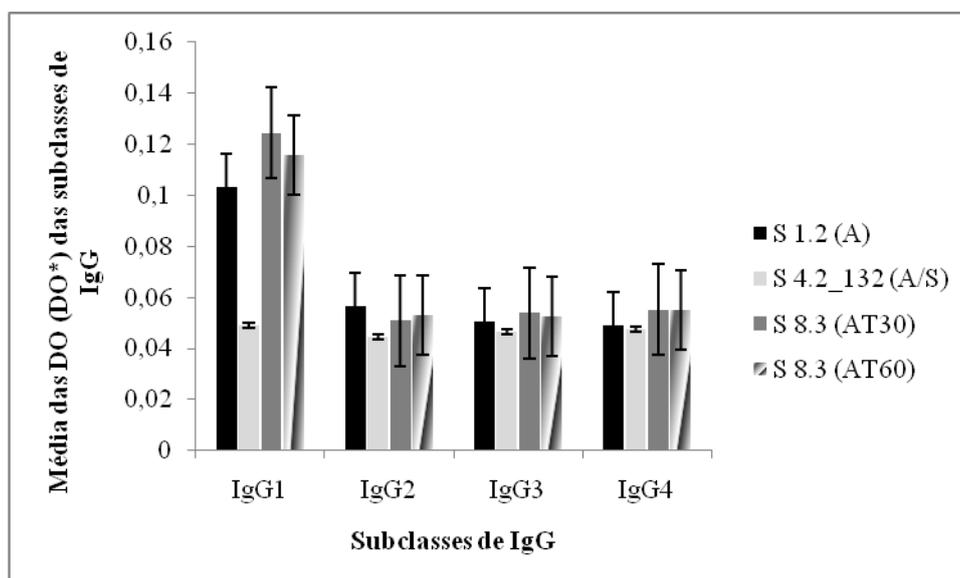


Figura 15- Gráfico de barras da média das DO (DO*) das subclasses de IgG envolvidas na resposta anti-S 1.2, S 4.2_132 e S 8.3 entre plasmas assintomáticos (A), sintomáticos (S) e assintomáticos do T30 e T60.

Tabela 11- Média das DOs (DO*) , de cada subclasse de IgG anti-S 4.2_XXX. A=Assintomáticos, S=Sintomático, T30 e T60=plasmas coletados 30 e 60 dias pós-tratamento.

Plasmas/ Total de Plasmas	Subclasses de IgG			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	DO*	DO*	DO*	DO*
A/6	0,076	0,048	0,050	0,048
S/3	0,047	0,048	0,069	0,047
AT30/3	0,142	0,046	0,061	0,049
AT60/3	0,081	0,046	0,050	0,046
DO*(A)/DO*(S)	1,625	1	0,730	1,023
DO*(A)/DO*(T60)	0,939	1,041	1,013	1,041

A Tabela 11 mostra o discreto predomínio de IgG1 entre os assintomáticos iniciais (A) e o discreto predomínio de anticorpos IgG3 entre os sintomáticos (S). A média de idade desses assintomáticos foi de 50 anos (15-84 anos) e o indivíduo mais jovem, já apresentou o predomínio da resposta de IgG1. O indivíduo sintomático mais jovem (11 anos) não apresentou predomínio para nenhuma subclasse. Os outros dois indivíduos sintomáticos (20 e 62 anos) apresentaram predomínio da subclasse IgG3.

Houve um aumento da resposta de IgG1 e IgG3, entre os plasmas assintomáticos em T30 e retorno aos níveis iniciais em T60. A média de idade dos grupos foi de 57 anos (39-84 anos) e ambos contêm os mesmos pacientes. Os números obtidos dividindo-se a média das DOs (DO*) dos assintomáticos pela DO* dos sintomáticos traduz a maior quantidade de anticorpos IgG1 na resposta dos assintomáticos e de anticorpos IgG3 na resposta de sintomáticos. Os números obtidos dividindo-se a DO* dos assintomáticos pela DO* dos plasmas do T60 são muito próximos a 1, traduzindo o retorno em T60 aos valores iniciais. A seguir o gráfico em barras desses resultados.

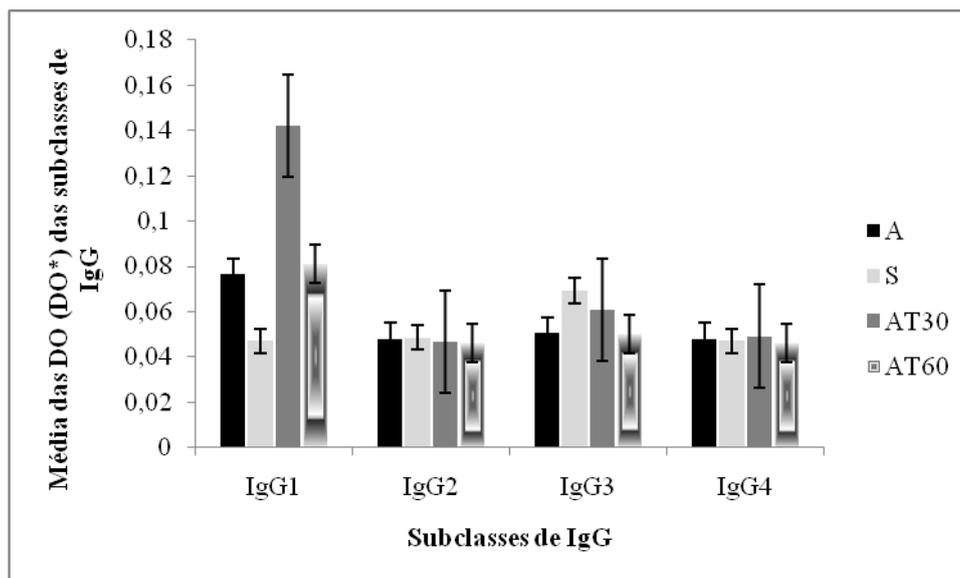


Figura 16- Gráfico de barras da média das DO (DO*) das subclasses de IgG envolvidas na resposta anti-S 4.2_XXX entre assintomáticos (A), sintomáticos (S) e plasmas assintomáticos do T30 e T60.

A maioria dos fragmentos amplificados foram obtidos a partir de gDNA de isolados oriundos de infecções sintomáticas. Porém, o reconhecimento humoral do grupo de assintomáticos foi maior em frequência e intensidade, para os antígenos S 1.1, S 4.2_132 e S13.1. Apesar de não terem sido amplificados fragmentos do gene PF13_0075 nos isolados coletados, o S 13.1 foi um dos antígenos mais reconhecidos pelos plasmas assintomáticos, apresentando reconhecimento diferencial em frequência e intensidade, por esse grupo. Isso pode indicar que, apesar do provável polimorfismo intenso na sequência desse gene, os produtos protéicos de diferentes alelos compartilham epítomos comuns.

A identificação das subclasses de IgG, na resposta anti-S 1.2, S 4.2_XXX e S 8.3 mostrou um padrão de resposta Th1 no grupo assintomático, com o predomínio do anticorpo citofílico IgG1. O aumento de IgG1 em T30 e a presença em T60 sugerem a presença de células plasmocitárias de longa duração (*long lived plasma cells-LLPC*) na resposta aos antígenos S 4.2_XXX e S 8.3. Os plasmas dos indivíduos sintomáticos, coletados no momento da manifestação clínica da doença, apresentam uma resposta Th1, com predomínio do anticorpo citofílico IgG3 anti-S 4.2_XXX.

4.2.6 Análise da transcrição dos genes *surf*: exclusão alélica e switching transcricional?

O resultado da amplificação por RT-qPCR de transcritos da cultura sincronizada da cepa 3D7 nas fases de anel (4–6 horas), trofozoíto (19–23 horas) e esquizonte (27–33 horas),

após *panning* em células CHO, que expressam constitutivamente na superfície o receptor humano CD36, mostra pouca quantidade de transcritos dos 10 genes *surf* nas 3 fases, em comparação com os transcritos do gene constitutivo PF07_0073 e dos genes *var*, *rif* e *stevor*, publicados anteriormente (141, 142). A fase de anel apresenta a maior quantidade de transcritos *surf*, sinalizando o possível predomínio da expressão das proteínas SURFIN durante a fase de trofozoíto. Porém, transcrições mais significativas dos genes PFD0100c e PF14_0747 foram observadas. A transcrição, praticamente exclusiva desses genes e o silenciamento do restante sugerem a presença de exclusão alélica para os genes *surf*, assim como identificada para os genes *var* e *rif* (141-144).

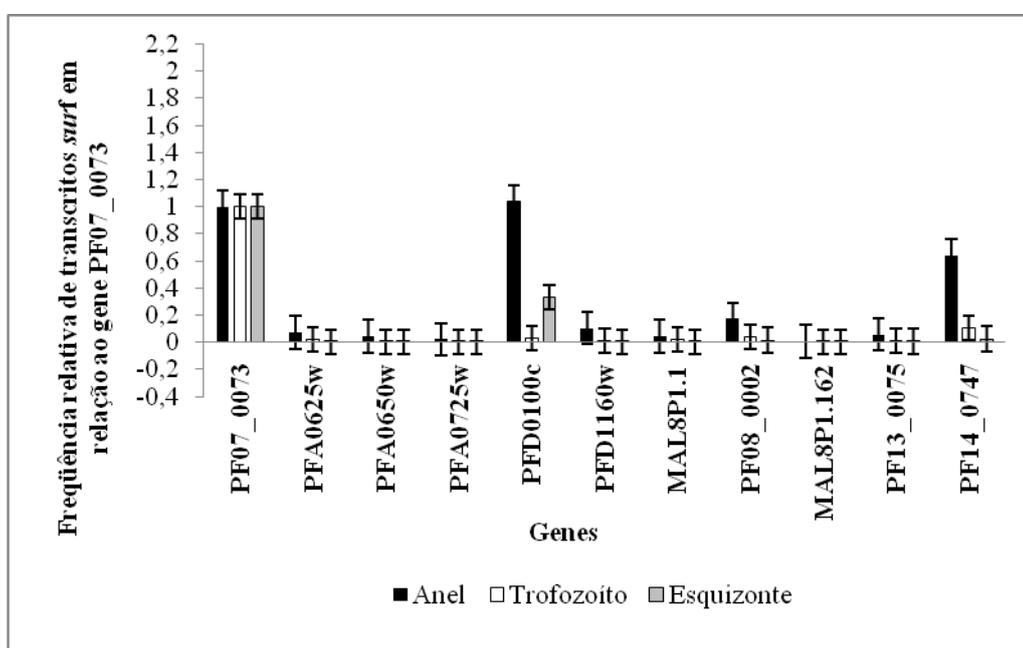


Figura 17- Gráfico de barras da frequência de transcrição dos genes *surf* nas 3 fases do ciclo biológico do parasita da cepa 3D7, após *panning* em células CHO-CD36, em comparação ao gene constitutivo PF07_0073. A maior quantidade de transcritos, para todos os genes *surf*, foi encontrada na fase de anel e para os genes PFD0100c e PF14_0747.

A possibilidade de ocorrência de *switching* transcricional dos genes *surf* foi testada cultivando a mesma cultura sincronizada da cepa 3D7 por 20 gerações. Novamente, RNA das fases de anel (4–6 horas), trofozoíto (19–23 horas) e esquizonte (27–33 horas) foram coletados. A nova análise da transcrição por RT-qPCR mostrou a transcrição mais significativa de outro gene *surf*, PF13_0075, e maior quantidade de transcritos desse gene do que do gene controle, em comparação ao gene PF14_0747 no experimento anterior. Novamente, a transcrição do gene PFD0100c foi observada nas fases de esquizonte e anel,

com discreto predomínio para a primeira. Os demais genes *surf* permaneceram silenciados durante esse ciclo.

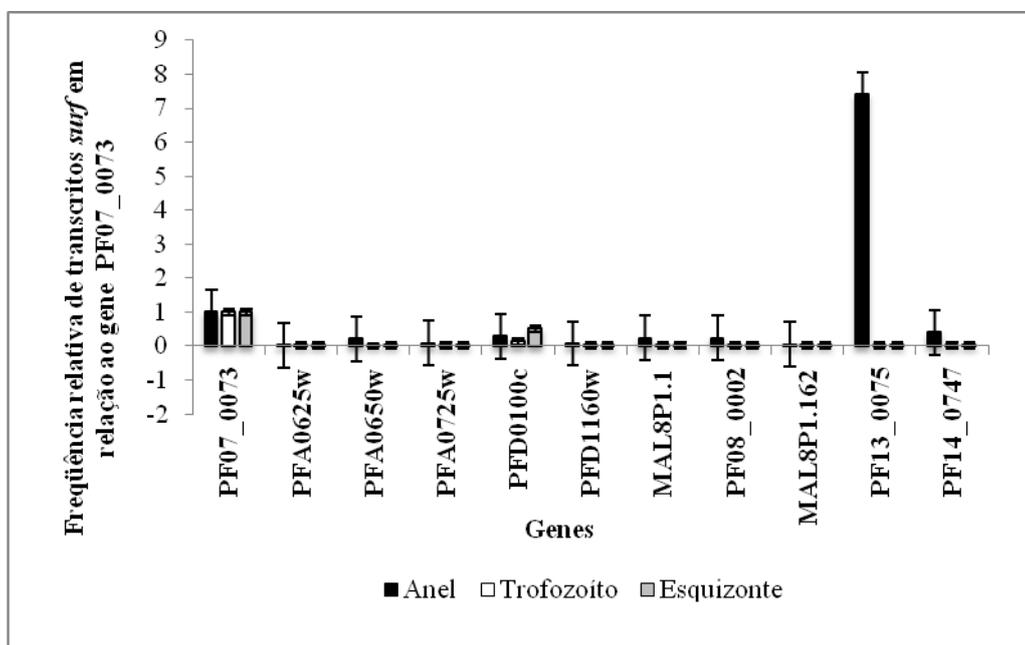


Figura 18- Gráfico de barras da frequência de transcrição dos genes *surf* nas 3 fases do ciclo biológico do parasita da cepa 3D7, após 20 ciclos do *panning*, em comparação ao gene constitutivo PF07_0073. A maior quantidade de transcritos, para todos os genes *surf*, foi encontrada na fase de anel (salvo PFD0100c em esquizonte) e para o gene PF13_0075.

Um terceiro ciclo de coletas de transcritos nos mesmos tempos anteriores, a partir da mesma cultura sincronizada após 40 gerações da cultura selecionada por citoaderência em células CHO-CD36, foi realizado (Figura 19). Novamente, houve transcrição dos genes PFD0100c e PF13_0075, porém este último, em menor quantidade do que em 20 gerações anteriores. Novo silenciamento relativo dos restantes foi observado.

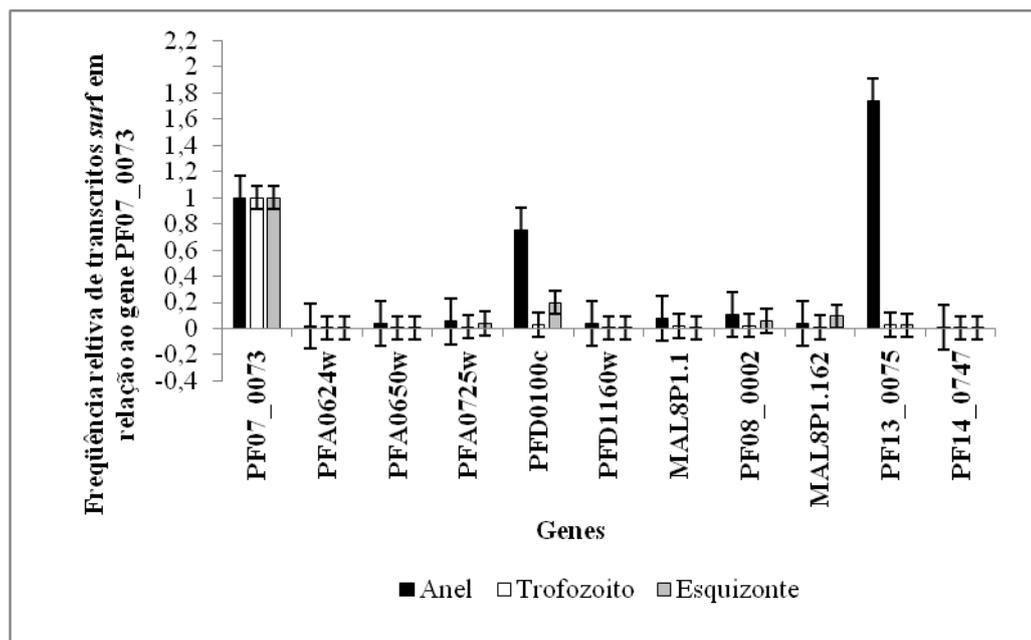


Figura 19- Gráfico de barras da frequência de transcrição dos genes *surf* nas 3 fases do ciclo biológico do parasita da cepa 3D7, após 40 ciclos do *panning*, em comparação ao gene PF07_0073. A maior quantidade de transcritos, para todos os genes *surf*, foi encontrada na fase de anel e para os genes PFD0100c e PF13_0075.

A transcrição contínua do gene PFD0100c nas fases de anel e esquizonte, nos 3 experimentos, parece indicar que esse gene seja transcrito de forma constitutiva. A transcrição mantida do gene PF13_0075 após 20 gerações pode indicar uma taxa mais lenta de *switching* dos genes *surf*, em comparação aos genes *rif* (141).

4.3 Genes que codificam a família das proteínas MSP (*merozoite surface proteins*)

As respostas imunológicas geradas contra as proteínas da família das MSP (MSP1-11) são constantemente correlacionadas, em diversos trabalhos, com proteção ao desenvolvimento de infecções sintomáticas de malária falciparum (117, 145, 146). As respostas contra a porção C-terminal da MSP1, regiões polimórficas de MSP2 e MSP3, regiões conservadas de MSP4 e MSP5, região C-terminal de MSP6 e regiões de ligação da MSP8 e MSP9 com a superfície eritrocítica são apontadas, por alguns grupos, como importantes alvos para o desenvolvimento da resposta imune humoral efetiva. Vários desses antígenos, além de serem preconizados como possíveis candidatos vacinais, estão sendo testados em formulações experimentais de vacinas (12, 13, 147).

Os fragmentos amplificados dos genes que expressam as proteínas MSP1 (bloco 2), MSP2, MSP3 3D7-like, MSP3 K1-like, MSP4, MSP5, MSP6, MSP7, MSP8, MSP9 e MSP10

foram amplificados por PCR convencional e em seguida, clonados e seqüenciados, segundo as metodologias descritas em Materiais e Métodos. Todos os fragmentos diferentes encontrados foram expressos em sistema recombinante, fusionados à proteína GST. Apenas, o fragmento relativo à proteína MSP8 não apresentou sucesso na expressão. O peptídeo recombinante que corresponde à porção C-terminal da proteína MSP1 (MSP1₁₉) já havia sido expresso anteriormente, a partir do gDNA do isolado S20, originário de Porto Velho.

Primeiramente serão mostrados os resultados relativos à diversidade das seqüências encontradas para cada gene. Em seguida, os resultados sobre a expressão dos peptídeos recombinantes serão mostrados e finalmente, os resultados sobre a resposta humoral de pacientes assintomáticos e sintomáticos aos peptídeos recombinantes expressos e sobre as subclasses de IgG envolvidas nessa resposta.

4.3.1 Diversidade das seqüências gênicas da família MSP nos isolados do estudo

Os resultados obtidos envolveram amplificação dos fragmentos de cada gene, com posterior clonagem, seqüenciamento e alinhamento das seqüências obtidas. A definição de seqüências diferentes para cada gene foi obtida através da análise de uma matriz de identidade por um script *PERL*, que considerou idênticas, seqüências com mais de 95% de identidade.

4.3.1.1 Genes que codificam as proteínas do complexo MSP1

O complexo protéico MSP1 é composto pela associação das proteínas MSP1, MSP6, MSP7 e, possivelmente, MSP9. Os resultados sobre a diversidade das seqüências para cada um dos genes que expressam essas proteínas serão mostrados consecutivamente, na ordem descrita acima. Apenas fragmentos do bloco 2 da proteína MSP1 foram amplificados.

- **MSP1_bloco2**

Primeiramente, a identificação das 3 famílias alélicas (RO33, K1 e MAD20) foi baseada na filtragem e identificação de seqüências que compartilham identidade de 100 a 95% pelo script *PERL*. A análise minuciosa das regiões polimórficas dos alelos K1 e MAD20 foi realizada, posteriormente, quando os peptídeos já haviam sido expressos e utilizados nos ensaios imunoenzimáticos.

As sequências das famílias K1 e MAD20 foram analisadas, buscando-se encontrar os motivos repetitivos das regiões polimórficas descritos anteriormente (134). Cada um dos motivos é formado por trincas de 3 nucleotídeos ou sequências de 3 códon. Cada sequência de 3 códon é codificada pelos números 1, 2, 3, 4 ou 7, quando da família K1 e por 5, 5, 6, 7, 8 ou 9, quando da família MAD20. Essas trincas repetem-se e intercalam-se ao longo das regiões polimórficas centrais do bloco 2. Sequências que não apresentaram tais motivos foram idênticas a uma única sequência descrita para a família alélica RO33.

Duas sequências pertencentes à família alélica K1, não identificadas anteriormente em isolados de Rondônia, foram encontradas. Uma delas é idêntica às sequências da cepa 3D7 e de um isolado de Dielmo, Senegal (K1-3D7-like) e outra (K1-C), apresenta 95% de identidade, pela base de dados de sequências de nucleotídeos *Blast/n*, com sequências de isolados da Tanzânia.

Quatro sequências não descritas anteriormente em isolados de Rondônia foram encontradas no grupo alélico MAD20. As sequências MAD20-FCR3-like, MAD20-B e MAD20-D apresentaram identidade de 99%, 94% e 96% a isolados da Tailândia e Tanzânia e a sequência MAD20-C apresentou 99% de similaridade a isolados da Índia. Um motivo repetitivo não descrito anteriormente foi encontrado no final de todas as sequências da família MAD20 e recebeu o código 10.

A Tabela 12 apresenta os motivos repetitivos característicos para K1 e MAD20 e as sequências encontradas nos isolados do estudo.

Tabela 12- Diversidade de sequências das famílias alélicas K1 e MAD20 do bloco 2 de MSP1. O código numérico dos motivos repetitivos (MR) das regiões polimórficas (sequências de 3 códons) são mostrados como *repeats* nas sequências encontradas nos gDNAs do estudo. Nomes atribuídos às sequências e locais onde as sequências encontradas já foram encontradas anteriormente. Sequências em negrito não haviam sido descritas para isolados de Rondônia.

Família	Código	MR	Sequências encontradas com MR	Nomes	Locais já encontrados
	1	AGT GGT ACA	3 4 3 4 3 4 3 4 3 4 3 1 2 2 1	K1-3D7 like	África
	2	AGT GGT CCA	3 1 1 2 1	K1-A	Mato Grosso e Rondônia
K1	3	AGT GCT CAA	3 1 1 2 1 2 1 2 1 2 1	K1-B	Mato Grosso e Rondônia
	4	AGT GGT GCA	3 4 3 4 3 4 1	K1-C	Tanzânia
	<u>7</u>	AGT GTT ACA			
	5	TCA GGT GGT	5 6 <u>5</u> 6 <u>5</u> 5 <u>6</u> <u>5</u> 6 5 10	MAD20-D	Ásia
	<u>5</u>	TCA GGT GGC	5 7 5 5 5 5 6 <u>5</u> 6 <u>5</u> 5 6 <u>5</u> 6 5 10	MAD20-A	Rondônia
MAD20	6	TCA GTT GCT	5 7 5 5 10	MAD20-B	Ásia
	7	TCA GTT ACT	8 6 5 <u>5</u> 6 <u>5</u> 6 <u>5</u> 6 5 10	MAD20-FCR3	Ásia
	8	TCA AAG GGT	8 6 5 10	MAD20-C	Ásia
	9	TCA AGT GGT			
	10	TCA GGT AAT			

Uma única sequência da família alélica RO33, identificada anteriormente em Rondônia e Mato Grosso, foi encontrada nos isolados do estudo (148). Essa sequência apresenta uma mutação no códon 64, trocando D (aspartato) por G (glicina). Segundo sequências identificadas em isolados de Dielmo, Senegal, essa mutação ocorre no códon 67(134).

Família	Mutação	Sequência encontrada
RO33	D64/67G	KPA G AVSTQSAKNPPGATVPSGTASTKGAIIRSPGAANPSDGS

A diversidade das sequências entre os gDNAs da amostra é disposta no Quadro 2.

Quadro 2- Diversidade de seqüências das famílias RO33, K1 e MAD20 do bloco 2 de MSP1 entre os gDNAs do estudo, segundo o *script PERL* e os motivos repetitivos das regiões polimórficas. Células em branco=ausência de seqüências.

gDNAs	Famílias alélicas e variantes											Fragmentos de DNA Humano
	RO33	K1A	K1B	K1C	K13D7	K1117	MAD20A	MAD20B	MA20C	MAD20D	MA20FCR3	
Isolados de infecções Assintomáticas	█											
	█				█		█					
	█						█				█	
	█	█										
	█	█										
	█	█										
	█	█										
	█	█										
	█	█										
	█	█										
Isolados de infecções Sintomáticas	█	█			█		█					
	█	█			█		█					
	█	█			█		█					
	█	█			█		█					
	█	█			█		█					
	█	█			█		█					
	█	█			█		█					
	█	█			█		█					
	█	█			█		█					
	█	█			█		█					
Isolados do laboratório	█	█				█	█					
	█	█						█				
FCR3											█	
3D7					█						█	

A maioria dos 52 isolados coletados (73,07%) apresentou um único genótipo para o bloco 2 de MSP1, sendo que 16 isolados eram de infecções assintomáticas e 22 de infecções sintomáticas. Múltiplos genótipos foram encontrados em 10 isolados, 5 oriundos de infecções

assintomáticas e 5 de infecções sintomáticas (19,23%). Fragmentos de DNA humano foram amplificados em quatro isolados (7,69%), todos de infecções assintomáticas. Vale ressaltar que foram analisados em média 5 clones por amostra.

As sequências K1B, MA20DB e MAD20C não foram encontradas entre os isolados assintomáticos e as sequências K1C e MAD20D não foram encontradas em isolados sintomáticos. As demais sequências foram encontradas em isolados de ambos os grupos.

RO33 foi amplificada em 59% dos isolados sintomáticos e em 36% dos isolados assintomáticos. K1A foi amplificada em 26% dos isolados sintomáticos e em 36% dos isolados assintomáticos. MAD20A foi amplificada em 22% dos isolados sintomáticos e em 12% dos isolados assintomáticos. Os isolados presentes no laboratório apresentaram amplificação de apenas uma das sequências acima e a sequência MAD20C foi encontrada em apenas um isolado, em toda a amostra. Não foram amplificados entre os isolados do Brasil sequências idênticas à sequência K1 Africana. Os fragmentos expressos foram: RO33, a partir do isolado 59, MAD20A, a partir do isolado 61 e K1Africana, a partir do isolado 117.

A frequência de cada família alélica e/ou variante entre os isolados do estudo é apresentada na Figura 20 e a frequência de cada família alélica por localidade é mostrada na Figura 21.

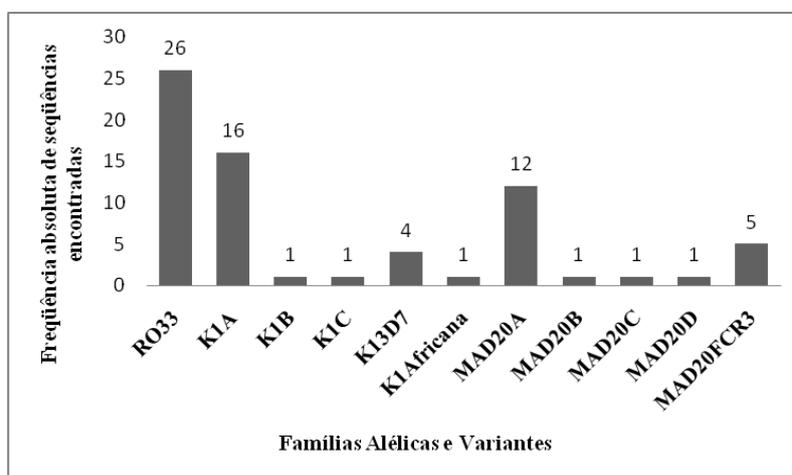


Figura 20- Gráfico de barras da frequência de sequências dos múltiplos genótipos do bloco 2 de MSP1 encontrados nos isolados do estudo. O maior número de sequências (69) do que de isolados (61) mostra a existência de infecções policlonais.

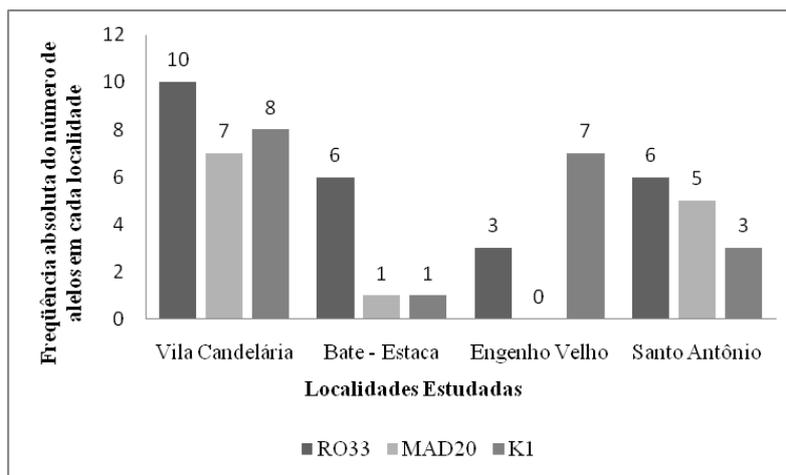


Figura 21- Gráfico de barras da frequência absoluta de cada família alélica do bloco 2 de MSP1 por localidade .

Podemos observar o predomínio da família alélica RO33 nas localidades de Vila Candelária, Bate-Estaca e Santo Antônio. A família alélica MAD20 não foi encontrada entre os isolados coletados em Engenho Velho. Vale ressaltar que as localidades de Vila Candelária, Bate-Estaca e Santo Antônio estão dispostas, consecutivamente, ao longo da margem direita do Rio Madeira, apresentando assim, o mesmo padrão de circulação das famílias alélicas. Engenho Velho está em frente a elas, na outra margem do rio e apresenta um padrão diverso, com predomínio do alelo K1 e ausência de amplificação do alelo MAD20.

- **MSP1_C-terminal: MSP1₁₉**

Analisar a resposta imune humoral contra MSP1₁₉ não estava incluso no projeto inicial, dada a vasta literatura existente, que aponta a resposta humoral contra esse antígeno como fundamental, tanto no controle da sintomatologia malárica, quanto no controle da parasitemia (23, 26, 27, 29). A intenção era caracterizar a resposta contra o bloco 2 da proteína, justamente pelas controvérsias sobre a participação desse bloco no desenvolvimento de proteção contra malária clínica.

Porém, as peculiaridades das respostas humorais apresentadas pelos pacientes, sugerem que a resposta humoral seja moldada, a partir do reconhecimento de múltiplos antígenos. Excluir justamente este seria prejudicial para o entendimento global da resposta humoral contra malária falciparum.

Sendo assim, foi testada também em reações de ELISA, a resposta dos pacientes do estudo ao antígeno MSP1₁₉. Esse antígeno já havia sido expresso no laboratório, a partir do gDNA do isolado S20, originário de Porto Velho. As sequências gênicas do fragmento de MSP1₁₉ depositadas na base de dados *Genbank* são bastante conservadas, o que permite

utilizar um fragmento expresso a partir de um isolado obtido de um paciente há mais de 20 anos.

- **MSP6 e MSP7**

Os fragmentos amplificados dos genes que codificam MSP6 e MSP7 correspondem às regiões C-terminais de cada gene. As regiões C-terminais das proteínas expressas são apontadas como alvos do reconhecimento imune por plasmas de indivíduos moradores de áreas endêmicas para malária (149-151).

A região C-terminal de MSP6 contém epítomos de células B, sendo alvo dos anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3, participantes de citotoxicidade celular mediada por anticorpos (150) e possivelmente lise após interação com proteínas do sistema complemento. Baseando-se em evidências que apontam para a conservação da região C-terminal de MSP6 entre diversas cepas de *P. falciparum*, o gDNA de um único isolado foi amplificado, juntamente com o gDNA da cepa 3D7 (151). As sequências apresentaram identidade de 98% entre si e entre sequências depositadas na base de dados *GenBank*. O peptídeo recombinante foi expresso, a partir do gDNA de um isolado sintomático.

As ampliações dos fragmentos de MSP7 foram positivas em 52% dos isolados da amostra, incluindo isolados de campo, anteriormente presentes no laboratório e as cepas 3D7 e FCR3 (n=61). Porém, os isolados sintomáticos contribuíram com mais de 70% das ampliações. Os resultados do alinhamento e sequenciamento apontam uma única sequência circulante, idêntica à sequência da cepa 3D7.

- **MSP9**

Os fragmentos amplificados do gene de MSP9, correspondentes à região N-terminal do gene, mostraram-se bastante conservados entre si e com identidade de 98 a 100% com sequências depositadas na base de dados *Genbank*. Os dados do alinhamento identificaram apenas um alelo circulante.

As ampliações foram positivas em 39% dos isolados de infecções sintomáticas e em 33% dos isolados de infecções assintomáticas. As ampliações foram também positivas em 5 dos 6 isolados de campo já existentes no laboratório e nas cepas 3D7 e FCR3.

4.3.1.2 Genes que codificam as proteínas MSP2, MSP4 e MSP5

As próximas análises refrem-se aos genes que codificam as proteínas de superfície do merozoíto MSP2, MSP4 e MSP5, localizados consecutivamente no cromossomo 2. Apesar da ausência de conhecimento sobre a exata participação das proteínas codificadas por eles nas etapas de invasão eritrocítica, todas são alvos do reconhecimento humoral.

- **MSP2**

O par de oligonucleotídeos usado para amplificação dos fragmentos de MSP2 permite amplificar quase toda a extensão do gene, partindo das extremidades conservadas em direção às regiões semi conservadas e variáveis (127). Apesar disso, houve muitos resultados negativos e amplificações de fragmentos humanos com esse par de oligonucleotídeos. Apenas 23 isolados de um total de 61 apresentaram amplificação de fragmentos de MSP2. Não houve amplificação, a partir do gDNA do isolado africano (isolado 117) e da cepa FCR3. Apenas um fragmento amplificado foi obtido de um isolado de infecção assintomática.

A separação das sequências em duas famílias alélicas (IC1 e FC27), assim como a identificação de dois variantes para a família IC1 foi possível através da comparação das sequências obtidas, com sequências de Rondônia depositadas na base de dados *Genbank*. Todas as sequências obtidas, juntamente com as sequências encontradas em Ariquemes, Rondônia, foram alinhadas no *software Clustal X* (1.81) e comparadas pelo *script PERL*, a partir de uma matriz de identidade. As sequências com mais de 95% de identidade foram consideradas idênticas. Os dois variantes de IC1 foram identificados em um único isolado. Todos os outros isolados apresentaram apenas um genótipo e/ou variante.

O alelo IC1 foi mais prevalente do que o alelo FC27 no âmbito geral e na localidade de Vila Candelária. A frequência dos alelos foi igual em Bate-Estaca e Santo Antônio e em Engenho Velho não foram amplificados fragmentos do alelo IC1.

IC1 3D7-like, denominado de IC1_XXX, foi mais prevalente que o outro variante do mesmo alelo, em Vila Candelária (Figura 20). Uma sequência de cada grupo foi escolhida para ser expressa. Cada uma recebeu o nome ou o número do isolado da qual foram amplificadas, batizando assim o peptídeo e o grupo de sequências idênticas.

O alelo FC27 foi expresso a partir da sequência do isolado 29 e o alelo IC1, a partir dos isolados 69 e XXX. A sequência do isolado XXX foi idêntica à sequência do isolado 3D7.

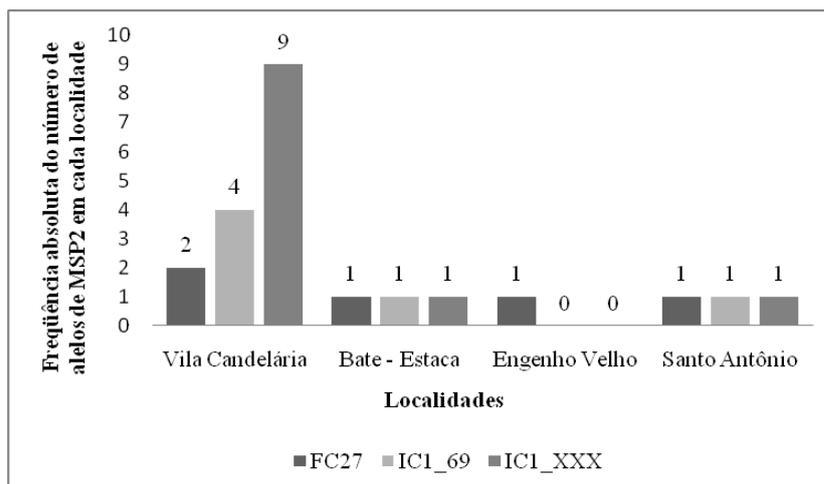


Figura 22- Gráfico da distribuição da frequência absoluta dos alelos e variantes de MSP2 por localidade.

- **MSP4**

O gene que codifica a proteína MSP4 está localizado consecutivamente aos genes que codificam MSP5 e MSP2 no cromossomo 2, segundo a base de dados *PlasmoDB*. As sequências analisadas dos isolados do estudo apresentaram homologia de 98 a 100% com as sequências depositadas na base de dados *Genbank*, provenientes de outros isolados de campo e cepas de laboratório. Apenas um alelo circulante foi identificado entre as sequências amplificadas.

Esses dados corroboram dados previamente publicados, que indicam um baixo polimorfismo entre as sequências identificadas do gene PFB0310c (152, 153). Porém, houve amplificação em apenas 36% dos isolados das localidades do estudo, todos de infecções sintomáticas. A sequência escolhida para ser amplificada está presente no éxon 1.

- **MSP5**

Alguns trabalhos associam a resposta contra a proteína MSP5 com proteção ao desenvolvimento de episódios de malária, sendo considerada também, um antígeno-alvo para formulação vacinal (154-156).

A região do gene escolhida para ser amplificada e expressa corresponde à região N-terminal do éxon 1. Houve amplificação positiva em 23 isolados oriundos de infecções sintomáticas e em 8 isolados de infecções assintomáticas. Fragmentos humanos foram amplificados em 13 isolados. Os 6 isolados já existentes no laboratório apresentaram amplificação desse fragmento, assim como, as cepas FCR3 e 3D7. As localidades que contribuíram com maior número de isolados (Vila Candelária e Santo Antônio) apresentaram maior número de fragmentos amplificados.

Os fragmentos clonados e seqüenciados apresentaram similaridade de 98% com o genoma da cepa 3D7, confirmando dados anteriores que MSP5 é conservado entre isolados (157) Um único fragmento foi escolhido para ser expresso, a partir de isolado de infecção sintomática.

4.3.1.3 Genes que codificam as proteínas MSP3 e MSP10

- **MSP3**

O antígeno MSP3 foi identificado como um alvo essencial da resposta humoral em um estudo recente (158) e a imunização de crianças de 1 a 2 anos da Tanzânia e de voluntários adultos de Burkina Faso com peptídeo MSP3 sintético induziu o desenvolvimento de anticorpos citofílicos, IgG1 e IgG3, em níveis semelhantes aos encontrados em adultos africanos assintomáticos (159, 160). A resposta imune contra MSP3 de *P. falciparum* nunca foi testada em áreas endêmicas do Brasil.

Inicialmente, o par de oligonucleotídeos utilizado para amplificação dos fragmentos do gene que codifica MSP3 foi construído para amplificar a região central polimórfica do gene, utilizando como molde o genoma da cepa 3D7. Apesar de ancorar em regiões conservadas no gene, não ocorreu amplificação de fragmentos em todos os isolados. As amplificações foram bem sucedidas apenas para 18 dos 52 isolados da amostra. O número pequeno de amplificações levou-nos a construir um novo par de oligonucleotídeos, específico para amplificação do alelo K1 desse gene. Porém, não ocorreu nenhuma amplificação, com esse novo par, a partir dos isolados do estudo. O isolado XXX apresentou amplificação positiva da sequência K1, o isolado S20 apresentou amplificação das duas sequências e a cepa FCR3 também apresentou amplificação da sequência K1.

A distribuição dos fragmentos amplificados por localidade foi homogênea para 3 localidades. Os 18 fragmentos amplificados foram obtidos de 6 isolados coletados em Vila Candelária, de 5 isolados de Santo Antônio e de 5 isolados de Bate-Estaca. Apenas 1 isolado de Engenho Velho apresentou amplificação para esse gene e 1 isolado pertencente uma localidade diferente das localidades estudadas.

Não houve diferença no sucesso das amplificações entre isolados coletados em pacientes assintomáticos ou sintomáticos. 10 foram coletados de pacientes assintomáticos e 8 foram coletados, a partir de pacientes sintomáticos.

Todos os fragmentos amplificados apresentaram similaridade, em torno de 98%, com o fragmento da cepa 3D7.

- **MSP10**

As sequências de *P. falciparum* depositadas na base de dados *GenBank* apresentam identidade de 99% entre si e de 70% com sequências que codificam MSP10 em *P. vivax*, *P. yoelii* e *P. berghei*. As sequências identificadas, a partir dos isolados desse estudo, apresentaram 99 a 96% de identidade com as sequências de isolados e das cepas 3D7, FCR3 e HB3, depositadas na mesma base de dados.

Apenas 20% dos isolados da amostra apresentaram amplificação do fragmento de 444 pb, presente no início da região N-terminal. Nenhum isolado de infecção assintomática contribuiu com amplificações. Duas sequências diferentes foram encontradas em 3 isolados da amostra. Utilizando a sequência da cepa 3D7 como referência, o isolado 17 apresentou 30 nt adicionais entre os códons 70–100 e os isolados 48 e 369 apresentaram 9 nt adicionais entre as posições 501-510. Uma deleção entre os códons 234–250 foi observada nas duas sequências.

A região gênica amplificada não codifica epítomos imunes, segundo a base de dados *IEDB*. Não há estudos sobre reposta imune contra MSP10 depositadas na base de dados *PubMed (NCBI)*.

A seguir, o Quadro 3 apresenta a diversidade das sequências encontradas, assim como, a diferença visual entre o número de amplificações entre os isolados de infecções assintomáticas, sintomáticas, dos isolados já presentes no laboratório e das cepas FCR3 e 3D7, para os genes que codificam MSP2 a MSP10.

Quadro 3- Diversidade das sequências encontradas dos genes que codificam MSP2 a MSP10 entre os gDNAs do estudo. Sequências idênticas compartilham identidade superior a 95%. Ausência de amplificações nas células em branco.

gDNAs	MSP2	MSP3	MSP4	MSP5	MSP6	MSP7	MSP8	MSP9	MSP10
Isolados de infecções Assintomáticas									
	Isolados de infecções Sintomáticas								
Isolados do laboratório									
FCR3									
3D7									
Códigos	FCR3	TC1-69	3D7-like	K-like	MSP10-17	MSP10-369	Humano	Não realizado	

Fragmentos do gene que codifica MSP8 foram amplificados apenas de isolados sintomáticos e todos foram idênticos à sequência da cepa 3D7. A região escolhida para ser amplificada corresponde à região de ligação da proteína à superfície do eritrócito, porém a expressão protéica foi incipiente, discordante do peso molecular esperado e insuficiente para realizar os ensaios imunoenzimáticos.

4.3.2 Expressão de peptídeos MSP recombinantes e frequência do reconhecimento humoral dos peptídeos MSP expressos

Todas as sequências diferentes encontradas na etapa anterior foram expressas em sistema recombinante, fusionadas à proteína GST, como descrito no item 3.17 dos Materiais e Métodos. As Figuras 23 e 24 mostram os peptídeos expressos submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (SDS-PAGE), em condições redutoras.

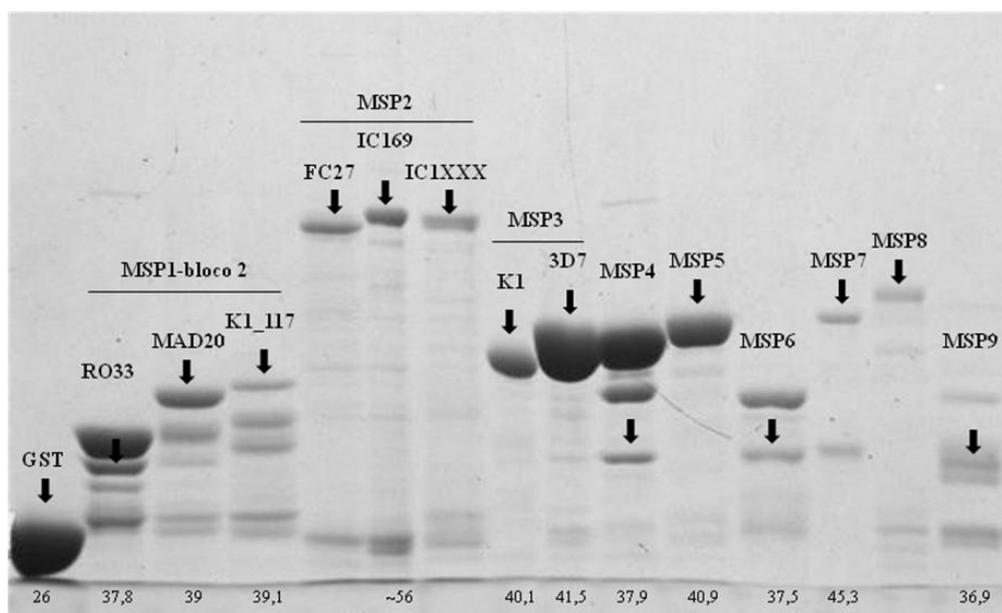


Figura 23- Eletroforese de proteínas MSPs recombinantes em gel de poliacrilamida a 8%. As alturas das bandas (flechas) correspondem às proteínas fusionadas a GST. A numeração abaixo das canaletas corresponde ao PM esperado, em kDa, do peptídeo fusionado. As proteínas estão a 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 40 mM de DTT foram adicionados às amostras. O PM esperado de MSP8 é de 57 kDa

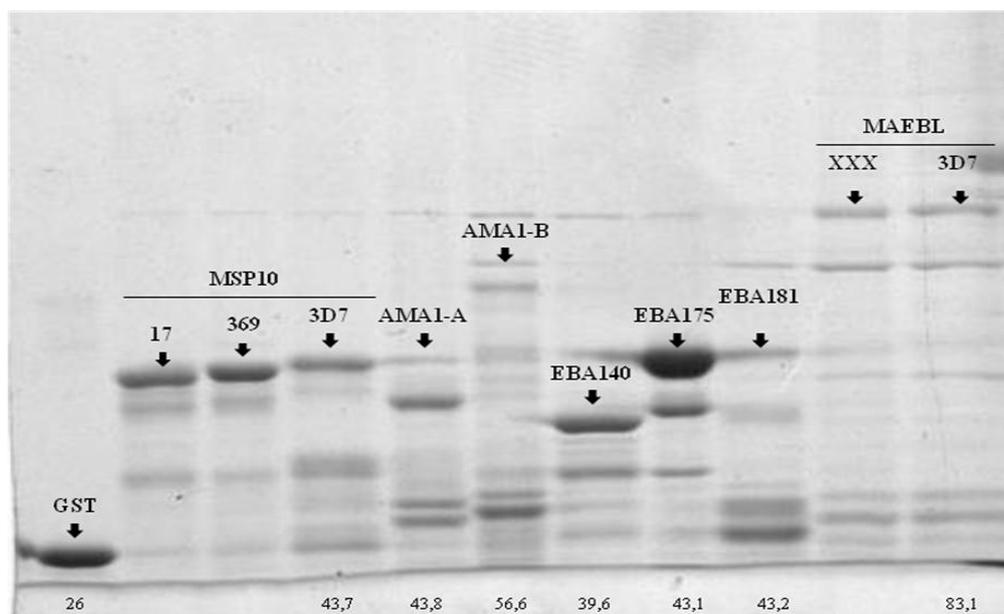


Figura 24- Eletroforese de proteínas MSP10, AMA1, EBAs e MAEBL recombinantes em gel de poliacrilamida a 8%. As alturas das bandas (flechas) correspondem às proteínas fusionadas a GST. Peso molecular (PM) esperado da proteína fusionada, em kDa, abaixo das canaletas. As proteínas estão a 0,2 µg/µl e 40 mM de DTT foram adicionados às amostras.

A seguir, análises da frequência e da intensidade de reconhecimento de cada antígeno expresso pelos plasmas sintomáticos e assintomáticos serão abordadas. A Figura 25 apresenta a frequência de reconhecimento humoral dos antígenos de merozoíto expressos em sistema recombinante, entre sintomáticos e assintomáticos.

Os antígenos mais reconhecidos pelos dois grupos clínicos, ou seja, com frequência de reconhecimento maior do que 60% foram: MSP1₁₉, MSP2_IC1, MSP3, MSP4, MSP10, AMA1 e EBA175. Os antígenos que apresentaram maior frequência de reconhecimento por assintomáticos foram MSP5 e MSP9 e por sintomáticos, MSP1-bloco 2_MAD20.

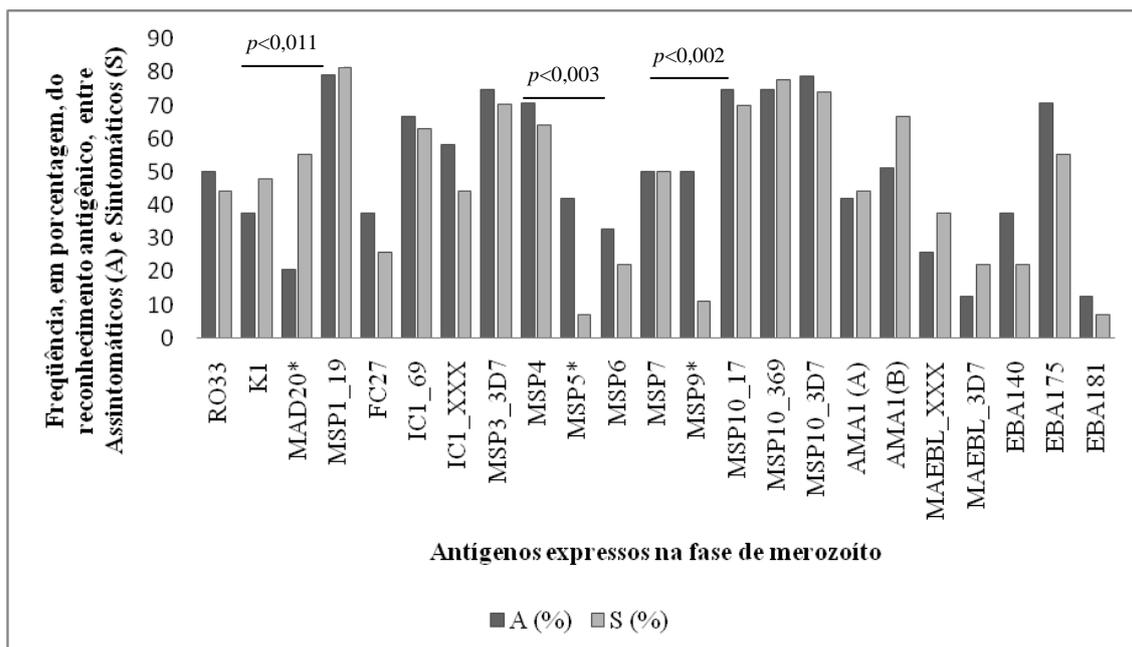


Figura 25- Gráfico de barras da frequência em porcentagem do reconhecimento dos antígenos expressos em merozoíto entre assintomáticos (A) e sintomáticos (S). Antígenos com asterisco (*) apresentaram frequência de reconhecimento diferencial entre os perfis clínicos evidenciada pelos valores de $p < 0,05$.

4.3.3 Análise comparativa entre a frequência, a intensidade e a longevidade da resposta humoral aos peptídeos MSP expressos

A frequência do reconhecimento humoral dos antígenos expressos pelos plasmas assintomáticos e sintomáticos, a diferença de intensidade da resposta entre esses plasmas e a longevidade da resposta serão mostrados abaixo. Algumas peculiaridades da resposta anti-MSP1-bloco 2 também serão abordadas.

4.3.3.1 Resposta humoral aos peptídeos do complexo MSP1

- **MSP1-bloco 2**

- **Frequência e intensidade da resposta humoral**

O reconhecimento humoral do bloco 2 da proteína MSP1 foi correlacionado com proteção contra infecção sintomática por alguns grupos (145, 161) embora outros grupos discordem dessa observação (134). Essa associação também foi avaliada em moradores de área endêmica do Mato Grosso, porém, não houve uma conclusão exata sobre o envolvimento da resposta anti-bloco 2 em proteção (148).

A frequência de reconhecimento dos antígenos RO33 e K1Africano do bloco 2 da proteína MSP1 foi proporcional entre sintomáticos e assintomáticos (aproximadamente, 50% dos plasmas de cada grupo, para cada antígeno). O antígeno MAD20A foi mais reconhecido por sintomáticos do que assintomáticos ($X^2=6,6$, $p<0,01$). O reconhecimento de pelo menos, um dos alelos para o bloco 2 de MSP1 foi positivo para 86,5% dos pacientes da amostra. 38,4% reconheceram pelo menos dois peptídeos, 21,1% dos indivíduos reconheceram um dos peptídeos isoladamente e 13,4% reconheceram os 3 peptídeos.

Apenas 3 plasmas assintomáticos não-reativos aos antígenos do bloco 2 originaram-se de amostras de sangue, onde as amplificações de fragmentos do gene foram negativas. Os demais plasmas assintomáticos não-reativos foram provenientes de amostras positivas para amplificações de fragmentos do respectivo gene. Os plasmas reativos reconheceram ao menos um dos antígenos expressos e originaram-se de amostras de sangue positivas para pelo menos um dos fragmentos do gene. Não houve o reconhecimento específico de um determinado plasma pela sequência representante do grupo alélico ou da sequência, encontrados na mesma amostra de sangue.

Todos os plasmas sintomáticos não-reativos originaram-se de amostras positivas para amplificações de fragmentos de algum dos alelos do bloco 2. Semelhante aos plasmas assintomáticos, os plasmas reativos sintomáticos não reconheceram especificamente o alelo encontrado na amostra de sangue que os originou.

A intensidade da resposta não apontou diferença entre plasmas de sintomáticos e assintomáticos pelo teste de *Mann-Whitney*, para os antígenos RO33 e K1, porém houve diferença para o antígeno MAD20, sendo este reconhecido mais intensamente por sintomáticos. Esse antígeno também apresentou maior frequência de reconhecimento por esse grupo (**RO33**: $U=287,5$; $p<0,455$, **MAD20**: $U=218,5$; $p<0,024$ e **K1**: $U=288$; $p<0,452$).

As comparações entre os valores dos IR entre sintomáticos evidenciaram uma resposta mais intensa ao antígeno RO33 do que para K1 ($p<0,044$), porém não houve diferença entre RO33 e MAD20 ($p<0,106$) e entre MAD20 e K1 ($p<0,420$) pelo teste de *Wilcoxon*. Através do mesmo teste, observamos entre os assintomáticos resposta mais intensa contra o antígeno RO33 do que MAD20 ($p<0,003$) e K1 ($p<0,022$), mas não houve diferença entre K1 e MAD20 ($p<0,213$). Assintomáticos apresentaram resposta mais intensa a RO33 do que a K1 e MAD20.

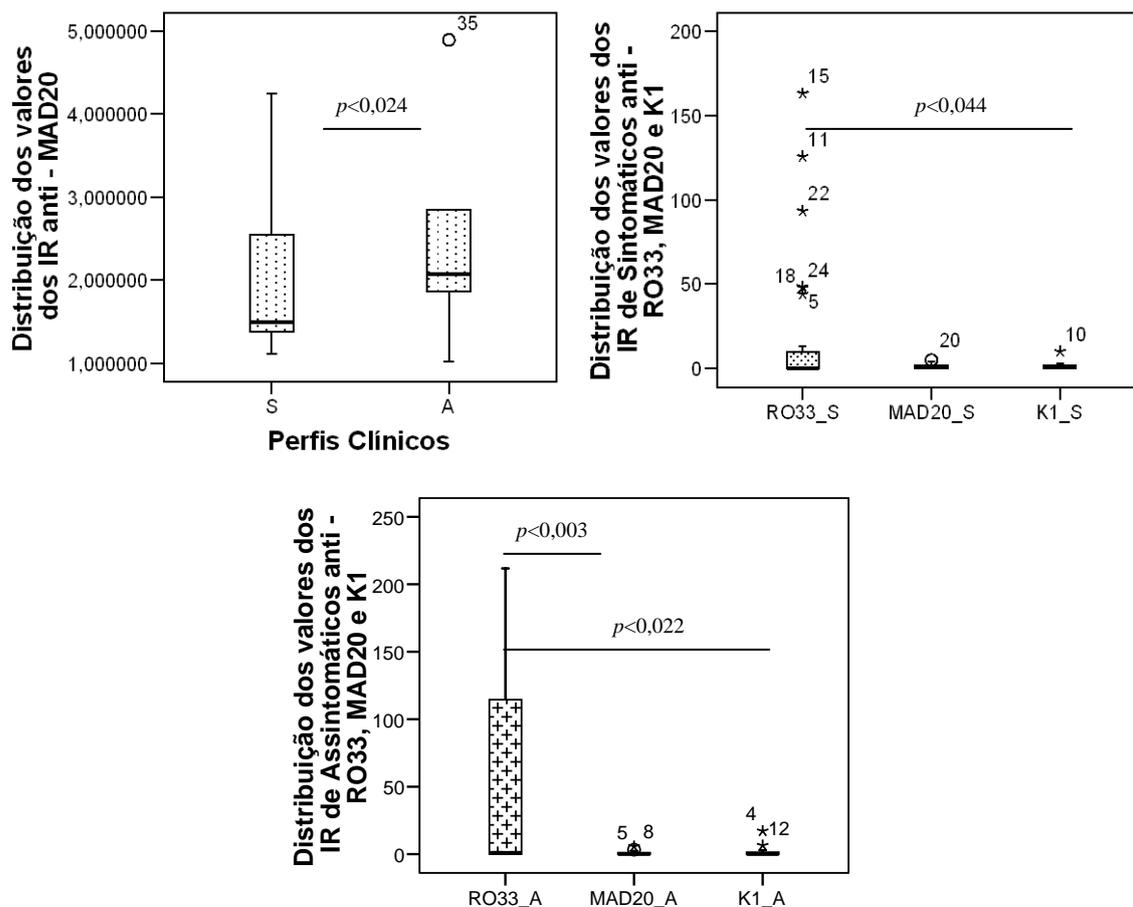


Figura 26- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR contra MAD20 entre sintomáticos (S) e assintomáticos (A) mostrando reconhecimento diferencial, pelo teste de *Mann-Whitney*, com maior resposta de sintomáticos ($p < 0,024$ - canto superior esquerdo). Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR anti-bloco 2 entre sintomáticos (S-canto superior direito), com maior resposta para RO33 do que K1 ($p < 0,044$) e assintomáticos (A-inferior), com maior resposta para RO33 do que MAD20 ($p < 0,003$) e K1 ($p < 0,022$), ambos pelo teste de *Wilcoxon*.

○ Reconhecimento cruzado dos antígenos expressos

A ausência de reconhecimento específico dos plasmas, pelo antígeno representante do mesmo grupo alélico ou da mesma sequência presente na mesma amostra de sangue, pode ser explicada de 2 maneiras. A primeira pela possibilidade de reconhecimento cruzado entre os alelos ou variantes. A segunda pela ausência de anticorpos IgG contra o atual antígeno infectante.

Podemos observar pela tabela abaixo, que apenas dois indivíduos infectados pelo alelo RO33 isoladamente reconheceram o próprio alelo RO33. Todos os outros indivíduos infectados pelo alelo RO33 isoladamente reconheceram:

- Os outros dois alelos isoladamente ou,
- RO33 e um dos outros dois alelos ou,
- Os outros dois alelos apenas ou,

- Os 3 alelos ao mesmo tempo.

Não houve diferença entre sintomáticos e assintomáticos para esses padrões.

Os indivíduos infectados pelo alelo K1 isoladamente reconheceram o alelo MAD20, juntamente com os alelos K1Africano ou K1 Africano e RO33. Não houve reconhecimento isolado de MAD20 por esses indivíduos.

Os indivíduos infectados pelo alelo MAD20A isoladamente não reconheceram o alelo K1 isoladamente e quando o reconheceram, também reconheceram MAD20A ou MAD20A e RO33.

Apenas 3 indivíduos infectados pelo alelo RO33 e 2 indivíduos infectados pelo alelo variante MAD20A não apresentaram resposta contra esses antígenos expressos. O paciente assintomático que apresentou as sequências K1A e MAD20FCR3 não reagiu contra nenhum dos antígenos expressos.

Os dados apontam que pode haver reconhecimento cruzado entre RO33 e MAD20 e RO33 e K1, mas não entre K1 e MAD20. Ao mesmo tempo, o reconhecimento cruzado entre variantes do alelo MAD20 foi menor do que o reconhecimento cruzado entre variantes do alelo K1.

Tabela 14- Análise da resposta imune contra o isolado infectante e a possibilidade de resposta cruzada. Coluna à esquerda=isolados infectantes, linha superior=antígenos expressos. Resposta isolada contra apenas 1 antígeno expresso ou resposta a múltiplos antígenos expressos.

Isolado infectante	Resposta a um único antígeno			Resposta a múltiplos antígenos				Nenhuma resposta
	RO33	MAD20A	K1Africana	R + M	R + KI	M + KI	R + M + KI	
RO33	2	2	2	2	3	1	4	3
MAD20A	1	1	0	1	0	1	0	2
K13D7	0	0	0	0	0	1	0	0
K1A	4	0	1	0	2	2	1	1
K1B	0	0	0	0	0	0	1	0
RO33/MAD20FCR3	0	0	0	0	0	2	0	0
MAD20A/K13D7/K1A	0	0	0	0	0	1	0	0
RO33/MAD20A	0	0	0	0	0	0	1	0
RO33/K1A	0	0	0	0	1	2	0	0
MAD20A/MAD20B	0	1	0	0	0	0	0	0
K1A/MAD20FCR3	0	0	0	0	0	0	0	0
K1C/K13D7/MAD20D	1	0	0	0	0	0	0	0
Total	8	4	3	3	6	10	7	6

○ Longevidade da resposta anti-RO33, anti-K1 e anti-MAD20

Os resultados foram obtidos comparando a reatividade de um grupo de plasmas, 10 de indivíduos assintomáticos e 3 de indivíduos sintomáticos, ao longo do tempo. As respostas dos plasmas iniciais contra os antígenos do bloco 2 foram comparadas às respostas dos memos plasmas, coletados 30 e 60 dias após o tratamento.

➤ **Alelo RO33**

A resposta humoral para esse antígeno sofreu diminuição progressiva, ao longo do tempo, como podemos observar nos gráficos *Box plot* abaixo. Os valores dos IR de um período diminuíram significativamente em relação ao período anterior, como mostrado pelo teste de *Wilcoxon* (IR T0>IR T30 ($p<0,028$), IR T30>IR T60 ($p<0,015$) e IR T0>IR T60 ($p<0,012$)). Apesar dos valores dos IR diminuírem ao longo do tempo, permaneceram altos em comparações aos valores dos IR contra os outros dois antígenos, como pode ser observado na Figura 19. A frequência de plasmas reativos a RO33 nesse grupo permaneceu maior do que 50% nos 3 períodos.

➤ **Alelo_variante MAD20A**

A resposta anti-MAD20A apresentou aumento em T30 em relação ao período T0, porém, o valor de p encontrado pelo teste de *Wilcoxon*, possui valor limítrofe de significância (IR T0<IR T30 ($p<0,063$)). Houve diminuição em T60 (IR T30>IR T60 ($p<0,028$)) com retorno aos níveis iniciais (IR T0>IR T60 ($p<0,465$)). A frequência de reconhecimento duplicou em T30, em relação ao número de plasmas iniciais reativos e voltou a frequência inicial em T60.

➤ **Alelo_variante K1Africana**

A resposta anti-K1Africana não apresentou variação entre os períodos T0 e T30 (IR T0>IR T30 ($p<0,345$)), porém houve diminuição em T60 (IR T30>IR T60 ($p<0,043$)), com retorno aos níveis iniciais (IR T0>IR T60 ($p<0,109$)) pelo teste de *Wilcoxon*. A frequência dos plasmas reativos duplicou em T30, retornando a frequência inicial em T60.

Esses resultados mostram que a resposta contra os antígenos MAD20 e K1 apareceram tardiamente em alguns plasmas, no T30, porém não apresentaram longa duração, desaparecendo no T60. A resposta contra o antígeno RO33 apresentou maior estabilidade ao longo do tempo.

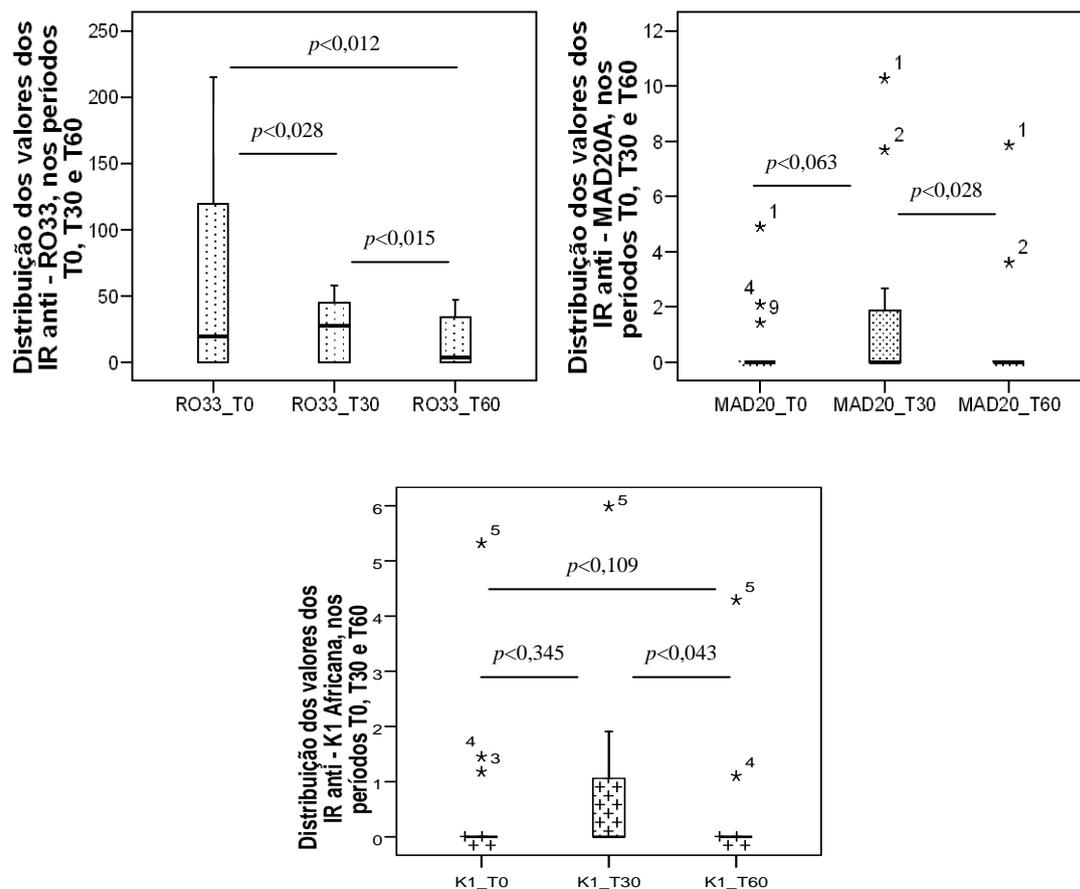


Figura 27- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR anti-RO33, MAD20 e K1, nos período inicial (T0), 30 dias (T30) e 60 dias (T60) pós-tratamento. Diminuição progressiva da resposta anti-RO33, com valor de p , pelo teste de *Wilcoxon*, significativo para todas as comparações. Discreto aumento da resposta em T30 para MAD20 e K1 sem significância estatística, com retorno aos valores iniciais em T60, com significância pelo teste de *Wilcoxon*.

- **MSP1₁₉**

- **Frequência, intensidade e longevidade da resposta humoral anti-MSP1₁₉**

Os resultados mostraram amplo reconhecimento do antígeno, tanto por sintomáticos (81,4%) quanto por assintomáticos (79,2%), sem diferença entre as proporções (Figura 25).

A maioria dos indivíduos apresentou valores de IR>10, como pode ser observado na Tabela 13, contrastando bastante em frequência com os 3 antígenos do bloco 2 e intensidade da resposta com os antígenos K1 e MAD20 do bloco 2.

Não houve diferença na intensidade da resposta, quando comparamos os valores dos IR, entre sintomáticos e assintomáticos, pelo teste de *Mann-Whitney* ($U=258,5$, $p<0,215$).

Não houve diferença entre os valores dos IR para os plasmas colhidos em T0, T30 e T60, quando comparados dois a dois pelo teste de *Wilcoxon* (IR T30>IRT0 ($p<0,917$), IR T60>IR T0 ($p<0,754$), IR T30>IR T60 ($p<0,064$)). A tendência à diminuição da resposta em T60 é evidenciada pela diminuição dos valores dos IR de alguns plasmas, coletados nesse

período, porém, a frequência de 90% de plasmas reativos nesse grupo permaneceu inalterada, ao longo do tempo.

Podemos observar que o percentil 50 (P_{50}) em sintomáticos é maior do que em assintomáticos, sugerindo uma possível correlação positiva entre parasitemia e quantidade de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉, nos plasmas iniciais.

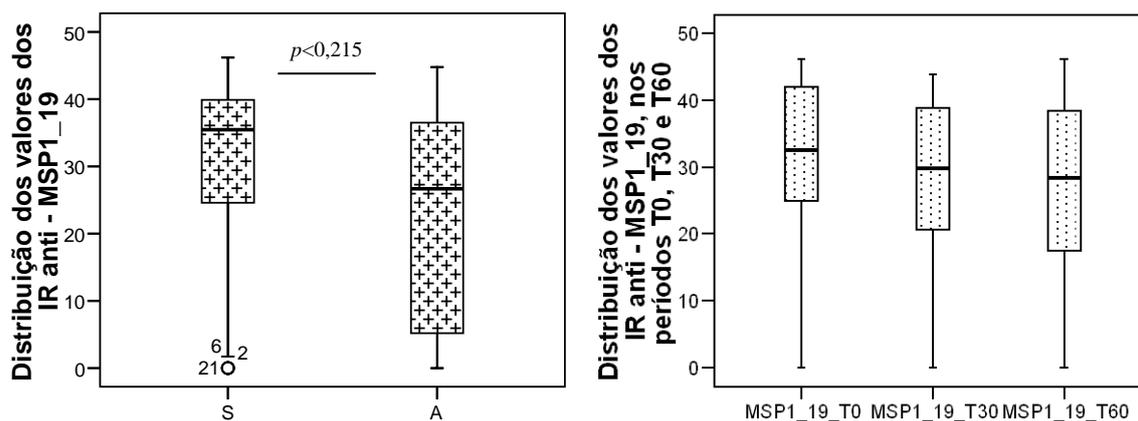


Figura 28- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR anti-MSP1₁₉ entre sintomáticos (S) e assintomáticos (A) à esquerda e nos período inicial (T0), 30 dias (T30) e 60 dias (T60) pós-tratamento à direita. Valor de p pelo teste de *Mann-Whitney*. Não houve diferença entre os valores dos IR nos 3 períodos pelo teste de *Wilcoxon*.

- **MSP6 e MSP7**

- **Frequência, intensidade e longevidade da resposta humoral contra MSP6 e MSP7**

O peptídeo MSP7 foi reconhecido pela metade dos indivíduos sintomáticos e assintomáticos, enquanto o antígeno MSP6 foi reconhecido por 22% dos sintomáticos e 33% dos assintomáticos, como pode ser observado na Figura 23. Não houve diferença significativa entre essas proporções.

Vale lembrar que fragmentos do gene de MSP7 foram amplificados em metade dos isolados da amostra e 70% das amplificações ocorreram em isolados de infecções sintomáticas. A reação de PCR para amplificar o fragmento do gene de MSP6 foi feita em apenas um isolado e a sequência amplificada foi expressa, posteriormente.

Os valores dos IR anti-MSP6 entre sintomáticos variaram de 1-4,99, enquanto em assintomáticos variaram de 1 a >10 . Os valores dos IR anti-MSP7 de ambos variaram entre 1 a >10 .

Não houve diferença nos valores do IR, tanto de MSP6 quanto de MSP7, entre sintomáticos e assintomáticos, pelo teste de *Mann-Whitney*. A comparação entre os valores

dos IR contra MSP6 mostrou $U=281$, $p<0,302$ e para MSP7, $U=316,5$, $p<0,882$, sinalizando a mesma intensidade de resposta entre os dois grupos.

As comparações entre os plasmas iniciais, do T30 e do T60 para o antígeno MSP7 apontaram intensificação da resposta em T30 e retorno aos níveis iniciais no T60 pelo teste de *Wilcoxon*, para comparações entre 2 amostras relacionadas. $IR\ T30 > IR\ T0$ ($p<0,05$), $IR\ T60 > IR\ T0$ ($p<0,314$) e $IR\ T30 > IR\ T60$ ($p<0,025$).

As comparações entre os plasmas do T0, T30 e T60, pelo mesmo teste para o antígeno MSP6, apontaram intensificação da resposta em T30 e T60, em relação aos valores iniciais dos IR. Porém, os valores foram mantidos em T30 e T60. $IR\ T30 > IR\ T0$ ($p<0,043$), $IR\ T60 > IR\ T0$ ($p<0,046$) e $IR\ T30 > IR\ T60$ ($p<0,345$).

Vale lembrar que essas análises foram realizadas com um subgrupo de 13 plasmas, a maioria de assintomáticos. A frequência de plasmas reativos permaneceu inalterada, ao longo do tempo.

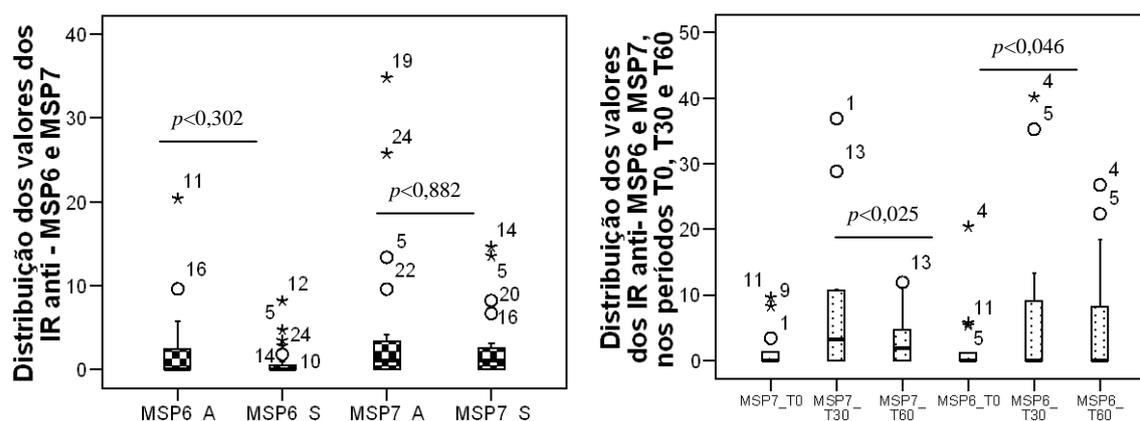


Figura 29- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR anti-MSP6 e MSP7, entre sintomáticos (S) e assintomáticos (A), à esquerda e nos período inicial (T0), 30 dias (T30) e 60 dias (T60) pós-tratamento, à direita. Valor de p , pelo teste de *Mann-Whitney*, à esquerda e *Wilcoxon*, à direita, entre T30 e T60, para MSP7 e T0 e T60, para MSP6.

- **MSP9**

- **Frequência, intensidade e longevidade da resposta humoral anti-MSP9**

Esse antígeno foi reconhecido por 11% dos indivíduos sintomáticos e por 50% dos indivíduos assintomáticos, nas reações de ELISA (Figura 25 e Tabela 13).

Vale lembrar que apesar da baixa prevalência de sintomáticos no reconhecimento, fragmentos do gene de MSP9 foram amplificados em 30% dos isolados sintomáticos e apenas, um tipo de sequência foi amplificada na amostra. A alta reatividade dos plasmas assintomáticos e a relativa baixa prevalência de amplificações de fragmentos nos gDNAs de

isolados assintomáticos (30%) corroboram para a existência de epítomos imunes comuns entre sequências diferentes circulantes e para associação positiva entre aquisição de anticorpos IgG contra esses epítomos e tempo de exposição ao patógeno.

Os valores dos IR dos pacientes sintomáticos variaram entre 1–4,9, enquanto os valores dos IR entre pacientes assintomáticos variaram entre 1–85, como disposto na Tabela 12.

O teste de *Mann–Whitney* apontou diferença nos valores dos IR entre os dois grupos, estando os maiores valores dispostos no grupo de assintomáticos. O teste encontrou $U=189,5$ e $p<0,002$.

Através do teste de *Wilcoxon*, não encontramos variações significativas entre os valores dos IR dos 13 plasmas colhidos em T0, T30 e T60, originários de 3 pacientes sintomáticos e 10 pacientes assintomáticos. $IR\ T0 > IR\ T30$ ($p<0,241$), $IR\ T0 > IR\ T60$ ($p<0,508$) e $IR\ T60 > IR\ T30$ ($p<0,386$). A frequência de plasmas reativos apresentou aumento de 20%, a partir do T30. A seguir, gráficos *Box plot* com os resultados obtidos por *Mann–Whitney* e *Wilcoxon*.

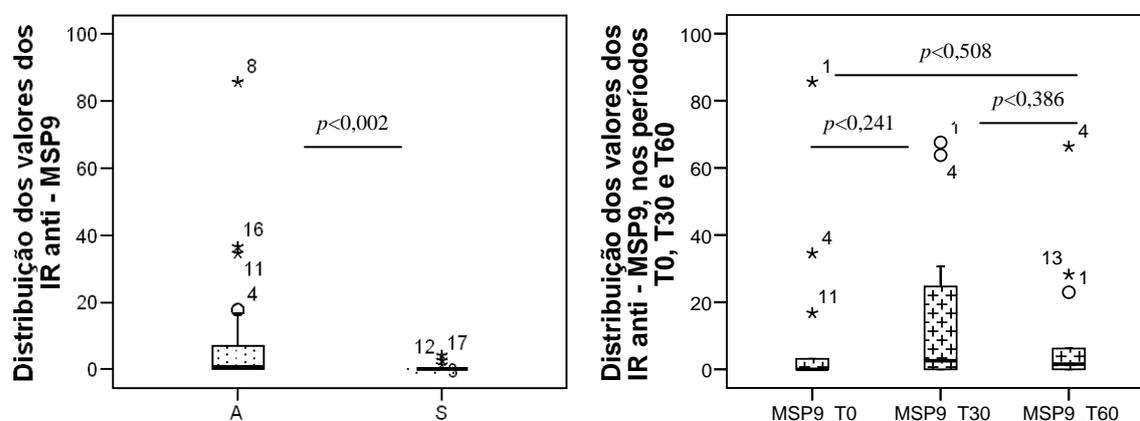


Figura 30- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR anti–MSP9, entre sintomáticos (S) e assintomáticos (A), à esquerda e nos período inicial (T0), 30 dias (T30) e 60 dias (T60) pós–tratamento, à direita. Valores de p , pelo teste de *Mann–Whitney*, à esquerda e *Wilcoxon*, à direita.

A pouca quantidade de fragmentos amplificados nos isolados da amostra e o intenso, freqüente e estável reconhecimento do antígeno por plasmas assintomáticos aponta para a possibilidade de polimorfismos na sequência escolhida, assim como a presença de resposta humoral de memória e o compartilhamento de epítomos comuns entre sequências polimórficas.

4.3.3.2 Resposta humoral aos peptídeos MSP2, MSP4 e MSP5

Os resultados sobre a frequência, intensidade e longevidade da resposta humoral contra esses antígenos serão abordados, a seguir.

- **MSP2**

- **Frequência e intensidade da resposta humoral anti-MSP2**

A reação de anticorpos IgG3 contra alelos de MSP2 foi correlacionada com proteção (8) e o um alto título de anticorpos contra MSP2 também demonstrou associação com proteção (162). A reatividade de plasmas de área endêmica brasileira contra MSP2 de isolados de campo nunca havia sido testada, anteriormente.

Os 3 antígenos foram reconhecidos por proporção semelhante de indivíduos sintomáticos e assintomáticos (Figura 25). O alelo FC27 foi o menos reconhecido e a maioria dos indivíduos que reagiu a um dos variantes de IC1, também reagiu ao outro variante da mesma família. Não houve frequência de reconhecimento diferencial entre sintomáticos e assintomáticos.

O Quadro 3, sobre a diversidade de sequências encontradas na amostra, mostrou que apenas uma sequência foi amplificada da amostra de isolados de infecções assintomáticas e as ampliações dos 3 tipos de sequências foram positivas em apenas 36% do restante da amostra.

A Tabela 14 abaixo mostra os valores dos IR dispostos em padrões de cor, contra os peptídeos FC27, IC1_69 e IC1_XXX, referentes à MSP2, como também os valores referentes à MSP4 e MSP5.

Os valores dos IR variaram entre 1 a >10 para os alelos FC27 e IC1_69 no grupo assintomático e entre 1-4,9 e 1-9,9 para os mesmos alelos, respectivamente, no grupo dos sintomáticos. Os valores dos IR anti-IC1_XXX variaram entre 1-9,9 no grupo de assintomáticos e 1-4,9 no grupo de sintomáticos. Houve tendência de maiores valores dos IR entre assintomáticos.

Cinco plasmas sintomáticos oriundos de indivíduos adultos jovens, primoinfectados ou com história pregressa de apenas 2 infecções prévias por *P. falciparum*, não reagiram a nenhum antígeno. Os 4 plasmas não-reativos de assintomáticos, também são oriundos de indivíduos com poucas infecções prévias por *P. falciparum*. Dois deles são crianças e dois são adultos jovens.

antígeno IC1, corroborando para a evidência de epítomos comuns entre sequências polimórficas. Apesar de não terem sido amplificadas sequências do alelo IC1 na localidade de Engenho Velho, os plasmas dos indivíduos residentes na localidade apresentaram amplo e intenso reconhecimento dos antígenos IC1_69 e IC1_XXX (porção central da Tabela 14, na parte de plasmas assintomáticos).

O alelo FC27 foi o menos amplificado e o que apresentou menor frequência de reconhecimento. Isso pode apontar para um maior polimorfismo da região de hibridação dos oligonucleotídeos usados na amplificação, entre variantes dessa família alélica.

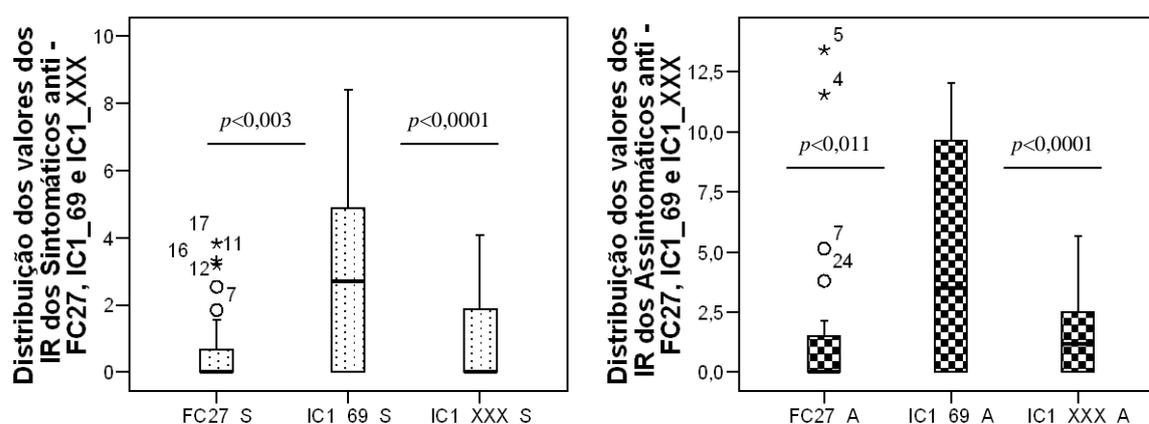


Figura 31- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR entre sintomáticos (S) à esquerda e assintomáticos (A) à direita, anti-alelos de MSP2. Valores de $p < 0,05$ pelo teste de *Wilcoxon*.

○ Longevidade da resposta humoral anti-MSP2

➤ Peptídeo FC27

Os valores dos IR obtidos com os plasmas coletados nos 3 períodos inicial (T0), 30 dias (T30) e 60 dias (T60) pós-tratamento foram comparados através do teste de *Wilcoxon*, para comparações dois a dois entre duas amostras relacionadas. Não houve alteração entre os plasmas coletados em T0 e T30 ($p < 0,575$), mas houve diminuição da resposta em T60, com $p < 0,018$ em comparação com os valores dos IR em T30.

Houve aumento do número de plasmas reativos em T30 e posterior diminuição em T60, porém o número final de plasmas reativos foi maior do que no período inicial.

➤ Peptídeos IC1_69 e XXX

A intensidade da resposta contra o variante 69 aumentou em T30 (IR T30 > IR T0, $p < 0,026$) e diminuiu em T60, porém sem significância estatística (IR T30 > IR T60, $p < 0,074$). O mesmo padrão de resposta foi observado para o variante XXX com aumento em T30 ($p < 0,011$) e diminuição em T60, porém sem significância estatística ($p < 0,059$).

A frequência de plasmas reativos contra os dois variantes permaneceu inalterada ao longo do tempo.

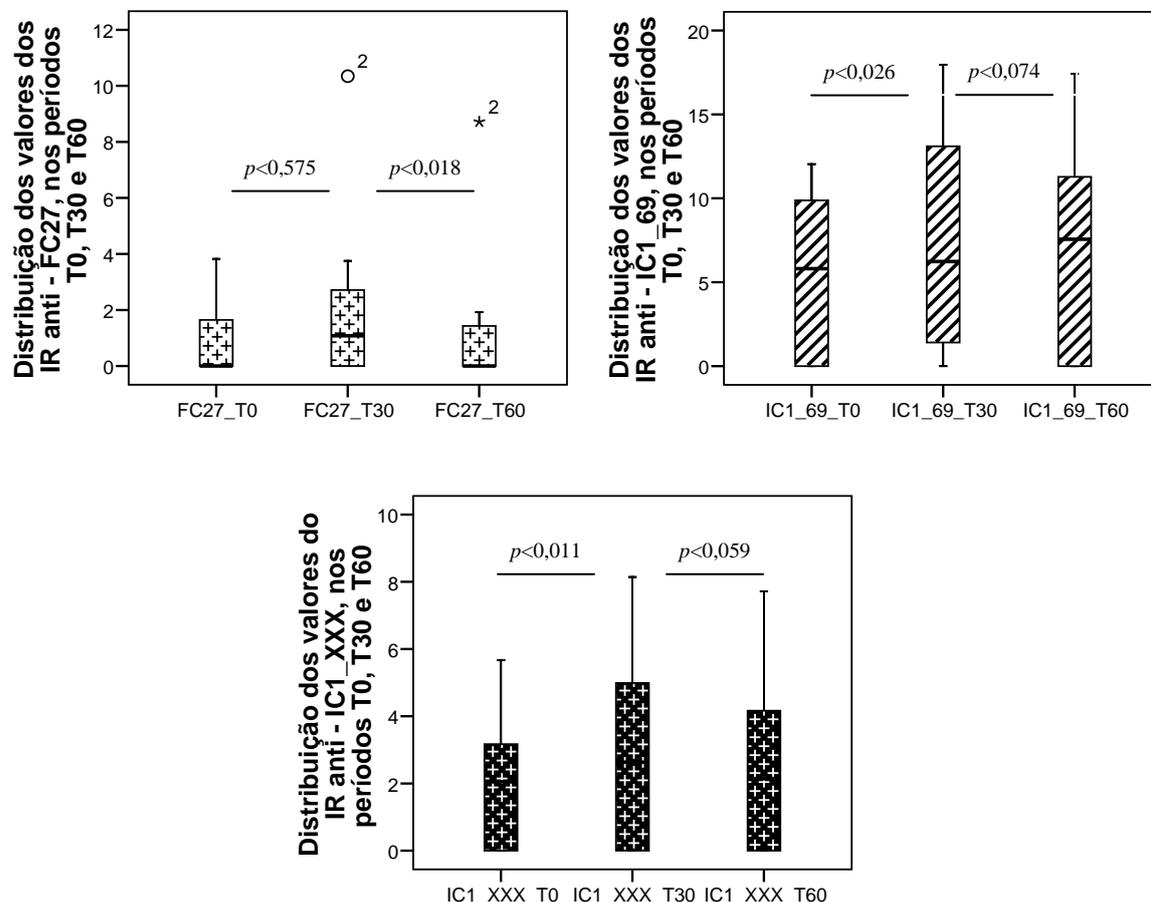


Figura 32- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR para os peptídeos MSP2 nos 3 tempos. Valores de *p* obtidos pelo teste de *Wilcoxon*.

- **MSP4 e MSP5**

- **Frequência, intensidade e longevidade do reconhecimento humoral anti-MSP4**

O antígeno MSP4 recombinante foi reconhecido por 67% dos plasmas dos indivíduos sintomáticos e por 71% dos plasmas dos assintomáticos nas reações de ELISA, como mostra a Figura 25. A alta frequência de plasmas reativos de assintomáticos contrasta com a ausência de ampliações de sequências entre os gDNAs dos isolados encontrados nesse grupo (Quadro 3). Um maior número de plasmas assintomáticos apresentou valores de IR maiores do que 10 contra MSP4 em comparação aos plasmas sintomáticos, como pode ser observado na Tabela 15.

Essas observações foram conferidas pelos testes estatísticos. Houve diferença estatisticamente significativa entre os valores dos IR dos assintomáticos e sintomáticos pelo

teste de *Mann-Whitney* ($U=210,5$, $p<0,030$). Os maiores valores dos IR ocorreram no grupo dos indivíduos assintomáticos.

Os valores dos IR dos plasmas colhidos no corte (T0) e nos períodos de 30 (T30) e 60 dias (T60) pós-tratamento quando comparados dois a dois, pelo teste de *Wilcoxon*, não apresentaram variações ao longo do tempo para nenhuma das combinações. A frequência de plasmas reativos permaneceu inalterada ao longo do tempo. A permanência dos valores em T60 colabora com a hipótese de desenvolvimento de uma resposta imune de longa duração contra esse antígeno, assim como a possibilidade de envolvimento do mesmo em proteção.

Os gráficos *Box plot*, com a distribuição dos valores dos IR entre os perfis clínicos e ao longo do tempo podem ser visualizados na Figura abaixo.

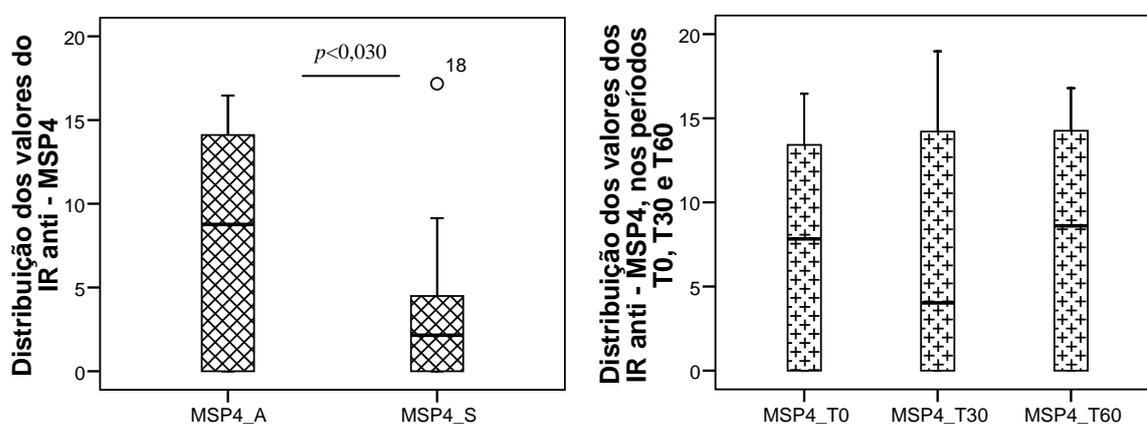


Figura 33- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR contra o antígeno MSP4 entre assintomáticos (A) e sintomáticos (S) à esquerda e ao longo do tempo à direita. Não há diferença entre as flutuações ao longo do tempo. Valor de p obtido pelo teste de *Mann-Whitney* com significância para $p<0,05$.

○ **Frequência, intensidade e longevidade do reconhecimento humoral anti-MSP5**

A frequência do reconhecimento do peptídeo MSP5 recombinante foi alta em pacientes assintomáticos, representando 42% dos indivíduos desse grupo e baixa em sintomáticos, representando apenas, 7% dos pacientes desse grupo. A frequência diferencial de reconhecimento entre os grupos apresentou significância pelo teste do X^2 de *Pearson*, com $p<0,004$.

Os dados contrastam com a prevalência de amplificações dos fragmentos gênicos nos isolados de ambos os grupos. Alta frequência de amplificações foi observada a partir dos gDNAs dos isolados de infecções sintomáticas e um baixo número foi observado em isolados de infecções assintomáticas.

Apesar da maior frequência de reconhecimento de MSP5 por plasmas assintomáticos, os valores dos IR em ambos os grupos variaram de 1-4,9.

Essas observações foram conferidas pelos testes estatísticos. Quando comparamos os valores dos IR de sintomáticos e assintomáticos pelo teste de *Mann-Whitney* encontramos diferença significativa estatisticamente ($U=212$, $p<0,004$). Porém, esse resultado pode ser decorrente da alta frequência de reconhecimento por assintomáticos.

A duração da resposta humoral anti-MSP5 foi conferida através da comparação das reatividades dos plasmas ao longo do tempo. Não houve diferenças nas variações dos valores dos IR anti-MSP5 ao longo do tempo, pelo teste de *Wilcoxon*. $IR\ T0 > IR\ T30$ ($p<0,499$), $IR\ T0 > IR\ T60$ ($p<0,866$) e $IR\ T30 > IR\ T60$ ($p<0,753$). A frequência de plasmas reativos nesse grupo apresentou queda em T30, porém alguns plasmas voltaram a apresentar reatividade ao antígeno no T60 (Figura 34).

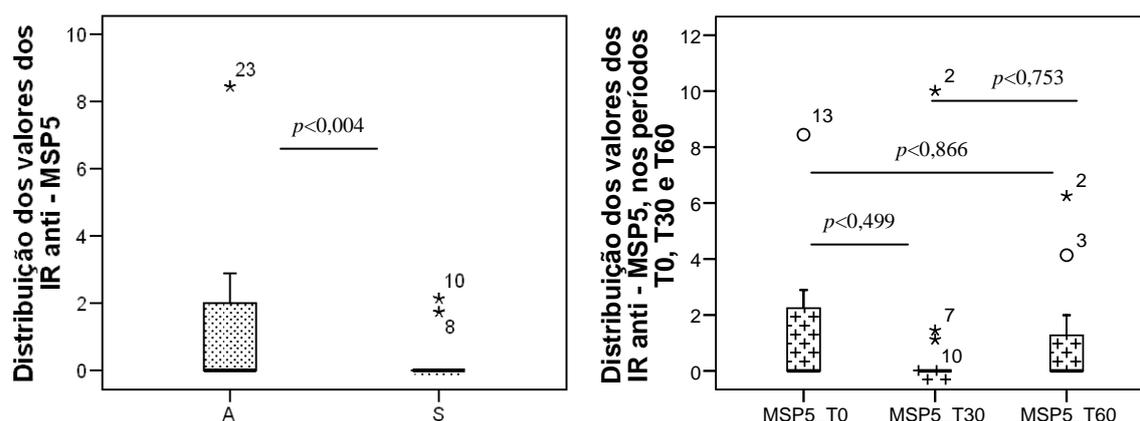


Figura 34- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR contra o antígeno MSP5, entre assintomáticos (A) e sintomáticos (S), à esquerda e ao longo do tempo, à direita. Há diferença significativa entre os valores de Assintomáticos e Sintomáticos, à esquerda, pelo teste de *Mann-Whitney*, com significância para $p < 0,05$.

4.3.3.3 Resposta humoral aos peptídeos MSP3 e MP10

O mesmo padrão de disposição dos resultados será seguido para esses antígenos. Primeiramente, a tabela com os valores dos IR para os dois antígenos dispostos em padrões de cor será apresentada.

Tabela 16- Padrões dos Índices de Reatividade obtidos em teste de ELISA para os peptídeos MSP3 3D7-like, MSP3 K1-like e para os antígenos MSP10. Plasmas não-reagentes, para nenhum dos antígenos, em rosa-claro.

	MSP3_3D7	MSP3_K1	MSP10_17	MSP10_369	MSP10_3D7		MSP3_3D7	MSP3_K1	MSP10_17	MSP10_369	MSP10_3D7
	Plasmas Assintomáticos										
Plasmas Sintomáticos											
IR e Padrão	<1		1-4,9			5-9,9		>10		>50	

- **MSP3**

- **Frequência, intensidade e longevidade da resposta humoral anti-MSP3**

Houve amplo reconhecimento do antígeno MSP3_3D7-like, tanto por sintomáticos (70,3%) quanto por assintomáticos (75%), como mostra a Figura 23. O antígeno MSP3_K1-like foi reconhecido por apenas 15% dos plasmas de sintomáticos e 29% dos plasmas de assintomáticos.

A Tabela 16 e a Figura 25 mostram que os valores dos IR maiores do que 10 contra MSP3_3D7-like representaram 50% dos valores no grupo de assintomáticos, enquanto que no grupo de sintomáticos ocuparam apenas 18,5% dos valores. Quatro plasmas do grupo de assintomáticos apresentaram valores dos IR maiores do que 50, enquanto apenas um plasma do grupo de sintomáticos apresentou o mesmo valor. Esses resultados apontam que plasmas de indivíduos assintomáticos apresentam maior reatividade contra esse antígeno.

Por outro lado, esses dados contrastam com o número de fragmentos amplificados nos isolados dos dois grupos. Houve menor número de amplificações do que de plasmas reativos. Apesar da ausência de amplificação do fragmento da sequência K1 entre esses isolados, houve frequência de reconhecimento relativamente alta pelo peptídeo expresso, a maioria por plasmas de assintomáticos.

A maioria dos valores dos IR contra K1-like ficou entre 1 a >10 entre os plasmas assintomáticos e entre 1-9,9 entre os plasmas sintomáticos. Todos os indivíduos sintomáticos e assintomáticos que reconheceram o antígeno K1-like, também reconheceram o antígeno 3D7-like.

Essas observações foram conferidas pelos testes estatísticos. A comparação entre a intensidade da resposta contra o antígeno 3D7-like entre os dois perfis clínicos pelo teste de *Mann-Whitney*, não apontou diferença ($U=228$, $p<0,067$). Porém, houve tendência de valores maiores dos IR no grupo de assintomáticos, evidenciada pela média das posições dos valores dos IR de cada grupo (22,4 para o grupo dos sintomáticos e 30 para o grupo dos assintomáticos).

Também, não houve diferença entre as respostas de sintomáticos e assintomáticos contra o antígeno K1-like, pelo mesmo teste ($U=269$, $p<0,163$) (Figura 35).

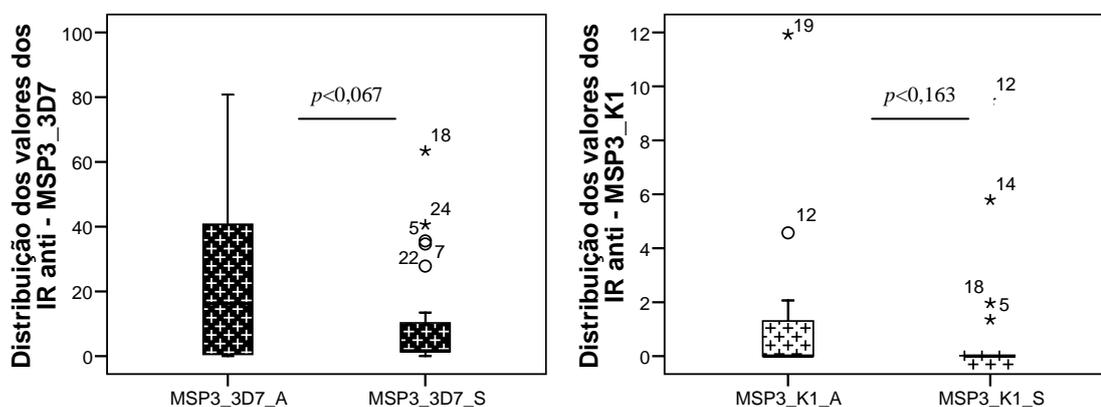


Figura 35- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR contra os antígenos MSP3_3D7 à esquerda e MSP3_K1 à direita, entre assintomáticos (A) e sintomáticos (S). Valores de p obtidos pelo teste de *Mann-Whitney*.

O escasso reconhecimento do alelo K1 e a resposta bem menor, comparada com a resposta contra o alelo 3D7, apóiam a hipótese de que existam poucos genótipos circulantes do alelo K1 nas localidades do estudo. Todos os indivíduos que apresentaram anticorpos contra o antígeno K1-like, também reconheceram o antígeno 3D7-like. Isso sugere a

existência de epítomos comuns aos dois antígenos e a possibilidade de resposta cruzada aos dois antígenos.

A duração da resposta anti-MSP3 foi conferida através da comparação da reatividade de um grupo de plasmas ao longo do tempo. O mesmo grupo de plasmas, coletados nos períodos de 30 e 60 dias pós-tratamento, foi utilizado para comparar flutuações nos valores dos IR para os peptídeos MSP3_3D7 e MSP3_K1.

Aplicando o teste de *Wilcoxon* para comparações dois a dois entre amostras relacionadas, encontramos diminuição nos valores dos IR contra MSP3_3D7 ao longo do período, com significância estatística entre os valores em T0 e T60 ($p<0,022$) e em T30 e T60 ($p<0,033$). O mesmo ocorre para a resposta contra o antígeno MSP3_K1, com significância estatística entre os valores em T0 e T60 ($p<0,043$).

Houve discreta diminuição da frequência de plasmas reativos anti-MSP3_3D7-like no T60 e diminuição importante da reatividade anti-MSP3_K1 ao longo do tempo. Nenhum plasma apresentou reatividade contra a sequência do alelo K1 no T60.

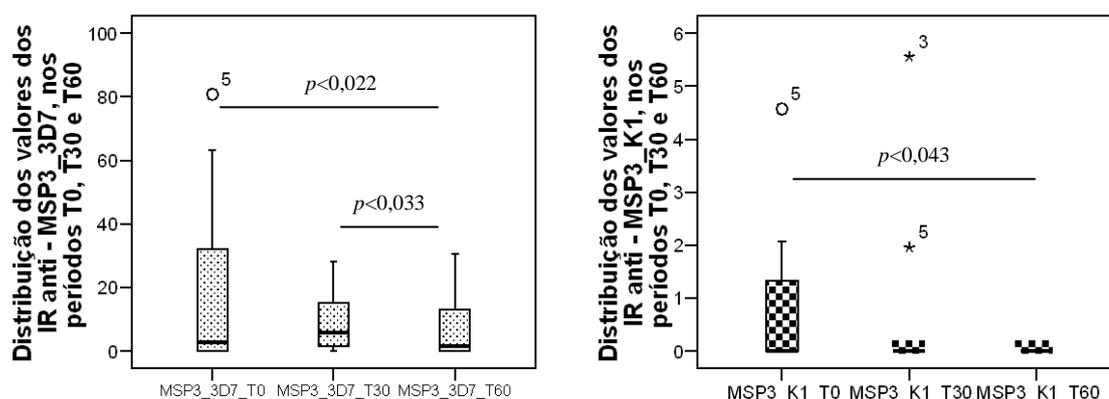


Figura 36- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR contra os antígenos MSP3 ao longo do tempo. Valores de p obtidos pelo teste de *Wilcoxon*.

- **MSP10**

- **Frequência e intensidade da resposta humoral anti-MSP10**

Os 3 peptídeos expressos de MSP10 foram reconhecidos amplamente por sintomáticos e assintomáticos. A sequência expressa a partir do isolado de número 17 foi reconhecida por 75% dos assintomáticos e 70% dos sintomáticos, a do isolado 369 foi reconhecida por 77,7% dos sintomáticos e 75% dos assintomáticos e a sequência da cepa 3D7 foi reconhecida por 74% dos sintomáticos e 79% dos assintomáticos (Figura 25). A frequência elevada de reconhecimento dos antígenos e a baixa amplificação de fragmentos nos isolados da amostra

(Quadro 3) apontam para a existência de intenso polimorfismo na região de hibridação dos oligonucleotídeos utilizados em PCR, assim como, o compartilhamento de epítomos comuns entre as diversas sequências. Nenhum fragmento foi amplificado nos gDNAs dos isolados assintomáticos, a despeito da intensa reatividade dos plasmas desse grupo pelos peptídeos expressos.

Os valores dos IR contra cada peptídeo expresso variaram igualmente entre os plasmas sintomáticos e os assintomáticos. Os valores anti-MSP10_17 variaram de 1-9,9 e os valores anti-MSP10_369 e MSP10_3D7 variaram entre 1 a >10. Valores maiores do que 10 foram mais frequentes para MSP10_3D7 nos dois grupos clínicos.

Essas observações foram validadas pelos testes estatísticos. O teste de *Mann-Whitney* não apontou diferença nos valores dos IR entre assintomáticos e sintomáticos para nenhum dos 3 peptídeos (MSP10_17 (U=317, $p<0,894$), MSP10_369 (U=283, $p<0,436$), MSP10_3D7 (U=320, $p<0,939$).

Os maiores valores dos IR tanto para sintomáticos quanto para assintomáticos foram contra o peptídeo 3D7, como mostra o teste de *Wilcoxon*. Para os sintomáticos, IR 3D7>IR 369>IR 17, com $p<0,0001$ para quaisquer das 3 comparações e para assintomáticos, IR 3D7>IR 369 ($p<0,001$), IR 3D7>IR 17 ($p<0,003$) e IR 369>IR 17 ($p<0,014$) (Figura 37).

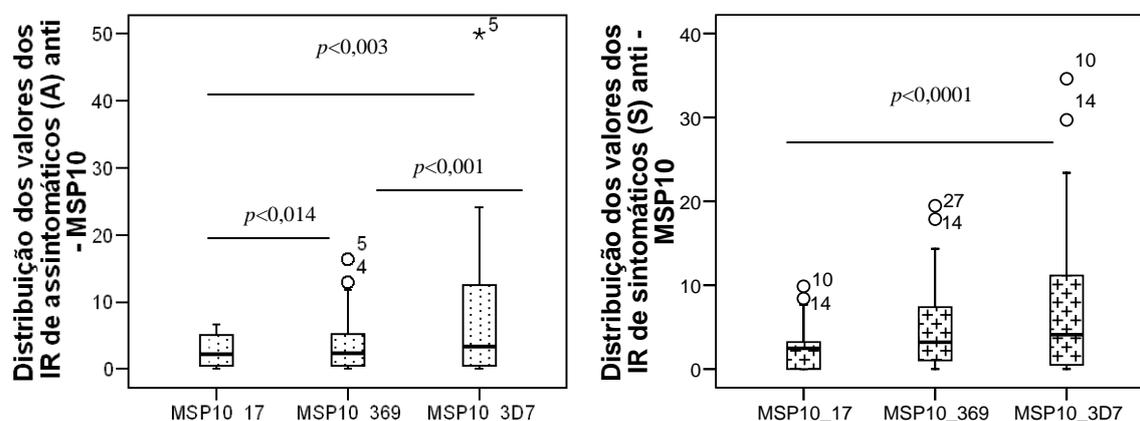


Figura 37- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR anti-MSP10 entre assintomáticos (A) à esquerda e sintomáticos (S) à direita. Não há diferença na resposta entre grupos para o mesmo variante, por *Mann-Whitney*. Maior resposta contra MSP10_3D7 nos dois grupos clínicos pelo teste de *Wilcoxon*.

○ Longevidade da resposta humoral anti-MSP10

➤ MSP10_17

Os valores dos IR obtidos nas reações de ELISA com os plasmas coletados no T0, T30 e T60 apontaram variações significantes ao longo do tempo, com intensificação da resposta

em T60. IR T30>IR T0 ($p<0,059$), IR T60>IR T0 ($p<0,041$), IR T60>IR T30 ($p<0,814$). A frequência de plasmas reativos também aumentou ao longo do tempo.

➤ MSP10_369

Não houve significância nas variações dos valores dos IR contra MSP10_369 ao longo do tempo. IR T30>IR T0 ($p<0,314$), IR T60>IR T0 ($p<0,213$), IR T30>IR T60 ($p<0,374$). A frequência dos plasmas reativos sofreu poucas alterações ao longo do tempo.

➤ MSP10_3D7

Semelhante à resposta anti-MSP10_369, não houve significância nas variações dos valores dos IR ao longo do tempo. IR T30>IR T0 ($p<0,386$), IR T60>IR T0 ($p<0,530$), IR T30>IR T60 ($p<0,248$). A frequência dos plasmas reativos também apresentou o mesmo comportamento (Figura 38).

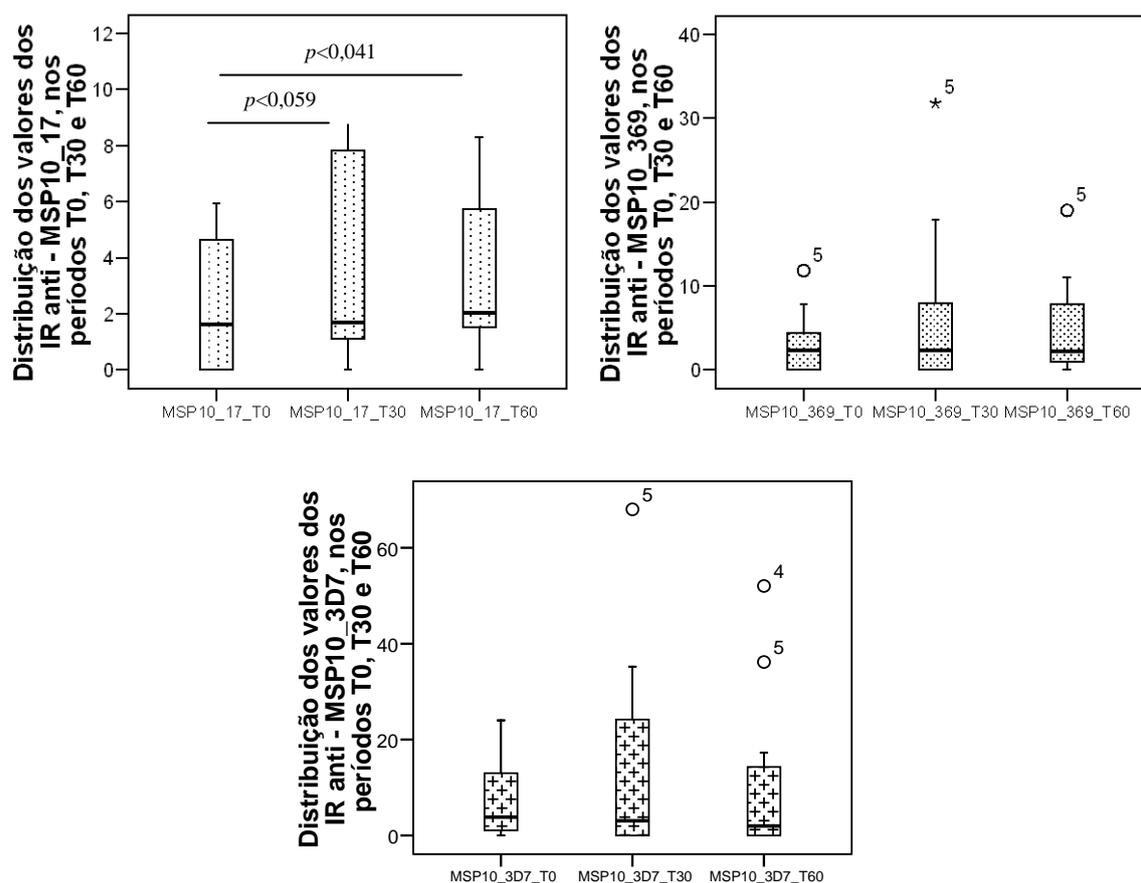


Figura 38- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR anti-MSP10_17/369/3D7 ao longo do tempo. Diferença significativa apenas entre os períodos T0 e T60 para MSP10_17, por *Wilcoxon*.

4.3.4 Isotipagem das subclasses de IgG envolvidas na resposta humoral aos peptídeos MSP

Os plasmas escolhidos para essa análise apresentaram IR>10 na reação de ELISA anterior, quando utilizados na diluição 1/200. A mesma diluição dos plasmas foi mantida conforme explicado no item 3.22 dos Materiais e Métodos e, conseqüentemente, plasmas com IR<10 não foram analisados.

Os resultados sobre as subclasses de IgG envolvidas na resposta contra os antígenos do complexo MSP1 (MSP1-bloco 2_RO33, MSP1₁₉, MSP6, MSP7 e MSP9), MSP2_IC169, MSP4, MSP3_3D7 e MSP10 serão abordados abaixo.

4.3.4.1 Isotipagem de anticorpos IgG anti-complexo MSP1

- **MSP1-bloco2_RO33**

Plasmas de 9 indivíduos assintomáticos e de 7 pacientes sintomáticos foram analisados. Os resultados obtidos com o plasma inicial e do T30 de um indivíduo assintomático (plasma 42) será mostrado separadamente, pelas singularidades observadas. A seguir, os resultados na Tabela 17.

Tabela 17- Média das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-MSP1-bloco2_RO33 em plasmas sintomáticos (S-cinza-claro) e assintomáticos (A-cinza-escuro).

Plasmas/ Total de plasmas	Subclasses de IgG			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	DO*	DO*	DO*	DO*
A/8	0,321	0,057	0,745	0,092
S/7	0,360	0,050	0,342	0,048
DO*(A)/DO*(S)	0,89	1,13	2,17	1,90

Os resultados acima mostraram preponderância de IgG3 no plasma dos indivíduos assintomáticos. A resposta dos plasmas dos sintomáticos foi homogênea quanto à presença de IgG1 e IgG3. Houve maior presença da subclasse IgG4 entre os plasmas assintomáticos. Os resultados são mostrados no gráfico da Figura 39.

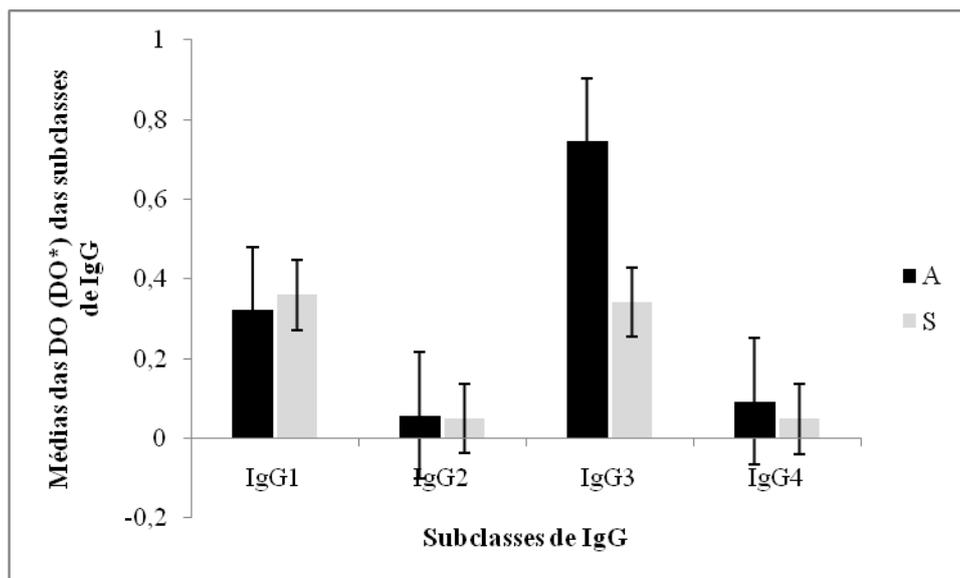


Figura 39- Gráfico de barras das médias dos valores das DOs (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP1-bloco 2_RO33 entre assintomáticos (A) e sintomáticos (S).

A média das idades dos indivíduos do grupo assintomático foi de 34 anos (4-56) e a média no grupo de sintomáticos foi de 21 anos (8-39). Nos dois grupos, os valores das DO de todas as subclasses aumentaram progressivamente em função da idade e as subclasses IgG1 e IgG3 foram preponderantes desde a infância, mas com diferenças entre assintomáticos e sintomáticos, já nesse período. O assintomático mais jovem, de 4 anos, apresentou prevalência da resposta de IgG3, enquanto nos sintomáticos mais jovens houve presença equivalente de IgG1 e IgG3. O pico das duas subclasses nos dois grupos ocorreu aos 30 anos, porém IgG1 apresentou queda posterior, enquanto IgG3 permaneceu inalterada. No grupo dos assintomáticos uma nova elevação de IgG1 foi observada aos 60 anos e discreta queda dos valores de IgG3 nessa idade. Os resultados parecem sugerir que a aquisição estável e preponderante de IgG3 pode estar associada à ausência de sintomas.

Os plasmas de números 39 (49 anos) e 42 (84 anos) foram também coletados em T30 e T60 e foram os únicos que mantiveram os valores dos IR >10 no ELISA anterior. As análises foram feitas apenas com os plasmas do T30, mas os plasmas permaneceram reativos ao antígeno no T60.

O plasma 42 apresentou valores de DO alto para todas as subclasses, tanto no plasma inicial quanto no plasma do T30 e esse resultado foi específico para o antígeno RO33. Observamos queda nos valores de IgG1 em T30 e manutenção dos valores iniciais para as outras subclasses.

O plasma 39 apresentou resposta preponderante de IgG3 tanto no início como em T30 e os valores das DO de IgG1 e IgG4 sofreram queda em T30, sugerindo que a presença do parasita possa estar correlacionada com os títulos altos dessas subclasses.

O padrão de frequência das subclasses para esse antígeno encontrado no plasma 42, talvez seja o resultado de uma longa e contínua exposição natural ao parasita. A contribuição da resposta anti-RO33 para a ausência de sintomas por longos períodos pode ser explicada por um conjunto de respostas humorais que compreende a presença estável e preponderante de anticorpos citofílicos e de padrão Th1 de resposta imune, IgG1 e IgG3, associada ao aumento de IgG1 na presença de parasitemia e à presença marcante e permanente de anticorpos neutralizantes e de padrão Th2 de resposta imune.

Tabela 18- Valores da DO de cada subclasse de IgG, nos plasmas assintomáticos 39 e 42 anti-RO33 ao longo do tempo.

Plasmas	Subclasses							
	IgG1		IgG2		IgG3		IgG4	
	Início	T30	Início	T30	Início	T30	Início	T30
39	0,259	0,078	0,071	0,060	1,197	0,942	0,209	0,078
42	0,640	0,420	0,757	0,898	0,687	0,720	0,1195	0,146

- **MSP1₁₉**

Plasmas de 17 pacientes assintomáticos e 20 sintomáticos, juntamente com 8 plasmas assintomáticos e 3 plasmas sintomáticos do T30 e do T60 preencheram os critérios de inclusão para a identificação das subclasses de IgG envolvidas na resposta contra esse antígeno.

A Tabela 19 apresenta os resultados das médias das DO (DO*) de cada subclasse em cada um dos grupos citados acima. A resposta preponderante nos 4 grupos foi de IgG1. As DO* das subclasses IgG1 e IgG3 entre sintomáticos foram maiores do que em assintomáticos. Os plasmas dos assintomáticos do T30 e do T60 apresentaram aumento gradativo das subclasses IgG1 e IgG3, porém a prevalência da subclasse IgG1 foi mantida ao longo do tempo. Os plasmas sintomáticos do T30 e do T60 apresentaram diminuição das subclasses IgG1 e IgG3 ao longo do tempo, porém a prevalência de IgG1 também foi mantida.

Tabela 19- Médias dos valores das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-MSP1₁₉ em plasmas sintomáticos (S-cinza-claro) e assintomáticos (A-cinza-escuro), do T30 e do T60.

Plasmas/ Total de plasmas	Subclasses			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	DO*	DO*	DO*	DO*
A/17	0,222	0,044	0,056	0,045
S/20	0,598	0,047	0,108	0,054
T30_A/8	0,505	0,047	0,086	0,052
T30_S/3	0,388	0,045	0,044	0,061
T60_A/8	0,498	0,056	0,100	0,061
T60_S/3	0,403	0,047	0,047	0,056

A média das idades do grupo assintomático foi de 38 anos (4-84 anos) e a média das idades no grupo sintomático foi de 28 anos (8-62 anos). A subclasse IgG1 apresentou nos dois grupos padrão flutuante nas várias idades até 60 anos e aumento progressivo dos valores das DO nos plasmas, a partir dos 60 anos. O assintomático e o sintomático mais jovens, 4 e 8 anos respectivamente, já apresentam resposta preponderante de IgG1, porém em níveis menores do que nos adultos.

A subclasse IgG3 apresentou apenas um padrão flutuante, com elevações e diminuições ao longo das idades, porém sempre mantendo valores de DO relativamente baixos. Os dados acima são exemplificados na Figura 40.

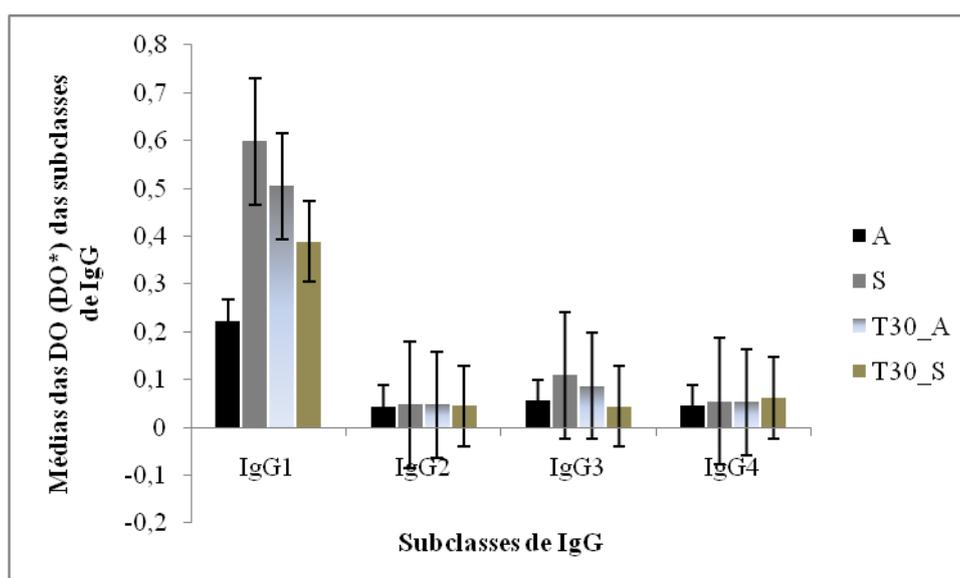


Figura 40- Gráfico de barras das médias dos valores das DO (DO*) das subclases de IgG, anti-MSP1₁₉, nos grupos assinalados na legenda. Maior prevalência de IgG1 em todos os grupos.

- **MSP6 e MSP7**

A Tabela 20 apresenta os resultados para MSP7. Podemos observar o predomínio das subclasses IgG1 e IgG4 na resposta de assintomáticos e a discreta prevalência relativa das subclasses IgG1, IgG3 e IgG4 nos plasmas sintomáticos. Todos os grupos apresentaram a mesma DO* para IgG2. Os plasmas em T30 e T60 são de indivíduos assintomáticos diferentes dos indivíduos dos plasmas iniciais. A resposta global desses plasmas foi menor em T30 e T60, evidenciada pela diminuição dos valores das médias das DO (DO*) de cada subclasse, mantendo discreta prevalência de IgG4 nos dois períodos (Figura 41).

Tabela 20- Médias das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-MSP7 em assintomáticos (A-cinza-escuro) e sintomáticos (S-cinza-claro) e plasmas assintomáticos do T30 e do T60.

Plasmas/ Total de plasmas	Subclasses			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	DO*	DO*	DO*	DO*
A/4	0,121	0,045	0,047	0,233
S/3	0,078	0,046	0,068	0,077
AT30/6	0,058	0,046	0,046	0,067
AT60/2	0,046	0,049	0,051	0,071

A média das idades nos dois grupos foi de 30 anos, variando de 13-39 anos no grupo dos sintomáticos e de 15-53 anos no grupo dos assintomáticos.

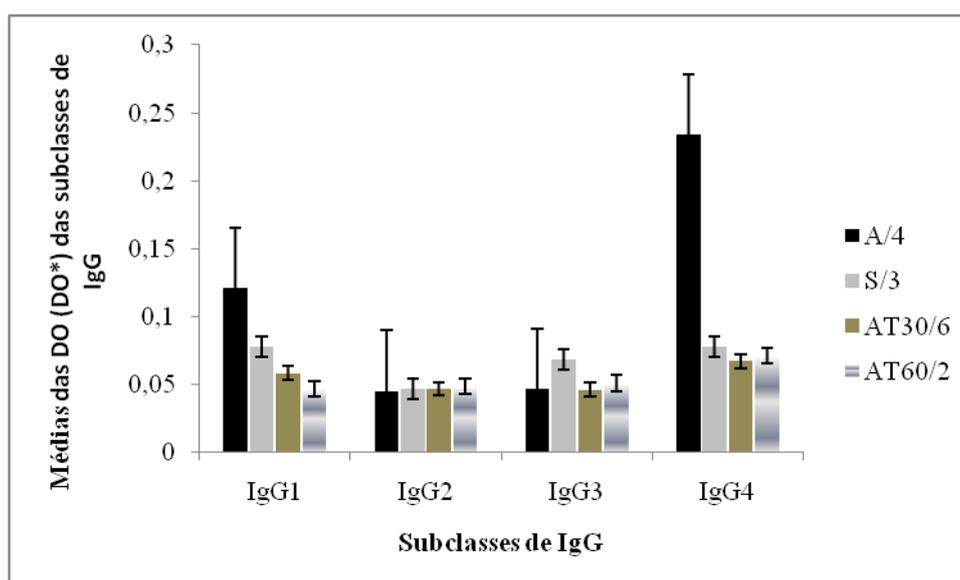


Figura 41- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP7 em plasmas assintomáticos (A), sintomáticos (S) e assintomáticos do T30 e do T60.

A Tabela 21 apresenta os resultados da isotipagem para o antígeno MSP6. Apenas foram considerados plasmas do T30 e do T60, pois os plasmas iniciais não preencheram os critérios de inclusão citados anteriormente. Todos os plasmas são de indivíduos assintomáticos. A subclasse preponderante foi IgG4 e com níveis maiores do que contra MSP7 nos mesmos períodos. Ambos os grupos foram formados pelos mesmos indivíduos com idade adulta. Os dados são dispostos no gráfico da Figura 42.

Tabela 21- Médias das DO (DO*) de cada subclasse de IgG, na resposta contra MSP6, a partir de plasmas do T30 e do T60.

Plasmas/ Total de plasmas	Subclasses			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	DO*	DO*	DO*	DO*
AT30/4	0,056	0,050	0,047	0,117
AT60/4	0,062	0,045	0,047	0,113

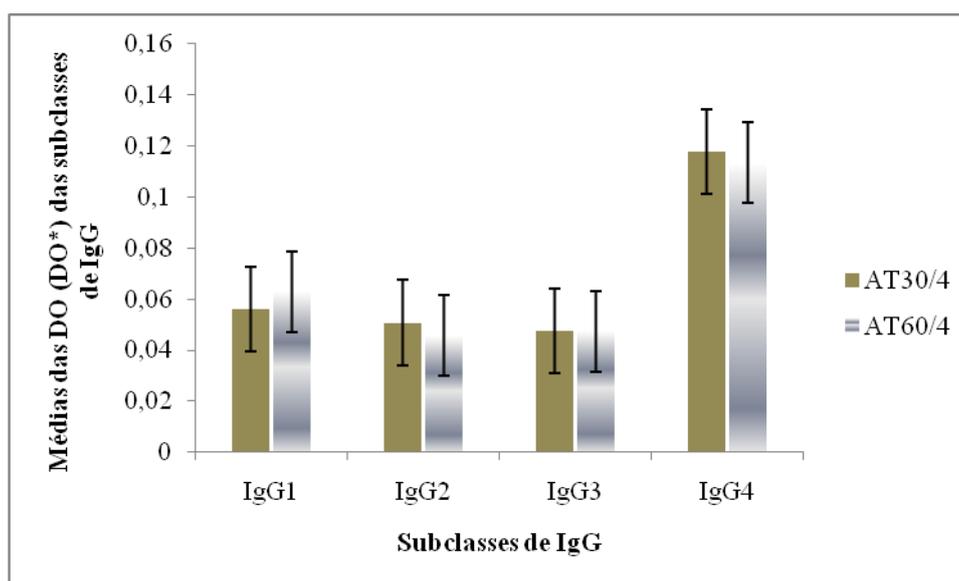


Figura 42- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP6 em plasmas assintomáticos do T30 e do T60.

A resposta dos assintomáticos contra os antígenos MSP6 e MSP7 evidenciou a presença de anticorpos neutralizantes da subclasse IgG4, cuja prevalência foi mantida ao longo do tempo, na resposta anti-MSP6. A presença de maior quantidade de anticorpos IgG1 contra MSP7 pode contribuir para a atenuação dos sintomas de malária no momento da infecção, levando à ausência ou atenuação dos sintomas.

- **MSP9**

A Tabela 22 apresenta os resultados da isotipagem das subclasses de IgG dos plasmas que apresentaram IR>10, nas reações de ELISA anteriores. Apenas 1 paciente sintomático foi analisado.

Tabela 22- Média das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-MSP9 em plasmas assintomáticos iniciais (A-cinza-escuro), sintomático (S-cinza-claro) e assintomáticos do T30 e do T60.

Plasmas/ Total de plasmas	Subclasses			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	DO*	DO*	DO*	DO*
A/5	0,173	0,054	0,058	0,051
S/1	0,146	0,190	0,066	0,055
AT30/5	0,235	0,076	0,055	0,051
AT60/3	0,097	0,055	0,058	0,062

A tabela acima aponta o predomínio da resposta de IgG1 entre assintomáticos com parasitemia e após 30 e 60 pós-tratamento semelhante à resposta contra MSP1₉. Porém, houve diminuição de IgG1 em T60 e não houve flutuações nos valores das médias das DOs (DO*) das outras subclasses ao longo do tempo. O predomínio de IgG1 não foi encontrado no plasma do paciente sintomático, evidenciando uma resposta mista de IgG1 e IgG2 na presença de parasitemia. Os indivíduos assintomáticos apresentaram idades entre 39-78 anos e o indivíduo sintomático 28 anos. O gráfico da Figura 43 exemplifica os dados apontados.

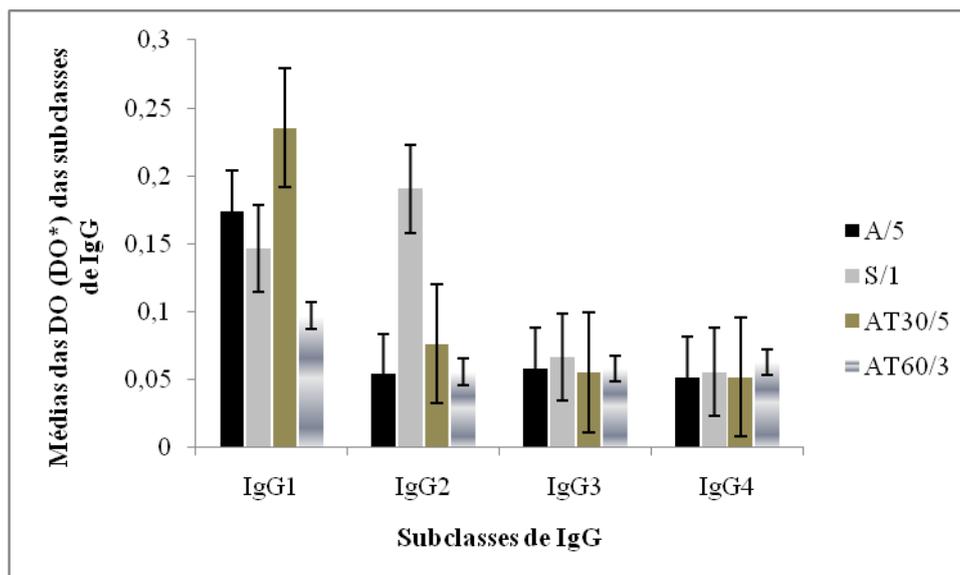


Figura 43- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP9 em plasmas assintomáticos (A), sintomático (S) e de assintomáticos do T30 e do T60.

4.3.4.2 Isotipagem de anticorpos IgG anti-MSP2-IC1_69 e MSP4

- **MSP2_IC1_69**

Plasmas reativos aos antígenos MSP2 que apresentaram $IR > 10$ nas reações de ELISA anteriores foram considerados nas reações de identificação das subclasses. Obedecendo a padronização estabelecida, apenas 7 plasmas de indivíduos assintomáticos e 6 coletados em T30 e T60 foram isotipados contra, apenas, o alelo IC1_69. Os resultados são mostrados na Tabela 23.

Tabela 23- Médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP2-IC1_69 em plasmas assintomáticos coletados no corte e nos períodos de 30 e 60 dias pós-tratamento.

Plasmas/ Total de plasmas	Subclasses			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	DO*	DO*	DO*	DO*
A/7	0,291	0,078	1,089	0,207
AT30/6	0,331	0,1	1,308	0,096
AT60/6	0,373	0,083	1,185	0,092

A Tabela 23 aponta a preponderância da resposta de IgG3 na presença ou ausência de parasitemia. A resposta de IgG1, mais baixa, manteve-se também ao longo do tempo. A maior

flutuação no valor das DO*, encontrada entre as subclasses, durante os 3 períodos, foi para IgG4.

Os grupos são formados por indivíduos com idades entre 15-84 anos e a prevalência de IgG3 foi independente da idade. Podemos observar que indivíduos mais jovens e indivíduos sintomáticos não apresentaram $IR > 10$, na reação de ELISA anterior, provavelmente pelos baixos títulos de IgG3, pois esta parece ser a subclasse preponderante da resposta humoral. Os dados são mostrados no gráfico da Figura 44.

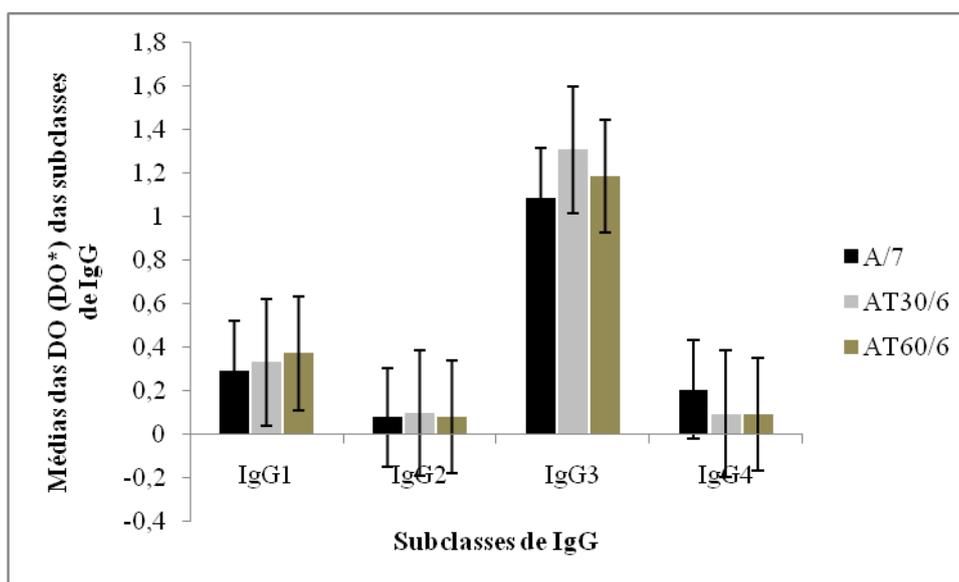


Figura 44- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP2-IC1_69 nos plasmas assintomáticos iniciais, do T30 e do T60.

- **MSP4**

Plasmas de 11 indivíduos assintomáticos, 4 sintomáticos e 6 plasmas coletados em T30 e 7 plasmas coletados em T60 foram submetidos à identificação das subclasses contra o antígeno MSP4. Todos os plasmas do T30 e do T60 são de indivíduos assintomáticos, que também estão presentes entre os plasmas iniciais (Tabela 24).

Tabela 24- Média das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-MSP4 em plasmas assintomáticos (A-cinza-escuro), sintomáticos (S-cinza-claro) e assintomáticos do T30 e do T60.

Plasmas/ Total de plasmas	Subclasses			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	DO*	DO*	DO*	DO*
A/11	0,274	0,048	0,149	0,054
S/4	0,119	0,047	0,309	0,057
AT30/6	0,333	0,049	0,454	0,071
AT60/7	0,277	0,047	0,313	0,052

Os resultados mostram preponderância de IgG1 e IgG3 nas respostas dos sintomáticos e assintomáticos, porém maior quantidade de IgG1 foi observada na resposta de assintomáticos e maior quantidade de IgG3 na resposta de sintomáticos, no momento da infecção. Os plasmas de assintomáticos coletados em T30 e T60 mostraram aumento na quantidade de IgG3 ao longo do tempo.

A média das idades no grupo de assintomáticos foi de 44,5 anos (15-84 anos) e no grupo sintomático foi de 30,5 anos (20-39). Diferenças entre valores de DO foram observadas em integrantes de diferentes idades no mesmo grupo, porém foram independentes da idade (Figura 45).

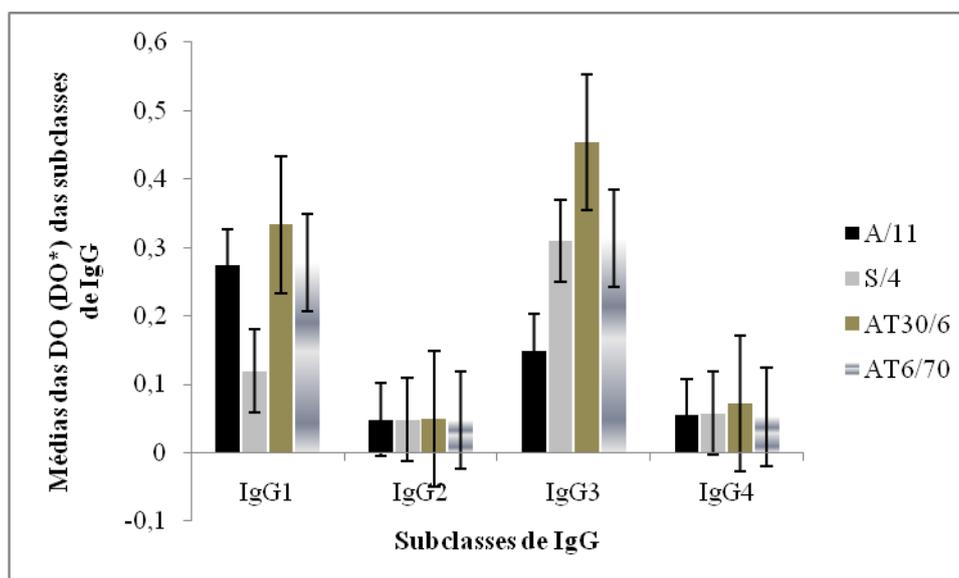


Figura 45- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP4 nos plasmas assintomáticos (A), sintomáticos (S) e assintomáticos do T30 e do T60.

4.3.4.3 Isotipagem de anticorpos IgG anti-MSP3_3D7-like e MSP10

- **MSP3_3D7**

A identificação das subclasses de anticorpos IgG anti-MSP3_3D7 foi obtida em ensaio de ELISA, como descrito no item 3.18 dos Materiais e Métodos. Apenas os plasmas que haviam apresentado IR>10 na reação de ELISA para identificação dos plasmas reativos foram utilizados na identificação das subclasses. 21 plasmas, 13 provenientes de pacientes assintomáticos e 8 de pacientes sintomáticos foram analisados. Os plasmas do T30 e do T60 são dos mesmos indivíduos assintomáticos. A Tabela 25 mostra as médias das DO (DO*) de cada subclasse entre os perfis clínicos e em T30 e T60.

Observamos no grupo de assintomáticos a presença homogênea e preponderante das subclasses IgG1 e IgG3 e em menor quantidade a subclasse IgG4. Houve diminuição das duas subclasses, ao longo do tempo, porém a subclasse IgG3 permaneceu maior. O grupo de sintomáticos apresentou apenas a prevalência da subclasse IgG1.

Tabela 25- Médias das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-MSP3_3D7-like nos plasmas assintomáticos (A-cinza-escuro), sintomáticos (S-cinza-claro) e assintomáticos do T30 e do T60.

Plasmas/ Total de plasmas	Subclasses			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	DO*	DO*	DO*	DO*
A/13	0,397	0,051	0,422	0,102
S/8	0,314	0,041	0,067	0,044
AT30/7	0,171	0,046	0,222	0,075
AT60/5	0,120	0,046	0,246	0,070

Podemos observar na tabela acima, que a presença da parasitemia parece importante para a geração de uma alta resposta de IgG1. Tanto pacientes assintomáticos e sintomáticos apresentaram alta resposta de IgG1, porém, na ausência do parasita ocorreu diminuição importante nesses títulos, como observado no grupo de assintomáticos. A resposta de IgG3 parece estar menos relacionada à presença da parasitemia do que IgG1, pois a preponderância da resposta de IgG3 permaneceu em T60. A presença estável de IgG3 em assintomáticos pode ser uma das explicações para a ausência de sintomatologia clínica e baixa parasitemia encontrados nesse grupo.

A média das idades dos assintomáticos foi de 43 anos (15-84 anos) e a média das idades dos sintomáticos foi de 23 anos (8-54 anos). A maioria dos plasmas assintomáticos

coletados no momento da infecção apresentou maior quantidade IgG3, de maneira independente da idade, em comparação aos plasmas sintomáticos coletados no mesmo período.

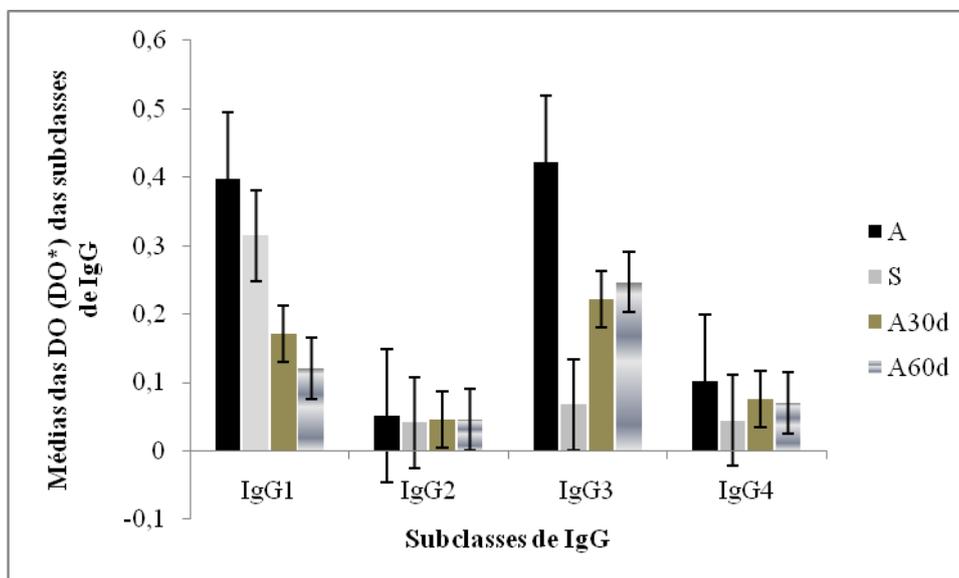


Figura 46- Gráfico de barras da distribuição das médias das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-MSP3 em plasmas assintomáticos, sintomáticos e assintomáticos do T30 e do T60.

- **MSP10**

As subclasses de IgG envolvidas na resposta contra os 3 peptídeos MSP10 expressos foram identificadas e os resultados serão mostrados, a seguir.

- **MSP10_17**

A identificação das subclasses de IgG envolvidas na resposta contra esse peptídeo foi realizada a partir de 4 plasmas, 2 de cada grupo clínico. O grupo assintomático foi representado por plasmas do período T30.

Houve maior prevalência de IgG1 nos plasmas sintomáticos e prevalência maior e semelhante de IgG1 e IgG2 nos plasmas assintomáticos do T30.

- **MSP10_369**

A frequência das subclasses de IgG envolvidas no reconhecimento desse peptídeo acompanhou a tendência evidenciada para MSP10_17, de maior quantidade da subclasse IgG1 no grupo sintomático e equilíbrio na prevalência das subclasses IgG1 e IgG2 no grupo de assintomáticos. Houve intensificação da resposta de IgG2 nos plasmas assintomáticos do T30 e diminuição e equilíbrio de todas as subclasses em T60.

○ **MSP10_3D7**

A subclasse IgG1 prevaleceu nos dois grupos clínicos. Assintomáticos do T30 apresentaram intensificação da resposta de IgG2 e de IgG1. Semelhante ao observado para MSP10_369 com plasmas do T60 houve diminuição de todas as subclasses.

Ambos os peptídeos geraram respostas caracterizadas pela prevalência de IgG1 em indivíduos sintomáticos e intensificação da resposta de IgG1 e IgG2 em indivíduos assintomáticos no período posterior à infecção, com queda em todos os valores a longo prazo. Os resultados obtidos para MSP10_17, MSP10_369 e MSP10_3D7 são mostrados na Tabela 26.

Na Figura 47, apenas os dados para MSP10_369 são exemplificados, pois as subclasses de IgG apresentaram comportamento semelhante aos outros antígenos.

Tabela 26- Média das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-MSP10 expressos entre sintomáticos (S-cinza-claro), assintomáticos (A-cinza-escuro) e assintomáticos do T30 e do T60.

Plasmas/ Total	Antígenos	Subclasses de IgG			
		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
		DO*	DO*	DO*	DO*
S/2	MSP10_17	0,125	0,055	0,070	0,068
AT30/2		0,103	0,101	0,052	0,049
A/3	MSP10_369	0,136	0,084	0,069	0,054
S/4		0,201	0,053	0,066	0,060
AT30/3		0,092	0,129	0,061	0,047
AT60/3		0,065	0,064	0,053	0,049
A/9	MSP10_3D7	0,078	0,056	0,057	0,051
S/9		0,113	0,055	0,068	0,056
AT30/4		0,103	0,107	0,060	0,052
AT60/4		0,064	0,069	0,055	0,052

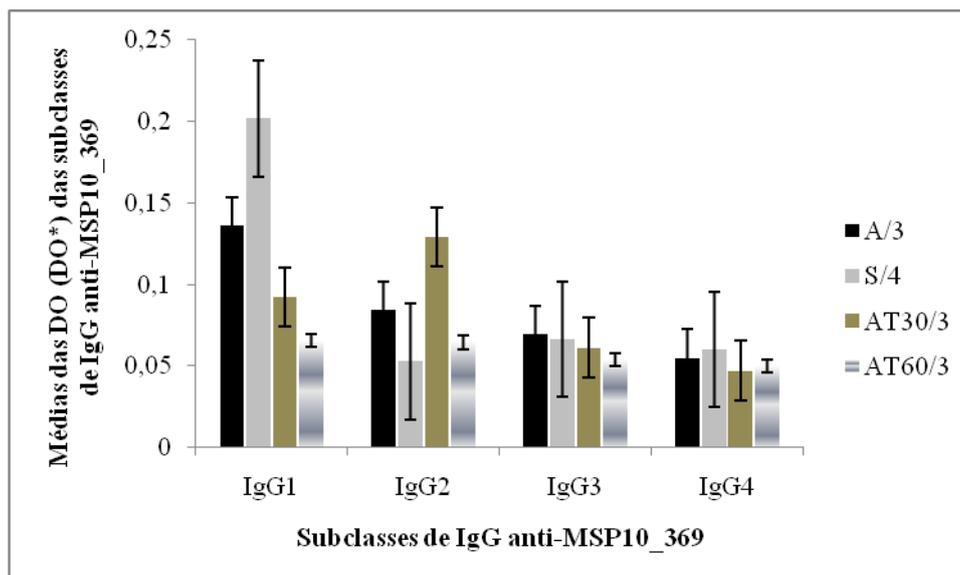


Figura 47- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-MSP10_369 nos plasmas assintomáticos (A), sintomáticos (S) e assintomáticos do T30 e do T60.

4.4 Proteínas secretadas por organelas do merozoíto: MAEBL, EBAs e AMA1

Os próximos resultados referem-se às proteínas secretadas pelas organelas apicais micronemas (AMA1 e EBAs) e róptrias (MAEBL).

O mesmo padrão de apresentação será seguido, iniciando-se com os resultados sobre a diversidade das sequências encontradas e a freqüência das ampliações entre os gDNAs da amostra. A freqüência de reconhecimento humoral dos peptídeos expressos pelos plasmas assintomáticos e sintomáticos, bem como as análises da intensidade e longevidade das respostas humorais entre sintomáticos e assintomáticos serão mostradas em seguida. Finalmente, as análises sobre as subclasses de IgG serão abordadas.

Essas proteínas atuam na etapa de invasão eritrocitária e possuem domínios comuns de ligação ao eritrócito chamados de *Duffy* e PAN. Os PAN domínios contêm uma estrutura *hair-pin loop like* e uma região conservada com 3 pontes dissulfetos e mediam interações proteína-proteína ou proteína-carboidrato. A Figura abaixo mostra um desenho esquemático da estrutura desses antígenos. Os domínios *Duffy* encontram-se na região 2 das proteínas EBAs e os domínios PAN nos blocos homólogos M1-M2 das proteínas AMA1 e MAEBL.

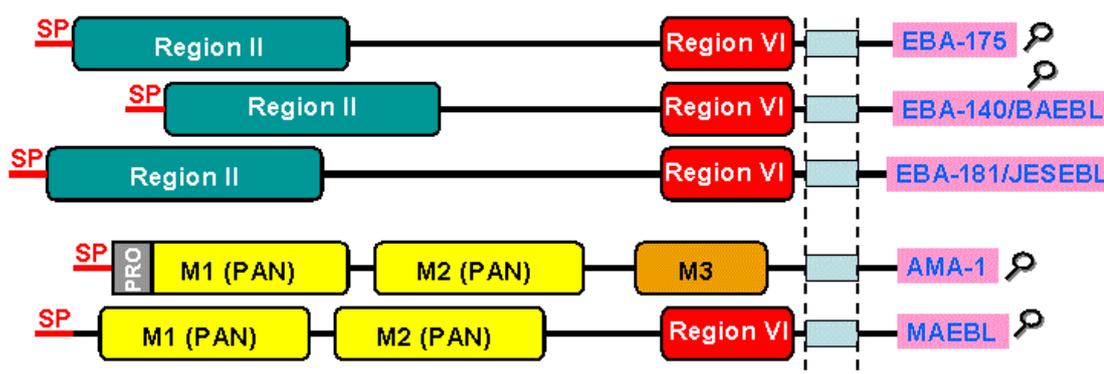


Figura 48- Domínios de ligação ao eritrócito de proteínas secretadas pelo merozoíto segundo a base de dados *PlasmoDB*.

Esses antígenos são fundamentais na etapa da invasão eritrocitária e alvos do reconhecimento imunológico. Há evidências que apontam papel protetor dos anticorpos específicos contra eles no desenvolvimento de episódios clínicos ou parasitemia por *P. falciparum*.

4.4.1 Diversidade das sequências gênicas de AMA1, MAEBL e EBAs nos isolados do estudo

- **AMA1**

Dois pares de oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar o gene de AMA1, o primeiro em 2006 e o segundo em 2010. O genoma da cepa 3D7 foi utilizado como molde.

Fragmentos de 793 pares de bases (pb) foram amplificados com o primeiro par, representando os domínios I e II (M1+M2=B) (163).

Houve amplificação em 52,4% da amostra, incluindo gDNA dos isolados de campo deste estudo, dos isolados já presentes no laboratório e das cepas FCR3 e 3D7. A maioria das amplificações, porém, ocorreu em isolados de infecções sintomáticas.

Apenas um genótipo circulante foi encontrado após o seqüenciamento e alinhamento, idêntico à sequência da cepa 3D7. Porém, os fragmentos amplificados por esse par não estavam na fase de leitura correta para clonagem em vetores de expressão pGEX a partir da clonagem no vetor pGEM-T. Dessa forma, foi desenhado um novo par.

O segundo par foi desenhado para amplificar fragmentos de 460 pb, compreendendo a o domínio I e a região entre os domínios I e II (M1+RID=A) (163). Porém, só houve amplificação em 18% dos gDNAs da amostra e em apenas um isolado de infecção assintomática. Um único genótipo circulante foi encontrado, idêntico à sequência da cepa

3D7. Um dos fragmentos amplificados foi escolhido para ser expresso no vetor de expressão pGEX2T. O peptídeo expresso pode ser visualizado como uma banda única, sem fragmentos truncados em gel SDS–PAGE na Figura 24.

Porém, o reconhecimento humoral desse peptídeo recombinante, por menos da metade dos plasmas da amostra (Figura 25), obrigou-nos a expressar o primeiro fragmento de 793 pb (AMA1-B) disposto no gel da Figura 24.

Baseando-se em evidências que apontam a existência de epítomos conformacionais em AMA1, importantes para o reconhecimento humoral, a presença de uma região maior do domínio II nesse fragmento poderia facilitar a identificação dos plasmas reativos à AMA1.

Houve aumento na frequência dos plasmas reativos à AMA1 de sintomáticos e assintomáticos, como mostrou a Figura 25 anteriormente.

- **MAEBL**

O par de oligonucleotídeos foi desenhado para amplificar um fragmento de 1466 pb, localizado no éxon 2.

Dessa forma, foi expressa como peptídeo recombinante, a região C–terminal do domínio M1 e a região correspondente ao domínio M2. O éxon 2 é bastante polimórfico, apresentando grande quantidade de mutações pontuais (*SNPs*) principalmente, entre a região central e a porção C–terminal desse éxon, segundo a base de dados *PlasmoDB*. O genoma da cepa 3D7 foi utilizado como molde.

Porém, as amplificações foram positivas em apenas 6 isolados, 3 isolados oriundos de infecções sintomáticas e 3 isolados já existentes no laboratório. Não houve amplificações do gene de MAEBL em gDNAs de isolados de infecções assintomáticas. A amplificação foi bem sucedida a partir da cepa 3D7, porém negativa a partir da cepa FCR3.

Fragmentos humanos foram amplificados a partir de 4 isolados oriundos de infecções assintomáticas. Esses resultados apontam um grande polimorfismo na região dos domínios de hibridação dos oligonucleotídeos, como mostrado na base de dados *PlasmoDB*, através da presença de grande número de mutações pontuais (*SNPs*) na região do éxon 2.

Apesar da pequena quantidade de fragmentos amplificados, os resultados do seqüenciamento e alinhamento apontaram a presença de dois genótipos circulantes. Dois peptídeos recombinantes de 57,1 kDa foram expressos a partir dos fragmentos amplificados do isolado XXX e da cepa 3D7.

- **EBA175, EBA140 e EBA181**

Os genes MAL13P1.60, MAL7P1.176 e PFA0125c, responsáveis pela expressão de EBA140, EBA175 e EBA181, localizam-se nos cromossomos 13, 7 e 1, respectivamente. Os três genes possuem estrutura bastante similar, composta por 4 éxons, sendo que o éxon 1 é o responsável pela codificação do ectodomínio das proteínas.

A região II que compreende os domínios de ligação ao eritrócito (*Duffy binding domains* F1 e F2) localiza-se na porção N-terminal das 3 proteínas. Epítomos imunes estão presentes nos domínios *Duffy* nas 3 proteínas, sendo que em EBA140 e EBA175, os epítomos imunes estendem-se ao longo dos ectodomínios, segundo a base de dados *IEDB (Immune Epitopes Data Base)*. Um epítopo imune (NKND) compartilhado pelas proteínas EBA140 e EBA175 localiza-se na porção final de F1 em EBA140 e entre os domínios F1 e F2 em EBA175. Os epítomos imunes em EBA181 estão praticamente restritos ao domínio *Duffy* F2.

Os pares de oligonucleotídeos foram desenhados buscando-se amplificar regiões codificadoras de epítomos imunes. O fragmento amplificado de 443 pb do gene PFA0125c (EBA181) contém as regiões codificadoras dos epítomos imunes do domínio F2. O fragmento de 356 pb do gene MAL13P1.60 (EBA140) e o fragmento de 369 pb do gene MAL7P1.176 (EBA175) compreendem as regiões codificadoras do epítopo imune NKND, comum a ambas.

Um intenso polimorfismo é descrito para essas regiões segundo a base de dados *PlasmoDB*. A frequência de ampliações positivas dos 3 genes é mostrada na Tabela 27.

Tabela 27- Número absoluto e frequência em porcentagem de fragmentos amplificados dos genes de EBA140, EBA175 e EBA181 a partir de gDNAs dos isolados do estudo, dos isolados do laboratório e das cepas FCR3 e 3D7.

Origem dos gDNAs	Nº absoluto de ampliações / % de ampliações		
	MAL13P1.60 (EBA140)	MAL7P1.176 (EBA175)	PFA0125c (EBA181)
Infecções sintomáticas	14 (48,2%)	13 (44,8%)	17 (58,6%)
Infecções assintomáticas	5 (20,8%)	4 (16,6%)	1 (4,1%)
Isolados do laboratório	3 (50,0%)	6 (100%)	4 (66,6%)
Cepa FCR3	-	+	+
Cepa 3D7	+	+	+
Fragmentos humanos	-	-	4_A/1_S

A maioria das ampliações positivas dos 3 genes ocorreu a partir de gDNAs oriundos de infecções sintomáticas ou dos gDNAs de isolados existentes no laboratório. Apesar do intenso polimorfismo das regiões amplificadas, os dados do seqüenciamento e alinhamento dos fragmentos revelaram um único genótipo circulante de cada um dos genes. O único

isolado africano da amostra não apresentou amplificação de fragmentos dos genes MAL13P1.60 (EBA140) e PFA0125c (EBA181), sendo positivo, apenas, para MAL7P1.176 (EBA175).

A seguir, o Quadro 4 com as informações sobre a diversidade das sequências e a distribuição das amplificações dos genes de AMA1, MAEBL e EBAs nos vários gDNAs da amostra.

Quadro 4- Diversidade das sequências encontradas dos genes que codificam AMA1, MAEBL e EBAs entre os gDNAs da amostra. Células em preto=sequências 3D7-like. Células em branco=ausência de amplificações. Células em cinza=fragmentos humanos. Célula rachurada=sequência diferente de MAEBL.

gDNAs	AMA1-B	AMA1-A	MAEBL	EBA140	EBA175	EBA181
Isolados de infecções Assintomáticas						
Isolados de infecções Sintomáticas						
	Isolados do laboratório					
FCR3						
3D7						

antígenos. Os antígenos mais reconhecidos desse grupo foram AMA1 e EBA175, seguidos por MAEBL, EBA140 e EBA181. Nitidamente, percebe-se que os plasmas assintomáticos são mais reativos à EBA175, do que os plasmas sintomáticos, bem como aos outros antígenos.

Os valores dos IR obtidos para cada antígeno forão comparados por testes estatísticos e serão mostrados, a seguir.

- **AMA1**

- **Frequência, intensidade e longevidade da reposta humoral anti-AMA1**

AMA1-A (M1+RID=A) foi reconhecida por 44,4% dos sintomáticos e 42% dos assintomáticos, enquanto AMA1-B (M1+M2=B) foi reconhecida por 66,6% dos sintomáticos e 51,4% dos assintomáticos (Figura 25). Não houve diferença siginificante para essas proporções.

Também não houve diferença entre os valores dos IR contra AMA1-A e AMA1-B entre assintomáticos e sintomáticos, como mostrado pelo teste de *Mann–Whitney* ($U=303$, $p<0,661$ e $U=298,5$, $p<0,620$, respectivamente). Aplicando o teste de *Wilcoxon*, percebemos que os dois antígenos são reconhecidos de forma semelhante pelos sintomáticos e assintomáticos, sem diferença nos valores dos IR. $IR\ AMA1-B_S > IR\ AMA1-A_S$ ($p<0,330$) e $IR\ AMA1-B_A > IR\ AMA1-A_A$ ($p<0,122$) (Figura 48).

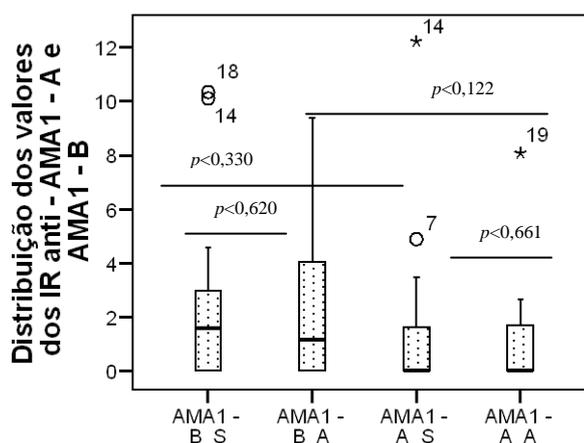


Figura 49- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR anti-AMA1-A e AMA1-B entre sintomáticos (S) e assintomáticos (A). Não houve diferença entre os perfis clínicos intra-peptídeos e inter-peptídeos segundo *Mann–Whitney* e *Wilcoxon*, respectivamente.

A reatividade humoral dos plasmas coletados no corte foi comparada com plasmas relacionados coletados no T30 e T60, ou seja, 30 e 60 dias pós-tratamento, respectivamente.

A reatividade contra AMA1-A apresentou variações com significância limítrofe ao longo do tempo. Um discreto aumento foi observado no número de plasmas reativos, nos períodos T30 e T60, em relação ao período inicial. IR T0<IR T30 ($p<0,068$), IR T0<IR T60 ($p<0,075$) e IR T30>IR T60 ($p<0,753$) segundo *Wilcoxon*.

A reatividade contra o peptídeo maior, ou seja, AMA1-B, não sofreu variações significativas ao longo do tempo, porém, o número de plasmas reativos aumentou consideravelmente nesse período. IR T30>IR T0 ($p<0,646$), IR T60>IR T0 ($p<0,345$), IR T60>IR T30 ($p<0,807$) (Figura 49).

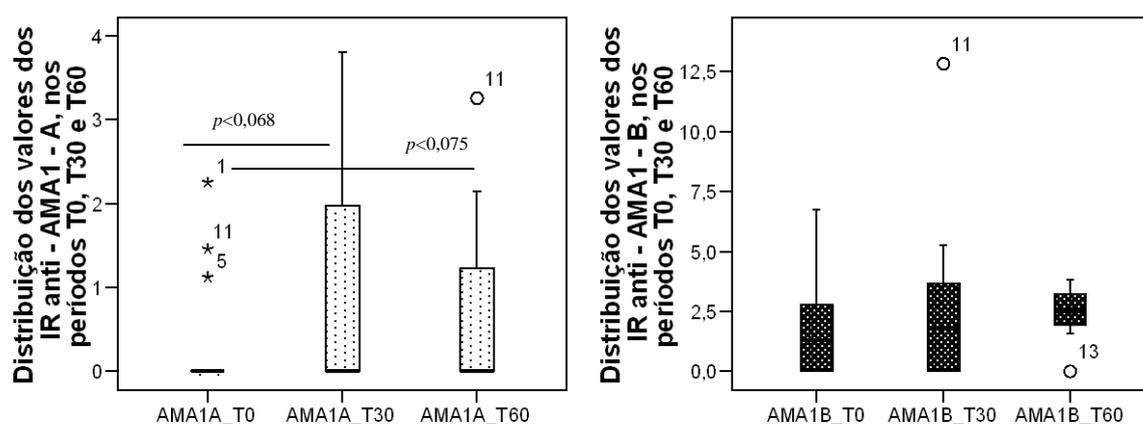


Figura 50- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR anti-AMA1-A à esquerda e AMA1-B à direita, ao longo do tempo. Diferença limítrofe sinalizada à esquerda por *Wilcoxon*.

- **MAEBL**

- **Frequência, intensidade e longevidade da resposta humoral anti-MAEBL**

O antígeno MAEBL_XXX foi reconhecido por 37,5% dos sintomáticos e 26% dos assintomáticos, enquanto MAEBL_3D7 foi reconhecido por 22,2% dos sintomáticos e 12,5% dos assintomáticos, sem diferença estatística entre as proporções pelo teste do X^2 ($p<0,30$, para as duas comparações). O gráfico de barras da frequência em porcentagem foi mostrado na Figura 25.

Apesar da ausência de amplificações de fragmentos em isolados de infecções assintomáticas, houve reconhecimento relativamente alto pelas sequências expressas por esse grupo. O reconhecimento mais frequente da sequência presente no isolado XXX, pelos dois grupos clínicos, pode indicar compartilhamento maior de epítomos imune dessa sequência com outras sequências polimórficas, não amplificadas nos gDNAs dos isolados da amostra.

O teste de *Mann–Whitney* não apontou diferença entre os valores dos IR entre sintomáticos e assintomáticos, tanto para o antígeno MAEBL_XXX ($U=290$, $p<0,435$) quanto para MAEBL_3D7 ($U=294,5$, $p<0,402$).

MAEBL_XXX foi reconhecido mais intensamente do que MAEBL_3D7, tanto pelos sintomáticos ($p<0,043$) quanto por assintomáticos ($p<0,008$) (Figura 50).

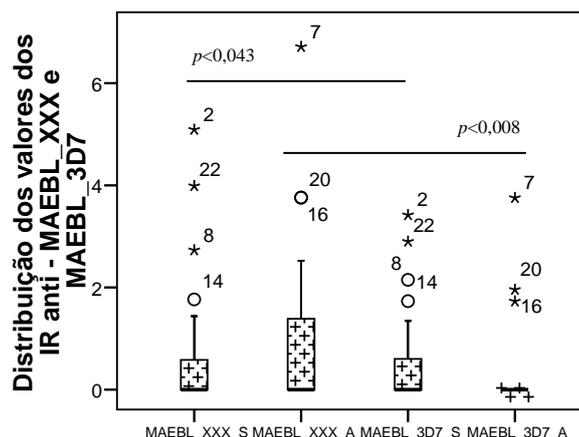


Figura 51- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR anti-MAEBL_XXX e MAEBL_3D7 entre sintomáticos (S) e assintomáticos (A). Não houve diferença entre os perfis clínicos, para cada peptídeo, por *Mann–Whitney*. MAEBL_XXX mais intensamente reconhecida do que MAEBL_3D7 pelos dois perfis por *Wilcoxon*.

O mesmo grupo de plasmas utilizados anteriormente foi utilizado para testar a longevidade da resposta humoral contra os dois peptídeos MAEBL expressos.

Apenas 4 plasmas assintomáticos desse grupo apresentaram reatividade contra MAEBL_XXX, porém, apenas dois mantiveram-se positivos ao longo do tempo. Os valores dos IR anti-MAEBL_XXX não apresentaram variações significativas segundo *Wilcoxon*. IR T0<IR T30 ($p<0,273$), IR T0<IR T60 ($p<0,715$) e IR T30>IR T60 ($p<0,109$).

MAEBL_3D7 foi reconhecida apenas por 3 plasmas assintomáticos desse grupo, porém, em apenas um deles, a resposta foi mantida ao longo do tempo. A resposta contra o outro peptídeo expresso foi mantida nesse mesmo plasma. Não houve diferenças significativas nas variações apresentadas pelo mesmo teste. IR T0<IR T30 ($p<0,180$), IR T0<IR T60 ($p<0,109$) e IR T30<IR T60 ($p<0,593$).

- **EBA175, EBA140 e EBA181**

- **Frequência, intensidade e longevidade da resposta humoral anti-EBAs**

EBA140 foi reconhecida por 22,2% dos sintomáticos e 37,5% dos assintomáticos, EBA175 foi reconhecida por 55,5% dos sintomáticos e 71% dos assintomáticos e EBA181 foi reconhecida por 7% dos sintomáticos e 12,5% dos assintomáticos, sem diferença estatística para nenhuma das proporções pelo teste do X^2 (Figura 25).

Observamos que apesar da baixa quantidade de fragmentos amplificados a partir dos gDNAs dos isolados oriundos de infecções assintomáticas, a frequência de reconhecimento dos 3 peptídeos por assintomáticos foi bastante importante. Por outro lado, foram amplificados mais fragmentos nos isolados de infecções sintomáticas e do que plasmas reativos sintomáticos identificados.

O teste de *Mann–Whitney* apontou uma diferença entre os valores dos IR de assintomáticos e sintomáticos apenas para EBA175 ($U=197$, $p<0,014$), mostrando que os maiores valores dos IR foram encontrados no grupo de assintomáticos. Não houve diferença entre os valores de sintomáticos e assintomáticos para EBA140 ($U=269$, $p<0,202$) e para EBA181 ($U=307$, $p<0,546$).

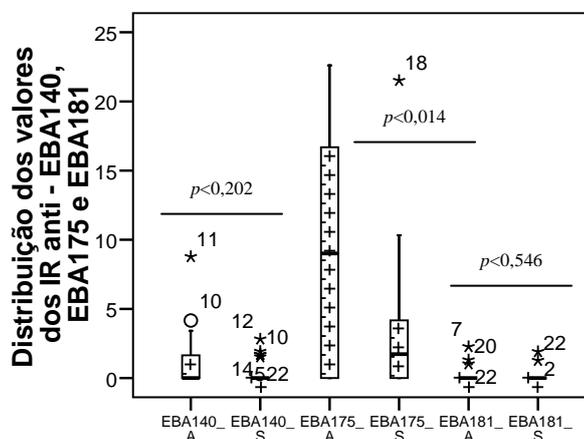


Figura 52- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR anti-EBA140, EBA175 e EBA181 entre sintomáticos (S) e assintomáticos (A). Diferença significativa entre os valores dos IR dos perfis clínicos apenas para EBA175 por *Mann–Whitney*.

Os resultados obtidos em ensaios de ELISA utilizando os plasmas assintomáticos ($n=10$) e sintomáticos ($n=3$), coletados nos períodos do corte (T0), T30 e T60, permitiram identificar as flutuações da resposta imune contra os 3 peptídeos expressos.

A resposta contra EBA140 apresentou aumento em T30 e posterior queda em T60, porém sem significância estatística para essas flutuações: IR T0 < IR T30 ($p<0,249$), IR

T60<IR T30 ($p<0,173$) e IR T60<IR T0 ($p<1,000$). A frequência dos plasmas reativos permaneceu inalterada.

A resposta contra EBA175 também apresentou aumento em T30 e posterior queda em T60, com retorno aos valores iniciais, mas sem significância estatística: IR T0<IR T30 ($p<0,859$), IR T60<IR T30 ($p<0,575$), IR T60<IR T0 ($p<0,953$). A frequência dos plasmas reativos permaneceu inalterada.

Observamos para EBA181 o mesmo padrão de resposta para EBA140, com aumento da resposta em T30 e posterior queda em T60, também sem significância estatística. IR T0<IR T30 ($p<0,109$), IR T60<IR T30 ($p<0,109$) e IR T0<IR T60 ($p<0,180$). A frequência dos plasmas reativos permaneceu inalterada também.

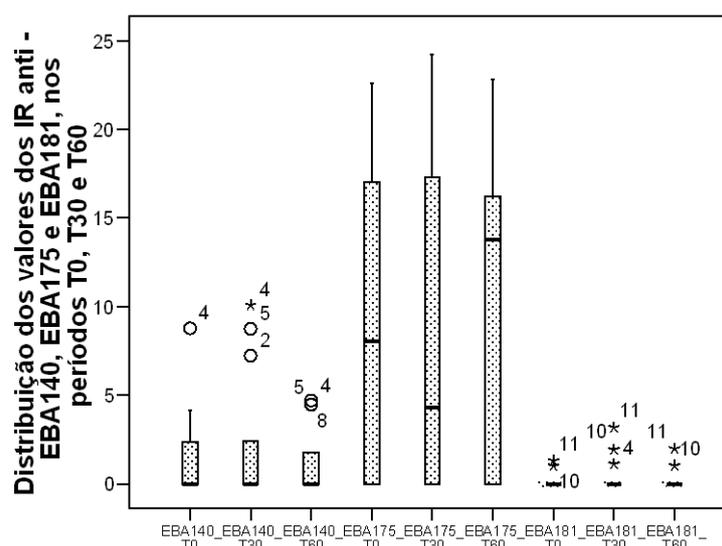


Figura 53- Gráficos *Box plot* da distribuição dos valores dos IR anti-EBA140, EBA175 e EBA181 ao longo do tempo. Não houve diferença significativa entre os valores dos IR para nenhum dos antígenos por *Wilcoxon*.

4.4.3 Isotipagem das subclasses de IgG envolvidas na resposta humoral aos peptídeos AMA1 e EBA175

- **AMA1**

Apenas 4 plasmas preencheram os critérios para a identificação das subclasses na resposta contra AMA1-B. Nenhum plasma apresentou IR>10 na resposta contra AMA1-A.

Os dados são visualizados na tabela abaixo. Podemos observar nos 2 plasmas sintomáticos e no plasma de infecção assintomático do T30 maior resposta de IgG1. Esse

plasma do T30 é de um paciente assintomático, cujo resultado em T0 foi negativo. Porém em T30, esse plasma apresentou $IR > 10$, prevalecendo a subclasse IgG1 nessa resposta.

Tabela 29- Médias das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-AMA1-B.

Plasmas/ Total de plasmas	Subclasses			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	DO*	DO*	DO*	DO*
A/1	0,051	0,046	0,047	0,049
S/2	0,088	0,054	0,048	0,045
AT30/1	0,171	0,044	0,047	0,044

- **EBA175**

Plasmas de 8 indivíduos assintomáticos, juntamente com 6 e 7 plasmas coletados no T30 e T60, respectivamente, foram utilizados nos ensaios de isotipagem. Observamos o predomínio das subclasses IgG1 e IgG3 nos 3 grupos e o aumento da resposta de IgG1 e IgG3 em T30 e T60, em relação ao tempo inicial. Os dados são exemplificados no gráfico da Figura 52.

Tabela 30- Médias das DO (DO*) de cada subclasse de IgG anti-EBA175.

Plasmas/ Total de plasmas	Subclasses			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	DO*	DO*	DO*	DO*
A/8	0,379	0,071	0,320	0,085
AT30/6	0,608	0,060	0,724	0,092
AT60/7	0,428	0,055	0,509	0,072

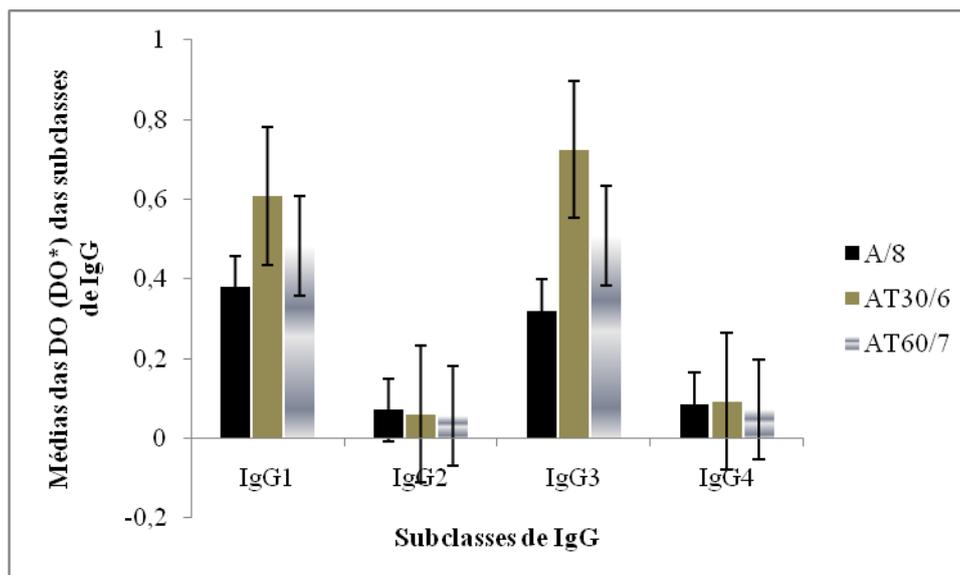


Figura 54- Gráfico de barras das médias das DO (DO*) das subclasses de IgG anti-EBA175 nos plasmas assintomáticos iniciais, do T30 e do T60.

4.5 Associação entre variáveis qualitativas e quantitativas e medidas de risco

As próximas análises estatísticas foram desenvolvidas buscando-se encontrar dependência entre variáveis quantitativas e qualitativas e medir o efeito dessa dependência, ou seja, quantificar o risco ou a proteção, que o reconhecimento e a intensidade de reconhecimento de um antígeno conferem ao desenvolvimento do perfil assintomático.

Até o momento, os resultados mostraram que alguns antígenos são mais frequentemente e mais intensamente reconhecidos pelo grupo de plasmas de infecções assintomáticas. Ao mesmo tempo, indivíduos assintomáticos apresentam maior duração na exposição à *P. falciparum*. Podemos afirmar, então, que o reconhecimento e/ou a intensidade de reconhecimento desses antígenos proporcionam um menor risco para o desenvolvimento de doença clínica ou será que o que observamos foi simplesmente a tradução de um maior período de exposição ao *Plasmodium falciparum* apresentada por esse grupo?

A fim de determinarmos se o reconhecimento de algum antígeno está associado ao perfil assintomático, a variável quantitativa contínua IR de cada antígeno recombinante foi transformada em variável categórica dicotômica “responde” e “não–responde” e comparada em tabelas de contingência 2x2 com a variável categórica dicotômica sintomas “ausente” e “presente”, representando o grupo de indivíduos assintomáticos e sintomáticos, respectivamente.

A Tabela 31 mostra os antígenos que apresentaram associação com o perfil assintomático com significância estatística pelo teste do X^2 de *Pearson* e a força da associação traduzida pelo coeficiente *V* de *Cramér*, segundo descrito no item 3.19 dos Materiais e Métodos. O valor de cada *odds ratio*, ou razão de chances, representa as chances dos indivíduos que não reconhecem o antígeno em relação aos que reconhecem, em não apresentar sintomas. Os valores de *odds* menores que 1 indicam que os indivíduos que respondem ao antígeno possuem maiores chances de não apresentarem sintomas do que os que não respondem. O intervalo de confiança das *odds* não inclui o valor 1, reforçando a força da associação entre as variáveis. Dessa forma, reconhecer determinados antígenos está implicado em proteção contra sintomas de malária. Apenas dois antígenos de merozoíto e um antígeno SURFIN foram implicados em menor risco de sintomas por essa análise. Porém, essa análise não considerou a intensidade do reconhecimento antigênico.

Tabela 31- Antígenos cujo reconhecimento está associado a um menor risco de sintomas.

Antígenos	$X^2 / (p)$	V de <i>Cramér</i> / (p)	<i>Odds ratio</i>	IC 95% para OR
MSP5	8,288 (0,004)	0,403 (0,004)	0,112	0,021–0,585
MSP9	9,256 (0,002)	0,426 (0,002)	0,125	0,030–0,529
S 13. 1	4,647 (0,031)	0,302 (0,031)	0,283	0,088–0,910

A intensidade de reconhecimento de cada antígeno foi avaliada através de regressão linear múltipla e regressão logística, buscando-se encontrar variáveis preditoras de infecção assintomática por *P. falciparum*. A variável “resposta” foi considerada o tempo desde o último episódio sintomático (TUES) na análise por regressão linear múltipla e o perfil clínico “assintomático” ou “sintomático” foi considerado a variável resposta na análise por regressão logística.

Primeiramente, para a primeira análise, coeficientes de correlação de *Pearson* foram estabelecidos entre todas as variáveis explanatórias (quantitativas contínuas e discretas) e a variável resposta (quantitativa contínua). Em seguida, coeficientes de correlação parcial foram calculados, tentando eliminar o efeito das demais variáveis na associação entre cada variável explanatória e a variável resposta, pois houve correlação, também, entre a maioria das variáveis explanatórias. Porém, os coeficientes parciais para cada variável explanatória não demonstraram associação com a variável resposta. Os resultados são apresentados nas Tabelas 32 e 33. Não houve associação significativa entre os IR aos antígenos SURFIN e a variável TUES.

Tabela 32- Coeficientes de correlação de *Pearson* entre as variáveis abaixo. Todos foram positivos, de moderada a forte intensidade e com significância estatística. A célula em azul explica os números de cada célula.

Variáveis	Correlações (Coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> (r_p)/Valor de p /N)								
	TUES	Idade	TVAE	TVEA	NEPF	K1	MSP3	MSP4	EBA175
TUES	1	0,613	0,582	0,451	0,576	0,432	0,357	0,419	0,424
		0,000	0,000	0,001	0,000	0,002	0,013	0,003	0,003
	48	48	48	48	46	48	48	48	48
Idade	r_p	1	0,964	0,584	0,522	0,468	0,296	0,463	0,460
	valor de p		0,000	0,000	0,000	0,001	0,035	0,001	0,001
	n	51	51	51	47	51	51	51	51
TVAE			1	0,620	0,455	0,395	0,243	0,434	0,427
				0,000	0,001	0,004	0,086	0,001	0,002
			51	51	47	51	51	51	51
TVEA				1	0,391	0,282	0,203	0,427	0,400
					0,007	0,045	0,152	0,002	0,004
				51	47	51	51	51	51
NEPF					1	0,499	0,635	0,519	0,514
						0,000	0,000	0,000	0,000
					47	47	47	47	47
IRMSP1_b12_K1						1	0,282	0,264	0,238
							0,045	0,062	0,093
						51	51	51	51
IRMSP3_3D7							1	0,684	0,697
								0,000	0,000
							51	51	51
IRMSP4								1	0,976
									0,000
								51	51
IREBA175									1
									51

Tabela 33- Coeficientes de correlação parcial de *Pearson*, entre a variável resposta (TUES) e cada uma das variáveis explanatórias, após controle do efeito das demais.

Variável resposta	Correlações (Coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> (r_p) /Valor de p)								
	TUES	Idade	TVAE	TVEA	NEPF	K1	MSP3_3D7	MSP4	EBA175
TUES	1	0,051	-0,008	0,122	0,236	0,167	-0,75	-0,004	0,061
		0,759	0,961	0,435	0,148	0,280	0,640	0,983	0,707

Podemos observar na Tabela 32 entre as variáveis relacionadas à exposição, que a associação das variáveis IR contra os antígenos MSP1_b12_K1, MSP3_3D7, MSP4 e EBA175 é mais intensa com a variável NEPF, sugerindo que o reconhecimento dessas variáveis pode ser apenas a tradução de um maior período de exposição ao *P. falciparum*, não necessariamente, significando maior proteção contra malária clínica. Porém, isso sinaliza para a necessidade de um maior número de episódios prévios de malária falciparum para o desenvolvimento de uma resposta de memória contra esses antígenos. A resposta anti-MSP3_3D7 é a única que mantém associação com NEPF, após o controle do efeito das demais variáveis (coeficiente de correlação parcial de *Pearson* (r_{pp})=0,462, $p<0,003$).

Através de regressão logística, procuramos estimar o quanto o reconhecimento mais intenso de um antígeno oferece de proteção ao desenvolvimento do perfil assintomático.

Para isso, cada variável quantitativa foi categorizada primeiramente em tercís, sendo que o terceiro tercil representa os valores mais altos de cada variável. A análise univariada indica que o reconhecimento mais intenso dos antígenos de merozoíto MSP3_3D7, MSP4, MSP5, MSP9, EBA175 e dos antígenos S 1.1 (PFA0625w), S 4.2_132 (PFD1160w_132), S 8.2_55 (PF08_0002_55) e S 13.1 (PF13_0075) oferece proteção ao desenvolvimento de malária clínica. A significância encontrada pelo teste da razão de verossimilhança (*likelihood ratio* (LR) *test*) e os valores das *odds ratio* (OR) para o desenvolvimento do perfil assintomático são mostrados na Tabela 34. As variáveis que medem exposição não apresentaram significância no teste LR.

Tabela 34- Efeitos não ajustados das variáveis categóricas preditoras do desenvolvimento do perfil assintomático obtidos por regressão logística.

Variáveis	LR test	OR	IC 95% para OR
IR MSP3_3D7 3º Tercil x 1º Tercil	$X^2(2)=6,295$ $p<0,043$	3,429	0,827–14,209
IR MSP4 3º Tercil x 1º Tercil	$X^2(2)=10,389$ $p<0,006$	4,643	1,057–20,385
IR MSP5 3º Tercil x 2º Tercil	$X^2(1)=8,791$ $p<0,003$	8,929	1,709–46,638
IR MSP9 3º Tercil x 2º Tercil	$X^2(1)=9,683$ $p<0,002$	8,000	1,891–33,850
IR EBA175 3º Tercil x 1º Tercil	$X^2(2)=14,660$ $p<0,001$	8,000	1,686–37,951
IR S 1.1 3º Tercil x 2º Tercil	$X^2(1)=5,249$ $p<0,022$	8,667	0,960–78,268
IR S 4.2_132 3º Tercil x 2º Tercil	$X^2(1)=5,249$ $p<0,022$	8,667	0,960–78,268
IR S 8.2_55 3º Tercil x 2º Tercil	$X^2(1)=4,299$ $p<0,038$	5,147	0,952–27,837
IR S 13.1 3º Tercil x 1º Tercil	$X^2(2)=6,502$ $p<0,039$	5,486	1,394–21,591

A ordem para a entrada no modelo multivariado obedeceu ao menor valor de p , sucessivamente, iniciando com a variável IR EBA175. Apenas, duas variáveis permaneceram no modelo final, indicando independência no efeito sobre o perfil assintomático. A maior resposta contra EBA175 e MSP5 confere proteção no desenvolvimento do perfil assintomático, de forma independente. A Tabela 35 apresenta os valores ajustados apresentados na Tabela 34, para as duas variáveis.

Tabela 35- Efeitos ajustados das variáveis categóricas preditoras do desenvolvimento do perfil assintomático obtidos por regressão logística.

Variáveis	LR test	OR	IC 95% para OR
IR EBA175 3º Tercil x 1º Tercil	$X^2(2)=14,660$ $p<0,001$	8,000	1,686–37,951
IR EBA175 3º Tercil x 1º Tercil	$X^2(2)=20,775$ $p<0,000$	5,757	1,119–29,627
IR MSP5 3º Tercil x 2º Tercil		9,447	1,289–69,256

4.6 Resumo dos resultados sobre a resposta humoral contra os antígenos de merozoíto e SURFIN

Os resultados mostrados sobre o perfil da resposta humoral contra antígenos expressos no merozoíto e antígenos SURFIN permitem agrupar os antígenos em 5 grupos, de acordo com: frequência de reconhecimento na amostra, predomínio do reconhecimento pelo grupo assintomático, em frequência e intensidade, longevidade da resposta, subclasses de IgG envolvidas e predição do perfil assintomático. Os antígenos e seus respectivos grupos são mostrados na Tabela 36

Tabela 366- Classificação dos antígenos analisados segundo a resposta humoral. (*) S 8.2_55 com valor limítrofe de significância.

Grupos de Antígenos	Antígenos do Merozoíto	Antígenos SURFIN
Frequência de reconhecimento na amostra \geq a 50%	MSP1_b12, MSP1 ₁₉ , MSP2_IC1, MSP3_3D7, MSP4, MSP7, MSP9, MSP10, AMA1 e EBA175	S 1.2, S 13.1
% A > % S	MSP5, MSP9	S 1.1, S 4.1, S 4.2_132, S 8.2_55, S 13.1
IR A > IR S	MSP4, MSP5, MSP9, EBA175	S 1.1, S 4.2_132, S 13.1, (*)
Resposta mantida ao longo do tempo	MSP1 ₁₉ , MSP2_IC1, MSP4, MSP5, MSP6, MSP9, MSP10, AMA1, MAEBL, EBAs	A resposta contra todos é mantida. Exceção, apenas, para S 1.2
Subclasses IgG1 e IgG3	MSP1_b12_RO33, MSP1 ₁₉ , MSP2_IC1, MSP3_3D7, MSP4, MSP5, MSP6, MSP7, MSP9, MSP10, AMA1, EBA175	S1.2, S4.2, S8.3
Subclasses IgG2 e IgG4	MSP1_b12, MSP6, MSP7, MSP10	-
Conferem proteção ao desenvolvimento de sintomas clínicos	MSP5, MSP9, EBA175	S 13.1

Os antígenos envolvidos no processo de invasão eritrocitária como as proteínas MSP1 e associadas (MSP7 e MSP9), juntamente com EBA175 e AMA1, destacaram-se como importantes alvos do reconhecimento humoral nessa amostra analisada.

Os antígenos MSP4, MSP5, MSP9 e EBA175, além do amplo reconhecimento pela amostra, apresentaram reconhecimento diferencial entre assintomáticos e sintomáticos em quantidade de anticorpos, para MSP4 e EBA175 e em frequência e quantidade de anticorpos para MSP5 e MSP9. Além disso, a resposta contra MSP5, MSP9 e EBA175 foi implicada em proteção contra o desenvolvimento de sintomas, com quantificação de chances de não apresentar sintomas, através da análise de associação entre variáveis qualitativas e por regressão logística. Isso aponta para um possível papel efetivo desses antígenos no controle dos sintomas clínicos e da parasitemia, durante as infecções maláricas. Adicionalmente, a resposta humoral mantida até 90 dias após o diagnóstico inicial foi observada para praticamente todos os antígenos citados acima, com exceção de MSP3 e MSP7.

Os antígenos SURFIN mostraram baixo reconhecimento humoral, pelos pacientes da amostra, com exceção dos antígenos S 1.2 e S 13.1. O perfil transcricional de genes *surf* pode estar implicado na escassez de resposta, como discutido adiante. Mesmo assim, a maioria dos antígenos SURFIN foi mais reconhecida por assintomáticos do que sintomáticos. Comparando plasmas de sintomáticos e assintomáticos, 5 antígenos mostraram reconhecimento diferencial em frequência e 3 deles em quantidade de anticorpos. A resposta adquirida contra os antígenos foi mantida ao longo do tempo com exceção para o S 1.2. A resposta contra S 13.1 foi implicada em proteção contra o desenvolvimento de sintomas através da análise de associação entre variáveis qualitativas.

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de imunidade clínica e parasitária, estável e duradoura, contra malária é um processo lento e com diferenças visíveis entre os dois aspectos. Se por um lado, a aquisição de imunidade clínica para as formas graves da doença ocorre rapidamente, após poucas infecções, a imunidade esterilizante está longe de ocorrer, mesmo após um extenso período de exposição.

Possivelmente, os custos em modular uma resposta inflamatória e reduzir danos ao hospedeiro prejudicam a aquisição de imunidade esterilizante. Vários exemplos evidenciam esse aspecto. A aquisição de imunidade contra as formas hepáticas do parasita é falha, mesmo em regiões de alta transmissão, possivelmente devido a processos de imunestimulação insuficiente ou supressão da resposta imunológica (164). A imunidade contra formas sanguíneas também é adquirida de forma insuficiente do ponto de vista parasitológico, já que a completa eliminação do parasita é exceção e não regra.

Se a imunidade esterilizante é algo difícil de ocorrer, o controle dos sintomas clínicos e da parasitemia é observado em pessoas continuamente expostas aos parasitas circulantes, após um determinado número de infecções. Sabe-se que a presença de uma resposta celular adequada e de anticorpos específicos contra os merozoítos ou hemácias infectadas é essencial para isso. Enquanto muitos estudos analisam a resposta imune contra um ou alguns antígenos em um grande número de indivíduos, estudos que analisam a resposta imune contra muitos antígenos ao mesmo tempo são raros, ainda.

Esse estudo investiu na quantificação de anticorpos contra várias proteínas do merozoíto, associadas ou não à invasão eritrocitária e proteínas SURFIN, a partir de isolados de campo que possuem um repertório restrito de antígenos variantes, em infecções sintomáticas ou assintomáticas (165). A discussão dos resultados segue a ordem da seção anterior e é subdivida na análise da resposta em dependência a importantes parâmetros epidemiológicos, seguida pela discussão da resposta contra antígenos individuais.

5.1 Dados epidemiológicos

Grande parte dos indivíduos da amostra provém de áreas endêmicas para malária, a maioria das localidades do estudo. Os mais jovens nasceram nas localidades e os mais velhos imigraram para elas há mais de 30 anos. Dessa forma, as quantificações da idade, do tempo de vida na área endêmica e do tempo de vida no endereço atual são medidas indiretas do tempo de exposição à malária de cada indivíduo.

Sabe-se que indivíduos assintomáticos, em geral, são os indivíduos que estão há mais tempo expostos à doença, portanto os mais antigos residentes de uma área endêmica. A frequência das faixas etárias entre sintomáticos e assintomáticos acompanhou o observado em regiões africanas hiperendêmicas (166, 167). Um maior número de sintomáticos foi encontrado nas faixas com menor idade e maior número de assintomáticos na faixa com maior idade, sinalizando a necessidade de exposição longa e contínua ao *P. falciparum* para o desenvolvimento do perfil assintomático. Além do parâmetro idade, os parâmetros tempo de vida em área endêmica (TVAE), tempo de vida no endereço atual (TVEA), número de episódios prévios de falciparum (NEPF) e número de antígenos expressos reconhecidos (NAR) foram utilizados para quantificar o tempo de exposição à malária de cada indivíduo da amostra.

Porém, a análise dessas variáveis evidenciou que os indivíduos sintomáticos e assintomáticos assemelham-se muito em relação a elas, devido à falta de significância entre as médias das variáveis entre os dois grupos clínicos. Apenas, em relação à duração dos períodos de ausência de sintomas, quantificados pela variável TUES (tempo desde o último episódio sintomático), houve diferença mais pronunciada, mas ainda não significativa. O maior tempo transcorrido desde o último episódio sintomático que os assintomáticos apresentam pode refletir a qualidade da resposta imune desenvolvida por esses indivíduos. Isso pode implicar em um reconhecimento mais abrangente dos isolados circulantes nas localidades, mais específico e efetivo em controlar a parasitemia, bem como, a possibilidade de desenvolvimento de mecanismos de regulação da resposta inflamatória. Todos garantem ausência de sintomas no curso das infecções, ou seja, no curso das parasitemias.

Devido à proximidade das localidades com a cidade de Porto Velho, à ocupação em atividades urbanas da maioria dos indivíduos e à estabilidade dos indivíduos nas localidades, a exposição ao *P. falciparum* ocorre essencialmente no local de residência do indivíduo. Isso facilita a aquisição de imunidade clínica e parasitária à malária, através do reconhecimento dos isolados circulantes nas localidades. Segundo Katsuragawa e colaboradores em estudo epidemiológico com dados de 2005 a 2007 (168), as localidades do estudo apresentam picos de alta transmissão de malária concentrados no início do período chuvoso e após o pico desse período (setembro-maio). Indivíduos não-residentes e crianças e adultos jovens residentes nas localidades são os mais acometidos. Nos demais meses, os casos de *P. falciparum* diminuem consideravelmente, persistindo em alguns meses, apenas casos de malária vivax. Apesar da alta densidade do vetor *An. darlingi* nas localidades, a taxa de transmissão dos mesmos é muito baixa. Como a transmissão e as circunstâncias ambientais assemelham-se a

muitos lugares da Amazônia Legal, especificamente considerando populações ribeirinhas, muitos dos nossos resultados seriam possivelmente obtidos também naqueles lugares e conclusões aqui obtidas, valeriam para os demais lugares.

Sabe-se que um pequeno número de infecções prévias é suficiente para proteger crianças africanas de um episódio de malária grave, seja através da produção de anticorpos específicos contra alguns antígenos ou através de mecanismos de regulação da resposta imune (89). Os dados obtidos com alguns pacientes do estudo permitiram verificar que as primeiras exposições ao parasita foram suficientes para gerar parasitemias assintomáticas, dada a existência de crianças assintomáticas com pouco tempo relativo de exposição. Isto favorece a visão que a infecção naquelas pessoas ocorreu com cepas antigenicamente restritas, lembrando que a antiga terapia contra neurosífilis também ficou ineficaz, quando a mesma cepa foi utilizada em infecções deliberadas (169). Esse fenômeno pode sugerir que antígenos polimórficos compartilham epítomos comuns entre seus variantes, com intensificação da resposta dos anticorpos específicos para os antígenos comuns após sucessivas exposições, favorecendo a aquisição de proteção clínica e parasitária ainda na infância. A baixa transmissão de malária na região também pode favorecer o reconhecimento do repertório circulante mais rapidamente. O reconhecimento de epítomos-chave em etapas essenciais do ciclo biológico do parasita e o desenvolvimento de resposta de memória contra esses antígenos também deve ser considerado. Desenvolvimento de células B de memória e de LLPC contra alguns antígenos de *P. falciparum* foi observado no norte da Tailândia, em uma região de baixíssima transmissão de malária, onde os indivíduos são pouco expostos e as exposições não são contínuas (170).

A presença de anticorpos específicos identificados nos testes de ELISA contra os antígenos recombinantes e a parasitemia escassa identificada apenas por técnica de PCR, aponta para a presença de uma resposta imune humoral protetora entre crianças assintomáticas menores de 10 anos. Porém, quando observamos a duração dessa resposta, através da quantificação do tempo desde o último episódio sintomático (TUES), percebemos que essas crianças, quando submetidas a uma alta exposição ao parasita no período de alta transmissão, são passíveis de sofrerem episódios sintomáticos. Os indivíduos mais velhos e com maior exposição à doença também possuem maior tempo transcorrido desde o último episódio sintomático, ou seja, não só estavam assintomáticos no período em que foram incluídos no estudo, como estão assintomáticos há um longo período. Esse fato sugere que o desenvolvimento de uma resposta duradoura é dependente de uma contínua exposição ao parasita e que o desenvolvimento de células plasmocitárias de longa duração (LLPC) pode

ser mais lento para aos antígenos preditores de proteção (171, 172). O acúmulo de anticorpos contra um vasto repertório de antígenos que funcionam como vias alternativas de mecanismos essenciais no ciclo biológico do parasita, como as várias proteínas que atuam na invasão eritrocítica, pode ser necessário para a aquisição de um perfil assintomático. A maturação do sistema imune e as contínuas exposições ao parasita parecem ser determinantes para a estabilidade do perfil assintomático observado nos indivíduos adultos, provavelmente, devido ao desenvolvimento de LLPC. Essa população de células é mantida na medula óssea, independentemente da parasitemia e não necessita de reposição, a partir de células B de memória (172). Porém, células plasmocitárias de curta-duração (SLPC) também podem ser geradas no curso da infecção. Essas células necessitam serem continuamente repostas na circulação, a partir de células B de memória e a persistência do contato com o organismo infectante é necessário para a continuidade desse processo (172).

Devemos lembrar assim, no curso dessa discussão que ambos os grupos foram semelhantes quanto à exposição à malária e que os indivíduos sintomáticos apresentaram quadros clínicos não-complicados e de parasitemia não muito alta (2 a 20 parasitas/campo). Assintomáticos apresentaram parasitemia detectável apenas por PCR e ausência total de sintomas.

5.2 Genes *surf* e proteínas SURFIN

Os genes *surf* compreendem uma família alélica de 10 membros localizados nos cromossomos 1, 4, 8, 13 e 14, a maioria em posição sub-telomérica, com exceção do gene PFA0625w, que ocupa uma posição mais central no cromossomo 1. Caracterizam-se por expressarem proteínas de, aproximadamente 200 kDa e que possuem sinal de exportação para além do vacúolo parasitóforo (sinal de PEXEL). Os dois artigos científicos publicados, envolvendo os genes *surf* PFD1160w e PFD0100c, verificaram a expressão dos dois em dois momentos do ciclo parasitário, a localização das proteínas S 4.2 (PFD1160w) nas superfícies do merozoíto e do eritrócito infectado e a localização da proteína S 4.1 (PFD0100c) próximo ao vacúolo parasitóforo (119, 121). A proteína S 4.2 (PFD1160w) foi implicada no transporte de PfEMP1 para a superfície do eritrócito (173).

Ao tentar amplificar por PCR as regiões posteriormente usadas para produção das proteínas recombinantes, observamos a ausência de produtos de PCR em alguns gDNAs, possivelmente, indicando polimorfismos na região de hibridação com os pares de oligonucleotídeos.

Os experimentos de PFGE mostraram indícios de que há mutações tanto no sítio de hibridação do par de oligonucleotídeos utilizados, quanto ao longo do fragmento reconhecido pela sonda, exemplificado pela existência de gDNAs não amplificados pelo PCR mas reconhecidos por sondas do respectivo gene (Figura 10).

Fragmentsos gênicos, representativos de todos os fragmentos seqüenciados de um determinado gene *surf*, foram escolhidos para serem expressos. O reconhecimento humoral, em comparação com o reconhecimento dos antígenos de merozoíto foi muito baixo, porém, os peptídeos SURFIN foram mais reconhecidos por assintomáticos. A proteína S 8.2_07 (PF08_0002) não foi reconhecida por nenhum dos plasmas sintomáticos testados. O próprio plasma do indivíduo, cujo fragmento foi amplificado a partir do respectivo isolado infectante, não reconheceu esse antígeno. Os valores dos IR para os SURFIN são, na grande maioria, menores do que 5. Apenas alguns assintomáticos reconheceram o peptídeo S 4.2_XXX (PFD1160w) com IR maiores do que 10. O baixo reconhecimento dos peptídeos recombinantes pelos plasma dos pacientes, tanto sintomáticos e assintomáticos, pode sugerir que as proteínas SURFIN não estejam expostas ao reconhecimento do sistema imune, como ocorre com as proteínas da superfície do merozoíto, ou que o reconhecimento imune seja específico para alelos e variantes, que, por sua vez não foram expressos, ou pode indicar a existência de epítomos conformacionais, não existentes em peptídeos recombinantes expressos em sistema procaríoto. A identificação das subclasses de IgG envolvidas na resposta anti-S 1.2, S 4.2 e S 8.3 aponta um perfil de resposta Th1, com predomínio de resposta IgG1 entre assintomáticos, discreta prevalência de IgG3 entre sintomáticos e efeito *boosting* na resposta de IgG1 anti-S 4.2 e 8.3 entre assintomáticos, nos plasmas coletados 30 e 60 dias pós-tratamento.

O único fragmento protéico expresso que continha epítomos imunes identificados pela base de dados *IEDB* (S 14.1) não apresentou grande reconhecimento pelos plasmas dos pacientes, tanto sintomáticos quanto assintomáticos. Porém, para a grande maioria das proteínas SURFIN não há epítomos imunes descritos no *IEDB*.

Apenas para os genes *surf* PFD0100c e PFD1160w existe informação na literatura sobre a localização das respectivas proteínas nos merozoítos e nos eritrócitos infectados (119, 121). Nada se sabe sobre a localização das outras proteínas SURFIN. Outra explicação para os resultados negativos nos experimentos de ELISA, com os plasmas iniciais, seria a existência de anticorpos IgM, não detectáveis pelo kit de ELISA utilizado. De qualquer forma, os resultados negativos indicam que, se antígenos SURFIN geram resposta imune humoral, ela não é de longa duração e de título não muito alto, ao contrário da resposta contra

vários antígenos de merozoítos, mas semelhante à resposta as fragmentos recombinantes DBL- α , presentes nas proteínas PfEMP1 expressas na superfície da hemácia infectada (Fratus e colaboradores, dados não publicados).

O perfil transcricional dos genes *surf* da cepa 3D7 pode explicar a ausência de resposta humoral dos indivíduos sintomáticos, como também, a pequena quantidade de anticorpos IgG contra SURFIN nos dois grupos, identificados nas reações de ELISA.

A ausência da expressão de algum gene *surf* durante uma infecção sintomática pode explicar a falta de resposta humoral contra ele. A aquisição de anticorpos IgG contra SURFIN pode ocorrer lentamente, ao longo de um grande período de exposição, por isso a maior ocorrência em indivíduos assintomáticos. A taxa de *switching* transcricional dessa família gênica pode ser determinante na velocidade com que o sistema imune do hospedeiro desenvolve anticorpos que reconhecem todo o repertório SURFIN expresso. A possibilidade de dependência de estrutura conformacional do peptídeo, na verificação da resposta humoral contra os peptídeos SURFIN expressos, também deve ser considerada.

No presente trabalho investimos também em analisar a transcrição dos genes *surf*. Eles foram inicialmente identificados como uma nova família multigênica, cujos produtos se encontram na superfície do merozoito - cobrindo o complexo apical - e também no esquizonte tardio, associados à membrana do eritrócito infectado (119) Mais tarde, em estudos de epigenoma, foi descoberto que os genes *surf* estão associados às mesmas modificações epigenéticas encontradas nas demais famílias multigênicas relacionadas à virulência como *var* e *rif* (122).

Assumindo a hipótese que a transcrição *surf* possa estar, por algum motivo, associada à transcrição *var*, analisamos a transcrição dos genes *surf* em parasitas selecionados para um determinado fenótipo citoaderente, por sua vez associado a um determinado gene *var* transcrito. Naqueles parasitas, ao longo de 40 gerações em cultura, observamos a transcrição contínua do gene *surf* PFD0100c, em anéis ou esquizontes, e uma flutuação na quantidade dos transcritos do gene *surf* PF13_0075.

Apesar destes resultados, ainda é prematuro tirar conclusões sobre taxas de *switching* ou sobre a intrínseca coordenação da transcrição desses genes (exceto talvez, para o gene PFD0100c, que parece ser constitutivamente transcrito). Também é impossível tirar mais conclusões sobre como seria a transcrição e expressão de genes *surf* em isolados circulantes em pacientes. Os dados obtidos na análise por *microarray* (174) indicam uma transcrição variável de genes *surf* em parasitas de pacientes diferentes. Entretanto, esse estudo abordou parasitas em um único estágio da fase eritrocítica. Comparando esses resultados com outros obtidos através

de seqüenciamento de RNA, acessíveis na base de dados *PlasmoDB*, observamos que alguns resultados obtidos aqui são concordantes com aqueles, em relação aos genes PFD0100c e PF13_0075. Porém, tanto os resultados obtidos aqui, como os resultados depositados na base de dados diferem dos resultados de Mphande e colaboradores, obtidos com a cepa 3D7S8 (121). Um problema na interpretação dos dados transcripcionais também reside na quantidade pequena dos transcritos de muitos *loci* em relação ao controle interno *seryl-t-RNA* sintetase. Não é claro se uma pequena quantidade de transcritos é negligenciável ou se esta quantidade é suficiente para uma expressão significativa de SURFIN (e conseqüentemente seu reconhecimento por plasmas de indivíduos infectados). Para uma abordagem futura dessas questões será necessária a repetição dos nossos experimentos, talvez incluindo isolados de campo, e outros fenótipos adesivos. A verificação da presença da proteína expressa, através das técnicas de *Western Blot* ou imunofluorescência indireta (IFI), ao longo dos ciclos, também é fundamental para um melhor entendimento da geração da resposta imune contra SURFIN, das possíveis funções que essas proteínas exercem e da localização celular que elas ocupam.

A presença de anticorpos anti-SURFIN em assintomáticos pode ser apenas um indicativo de longa exposição prévia ao antígeno ou de possíveis genes *surf* mais expressos nos isolados de campo de Rondônia, não tendo nenhuma correlação com controle da sintomatologia malárica. Porém, a análise estatística com as variáveis qualitativas dicotômicas “sintomas-sim x não” e “resposta-ausente x presente” encontra associação entre a resposta contra o S 13.1 e a ausência de sintomas, levando a uma diminuição do risco de apresentar malária sintomática, em 3,5 vezes

5.3 O complexo MSP1: MSP1_bloco 2, MSP1₁₉, MSP6, MSP7 e MSP9

A glicoproteína MSP1, principal proteína da superfície do merozoíto, é composta por 17 blocos, alguns variáveis e outros conservados e apresenta-se ancorada à superfície do merozoíto, através de uma âncora de GPI presente na extremidade C-terminal (175). Vários domínios globulares ricos em cisteína são encontrados nas proteínas que possuem âncora de GPI, incluindo domínios EGF-like (*epidermal growth factor-like*), um motivo de seis cisteínas homólogo a proteínas de superfície do *Toxoplasma gondii* (176) e estruturas em dobras presentes na proteína Pf92 de *P. falciparum* (177). Essas regiões podem mediar interações entre proteínas, incluindo ligações com receptores de membrana celular.

A proteína MSP1 sofre algumas modificações pós-traducionais, sendo clivada sucessivas vezes, gerando fragmentos de 83, 28, 38 e 42 kDa que permanecem ligados não-covalentemente à superfície dos merozoítos maduros e também, associados a MSP6, MSP7 e MSP9 (178). Posteriormente, o fragmento de 42kDa sofre uma segunda clivagem, originando um fragmento C-terminal (MSP1₁₉) que permanece ligado à superfície do merozoíto no momento da invasão eritrocitária, enquanto todos os outros fragmentos são perdidos no momento da invasão ou antes desse período (106). MSP1 parece ser uma proteína essencial, não sendo possível deletar o gene (179). Sabe-se que anticorpos gerados pela exposição a MSP1 têm função de bloquear a invasão eritrocitária e inibir o crescimento do parasita e de que essa atividade está associada a um menor risco de desenvolver infecções maláricas sintomáticas. Há evidências de que isso esteja mais associado aos anticorpos anti-MSP1₁₉ (180).

Estudos com animais imunizados com proteínas MSP1 apontam para um papel protetor contra o desenvolvimento de doença malárica, conferido pela proteína. A imunização de macacos *Aotus* com a proteína MSP1 purificada protegeu completamente os macacos, quando desafiados com cepa homóloga de *P. falciparum* (181). Macacos *Saimiri* imunizados com MSP1 nativa ou peptídeos MSP1-recombinantes apresentaram proteção total e parcial, respectivamente, quando desafiados com cepa heteróloga (182). Esses trabalhos evidenciam que tanto as porções C-terminal e N-terminal da proteína podem estar envolvidos com proteção, bem como apontam para a possibilidade de desenvolvimento de resposta imune cruzada entre as famílias. Vários estudos em humanos apontam para uma correlação entre anticorpos contra alelos de bloco 2 e imunidade “protetora” (145, 161, 181, 182), enquanto outros não observaram nenhuma correlação (134, 148, 183).

Devido à recombinação de duas formas alélicas principais do gene, combinações alélicas entre os blocos variantes 2, 4 e 10, podem gerar 24 tipos possíveis de proteínas MSP1. Apenas o bloco 2 apresenta 3 formas alélicas (K1, MAD20 e RO33), enquanto os blocos 4 e 10 apresentam apenas, duas formas, K1 e MAD20, sendo que o bloco 4 pode apresentar combinações entre os alelos K1 e MAD20 apresentando sequências híbridas (175).

Sequências híbridas do bloco 2, apresentando combinações entre os alelos RO33 e MAD20 e entre RO33, MAD20 e K1 foram encontrados em isolados africanos de Dielmo, Senegal e em isolados do Quênia (134). Até hoje, não foi descrita a ocorrência de sequências híbridas do bloco 2 em isolados do Brasil e também não encontramos nenhuma sequência dessa natureza nos isolados do estudo. O bloco 2 das famílias alélicas K1 e MAD20 apresenta uma estrutura similar, compreendendo extremidades conservadas que flanqueiam motivos

repetitivos centrais, como mostrados na Tabela 12. Esses motivos repetitivos podem variar em número originando blocos 2 de tamanhos variados. Portanto, blocos 2 dessas duas famílias alélicas apresentam polimorfismos de tamanho.

Comparando a frequência das famílias alélicas para o bloco 2 dos isolados desse estudo, com isolados coletados em Rondônia, provenientes de Porto Velho, nas décadas de 80 e 90, observamos que existe uma flutuação da prevalência das famílias alélicas para esse bloco ao longo do tempo (178). Havia maior prevalência do alelo RO33 na década de 80 e maior predomínio do alelo K1 na década de 90. Nos isolados desse estudo, coletados em 2004 e 2006, novamente foi encontrado um maior predomínio do alelo RO33. A flutuação nas frequências alélicas pode indicar certa instabilidade na transmissão de malária, podendo ser reflexo do intenso fluxo migratório que Rondônia experimentou nas décadas de 80 e 90. A alta prevalência de parasitemias assintomáticas em Rondônia, verificada em estudos do final da década de 90, pode indicar estabilidade na circulação de cepas e aquisição de proteção por parte de alguns indivíduos (90, 91).

Um estudo prospectivo de 10 anos, realizado em Dielmo, Senegal, região caracterizada por uma transmissão malárica intensa e constante, não encontrou diferença na distribuição dos tipos alélicos para o bloco 2, prevalecendo o alelo K1, ao longo do período. Porém, o número de variantes diferentes desse alelo e de MAD20 aumentou, ao longo do tempo (134).

A intensa variação alélica apresentada pelo bloco 2 pode ser em consequência da pressão imunológica sofrida pelo parasita, como tentativa de evasão do reconhecimento pelo sistema imune. Alguns trabalhos com indivíduos de área endêmica para malária encontraram correlação positiva entre anticorpos anti-bloco 2 e proteção contra formas graves da doença e/ou reinfeção (145, 161, 184). Porém, outros trabalhos não apontam para essa direção (134, 183). Uma das críticas aos trabalhos que testam resposta humoral de pacientes de áreas endêmicas para malária contra antígenos polimórficos recombinantes é que poderia não se estar levando em conta, a especificidade da resposta naturalmente adquirida (134). Alguns antígenos recombinantes podem não representar os isolados circulantes daquela região ou podem conter apenas os motivos repetitivos centrais específicos de um variante. A resposta imune pode ser específica para um determinado alelo e para alguns variantes desse alelo, por isso a negatividade dos resultados, quando testados antígenos recombinantes provenientes de alelos ou variantes diferentes (148).

Neste trabalho, conseguimos identificar os 3 alelos e alguns variantes das famílias alélicas K1 e MAD20 entre os isolados coletados. Toda a extensão do bloco 2 de cada família

alélica foi expressa associada às porções C-terminal e N-terminal dos blocos 1 e 3, respectivamente. Dessa forma, é possível que haja reconhecimento cruzado das famílias alélicas, através do reconhecimento das regiões não-repetitivas presentes nas extremidades do bloco, assim como, da região de transição entre os blocos 1 e 2, já descrita anteriormente, como importante para o desenvolvimento de resposta imune celular (185).

Ao contrário do verificado em Dielmo, Senegal, onde o alelo mais prevalente (K1) foi o mais reconhecido pelos pacientes, o alelo mais prevalente aqui (RO33) não foi o mais reconhecido, porém apresentou resposta mais intensa entre os assintomáticos do que os alelos MAD20 e K1 para o mesmo grupo. Indivíduos sintomáticos reconheceram mais intensamente o alelo MAD20 do que os demais alelos expressos. No estudo da África, em Dielmo, no Senegal, foram sintetizados vários peptídeos referentes às regiões repetitivas dos alelos K1 e MAD20 e houve um grande número de respostas negativas nos testes de ELISA realizados. Aqui, trabalhamos com toda a extensão do bloco e houve reconhecimento de pelo menos um dos antígenos recombinantes por 86,5% dos pacientes da amostra e a maioria dos pacientes apresentou resposta para mais do que um antígeno. Podemos observar pela Tabela 12 que a maioria dos indivíduos infectados pelo alelo RO33 isoladamente reconheceu os outros alelos, indicando a possibilidade de reconhecimento cruzado entre as famílias. Nenhum paciente infectado isoladamente pelos alelos K1A e MAD20 fez resposta cruzada isolada entre os respectivos alelos. Isso indica que a possibilidade de resposta cruzada entre as duas famílias K1 e MAD20 é mais difícil. Porém, houve um grande número de pacientes que reconheceu o alelo K1 Africano, cuja sequência não foi encontrada nos isolados daqui. Isso aponta para resposta cruzada entre variantes dessa família alélica (134) ou exposição a este alelo anteriormente.

A ausência da parasitemia pelo tratamento, a diminuição da exposição à malária pelas ações de controle vetorial realizadas nas localidades antes das coletas e o período do ano de baixa transmissão (final da estação seca) podem explicar a diminuição da resposta anti-RO33 nos plasmas coletados 60 dias pós-tratamento.

A maioria dos pacientes estava infectada ou pelo alelo RO33, ou por algum variante da família K1 (K1A foi o mais prevalente dessa família), ou por uma associação dos dois alelos. Após o período de 60 dias também houve diminuição da resposta para K1. Apenas para o alelo MAD20 houve aumento em 30 dias e posterior queda nos valores dos IR, mas sem diferença entre o início e 60 dias pós-tratamento.

As regiões conservadas do bloco 2 da família K1 que flanqueiam os motivos repetitivos centrais podem ser as regiões imunodominantes para as quais a resposta humoral é

direcionada. Os dados obtidos com o estudo em Dielmo corroboram para isso, já que apesar do aparecimento de um grande número de variantes da família K1, ao longo de 10 anos, não houve a aquisição de anticorpos contra os novos variantes pelos pacientes (134), fenômeno chamado de “*clonal imprinting*”. Também não houve aumento de infecções sintomáticas pelo aparecimento de novos variantes.

O alelo MAD20 foi o menos prevalente entre os isolados e parece haver uma maior especificidade para o reconhecimento dos diversos variantes dessa família. A maioria dos pacientes que apresentou reconhecimento do variante MAD20A estava infectada pelo alelo RO33.

O teste estatístico de *Mann-Whitney* não apontou reconhecimento diferencial entre sintomáticos e assintomáticos, com exceção para o maior reconhecimento do alelo MAD20 pelos plasmas sintomáticos. A diminuição do reconhecimento nos plasmas coletados 60 dias pós-tratamento aponta para a necessidade da parasitemia para a manutenção da resposta gerada.

A maioria dos pacientes do subgrupo em que houve coleta de plasmas no período de 30 e 60 dias pós--tratamento é composta por assintomáticos da localidade de Engenho Velho, cujos plasmas iniciais foram reativos contra os 3 antígenos. Analisando a história pregressa de malária desses pacientes, a última infecção sintomática que tiveram foi há 3 anos para alguns e há 30 anos para outros. Considerando a sazonalidade característica da transmissão de malária nessa região, é esperado que flutuações nos níveis de anticorpos específicos ocorram naturalmente. Esses dados parecem indicar que podemos encontrar proteção clínica contra malária, mesmo com títulos baixos desses anticorpos. Porém, as análises estatísticas por regressão linear múltipla, regressão logística e de associação entre variáveis qualitativas, não encontraram associação entre a resposta contra o bloco 2, MSP1₁₉, MSP6 e MSP7 e o perfil assintomático ou o TUES. Apesar disso, padrões específicos das subclasses de IgG podem modular a resposta imune, para um padrão anti-inflamatório, no âmbito individual.

Os resultados da isotipagem dos anticorpos IgG anti-RO33 identificaram a preponderância do perfil Th1 nas respostas dos assintomáticos e sintomáticos, refletida pelo predomínio das subclasses IgG1 e IgG3 nos dois grupos. Porém, assintomáticos possuem maior prevalência de IgG3, enquanto sintomáticos possuem homogeneidade na prevalência das duas subclasses. Os plasmas de dois indivíduos assintomáticos (39 e 42) que possuem longo tempo de exposição à malária e longo período de ausência de sintomas contêm também subclasses do padrão Th2 de resposta imune: IgG4 nos plasmas iniciais para o primeiro e IgG2 e IgG4, para o segundo. O plasma do indivíduo 39 coletado 30 dias pós- tratamento

aponta prevalência apenas de IgG3 na ausência da parasitemia, porém o plasma do indivíduo 42 apresenta ligeira queda apenas da subclasse IgG1, mantendo os níveis de anticorpos das outras subclasses.

O indivíduo 42 é o mais velho integrante do estudo e provavelmente o mais exposto, não só pela exposição natural de morar na região há mais tempo, mas por ter exercido funções de trabalho como soldado da borracha, que determinaram períodos de exposição intensa, com diversos episódios sintomáticos de malária. Os altos e permanentes valores das DO dos anticorpos neutralizantes, IgG2 e IgG4, parecem ter sido gerados, especificamente, em resposta ao antígeno RO33. Esse antígeno integra um complexo protéico, juntamente com MSP6 e MSP7, que sofre *shedding* (106) e é liberado na corrente sanguínea no momento da invasão eritrocítica pelo merozoíto. A produção de anticorpos neutralizantes, que não ativam o sistema complemento e que se ligam com baixa afinidade a receptores Fc na superfície de células efectoras do sistema imune, pode ser um mecanismo adaptativo no controle da sintomatologia malárica desenvolvido por esse paciente. Porém, a alta prevalência de infecções por helmintos (186), decorrente das precárias condições de saneamento básico da localidade de Engenho Velho onde o paciente reside, também pode ser responsável pelo direcionamento da resposta imune para um padrão Th2, com produção de IL-4 e IL-10 e anticorpos neutralizantes.

Considerando que MSP1 é a proteína mais abundante na superfície do merozoíto, apresentando participação essencial no mecanismo de invasão eritrocitária (180) e que o bloco 2 é rapidamente destacado da superfície do mesmo, anteriormente à invasão, é preciso que sejam geradas, em um curto espaço de tempo, moléculas efectoras específicas para esse bloco, que bloqueiem a invasão ou que inibam o processamento proteolítico. Dessa forma, a resposta anti-bloco 2 pode envolver a participação de SLPC que se originam de linfócitos B naïve, decorrentes da interação com alta afinidade ao antígeno na região da interface das células T e B, nos órgãos linfóides secundários. A grande afinidade entre o BCR (*B cell receptor*) e o antígeno direciona a diferenciação fenotípica do linfócito B para uma célula SLPC, que sofre *switching* de classe na região extrafolicular do órgão linfóide secundário. Essa célula pode migrar para os tecidos, através da expressão estimulada por IFN- γ , do receptor de quimiocina CXCR3, atuando no controle inicial da infecção e morrendo, posteriormente.

A região do gene que expressa MSP1₁₉ é bastante conservada entre todas as sequências gênicas depositadas na base de dados *Genbank*. Sabe-se que a fração MSP1₁₉, composta por dois domínios EGF-*like* e âncora de GPI, é de fundamental importância para o

processo de invasão eritrocitária (71), (187, 188) e que indivíduos de áreas endêmicas desenvolvem altos títulos de anticorpos contra essa fração protéica. Uma meta-análise recente comparou os resultados de 5 estudos ((189), (190), (145), (191) e (184)) que correlacionaram a presença de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉ com proteção contra malária sintomática e concluiu que ter anticorpos IgG contra MSP1₁₉, diminui em 18% o risco de contrair malária sintomática, principalmente em crianças (192). Também foi verificada a manutenção da avidéz do anticorpo pelo antígeno MSP1₁₉, após um período de 12 meses, na ausência de re-exposição parasitária (193). A intensa e freqüente resposta a esse antígeno, tanto em pacientes sintomáticos quanto em assintomáticos com parasitemias variadas, sugerem alta imunogenicidade do antígeno, capaz de estimular a manutenção de títulos altos de anticorpos IgG mesmo em parasitemias baixas, como as apresentadas pelos pacientes assintomáticos. A possibilidade da presença de LLPC é sugerida, dada a manutenção dos valores dos IR nos plasmas do T60. O amplo reconhecimento desse antígeno por indivíduos sintomáticos e assintomáticos pode indicar a presença das duas populações de células plasmocitárias, de longa-duração e de curta-duração, na resposta imune desenvolvida contra esse antígeno.

A identificação das subclasses de IgG na resposta contra MSP1₁₉ evidenciou a presença preponderante da subclasse de IgG1, tanto na resposta dos assintomáticos quanto na dos sintomáticos, sendo que sintomáticos apresentaram DO mais intensa relativa a IgG1. Os plasmas coletados 60 dias pós-tratamento mostraram diminuição na frequência dessa subclasse, nos dois grupos, porém assintomáticos esboçaram pequeno aumento na frequência da subclasse IgG3, enquanto em sintomáticos a frequência dessa subclasse diminuiu.

Apesar do intenso reconhecimento desse antígeno, podemos observar com os dados obtidos que ter anticorpos que reconhecem o antígeno MSP1₁₉ não está associado, exclusivamente, a um perfil clínico assintomático, já que 80% dos pacientes sintomáticos e assintomáticos são positivos contra ele. Isso aponta para a alta imunogenicidade desse antígeno relacionada à presença do parasita. Porém, o discreto aumento da subclasse IgG3 em assintomáticos, nos plasmas coletados 60 dias pós-tratamento, pode conferir proteção ao desenvolvimento de parasitemia nesses indivíduos. Como já citado acima, as análises estatísticas não associaram a resposta anti-MSP1₁₉ com o perfil assintomático e com o TUES.

As proteínas MSP6 e MSP7 associam-se não-covalentemente à proteína MSP1 na superfície do merozoíto e esse complexo protéico é denominado de complexo MSP1 (106)

A proteína MSP7 é codificada por uma família multigênica presente no cromossomo 13, responsável também pela expressão de 5 proteínas relativas a MSP7 (MSRPs). Apesar de evidências apontarem a transcrição dos 5 genes *msrp*, apenas a proteína MSRP2 foi detectada, porém, não na superfície dos merozoítos. Essa proteína sofre modificações pós-traducionais e o fragmento de 25 kDa é solúvel e secretado no momento do egresso do parasita do interior do eritrócito (194).

A proteína MSP7 sofre dois processos de clivagem, originando fragmentos de 20 e 33 kDa, primeiramente, e de 22 kDa, secundariamente. O primeiro é anterior ao processamento primário da proteína MSP1 e ocorre em compartimento posterior ao complexo de Golgi. O segundo ocorre na superfície do merozoíto, na proteína acoplada a MSP1 e MSP6 (195). Evidências apontam a participação da enzima *subtilisina 1-like* (PfSUB1), responsável pelo *shedding* do complexo MSP1 da superfície do merozoíto, no processamento de MSRP2 (196). A deleção do gene que codifica MSP7 não evidenciou letalidade, mas causou diminuição importante do crescimento do parasita (194, 197).

O gene que codifica MSP6 apresenta 2 formas alélicas, 3D7 e K1, cujos produtos protéicos apresentam dimorfismo de tamanho pela inserção de 3 blocos de sequências na região central do alelo K1. O alelo 3D7 apresenta distribuição mundial, enquanto o alelo K1 é restrito aos isolados do sudeste asiático. Os dois produtos protéicos sofrem modificações pós-traducionais, restando um fragmento de 36 kDa oriundo do alelo 3D7, acoplado à proteína MSP1, no momento do egresso do merozoíto do interior do eritrócito (151). Dados mais recentes apontam que as proteínas MSP3 e MSP6 fazem parte de uma mesma família de genes parálogos que compartilham um alto grau de conservação na região C-terminal. Os 6 genes são expressos simultaneamente no mesmo ciclo e alvos de anticorpos envolvidos em citotoxicidade celular (158, 198). Existem evidências de reatividade cruzada entre MSP3 e MSP6, porém restrita a algumas sequências das regiões C-terminais (150).

Anticorpos contra as regiões C-terminais de MSP6 e MSP7 são encontrados, em abundância, nos plasmas de indivíduos residentes em áreas endêmicas. Resultados obtidos em um estudo com uma população de crianças e adultos semi-imunes do sudeste do Vietnã apontam que anticorpos humanos, adquiridos naturalmente, reconhecem mais as regiões C-terminais das proteínas MSP6 e MSP7, do que toda a extensão das mesmas (149). Porém, não foi evidenciado papel protetor contra o desenvolvimento de parasitemia por malária falciparum nesses indivíduos (149). Houve maior predomínio de anticorpos da classe IgG1 para MSP6 e IgG3 para MSP7, porém não houve correlação entre ter anticorpos anti-MSP6 e

anti-MSP7 e proteção contra desenvolver parasitemia, durante os 6 meses de acompanhamento (149).

A amplificação de uma única sequência do gene que codifica MSP7 em mais da metade dos isolados de Rondônia e o reconhecimento humoral do peptídeo expresso por mais da metade dos indivíduos da amostra corroboram os dados discutidos acima. A resposta imune anti-MSP7 também não foi associada com proteção contra o desenvolvimento de sintomas de malária, através das análises estatísticas realizadas. Não houve reconhecimento diferencial por sintomáticos e assintomáticos, porém, houve manutenção da resposta humoral ao longo do tempo na ausência da parasitemia. Ao contrário do encontrado no estudo realizado no Vietnã discutido acima, as subclasses mais prevalentes na resposta anti-MSP7 foram IgG1 e IgG4, com maior prevalência da última entre assintomáticos e homogeneidade entre as duas entre sintomáticos. Os plasmas coletados 60 dias pós-tratamento apontaram diminuição de todas as subclasses, porém a subclasse IgG4 ainda manteve a prevalência.

O peptídeo recombinante MSP6 foi reconhecido por apenas 20% dos sintomáticos e 30% dos assintomáticos, sem diferença entre a intensidade de reconhecimento entre os dois grupos. A mesma tendência de manutenção da resposta ao longo do tempo, observada para MSP7, foi identificada para MSP6. Plasmas de assintomáticos, coletados 30 e 60 dias pós-tratamento apontam a prevalência da subclasse de IgG4 e mais fracamente de IgG1.

A disparidade entre os resultados das isotipagens mostrados com os plasmas de Rondônia e nos estudos citados acima pode evidenciar sequências nas regiões C-terminais, com propriedades diferentes de direcionamento da resposta humoral. Como já discutido anteriormente para o padrão de resposta anti-RO33 apresentado pelo plasma do indivíduo 42, a existência de co-infecções por helmintos, direcionando a resposta humoral para o padrão Th2 deve ser considerada nessa população. A prevalência da subclasse IgG4 entre assintomáticos também pode ser considerada como um mecanismo adaptativo de controle da resposta inflamatória, adquirido por esse grupo.

Roussillon e colaboradores observaram em uma coorte com 203 crianças do Sudoeste do Senegal uma correlação significativa entre episódios clínicos de malária e carga parasitária de helmintos, principalmente ancilostomídeos, com diminuição de anticorpos citofílicos e aumento da subclasse IgG4 na resposta anti-MSP3 (199). O mesmo grupo observou em uma coorte com crianças do Madagascar um risco 2,5 vezes maior de episódios clínicos de malária em crianças infectadas com helmintos (150). Porém, os nossos dados diferem desses estudos. Os pacientes em que foi observado esse padrão de resposta são adultos e assintomáticos há um longo tempo. Como será mostrado adiante, esses indivíduos

apresentam um padrão de resposta Th1 anti-MSP3, semelhante aos adultos dos estudos citados acima. Dessa forma, a resposta contra os antígenos solúveis do complexo MSP1 pode realmente envolver um padrão de resposta humoral antiinflamatório em adultos assintomáticos, talvez mediado por co-infecções com helmintos e esse aspecto pode contribuir para a modulação da resposta imune.

O gene PFL1385c é responsável pela expressão de MSP9, também conhecida como p101 (peptídeo de 101 kDa) ou ABRA (*acid basic repeat antigen*), devido a repetições de lisina (K) e ácido glutâmico (E) na sua porção C-terminal. A proteína é bastante conservada entre as espécies de *Plasmodium* nas quais foi caracterizada: *falciparum*, *vivax*, *knowlesi* e *cynomolgi* (200).

Evidências apontam a ligação de regiões de MSP9 com a porção C-terminal de MSP1 (MSP1₄₂ ou MSP1₁₉) e com a proteína banda 3 da superfície do eritrócito (107), anteriormente proposta como o receptor eritrocítico de MSP1 (201). A clivagem proteolítica da proteína banda 3 é necessária para o processo de invasão eritrocitária e a região N-terminal de MSP9 possui atividade de quimiotripsina (202). Porém, parece haver também, a participação de outra protease nesse processo, Gp76, uma serinoprotease ancorada à membrana, via âncora de GPI (203).

Ensaio *in vitro* demonstraram que anticorpos gerados a partir de imunizações de animais com peptídeos MSP9 recombinantes são capazes de inibir a invasão eritrocitária em mais de 90% (204). Não há estudos de resposta imune anti-MSP9 em humanos, em áreas endêmicas para malária.

A porção N-terminal escolhida para ser amplificada codifica um peptídeo que contém epítomos para células T e B, de acordo com a base de dados *IEDB*. Apenas um alelo circulante de MSP9 foi encontrado nos isolados amplificados, a partir de infecções sintomáticas e assintomáticas. As amplificações foram positivas para cerca de 20 a 30% dos isolados utilizados no estudo.

Houve reconhecimento diferencial do peptídeo expresso entre assintomáticos e sintomáticos, em frequência e intensidade de reconhecimento. Apenas 11% dos indivíduos sintomáticos reconheceram esse antígeno, apresentando valores de IR de 1–4,9, enquanto 50% dos assintomáticos o reconheceram com valores de IR maiores que 80.

A identificação das subclasses de IgG envolvidas na resposta humoral em pacientes assintomáticos aponta o predomínio de anticorpos da subclasse IgG1, mantidos ao longo do tempo na ausência de parasitemia. O plasma de um único indivíduo sintomático foi isotipado,

evidenciando a presença homogênea das subclasses IgG1 e IgG2, no plasma coletado no momento do episódio clínico.

As análises estatísticas que mediram risco associaram a resposta contra MSP9 com proteção ao desenvolvimento de sintomas clínicos. Os indivíduos que reconhecem essa proteína possuem 8 vezes menos risco de apresentar sintomas de malária do que aqueles que não respondem.

MSP9 recombinante oriunda de *P. vivax* e fusionada a GST foi utilizada para imunizar camundongos Balb/c, em um estudo. O fragmento expresso a partir da região N-terminal foi altamente imunogênico, gerando títulos de anticorpos de 1:800.000, com predomínio das subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b. A presença de reatividade cruzada, entre esquizontes de *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* e *P. coatney* foi observada, em todos os plasmas dos camundongos imunizados (27). Porém, nenhuma dessas regiões N-terminais possui qualquer identidade com a região N-terminal do gene PFL1385c, pelo *Blast/n*.

Vale lembrar que o *switching* das subclasses IgG1 e IgG2b é estimulado por IL-4 e TGF- β , respectivamente e ambas as citocinas são produzidas por linfócitos Th2. Apenas a subclasse IgG2a é estimulada por IFN- γ , produzido por linfócitos Th1. Em camundongos, o reconhecimento de MSP9 de *P. vivax* estimulou mais uma resposta antiinflamatória do que pró-inflamatória. Porém, não foi observado esse mesmo aspecto com os plasmas dos pacientes do estudo no reconhecimento de MSP9 de *P. falciparum*, como visto acima.

5.4 Proteínas MSP2, MSP4 e MSP5

A glicoproteína MSP2 possui aproximadamente 43 kDa e está ligada à superfície do merozoíto através de âncora de GPI. Apresenta extremidades conservadas que flanqueiam regiões semiconservadas e regiões polimórficas centrais (127). Essa proteína, em diversos trabalhos publicados demonstra estar envolvida em proteção contra o desenvolvimento de doença malárica (184, 205).

Infelizmente, não foi possível amplificar fragmentos de MSP2 em todos os isolados coletados. A partir de dados publicados de isolados de Ariquemes, Rondônia, depositados no *GenBank*, foi possível identificar os alelos dos fragmentos amplificados, a partir dos isolados daquele estudo (135). Os dois alelos descritos, FC27 e IC1, foram identificados nos isolados deste estudo.

Apesar de uma maior prevalência do alelo IC1 (77,27%) nos isolados amplificados da amostra, apenas na localidade de Vila Candelária foi observado o mesmo padrão de frequência alélica, destacando-se o variante IC1_XXX (60%). Nas localidades de Bate-Estaca e Santo Antônio os alelos apresentaram distribuição homogênea. Porém, na localidade de Engenho Velho, não foram identificados os alelos da família IC1.

A maior prevalência da família alélica IC1 e um maior polimorfismo desse alelo foram observados entre isolados da Tanzânia e da Papua Nova Guiné (70). A associação entre múltiplas infecções clonais e alta endemicidade também foi observada nesse mesmo estudo. A maior prevalência do alelo IC1 também foi observada, em estudo recente, entre isolados do Malawi, Burkina Faso, Uganda, Tanzânia e São Tomé, coletados entre os anos 1996 e 2000 (206). O intenso polimorfismo exibido pelos dois alelos pode explicar a pouca quantidade de isolados amplificados, assim como, a ausência da amplificação do alelo IC1 entre os isolados de Engenho Velho. No estudo realizado com isolados de Ariquemes (135), a maior parte da diversidade alélica observada foi atribuída a variações no interior das regiões repetitivas dos genes, não sendo identificadas sequências híbridas com os dois alelos. O mesmo fato foi observado entre os isolados das localidades estudadas. Não houve identificação dos dois alelos, a partir de gDNA de um único isolado, porém, houve a identificação dos dois variantes do alelo IC1 no mesmo isolado .

A escassez de alelos identificados nos isolados do estudo dificultou avaliar a especificidade da resposta gerada, ou seja, o direcionamento da resposta para o alelo infectante. Apesar disso, verificamos que os alelos IC1 foram amplamente reconhecidos pelos plasmas dos pacientes, tanto sintomáticos quanto assintomáticos e que a maioria dos indivíduos que reconheceu um dos variantes IC1 também reconheceu o outro variante. O alelo FC27 foi o menos prevalente entre os isolados, o menos reconhecido pelos plasmas dos pacientes sintomáticos e assintomáticos e o que gerou valores de IR mais baixos. Não houve reconhecimento diferencial entre sintomáticos e assintomáticos para nenhum dos peptídeos expressos. A maior reatividade contra o peptídeo IC1_69 pode indicar o reconhecimento cruzado entre variantes dessa família alélica, não observado entre a família alélica FC27. Um estudo de coorte realizado com adultos da região do Acre encontrou resultados opostos aos nossos, com maior reconhecimento do alelo FC27 e com evidências de reconhecimento cruzado entre variantes desse alelo (207).

A resposta humoral anti-IC1 foi mantida ao longo do tempo, com pequenas flutuações nos plasmas coletados 30 dias pós-tratamento. Porém, a resposta anti-FC27 não acompanhou o mesmo padrão. Resultado oposto a esse foi evidenciado no estudo com adultos do Acre,

citado acima. Os 5 peptídeos recombinantes utilizados no Acre não foram expressos a partir de isolados circulantes da região. Apenas dois peptídeos, um do alelo FC27 e outro do alelo IC1, foram expressos a partir de isolados da Amazônia Brasileira, porém não do Acre. Os outros 3 foram expressos a partir de isolados coletados na Papua Nova Guiné, em Uganda e em uma região do oeste Africano. A ausência de reatividade cruzada entre os variantes do alelo IC1 pode ser explicada pelo alto polimorfismo dessa família alélica e muito provavelmente, essas sequências não fazem parte do repertório de sequências da região do Acre. Porém, houve reatividade cruzada entre os peptídeos oriundos do alelo FC27 brasileiro e da Papua Nova Guiné, concordando com o menor polimorfismo dessa família alélica.

Analisando a Tabela 15, percebemos que o reconhecimento simultâneo dos dois alelos ou variantes de IC1 é maior em assintomáticos do que em sintomáticos.

Um trabalho prospectivo realizado com crianças da Gâmbia encontrou evidências de proteção clínica contra desenvolvimento de infecções sintomáticas, em crianças que apresentavam anticorpos IgG3 contra as duas famílias alélicas (205). Outro dado interessante encontrado com esse trabalho foi a associação de proteção contra malária sintomática em crianças que apresentavam anticorpos IgG3 contra MSP1 bloco 2 e MSP2. No estudo realizado com crianças do Quênia, a resposta de IgG/IgG3 contra MSP2 também foi associada com proteção para o desenvolvimento de episódios clínicos, porém não foi encontrada associação protetora entre anticorpos IgG3 específicos para um dos alelos e episódios clínicos de malária causados pelo alelo específico, em estudo subsequente (184, 208)

A prevalência de anticorpos das subclasses IgG3 e IgG1 foi observada nos plasmas dos indivíduos assintomáticos, com predomínio da primeira. Esse padrão foi mantido nos plasmas coletados 30 e 60 dias pós-tratamento. A presença de IgG4 foi identificada apenas nos plasmas coletados na presença de parasitemia.

As análises estatísticas realizadas para quantificar a diminuição do risco de ter sintomas clínicos de malária associado ao reconhecimento ou à intensidade do reconhecimento de algum antígeno específico, não evidenciou a participação da resposta anti-MSP2 nesse mecanismo, ao contrário dos estudos citados acima.

Os genes de MSP4 e MSP5 possuem semelhanças nas suas estruturas, que sugerem uma origem comum entre os dois. Possivelmente, um evento de duplicação de um gene ancestral e posterior divergência dos dois, originou os atuais MSP4 e MSP5. Ambos possuem uma sequência sinal hidrofóbica, na região N-terminal, enquanto a região C-terminal é composta por uma âncora de GPI e 1 domínio EGF-like (157, 209).

Não há dimorfismo de tamanho entre os produtos protéicos expressos pelos dois genes, corroborando com a identificação de apenas um alelo circulante para MSP4 e MSP5, entre as sequências amplificadas nesse estudo. Análises comparativas envolvendo isolados de campo da Papua Nova Guiné e Tailândia e cepas de laboratório apontam para um baixo nível de polimorfismo presente nas diversas sequências de MSP4 estudadas (153) (152). A mesma ausência de diversidade foi observada para várias sequências de MSP5 oriundas de isolados com ampla distribuição geográfica (157).

Evidências sugerem que o gene de MSP4 não está sob seleção positiva, ou seja, não apresenta diversidade na sua sequência, decorrente de tentativa de evasão do reconhecimento pelo sistema imunológico (152). Apesar da ausência de seleção positiva e da diversidade limitada de sequências diferentes do gene de MSP4, indivíduos semi-ímmunes residentes em áreas endêmicas para malária apresentam anticorpos que reconhecem proteínas MSP4 recombinantes, podendo sugerir algum papel em resposta ímune protetora (210). Camundongos imunizados com a proteína MSP4/5 de *P. yoelii*, homóloga a MSP4 de *P. falciparum*, ficaram protegidos quando desafiados de forma letal com *P. yoelii* e a proteção foi potencializada quando uma combinação de MSP4/5 de *P. yoelii* e domínios EGF-like da proteína MSP1 de *P. yoelii* foi utilizada (155, 156).

O peptídeo recombinante expresso fusionado a GST (MSP4_GST) foi amplamente reconhecido pelos plasmas dos indivíduos sintomáticos e assintomáticos, porém indivíduos assintomáticos apresentaram resposta mais intensa do que os sintomáticos.

A análise da longevidade da resposta revelou perpetuação da resposta humoral na ausência da parasitemia. A maioria dos plasmas utilizados nessa análise é oriunda de indivíduos assintomáticos e provavelmente, a resposta anti-MSP4 envolve a geração de LLPC. A alta resposta apresentada contra esse antígeno pelos indivíduos assintomáticos na presença da parasitemia, assim como a manutenção da resposta na ausência da parasitemia, pode ser indicativa de uma resposta protetora conferida pelos anticorpos que reconhecem MSP4. Por outro lado, também podem ser apenas a tradução da longa exposição prévia que esse grupo de indivíduos apresenta, como já discutido anteriormente.

A identificação das subclasses de IgG nos plasmas reativos evidenciou a prevalência das subclasses IgG1 e IgG3, tanto nos plasmas dos indivíduos assintomáticos quanto nos plasmas dos sintomáticos, porém com inversão de valores entre os dois grupos, nos plasmas coletados na presença de parasitemia. Indivíduos assintomáticos apresentaram maior prevalência da subclasse IgG1, enquanto a maior prevalência nos plasmas dos sintomáticos

foi da subclasse IgG3. Porém, nos plasmas assintomáticos coletados 30 e 60 dias pós-tratamento houve intensificação da resposta de IgG3.

A análise estatística por regressão logística encontrou efeito protetor da resposta contra esse antígeno associado ao desenvolvimento do perfil assintomático, apenas no modelo univariado. Quando a resposta foi avaliada em associação às respostas contra outros antígenos, o efeito foi perdido.

Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo com indivíduos residentes de uma área de alta endemicidade do sudoeste do Vietnã (210). A amostra trabalhada foi composta por adolescentes e adultos e 8 peptídeos foram expressos em dois sistemas recombinantes diferentes, perfazendo toda a extensão da proteína. Houve amplo e intenso reconhecimento dos peptídeos pelos plasmas dos pacientes. A grande maioria dos plasmas reconheceu mais do que um dos peptídeos de cada sistema recombinante. As subclasses prevalentes envolvidas na resposta contra todos os peptídeos expressos foram, em ordem de frequência, IgG3 e IgG1. A frequência das subclasses também foi mantida ao longo do tempo. Não houve associação entre a intensidade da DO das subclasses e de IgG total e ausência de parasitemia, durante o acompanhamento posterior. Os mesmos resultados obtidos para MSP1₁₉ foram obtidos nesse grupo, tais como prevalência da subclasse IgG1 e não-associação entre presença e intensidade de anticorpos IgG/IgG1 e ausência de parasitemia, no acompanhamento posterior.

Apesar da baixa amplificação de fragmentos do gene que codifica MSP5 em isolados oriundos de infecções assintomáticas, todos as sequências obtidas a partir de infecções sintomáticas e assintomáticas apresentaram identidade de 98% com sequências depositadas na base de dados *GenBank*, incluindo a sequência da cepa 3D7. Apesar disso houve maior frequência de reconhecimento do peptídeo expresso por plasmas dos indivíduos assintomáticos. Apenas dois indivíduos sintomáticos apresentaram resposta contra esse antígeno. Os plasmas coletados nos períodos posteriores ao tratamento mostraram perpetuação da resposta anti-MSP5 ao longo do tempo. Não houve identificação das subclasses de IgG envolvidas na resposta anti-MSP5, pois todos os plasmas reativos apresentaram IR menores de 10.

As análises estatísticas de associação entre variáveis qualitativas e de quantificação de risco por regressão logística, apontam associação entre a resposta e a intensidade da resposta anti-MSP5 com menores chances de desenvolver sintomas de malária ou o perfil assintomático. As duas metodologias estimam um risco 9 vezes menor de desenvolver sintomas maláricos para os indivíduos que apresentam resposta anti-MSP5.

Apesar desse achado, o gene que codifica MSP5 foi passível de ser deletado, em uma linhagem de parasitas nocautes para ele, gerados através da metodologia de dupla recombinação homóloga (*double cross over*), seguida de seleção negativa e positiva, sem prejuízo na capacidade de invasão e crescimento desses parasitas (211). Em um estudo realizado na região da Papua, na Indonésia, plasmas de indivíduos sintomáticos e assintomáticos reconheceram o peptídeo expresso com a mesma intensidade de resposta, sem diferença nas proporções das subclasses preponderantes da resposta, IgG1 e IgG3. Houve diminuição da frequência das subclasses, ao longo do tempo, nos plasmas analisados, na ausência da parasitemia (212).

5.5 Proteínas MSP3 e MP10

O gene que codifica para essa proteína faz parte de uma família gênica que apresenta 8 ORFs (*open read frames*) dispostas consecutivamente ao longo do cromossomo 10 (198). Seis dessas ORFs possuem regiões C-terminais semelhantes, entre elas, os genes que codificam MSP3, MSP6 e MSP11, que apresentam domínios ricos em ácido glutâmico e domínios *leucine zipper-like* nas regiões C-terminais (213, 214).

A proteína associa-se a superfície do merozoíto, apesar de não ter uma região transmembrana ou uma sequência sinal para uma âncora de GPI. Assim como MSP6 associa-se às proteínas MSP1 e MSP7, através de interações entre a região C-terminal e o complexo MSP1, o mesmo pode ocorrer com MSP3. Uma hipótese é de que essa associação seja através da interação dos domínios das regiões C-terminais com outra proteína de superfície e evidências apontam para a associação de MSP3 com MSP9, na superfície do merozoíto. Clones truncados na região *leucine-zipper like* de MSP3 não estão presentes no vacúolo parasitóforo e nem na superfície do merozoíto, o mesmo ocorrendo para MSP9 (214). Dois alelos do gene PF10_345 (K1 e 3D7) são encontrados e diferem pela região central polimórfica. A prevalência entre eles é bastante proporcional nas regiões central e oeste da África. Outro alelo de 350 pares de bases (pb) foi encontrado nas mesmas regiões, enquanto um alelo de 500 pb foi encontrado, apenas, em dois isolados da República dos Camarões (215). Apenas o alelo 3D7 foi encontrado nas sequências dos isolados do estudo, porém houve amplificação em apenas 18 dos 52 isolados de campo, com igual proporção entre isolados de infecções assintomáticas e sintomáticas. O mesmo alelo foi identificado no

isolado Africano, porém, dois isolados presentes anteriormente no laboratório e a cepa FCR3 apresentaram amplificação do alelo K1.

A proteína MSP3 possui um peso molecular em torno de 40 kDa. O mesmo trabalho que encontrou as 8 ORFs do cromossomo 10 (198) também evidenciou reatividade cruzada entre os representantes das ORFs, a partir de plasmas de camundongos imunizados com peptídeos recombinantes referentes aos diversos representantes da família MSP3.

Alguns trabalhos associam essa proteína à geração de resposta imune protetora contra desenvolvimento de infecção malárica (115, 117, 118, 160, 216). Macacos *Saimiri sciureus* imunizados com uma formulação vacinal híbrida contendo a região N-terminal do antígeno GLURP (*glutamic rich protein*) e a região C-terminal de MSP3, juntamente com os adjuvantes de *Freund* ou *Montanide* ISA720, obtiveram proteção parcial ao desenvolvimento de parasitemia, associada a altos títulos de anticorpos (217). Há evidências da presença de anticorpos IgG3 anti-MSP3 em indivíduos residentes em área endêmica para malária e de que esses anticorpos tenham participação em mecanismos de citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Há um grande interesse em se entender a resposta imune naturalmente adquirida contra esse antígeno, pensando em utilizá-lo em formulações vacinais (159, 160).

O peptídeo MSP3_3D7 recombinante foi amplamente reconhecido pelos pacientes, tanto sintomáticos quanto assintomáticos, porém, sem reconhecimento diferencial na intensidade da resposta. Apesar da ausência de amplificação do alelo K1 entre os isolados, o antígeno MSP3_K1 foi reconhecido tanto por assintomáticos quanto por sintomáticos. Isso ocorreu em menor número comparado ao antígeno 3D7, mas também sem diferença na intensidade da resposta entre os grupos. Todos os indivíduos que reconheceram o antígeno K1 também reconheceram o antígeno 3D7, sinalizando a possibilidade de reatividade cruzada entre os dois antígenos.

As análises com os plasmas coletados 30 e 60 dias pós-tratamento mostrou diminuição da resposta anti-MSP3_3D7 e K1, na ausência da parasitemia. A identificação das subclasses envolvidas na resposta anti-MSP3_3D7 mostrou predomínio das subclasses IgG1 e IgG3 na resposta dos assintomáticos, com discreto predomínio da última subclasse. Os plasmas dos sintomáticos apresentaram apenas o predomínio da subclasse IgG1. A mesma diminuição observada com IgG total foi evidenciada entre as subclasses IgG1 e IgG3, nos plasmas coletados nos períodos posteriores, porém, o predomínio da subclasse IgG3 permaneceu para a maioria dos indivíduos assintomáticos.

Apesar de todas as evidências com os estudos anteriormente citados do papel protetor dos anticorpos IgG/IgG3 anti-MSP3 no desenvolvimento de episódios clínicos e parasitemia

por *P. falciparum*, não foi encontrado papel semelhante da reposta anti-MSP3 nos plasmas utilizados neste trabalho. O amplo e intenso reconhecimento do antígeno parece estar mais associado a exposição prévia do que com proteção. As análises estatísticas que quantificam risco não associaram a reposta anti-MSP3 com menores chances de apresentar sintomas ou com maiores chances para desenvolver um perfil assintomático.

O gene PFF0995c (MSP10) codifica uma sequência sinal na extremidade 5' seguida por duas regiões centrais com motivos repetitivos e com presença de inserções e deleções de sequências. A porção C-terminal possui dois domínios EGF-like na região da âncora de GPI e regiões polimórficas na extremidade 5' (218).

Evidências apontam um possível processamento da proteína em fragmentos de 80 e 36 kDa, consecutivamente, assim como a presença da mesma nas superfícies dos trofozoítos, esquizontes e regiões apicais dos merozoítos (219). Há evidências que apontam para uma possível associação entre MSP10 e uma proteína de superfície do eritrócito de 50 kDa, assim como a participação de MSP10 no processo de invasão eritrocitária (220).

A presença de duas sequências diferentes entre os isolados da amostra, com regiões de inserção e deleção de pares de bases, corrobora com os dados citados acima. A baixa amplificação de sequências entre os isolados da amostra pode ser explicada pela possível existência de deleções ou inserções nas regiões de hibridação dos pares de oligonucleotídeos.

Apesar da baixa amplificação de sequências, os plasmas dos indivíduos apresentaram ampla reatividade contra os 3 peptídeos expressos, não havendo diferença entre frequência e intensidade de reconhecimento entre plasmas de indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Embora a região amplificada não seja descrita como um epítipo imune, esses resultados demonstram o potencial imunogênico dessa proteína.

O peptídeo expresso a partir da cepa 3D7 apresentou maior intensidade de reconhecimento pelos dois grupos clínicos do que os outros dois peptídeos. Esse fato pode ser explicado pela maior frequência de sequências semelhantes a da cepa 3D7 entre os isolados do estudo e evidencia a grande quantidade de epítipos comuns entre as 3 sequências. As análises da longevidade da resposta mostraram a perpetuação da reposta contra os peptídeos expressos, a partir do isolado 369 e da cepa 3D7. A resposta contra a sequência do isolado 17 apresentou intensificação ao longo do tempo.

O padrão das subclasses de IgG envolvidas na resposta contra os 3 peptídeos expressos possuem padrão semelhante. Sintomáticos apresentam predomínio de IgG1 para os 3 peptídeos, enquanto assintomáticos apresentam prevalência das subclasses IgG1 e IgG2. Os plasmas dos assintomáticos dos períodos posteriores de coleta apresentam intensificação da

resposta de IgG2 e diminuição contínua da resposta de IgG1. A intensidade de ambas as subclasses contra os peptídeos 369 e 3D7 diminuíram nos plasmas do último período. Enquanto a extremidade N-terminal do peptídeo estimula provavelmente uma resposta essencialmente inflamatória, com padrão Th1 e presença de anticorpos citofílicos IgG1 em indivíduos sintomáticos, indivíduos assintomáticos apresentam padrão misto de resposta e efeito *boosting* da subclasse IgG2.

Novamente encontramos a presença de anticorpos neutralizantes IgG2 ou IgG4 na resposta contra antígenos solúveis de malária, nos plasmas dos indivíduos assintomáticos, apontando para um padrão misto Th1 e Th2. O mesmo fenômeno foi observado, nos plasmas de alguns indivíduos assintomáticos, para os antígenos MSP1_bloco2, MSP6, MSP7 e MSP10. A aquisição desse padrão de resposta pode ser decorrente da exposição prévia, como também de um mecanismo adaptativo de controle dos sintomas de malária.

5.6 Proteínas secretadas pelo complexo apical: AMA1, EBAs e MAEBL

A proteína integral de membrana do tipo I AMA1 (*apical membrane antigen 1*), codificada pelo gene PF11_0344, é expressa nas fases de esporozoítio e merozoítio e apresenta papel fundamental nos processos de invasão do hepatócito e do eritrócito (86). AMA1 é bastante conservada entre as espécies de *Plasmodium*, assim como em outros parasitas do filo Apicomplexa. Tentativas de *knockout* do gene em *Plasmodium* (221) e *Toxoplasma* (222) não obtiveram sobreviventes, indicando um papel essencial dessa proteína nos dois organismos no processo de invasão celular. Um estudo recente em *T. gondii* e *P. falciparum* mostrou a associação conservada intra-espécies da proteína AMA1 com uma proteína secretada da região das róprias (*RON2-rhoptry neck protein*), sendo essa etapa essencial para a invasão celular (223). A proteína RON2 faz parte do complexo protéico conhecido como *Moving-Junction*, que ancora o parasita na célula no momento da invasão.

AMA1 apresenta uma estrutura composta por uma região N-terminal que sofre processamento, seguida de 3 domínios (MI, MII, MIII) que se caracterizam pela presença de resíduos de cisteína e ligações dissulfeto (163). A proteína precursora de 83 kDa sofre um primeiro processamento intra-celular, perdendo parte da região N-terminal, originando uma proteína de 66 kDa (224). Após essa etapa, a proteína processada é transferida da membrana das organelas celulares, micronemas, para a superfície dos merozoítos (225). Posteriormente, a proteína sofre novo processamento mediado pela enzima PfSUB2, uma serino protease,

também responsável pelo destacamento do complexo MSP1 da superfície do merozoíto. A proteína é destacada da superfície do merozoíto, na região que dista 29 aminoácidos da região transmembrana e atua na forma solúvel no processo de invasão celular (219).

Evidências apontam que a fosforilação inicial da porção citoplasmática da proteína de 66 kDa é crucial no processo de invasão eritrocitária (110), assim como a interação entre essa proteína e complexo de proteínas RON, sintetizadas nas róptrias e presentes também na superfície do merozoíto (223). Após a reorientação do pólo apical na superfície do eritrócito e a formação da zona de contato entre o merozoíto e o eritrócito, a interação entre AMA1 e o complexo RON promove uma sinalização para a secreção das róptrias, cujo conteúdo rico em lipídeos formará a membrana do vacúolo parasitóforo (111).

As regiões dos domínios I, II e III, que se caracterizam pelas ligações dissulfeto, apresentam-se bastante polimórficas e acredita-se que estejam sob contínua seleção positiva, como tentativa de evasão do reconhecimento pelo sistema imune. Porém, um único anticorpo monoclonal foi capaz de inibir a invasão eritrocitária de várias cepas de *P. falciparum* e de *P. reichenowi* e acredita-se que o alvo desse anticorpo seja um epítipo conformacional formado pelos domínios I e II (226). Uma região hidrofóbica presente entre os domínios I e II foi identificada como possível região de ligação da proteína com a membrana do eritrócito. A existência de “loops” altamente polimórficos nos domínios I e II protege essa região hidrofóbica mais conservada do reconhecimento por anticorpos protetores (227). Um estudo realizado com indivíduos da Papua Nova Guiné verificou a presença de um alto nível de anticorpos contra todo o ectodomínio de AMA1, mas não contra os ectodomínios expressos separadamente, o que sugere fortemente a existência de epítipos conformacionais direcionando a resposta humoral (228).

A amplificação de sequências de AMA1 em apenas 50% dos isolados da amostra com o primeiro par de oligonucleotídeos (AMA1-B) e de apenas 18%, com o segundo par (AMA1-A), evidencia o intenso polimorfismo das regiões escolhidas para serem amplificadas entre os isolados da amostra. Porém, todas as sequências amplificadas apresentaram mais de 95% de identidade com a sequência da cepa 3D7. Apesar disso, cerca de metade dos plasmas da amostra apresentaram reatividade contra os dois peptídeos, evidenciando epítipos comuns entre as diversas sequências de AMA1 entre os isolados da região. Isso pode sugerir a existência de um mecanismo de *clonal imprinting*, semelhante ao sugerido para o bloco 2 da proteína MSP1, para o qual um maior número de sequências protéicas polimórficas, não ocasiona aumento da diversidade de anticorpos, mas provoca boosting em anticorpos que reconhecem epítipos compartilhados. Não foram observadas

diferenças entre as frequências e intensidades de reconhecimento entre assintomáticos e sintomáticos e apenas 4 plasmas apresentam $IR > 10$, mas somente contra o peptídeo AMA1-B que contém os domínios I e II. Esses dados evidenciam que muito provavelmente, os anticorpos gerados contra AMA1 reconhecem epítomos conformacionais da proteína ou que o domínio II é mais imunogênico. Porém, foi observada perpetuação da resposta de IgG para AMA1-B e efeito *boosting* na resposta contra AMA1-A.

Os plasmas reativos contra AMA1-B, submetidos à identificação das subclasses, não evidenciaram diferenças significativas entre a prevalência das subclasses. A subclasse IgG1 apresentou os maiores valores de DO e houve intensificação da resposta de IgG1 em um dos plasmas analisados.

Os estudos apresentados acima mostram claramente a importância dessa proteína para a sobrevivência do parasita no interior celular. Vários estudos também apontam o efeito protetor conferido pelos anticorpos que reconhecem essa proteína, no desenvolvimento de sintomas de malária ou parasitemia (8, 64, 184, 229), sendo um dos principais antígenos vacinais testados (8, 230, 231). Porém, as únicas evidências encontradas neste estudo, que sinalizam um papel protetor dos anticorpos anti-AMA1, são os achados da perpetuação da resposta de IgG ao longo do tempo e o envolvimento da subclasse citofílica IgG1. Essas evidências sugerem a participação de LLPC e de mecanismos de lise mediada por interações entre os anticorpos IgG1 e proteínas do sistema complemento e de citotoxicidade dependente de anticorpos.

Porém, as análises estatísticas que quantificaram risco não encontraram associação entre a resposta anti-AMA1 e proteção ao desenvolvimento de sintomas ou em maiores chances de desenvolvimento do perfil assintomático. Muito provavelmente, a disparidade entre os dados encontrados seja decorrente da existência de epítomos conformacionais na sequência escolhida, necessários para o reconhecimento de anticorpos e não expressos corretamente no sistema recombinante procarioto.

O gene PF11_0486, responsável pela expressão de MAEBL, está localizado no cromossomo 11 e possui uma estrutura composta por 5 éxons, bastante conservada entre todas as espécies de *Plasmodium* em que foi caracterizado. A busca por sequências semelhantes à sequência da cepa 3D7 na base de dados *GenBank* aponta identidade de 100 a 99% com sequências depositadas de isolados, 97% com *P. reichenowi*, 90% com *P. knowlesi* e 70% de identidade com sequências de parasitas murinos.

A presença de *splicing* alternativo foi identificada para esse gene (232), assim como a expressão das duas isoformas de MAEBL em momentos distintos do ciclo biológico do

parasita. O *splicing* alternativo na extremidade 3' gera 2 regiões codificadoras, uma para a isoforma secretada (ORF2) e outra para a isoforma com domínio transmembrana (ORF1) (233).

A isoforma codificada pela ORF1 é homóloga às outras proteínas com domínios *Duffy binding like* de ligação ao eritrócito (EBAs), com semelhanças entre os domínios ricos em cisteína da região carboxiterminal (região VI, na Figura 47). Porém, os domínios ricos em cisteína da região aminoterminal assemelham-se mais aos domínios PAN da proteína AMA1. Se os domínios de ligação ao eritrócito são importantes para o contato entre o esporozoíto e as células da glândula salivar do mosquito, a importância da região citoplasmática da proteína no processo de invasão é evidenciada pela ausência e presença do parasita nesse local, em linhagens nocaute para ORF1 e ORF2, respectivamente (233).

O merozoíto encontrado na fase eritrocítica apresenta a proteína distribuída na sua superfície, na porção final do complexo apical e nas róptrias. MAEBL apresenta colocalização com as proteínas das róptrias RAP1 e RHOPH2, mas não com as proteínas dos micronemas, como EBA175 (112). Evidências apontam que anticorpos gerados em coelhos contra os domínios M1 e M2 da proteína conseguem inibir a invasão de hepatócitos por esporozoítos, *in vitro* (232). Peptídeos sintéticos contendo regiões dos domínios M1, M2 e regiões interdomínios conseguem inibir a invasão do eritrócito pelo merozoíto, *in vitro*, assim como interagem com uma proteína de 33 kDa da superfície do eritrócito (234). A resposta humoral de pacientes contra essa proteína nunca havia sido avaliada, anteriormente.

A pequena quantidade de sequências amplificadas a partir dos isolados do estudo e a identificação de dois alelos circulantes diferentes confirmam o intenso polimorfismo documentado na base de dados *PlasmoDB*, da região escolhida para ser amplificada. Não foram amplificados fragmentos a partir de isolados de campo de infecções assintomáticas, o que pode sugerir, além da existência de alelos circulantes diferentes, a existência de alelos específicos para cada grupo clínico, contribuindo com expressões clínicas diferentes da doença.

Essa sugestão é corroborada pela maior frequência de reconhecimento dos dois alelos expressos por indivíduos sintomáticos, embora a diferença não seja significativa entre os grupos clínicos. Porém, um dos alelos foi mais reconhecido do que o outro por ambos os grupos, tanto em frequência quanto em intensidade. Os plasmas utilizados para testar a longevidade da resposta são majoritariamente provenientes de indivíduos assintomáticos. Houve diminuição importante no número de plasmas reativos para os dois antígenos ao longo

do tempo nesse grupo, falando contra a existência de uma resposta de memória de longa duração.

A existência de epítomos conformacionais nas sequências escolhidas, importantes para o reconhecimento por anticorpos, deve ser considerada novamente devido à grande similaridade dos domínios PAN de MAEBL e AMA1. Dessa forma, a identificação da importância do reconhecimento humoral dessa proteína no desenvolvimento do perfil assintomático ficou prejudicada.

As proteínas EBA140, EBA175 e EBA181 são secretadas pelas organelas micronemas, presentes no pólo apical do merozoíto, no momento da invasão eritrocitária. A proteína EBA175 liga-se ao receptor eritrocítico glicoforina A, a proteína EBA140 liga-se à glicoforina C e a proteína EBA181 liga-se ao receptor W de eritrócitos. Essas interações ocorrem em uma via dependente de ácido siálico, presente nas glicoforinas (235, 236).

A estrutura protéica das 3 proteínas é bastante semelhante. Evidências apontam que a região II (FI/FII) de EBA175 apresenta-se polimórfica devido à constante pressão imunológica, favorecendo a seleção positiva das eventuais mutações (237). Juntando o fato de EBA175 não ser deletável (238) com a capacidade dos anticorpos gerados contra a região II de inibir a invasão, percebemos a importância da proteína na invasão do eritrócito.

O polimorfismo encontrado na região II (FI/FII) da EBA140 não parece estar relacionado com a pressão exercida pelo sistema imunológico do hospedeiro, porém, pode estar relacionado com uma maior especificidade na ligação com o receptor do eritrócito (109). Alguns polimorfismos estão associados com fenótipos diferentes de ligação à glicoforina C entre várias cepas estudadas. A ausência de uma assinatura de seleção positiva na proteína EBA140 decorrente de pressão imunológica pode apontar para um surgimento mais recente dessa via de invasão, posterior à via de EBA175. A possibilidade de *knockout* desse gene, sem inviabilizar a sobrevivência do parasita, colabora para essa observação (109).

A deleção do éxon 3 do gene que codifica a glicoforina C está associada ao fenótipo sanguíneo *Gerbich* negativo. Esse fenótipo sanguíneo é visto com bastante frequência na Papua Nova Guiné, região hiperendêmica para malária. Essa alteração na glicoforina C impossibilita a ligação com EBA140. A ausência de invasão por essa via pode ser interpretada como um mecanismo natural de proteção contra malária (239).

Anticorpos desenvolvidos por indivíduos voluntários de área não-endêmica para malária, após 3 sucessivas imunizações com uma formulação vacinal elaborada a partir da região F2 de EBA175, demonstraram-se eficazes em inibir o crescimento do parasita (240). Um estudo realizado com 206 crianças da Papua Nova Guiné identificou intenso

reconhecimento dos 3 antígenos associado a proteção contra episódios clínicos e alta parasitemia. As subclasses de IgG envolvidas na resposta foram predominantemente IgG1 e IgG3 com variações entre os antígenos, porém a presença de IgG3 foi mais associada com proteção (115).

Estudos realizados com EBA181 apontam que o receptor eritrocítico para essa proteína é resistente a tripsina e sensível a quimiotripsina. Tentativas de *knockout* do gene que codifica EBA181 não demonstraram prejuízo na capacidade invasiva dos parasitas mutantes (110). Embora tenha sido evidenciado que os polimorfismos encontrados nos domínios F1/F2 de EBA140 e EBA181 podem alterar a especificidade de ligação ao receptor eritrocítico, o mesmo não foi observado em estudo posterior (109, 241).

Embora a maior parte das amplificações das sequências dos 3 genes tenha sido obtida a partir de isolados de infecções sintomáticas, apenas um genótipo de cada um foi encontrado entre os gDNAs da amostra analisada. Não houve amplificação da sequência codificadora de EBA140 a partir do gDNA da cepa FCR3. Esses dados confirmam o intenso polimorfismo da região II como citado anteriormente e sugerem a possibilidade de genótipos diferentes circulantes com capacidades de virulência distintas, influenciando a expressão dos quadros clínicos.

O envolvimento da resposta contra essas proteínas em proteção é sugerida pela maior frequência de reconhecimento dos 3 peptídeos expressos por plasmas de indivíduos assintomáticos e pela maior intensidade de reconhecimento do antígeno EBA175. Porém, só houve significância estatística entre os grupos clínicos na intensidade de reconhecimento de EBA175. Esses dados apontam que os indivíduos assintomáticos acumularam anticorpos ao longo do período de exposição que reconhecem epítomos comuns dos variantes de cada antígeno. Outro dado que aponta o envolvimento desses antígenos em proteção é a perpetuação da resposta humoral, ao longo do tempo, na ausência da parasitemia.

A identificação das subclasses envolvidas na resposta anti-EBA175 corrobora os dados do estudo com crianças da Papua Nova Guiné (115) com predomínio das subclasses citofílicas IgG1 e IgG3 entre os assintomáticos e intensificação da frequência da subclasse IgG3 (efeito *boosting*) ao longo do tempo, na ausência da parasitemia. A análise por regressão logística da quantificação de risco ou proteção associado ao reconhecimento de EBA175 encontrou efeito protetor conferido pelos anticorpos contra esse antígeno no desenvolvimento do perfil assintomático. Os indivíduos que reconhecem mais intensamente esse antígeno possuem 5,7 vezes mais chances de desenvolver o perfil assintomático do que os indivíduos que não respondem ou respondem com menor intensidade.

5.7 Considerações finais

A realização desse trabalho, a fim de cumprir os objetivos propostos, exigiu um árduo esforço que começou nas etapas iniciais do trabalho de campo e estendeu-se por toda a bancada. Ao longo de 5 anos, além das técnicas aprendidas, um vasto conhecimento sobre o assunto estudado foi adquirido por mim, assim como o prazer pelo questionamento.

Todas as etapas apresentaram dificuldades que foram sendo superadas ao longo do tempo. A confecção de pares de oligonucleotídeos para regiões gênicas tão polimórficas, a extração e amplificação de gDNA escasso presente nas parasitemias assintomáticas, a expressão de 35 peptídeos recombinantes, as inúmeras reações de ELISA realizadas, as coletas cíclicas de RNA das culturas de 3D7, e finalmente, a aprendizagem de algumas ferramentas de análise estatística, essenciais para analisar todos os dados obtidos.

Além de gerar resultados extremamente importantes para a compreensão da resposta humoral desenvolvida por pacientes de uma área endêmica brasileira, vários antígenos expressos neste estudo nunca haviam sido expressos anteriormente, em sistema recombinante. Adicionalmente, a resposta humoral contra eles nunca havia sido testada a partir de plasmas humanos. Também, nunca havia sido testada a resposta humoral de pacientes de uma área endêmica brasileira, contra antígenos expressos pelos isolados de campo circulantes da mesma área.

O esforço agora será concentrado em disponibilizar todo esse conhecimento em publicações, que com certeza, contribuirão para um maior entendimento dos assuntos abordados, neste estudo. Porém, novas perguntas foram geradas, principalmente envolvendo os mecanismos reguladores da expressão de genes *surf*, que serão respondidas por futuros trabalhos do laboratório.

6 CONCLUSÕES

1. O desenvolvimento de um perfil assintomático estável, como tradução de imunidade protetora, aparentemente necessita de uma exposição longa ao parasita.
2. Antígenos SURFIN são fracamente imunogênicos e mais reconhecidos por indivíduos assintomáticos, possivelmente refletindo apenas um logo período de exposição ao parasita.
3. Genes *surf* parecem ser sujeitos a controle transcricional diferenciado, já que houve mudança significativa da expressão de ao menos um gene *surf*, ao longo de 40 reinvasões.
4. Antígenos de merozoíto, de um modo geral, são altamente imunogênicos e geram, preferencialmente, um padrão de resposta humoral Th1, com presença preponderante de anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3.
5. As respostas humorais contra os antígenos S 13.1, MSP9, MSP5 e EBA175 foram associadas com ausência de sintomas e desenvolvimento do perfil assintomático, sendo quantificadas as chances conferidas pelas respostas contra esses antígenos para esses defechos.
6. A aquisição de anticorpos citofílicos da subclasse IgG3 contra MSP1_b12_RO33, MSP1₁₉, MSP2, MSP3, MSP4 e EBA175 pode contribuir para o desenvolvimento do perfil assintomático.
7. A modulação da resposta humoral pró-inflamatória para um padrão antiinflamatório, traduzida pela presença das subclasses IgG2 e IgG4, na resposta contra MSP1_b12_RO33, MSP6, MSP7 e MSP10, pode contribuir para a atenuação dos sintomas clínicos de malária.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

1. Kakkilaya B. Malaria site: history of malaria. 2006. [Available from: <http://www.malariasite.com/malaria/History.htm>] [2011 Aug. 16].
2. Sallares R, Bouwman A, Anderung C. The spread of malaria to Southern Europe in antiquity: new approaches to old problems. *Med Hist.* 2004 Jul;48(3):311-28.
3. Shortt HE, Fairley NH, et al. The pre-erythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*; a preliminary note. *Br Med J.* 1949 Nov 5;2(4635):1006-8.
4. Garnham PC, Bray RS, Cooper W, Lainson R, Awad FI, Williamson J. Pre-erythrocytic Stages of Human Malaria: *Plasmodium Ovale*. *Br Med J.* 1954 Jan 30;1(4856):257.
5. Bray RS. Pre-erythrocytic stages of human malaria parasites: *Plasmodium malariae*. *Br Med J.* 1959 Oct 10;2(5153):679-80.
6. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 1976 Aug 20;193(4254):673-5.
7. Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature.* 2002 Oct 3;419(6906):520-6.
8. Courtin D, Oesterholt M, Huisman H, Kusi K, Milet J, Badaut C, et al. The quantity and quality of African children's IgG responses to merozoite surface antigens reflect protection against *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One.* 2009;4(10):e7590.
9. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature.* 2008 Oct 9;455(7214):757-63.
10. Pain A, Bohme U, Berry AE, Mungall K, Finn RD, Jackson AP, et al. The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature.* 2008 Oct 9;455(7214):799-803.
11. Sultan AA, Thathy V, Frevert U, Robson KJ, Crisanti A, Nussenzweig V, et al. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. *Cell.* 1997 Aug 8;90(3):511-22.
12. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. *J Clin Invest.* 2010 Dec 1;120(12):4168-78.
13. Wang R, Smith JD, Kappe SH. Advances and challenges in malaria vaccine development. *Expert Rev Mol Med.* 2009;11:e39.
14. Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Oct;15(4):564-94.
15. Holmes EC. Malaria: The gorilla connection. *Nature.* 2010 Sep 23;467(7314):404-5.

*De acordo com:

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

16. Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, et al. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*. 2010 Sep 23;467(7314):420-5.
17. Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, et al. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis*. 2010 Aug 15;202(4):638-47.
18. Franklin BS, Vitorino BL, Coelho HC, Menezes-Neto A, Santos ML, Campos FM, et al. Plasma circulating nucleic acids levels increase according to the morbidity of *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS One*. 2011;6(5):e19842.
19. Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhaes BL, Mourao MP, Lacerda MV, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 2010 Oct;16(10):1611-4.
20. Siqueira AM, Alexandre MA, Mourao MP, Santos VS, Nagahashi-Marie SK, Alecrim MG, et al. Severe rhabdomyolysis caused by *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Aug;83(2):271-3.
21. Vinetz JM, Li J, McCutchan TF, Kaslow DC. *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. *N Engl J Med*. 1998 Feb 5;338(6):367-71.
22. Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PC, et al. Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. *Clin Infect Dis*. 2009 Sep 15;49(6):852-60.
23. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU, Kho WG, Kaneko A, et al. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99(25):16348-53.
24. Lee KS, Divis PC, Zakaria SK, Matusop A, Julin RA, Conway DJ, et al. *Plasmodium knowlesi*: reservoir hosts and tracking the emergence in humans and macaques. *PLoS Pathog*. 2011 Apr;7(4):e1002015.
25. Marchand RP, Culleton R, Maeno Y, Quang NT, Nakazawa S. Co-infections of *Plasmodium knowlesi*, *P. falciparum*, and *P. vivax* among Humans and *Anopheles dirus* Mosquitoes, Southern Vietnam. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jul;17(7):1232-9.
26. Portes Mda G, Rossi JC, Nascimento JC, Zeccer S, Silva LA. [Anophelines of Santa Catarina (Diptera: culicidae), Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Mar-Apr;43(2):156-60.
27. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010;9:115.
28. Moutinho PR, Gil LH, Cruz RB, Ribolla PE. Population dynamics, structure and behaviour of *Anopheles darlingi* in a rural settlement in the Amazon rainforest of Acre, Brazil. *Malar J*. 2011 Jun 24;10(1):174.

29. Galardo AK, Zimmerman RH, Lounibos LP, Young LJ, Galardo CD, Arruda M, et al. Seasonal abundance of anopheline mosquitoes and their association with rainfall and malaria along the Matapi River, Amapa, [corrected] Brazil. *Med Vet Entomol*. 2009 Dec;23(4):335-49.
30. Barros FS, Arruda ME, Gurgel HC, Honorio NA. Spatial clustering and longitudinal variation of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larvae in a river of the Amazon: the importance of the forest fringe and of obstructions to flow in frontier malaria. *Bull Entomol Res*. 2011 Jul 1:1-16.
31. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasit Vectors*. 2010;3:117.
32. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006 Sep 1;313(5791):1287-90.
33. Portugal S, Carret C, Recker M, Armitage AE, Goncalves LA, Epiphanyo S, et al. Host-mediated regulation of superinfection in malaria. *Nat Med*. 2011 Jun;17(6):732-7.
34. Leiriao P, Albuquerque SS, Corso S, van Gemert GJ, Sauerwein RW, Rodriguez A, et al. HGF/MET signalling protects *Plasmodium*-infected host cells from apoptosis. *Cell Microbiol*. 2005 Apr;7(4):603-9.
35. Cerami C, Frevert U, Sinnis P, Takacs B, Clavijo P, Santos MJ, et al. The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Cell*. 1992 Sep 18;70(6):1021-33.
36. Coppi A, Natarajan R, Pradel G, Bennett BL, James ER, Roggero MA, et al. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J Exp Med*. 2011 Feb 14;208(2):341-56.
37. Sedegah M, Kim Y, Peters B, McGrath S, Ganeshan H, Lejano J, et al. Identification and localization of minimal MHC-restricted CD8+ T cell epitopes within the *Plasmodium falciparum* AMA1 protein. *Malar J*. 2010;9:241.
38. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 26;107(43):18640-5.
39. Riglar DT, Richard D, Wilson DW, Boyle MJ, Dekiwadia C, Turnbull L, et al. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe*. 2011 Jan 20;9(1):9-20.
40. Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):381-92.

41. Gravenor MB, Kwiatkowski D. An analysis of the temperature effects of fever on the intra-host population dynamics of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*. 1998 Aug;117 (Pt 2):97-105.
42. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Apr;24(2):377-410.
43. Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, et al. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):289-92.
44. Schlagenhauf P. Malaria: from prehistory to present. *Infect Dis Clin North Am*. 2004 Jun;18(2):189-205.
45. Ridley RG. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):686-93.
46. Trape JF, Pison G, Spiegel A, Enel C, Rogier C. Combating malaria in Africa. *Trends Parasitol*. 2002 May;18(5):224-30.
47. Chandre F, Darriet F, Manguin S, Brengues C, Carnevale P, Guillet P. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Cote d'Ivoire. *J Am Mosq Control Assoc*. 1999 Mar;15(1):53-9.
48. Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, et al. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato*. *Bull World Health Organ*. 1999;77(3):230-4.
49. Singer BH, de Castro MC. Agricultural colonization and malaria on the Amazon frontier. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Dec;954:184-222.
50. Muentener P, Schlagenhauf P, Steffen R. Imported malaria (1985-95): trends and perspectives. *Bull World Health Organ*. 1999;77(7):560-6.
51. Greenwood B, Mutabingwa T. Malaria in 2002. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):670-2.
52. Global malaria control strategy. *Bull Pan Am Health Organ*. 1993;27(3):280-3.
53. Feachem RG, Phillips AA, Hwang J, Cotter C, Wielgosz B, Greenwood BM, et al. Shrinking the malaria map: progress and prospects. *Lancet*. 2010 Nov 6;376(9752):1566-78.
54. Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8):e774.
55. Guerra CA, Gikandi PW, Tatem AJ, Noor AM, Smith DL, Hay SI, et al. The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS Med*. 2008 Feb;5(2):e38.
56. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):455-67.

57. Greenwood BM, Targett GA. Malaria vaccines and the new malaria agenda. *Clin Microbiol Infect*. 2011. In press.
58. Camargo EP. Malária, Maleita, Paludismo. *Ciência e Cultura*. 2003;55(1):26-9.
59. Katsuragawa TH GL, Tada MS, da Silva LHP. Endemias e Epidemias na Amazônia. Malária e doenças emergentes em áreas ribeirinhas do Rio Madeira. Um caso de escola. *Estudos Avançados*. 2008;22(64):111-41.
60. Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol*. 2006 Jan-Feb;28(1-2):35-49.
61. Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, et al. Malaria and the red cell. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002:35-57.
62. Mackinnon MJ, Read AF. Virulence in malaria: an evolutionary viewpoint. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004 Jun 29;359(1446):965-86.
63. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 2004 Mar;4(3):169-80.
64. Dodoo D, Hollingdale MR, Anum D, Koram KA, Gyan B, Akanmori BD, et al. Measuring naturally acquired immune responses to candidate malaria vaccine antigens in Ghanaian adults. *Malar J*. 2011;10:168.
65. Reece WH, Pinder M, Gothard PK, Milligan P, Bojang K, Doherty T, et al. A CD4(+) T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural *Plasmodium falciparum* infection and disease. *Nat Med*. 2004 Apr;10(4):406-10.
66. Lumsden JM, Schwenk RJ, Rein LE, Moris P, Janssens M, Ofori-Anyinam O, et al. Protective Immunity Induced with the RTS,S/AS Vaccine Is Associated with IL-2 and TNF-alpha Producing Effector and Central Memory CD4 T Cells. *PLoS One*. 2011;6(7):e20775.
67. Kester KE, Cummings JF, Ofori-Anyinam O, Ockenhouse CF, Krzych U, Moris P, et al. Randomized, double-blind, phase 2a trial of falciparum malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naive adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *J Infect Dis*. 2009 Aug 1;200(3):337-46.
68. Shiratsuchi T, Rai U, Krause A, Worgall S, Tsuji M. Replacing adenoviral vector HVR1 with a malaria B cell epitope improves immunogenicity and circumvents preexisting immunity to adenovirus in mice. *J Clin Invest*. 2010 Oct 1;120(10):3688-701.
69. Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med*. 1990 Dec 1;172(6):1633-41.
70. Stanistic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun*. 2009 Mar;77(3):1165-74.

71. Lazarou M, Patino JA, Jennings RM, McIntosh RS, Shi J, Howell S, et al. Inhibition of erythrocyte invasion and *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 processing by human immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies. *Infect Immun*. 2009 Dec;77(12):5659-67.
72. Hadley TJ, Leech JH, Green TJ, Daniel WA, Wahlgren M, Miller LH, et al. A comparison of knobby (K+) and knobless (K-) parasites from two strains of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1983 Nov;9(3):271-8.
73. Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med*. 1998 Mar;4(3):358-60.
74. Barry AE, Trieu A, Fowkes FJ, Pablo J, Kalantari-Dehaghi M, Jasinskas A, et al. The stability and complexity of antibody responses to the major surface antigen of *Plasmodium falciparum* are associated with age in a malaria endemic area. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Aug 8.
75. Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, et al. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*. 1995 Jul 14;82(1):77-87.
76. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell*. 1995 Jul 14;82(1):89-100.
77. Pasternak ND, Dzikowski R. PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Jul;41(7):1463-6.
78. Scherf A, Hernandez-Rivas R, Buffet P, Bottius E, Benatar C, Pouvelle B, 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*. 1998 Sep 15;17(18):5418-26.
79. Lopez-Rubio JJ, Mancio-Silva L, Scherf A. Genome-wide analysis of heterochromatin associates clonally variant gene regulation with perinuclear repressive centers in malaria parasites. *Cell Host Microbe*. 2009 Feb 19;5(2):179-90.
80. Freitas-Junior LH, Hernandez-Rivas R, Ralph SA, Montiel-Condado D, Ruvalcaba-Salazar OK, Rojas-Meza AP, et al. Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell*. 2005 Apr 8;121(1):25-36.
81. Chookajorn T, Dzikowski R, Frank M, Li F, Jiwani AZ, Hartl DL, et al. Epigenetic memory at malaria virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 16;104(3):899-902.
82. Newbold CI, Pinches R, Roberts DJ, Marsh K. *Plasmodium falciparum*: the human agglutinating antibody response to the infected red cell surface is predominantly variant specific. *Exp Parasitol*. 1992 Nov;75(3):281-92.

83. Woehlbier U, Epp C, Hackett F, Blackman MJ, Bujard H. Antibodies against multiple merozoite surface antigens of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* inhibit parasite maturation and red blood cell invasion. *Malar J.* 2010;9:77.
84. Doodoo D, Atuguba F, Bosomprah S, Ansah NA, Ansah P, Lamptey H, et al. Antibody levels to multiple malaria vaccine candidate antigens in relation to clinical malaria episodes in children in the Kasena-Nankana district of Northern Ghana. *Malar J.* 2011;10:108.
85. Gray JC, Corran PH, Mangia E, Gaunt MW, Li Q, Tetteh KK, et al. Profiling the antibody immune response against blood stage malaria vaccine candidates. *Clin Chem.* 2007 Jul;53(7):1244-53.
86. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):755-66.
87. Persson KE. Erythrocyte invasion and functionally inhibitory antibodies in *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Trop.* 2010 Jun;114(3):138-43.
88. Joos C, Marrama L, Polson HE, Corre S, Diatta AM, Diouf B, et al. Clinical protection from falciparum malaria correlates with neutrophil respiratory bursts induced by merozoites opsonized with human serum antibodies. *PLoS One.* 2010;5(3):e9871.
89. Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med.* 1999 Mar;5(3):340-3.
90. Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, Da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol.* 2005 Sep;42(5):777-9.
91. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jun;66(6):641-8.
92. Doolan DL, Dobano C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):13-36.
93. Wambua S, Mwangi TW, Kortok M, Uyoga SM, Macharia AW, Mwacharo JK, et al. The effect of alpha+-thalassaemia on the incidence of malaria and other diseases in children living on the coast of Kenya. *PLoS Med.* 2006 May;3(5):e158.
94. Seixas E, Gozzelino R, Chora A, Ferreira A, Silva G, Larsen R, et al. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 15;106(37):15837-42.
95. Ferreira A, Marguti I, Bechmann I, Jeney V, Chora A, Palha NR, et al. Sick cell hemoglobin confers tolerance to *Plasmodium* infection. *Cell.* 2011 Apr 29;145(3):398-409.
96. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jul;8(7):523-32.

97. Omer FM, de Souza JB, Riley EM. Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *J Immunol*. 2003 Nov 15;171(10):5430-6.
98. Omer FM, de Souza JB, Corran PH, Sultan AA, Riley EM. Activation of transforming growth factor beta by malaria parasite-derived metalloproteinases and a thrombospondin-like molecule. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1817-27.
99. Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, et al. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog*. 2009 Apr;5(4):e1000364.
100. Su Z, Segura M, Stevenson MM. Reduced protective efficacy of a blood-stage malaria vaccine by concurrent nematode infection. *Infect Immun*. 2006 Apr;74(4):2138-44.
101. Helmbj H. Helminths and our immune system: friend or foe? *Parasitol Int*. 2009 Jun;58(2):121-7.
102. Troye-Blomberg M, Berzins K. Immune interactions in malaria co-infections with other endemic infectious diseases: implications for the development of improved disease interventions. *Microbes Infect*. 2008 Jul;10(9):948-52.
103. Nacher M. Malaria vaccine trials in a wormy world. *Trends Parasitol*. 2001 Dec;17(12):563-5.
104. van der Giessen M, Rossouw E, van Veen TA, van Loghem E, Zegers BJ, Sander PC. Quantification of IgG subclasses in sera of normal adults and healthy children between 4 and 12 years of age. *Clin Exp Immunol*. 1975 Sep;21(3):501-9.
105. Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway's Immunobiology*. New York: Garland Science; 2008.
106. Koussis K, Withers-Martinez C, Yeoh S, Child M, Hackett F, Knuepfer E, et al. A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. *Embo J*. 2009 Mar 18;28(6):725-35.
107. Kariuki MM, Li X, Yamodo I, Chishti AH, Oh SS. Two *Plasmodium falciparum* merozoite proteins binding to erythrocyte band 3 form a direct complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 30;338(4):1690-5.
108. Singh S, Alam MM, Pal-Bhowmick I, Brzostowski JA, Chitnis CE. Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. *PLoS Pathog*. 2010 Feb;6(2):e1000746.
109. Maier AG, Baum J, Smith B, Conway DJ, Cowman AF. Polymorphisms in erythrocyte binding antigens 140 and 181 affect function and binding but not receptor specificity in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 2009 Apr;77(4):1689-99.
110. Leykauf K, Treeck M, Gilson PR, Nebl T, Braulke T, Cowman AF, et al. Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite. *PLoS Pathog*. 2010 Jun;6(6):e1000941.

111. Richard D, MacRaild CA, Riglar DT, Chan JA, Foley M, Baum J, et al. Interaction between *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. *J Biol Chem*. 2010 May 7;285(19):14815-22.
112. Blair PL, Kappe SH, Maciel JE, Balu B, Adams JH. *Plasmodium falciparum* MAEBL is a unique member of the ebl family. *Mol Biochem Parasitol*. 2002 Jun;122(1):35-44.
113. Kariu T, Yuda M, Yano K, Chinzei Y. MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *J Exp Med*. 2002 May 20;195(10):1317-23.
114. Baum J, Chen L, Healer J, Lopaticki S, Boyle M, Triglia T, et al. Reticulocyte-binding protein homologue 5 - an essential adhesin involved in invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*. 2009 Feb;39(3):371-80.
115. Richards JS, Stanisic DI, Fowkes FJ, Tavul L, Dabod E, Thompson JK, et al. Association between naturally acquired antibodies to erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and protection from malaria and high-density parasitemia. *Clin Infect Dis*. 2010 Oct 15;51(8):e50-60.
116. Galamo CD, Jafarshad A, Blanc C, Druilhe P. Anti-MSP1 block 2 antibodies are effective at parasite killing in an allele-specific manner by monocyte-mediated antibody-dependent cellular inhibition. *J Infect Dis*. 2009 Apr 15;199(8):1151-4.
117. Roussilhon C, Oeuvray C, Muller-Graf C, Tall A, Rogier C, Trape JF, et al. Long-term clinical protection from falciparum malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3. *PLoS Med*. 2007 Nov 13;4(11):e320.
118. Polley SD, Tetteh KK, Lloyd JM, Akpogheneta OJ, Greenwood BM, Bojang KA, et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 is a target of allele-specific immunity and alleles are maintained by natural selection. *J Infect Dis*. 2007 Jan 15;195(2):279-87.
119. Winter G, Kawai S, Haeggstrom M, Kaneko O, von Euler A, Kawazu S, et al. SURFIN is a polymorphic antigen expressed on *Plasmodium falciparum* merozoites and infected erythrocytes. *J Exp Med*. 2005 Jun 6;201(11):1853-63.
120. Marti M, Good RT, Rug M, Knuepfer E, Cowman AF. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science*. 2004 Dec 10;306(5703):1930-3.
121. Mphande FA, Ribacke U, Kaneko O, Kironde F, Winter G, Wahlgren M. SURFIN4.1, a schizont-merozoite associated protein in the SURFIN family of *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. 2008;7:116.
122. Salcedo-Amaya AM, van Driel MA, Alako BT, Trelle MB, van den Elzen AM, Cohen AM, et al. Dynamic histone H3 epigenome marking during the intraerythrocytic cycle of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 16;106(24):9655-60.
123. Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol*. 2003 Oct;1(1):E5.

124. Albrecht L, Castineiras C, Carvalho BO, Ladeia-Andrade S, Santos da Silva N, Hoffmann EH, et al. The South American *Plasmodium falciparum* var gene repertoire is limited, highly shared and possibly lacks several antigenic types. *Gene*. 2010 Mar 15;453(1-2):37-44.
125. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Apr;58(2):283-92.
126. Ferreira MU, Liu Q, Kaneko O, Kimura M, Tanabe K, Kimura EA, et al. Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the southwestern Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Sep;59(3):474-80.
127. Tonhosolo R, Wunderlich G, Ferreira MU. Differential antibody recognition of four allelic variants of the merozoite surface protein-2 (MSP-2) of *Plasmodium falciparum*. *J Eukaryot Microbiol*. 2001 Sep-Oct;48(5):556-64.
128. Puentes A, Garcia J, Ocampo M, Rodriguez L, Vera R, Curtidor H, et al. *P. falciparum*: merozoite surface protein-8 peptides bind specifically to human erythrocytes. *Peptides*. 2003 Jul;24(7):1015-23.
129. Ghai M, Dutta S, Hall T, Freilich D, Ockenhouse CF. Identification, expression, and functional characterization of MAEBL, a sporozoite and asexual blood stage chimeric erythrocyte-binding protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002 Aug 7;123(1):35-45.
130. Rathod PK, Ganesan K, Hayward RE, Bozdech Z, DeRisi JL. DNA microarrays for malaria. *Trends Parasitol*. 2002 Jan;18(1):39-45.
131. Salanti A, Staalsoe T, Lavstsen T, Jensen AT, Sowa MP, Arnot DE, et al. Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria. *Mol Microbiol*. 2003 Jul;49(1):179-91.
132. Boyle JS, Lew AM. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet*. 1995 Jan;11(1):8.
133. Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York. CSHL Press; 1991.
134. Noranate N, Prugnolle F, Jouin H, Tall A, Marrama L, Sokhna C, et al. Population diversity and antibody selective pressure to *Plasmodium falciparum* MSP1 block2 locus in an African malaria-endemic setting. *BMC Microbiol*. 2009;9:219.
135. Hoffmann EH, da Silveira LA, Tonhosolo R, Pereira FJ, Ribeiro WL, Tonon AP, et al. Geographical patterns of allelic diversity in the *Plasmodium falciparum* malaria-vaccine candidate, merozoite surface protein-2. *Ann Trop Med Parasitol*. 2001 Mar;95(2):117-32.
136. Laemmli UK, Paulson JR, Hitchins V. Maturation of the head of bacteriophage T4. V. A possible DNA packaging mechanism: in vitro cleavage of the head proteins and the structure of the core of the polyhead. *J Supramol Struct*. 1974;2(2-4):276-301.

137. Laemmli UK, Quittner SF. Maturation of the head of bacteriophage T4. IV. The proteins of the core of the tubular polyheads and in vitro cleavage of the head proteins. *Virology*. 1974 Dec;62(2):483-99.
138. Laemmli UK, Teaff N, D'Ambrosia J. Maturation of the head of bacteriophage T4. III. DNA packaging into preformed heads. *J Mol Biol*. 1974 Oct 5;88(4):749-65.
139. Kirsten Moll IL, Hedvig Perlmann, Artur Scherf MW. *Methods in Malaria Research*. Manassas. MR4/ATCC; 2008.
140. Albrecht L, Merino EF, Hoffmann EH, Ferreira MU, de Mattos Ferreira RG, Osakabe AL, et al. Extense variant gene family repertoire overlap in Western Amazon *Plasmodium falciparum* isolates. *Mol Biochem Parasitol*. 2006 Dec;150(2):157-65.
141. Cabral FJ, Wunderlich G. Transcriptional memory and switching in the *Plasmodium falciparum* rif gene family. *Mol Biochem Parasitol*. 2009 Dec;168(2):186-90.
142. Golnitz U, Albrecht L, Wunderlich G. Var transcription profiling of *Plasmodium falciparum* 3D7: assignment of cytoadherent phenotypes to dominant transcripts. *Malar J*. 2008;7:14.
143. Freitas-Junior LH, Bottius E, Pirrit LA, Deitsch KW, Scheidig C, Guinet F, et al. Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature*. 2000 Oct 26;407(6807):1018-22.
144. Dzikowski R, Li F, Amulic B, Eisberg A, Frank M, Patel S, et al. Mechanisms underlying mutually exclusive expression of virulence genes by malaria parasites. *EMBO Rep*. 2007 Oct;8(10):959-65.
145. Cavanagh DR, Dodoo D, Hviid L, Kurtzhals JA, Theander TG, Akanmori BD, et al. Antibodies to the N-terminal block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are associated with protection against clinical malaria. *Infect Immun*. 2004 Nov;72(11):6492-502.
146. Taylor RR, Allen SJ, Greenwood BM, Riley EM. IgG3 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Apr;58(4):406-13.
147. Woehlbier U, Epp C, Hackett F, Blackman MJ, Bujard H. Antibodies against multiple merozoite surface antigens of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* inhibit parasite maturation and red blood cell invasion. *Malar J*. 2010 Mar; 18;9:77.
148. Scopel KK, Fontes CJ, Ferreira MU, Braga EM. *Plasmodium falciparum*: IgG subclass antibody response to merozoite surface protein-1 among Amazonian gold miners, in relation to infection status and disease expression. *Exp Parasitol*. 2005 Feb;109(2):124-34.
149. Wang L, Crouch L, Richie TL, Nhan DH, Coppel RL. Naturally acquired antibody responses to the components of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 complex. *Parasite Immunol*. 2003 Aug-Sep;25(8-9):403-12.

150. Singh S, Soe S, Roussilhon C, Corradin G, Druilhe P. Plasmodium falciparum merozoite surface protein 6 displays multiple targets for naturally occurring antibodies that mediate monocyte-dependent parasite killing. *Infect Immun.* 2005 Feb;73(2):1235-8.
151. Pearce JA, Triglia T, Hodder AN, Jackson DC, Cowman AF, Anders RF. Plasmodium falciparum merozoite surface protein 6 is a dimorphic antigen. *Infect Immun.* 2004 Apr;72(4):2321-8.
152. Benet A, Tavul L, Reeder JC, Cortes A. Diversity of Plasmodium falciparum vaccine candidate merozoite surface protein 4 (MSP4) in a natural population. *Mol Biochem Parasitol.* 2004 Apr;134(2):275-80.
153. Wang L, Marshall VM, Coppel RL. Limited polymorphism of the vaccine candidate merozoite surface protein 4 of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol.* 2002 Apr 9;120(2):301-3.
154. Bracho G, Zayas C, Wang L, Coppel R, Perez O, Petrovsky N. AFCo1, a meningococcal B-derived cochleate adjuvant, strongly enhances antibody and T-cell immunity against Plasmodium falciparum merozoite surface protein 4 and 5. *Malar J.* 2009;8:35.
155. Kedzierski L, Black CG, Goschnick MW, Stowers AW, Coppel RL. Immunization with a combination of merozoite surface proteins 4/5 and 1 enhances protection against lethal challenge with Plasmodium yoelii. *Infect Immun.* 2002 Dec;70(12):6606-13.
156. Kedzierski L, Black CG, Coppel RL. Immunization with recombinant Plasmodium yoelii merozoite surface protein 4/5 protects mice against lethal challenge. *Infect Immun.* 2000 Oct;68(10):6034-7.
157. Wu T, Black CG, Wang L, Hibbs AR, Coppel RL. Lack of sequence diversity in the gene encoding merozoite surface protein 5 of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 Oct 15;103(2):243-50.
158. Demanga CG, Daher LJ, Prieur E, Blanc C, Perignon JL, Bouharoun-Tayoun H, et al. Toward the rational design of a malaria vaccine construct using the MSP3 family as an example: contribution of antigenicity studies in humans. *Infect Immun.* 2010 Jan;78(1):486-94.
159. Lusingu JP, Gesase S, Msham S, Francis F, Lemnge M, Seth M, et al. Satisfactory safety and immunogenicity of MSP3 malaria vaccine candidate in Tanzanian children aged 12-24 months. *Malar J.* 2009;8:163.
160. Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Soulama I, Bougouma EC, Tiono AB, et al. Humoral responses to Plasmodium falciparum blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa. *Infect Immun.* 2008 Feb;76(2):759-66.
161. Polley SD, Tetteh KK, Cavanagh DR, Pearce RJ, Lloyd JM, Bojang KA, et al. Repeat sequences in block 2 of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 are targets of antibodies associated with protection from malaria. *Infect Immun.* 2003 Apr;71(4):1833-42.

162. Polley SD, Conway DJ, Cavanagh DR, McBride JS, Lowe BS, Williams TN, et al. High levels of serum antibodies to merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced risk of clinical malaria in coastal Kenya. *Vaccine*. 2006 May 8;24(19):4233-46.
163. Hodder AN, Crewther PE, Matthew ML, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, et al. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem*. 1996 Nov 15;271(46):29446-52.
164. Borrmann S, Matuschewski K. Protective immunity against malaria by 'natural immunization': a question of dose, parasite diversity, or both? *Curr Opin Immunol*. 2011 Aug;23(4):500-8.
165. Afonso Nogueira P, Wunderlich G, Shugiro Tada M, d'Arc Neves Costa J, Jose Menezes M, Scherf A, et al. *Plasmodium falciparum*: analysis of transcribed var gene sequences in natural isolates from the Brazilian Amazon region. *Exp Parasitol*. 2002 Jun-Jul;101(2-3):111-20.
166. Crompton PD, Kayala MA, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Weiss GE, et al. A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 13;107(15):6958-63.
167. Crompton PD, Miura K, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Weiss G, et al. In vitro growth-inhibitory activity and malaria risk in a cohort study in mali. *Infect Immun*. 2010 Feb;78(2):737-45.
168. Katsuragawa TH, Gil LH, Tada MS, de Almeida e Silva A, Costa JD, Araujo Mda S, et al. The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondonia, in the Amazon region of Brazil. *PLoS One*. 2010;5(2):e9245.
169. Jeffery GM. Epidemiological significance of repeated infections with homologous and heterologous strains and species of *Plasmodium*. *Bull World Health Organ*. 1966;35(6):873-82.
170. Wipasa J, Suphavitai C, Okell LC, Cook J, Corran PH, Thaikla K, et al. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathog*. 2010 Feb;6(2):e1000770.
171. Baird JK. Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1998 Jun;92(4):367-90.
172. Weiss GE, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo S, Doumtable D, et al. The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS Pathog*. 2010 May;6(5):e1000912.
173. Maier AG, Cooke BM, Cowman AF, Tilley L. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol*. 2009 May;7(5):341-54.
174. Daily JP, Scanfeld D, Pochet N, Le Roch K, Plouffe D, Kamal M, et al. Distinct physiological states of *Plasmodium falciparum* in malaria-infected patients. *Nature*. 2007 Dec 13;450(7172):1091-5.

175. Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol.* 1987 May 20;195(2):273-87.
176. Gerloff DL, Creasey A, Maslau S, Carter R. Structural models for the protein family characterized by gamete surface protein Pfs230 of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 20;102(38):13598-603.
177. Sanders PR, Gilson PR, Cantin GT, Greenbaum DC, Nebl T, Carucci DJ, et al. Distinct protein classes including novel merozoite surface antigens in Raft-like membranes of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 2005 Dec 2;280(48):40169-76.
178. Roy SW, Weedall GD, da Silva RL, Polley SD, Ferreira MU. Sequence diversity and evolutionary dynamics of the dimorphic antigen merozoite surface protein-6 and other Msp genes of *Plasmodium falciparum*. *Gene.* 2009 Aug 15;443(1-2):12-21.
179. de Koning-Ward TF, Gilson PR, Boddey JA, Rug M, Smith BJ, Papenfuss AT, et al. A newly discovered protein export machine in malaria parasites. *Nature.* 2009 Jun 18;459(7249):945-9.
180. O'Donnell RA, de Koning-Ward TF, Burt RA, Bockarie M, Reeder JC, Cowman AF, 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.* 2001 Jun 18;193(12):1403-12.
181. Siddiqui WA, Tam LQ, Kramer KJ, Hui GS, Case SE, Yamaga KM, et al. Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 May;84(9):3014-8.
182. Etlinger HM, Caspers P, Matile H, Schoenfeld HJ, Stueber D, Takacs B. Ability of recombinant or native proteins to protect monkeys against heterologous challenge with *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 1991 Oct;59(10):3498-503.
183. Cavanagh DR, Elhassan IM, Roper C, Robinson VJ, Giha H, Holder AA, et al. A longitudinal study of type-specific antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan. *J Immunol.* 1998 Jul 1;161(1):347-59.
184. Osier FH, Fegan G, Polley SD, Murungi L, Verra F, Tetteh KK, et al. Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun.* 2008 May;76(5):2240-8.
185. Daubenberger CA, Nickel B, Ciatto C, Grutter MG, Poltl-Frank F, Rossi L, et al. Amino acid dimorphism and parasite immune evasion: cellular immune responses to a promiscuous epitope of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 displaying dimorphic amino acid polymorphism are highly constrained. *Eur J Immunol.* 2002 Dec;32(12):3667-77.
186. Cardoso MA, Ferreira MU, Camargo LM, Szarfarc SC. [Anemia in a population from an endemic area of malaria, Rondonia (Brazil)]. *Rev Saude Publica.* 1992 Jun;26(3):161-6.

187. John CC, O'Donnell RA, Sumba PO, Moormann AM, de Koning-Ward TF, King CL, et al. Evidence that invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of merozoite surface protein-1 (MSP-1 19) can play a protective role against blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in individuals in a malaria endemic area of Africa. *J Immunol.* 2004 Jul 1;173(1):666-72.
188. de Koning-Ward TF, O'Donnell RA, Drew DR, Thomson R, Speed TP, Crabb BS. A new rodent model to assess blood stage immunity to the *Plasmodium falciparum* antigen merozoite surface protein 119 reveals a protective role for invasion inhibitory antibodies. *J Exp Med.* 2003 Sep 15;198(6):869-75.
189. Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N, et al. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med.* 2000 Jun;6(6):689-92.
190. Egan AF, Morris J, Barnish G, Allen S, Greenwood BM, Kaslow DC, et al. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J Infect Dis.* 1996 Mar;173(3):765-9.
191. Perraut R, Marrama L, Diouf B, Sokhna C, Tall A, Nabeth P, et al. Antibodies to the conserved C-terminal domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and to the merozoite extract and their relationship with in vitro inhibitory antibodies and protection against clinical malaria in a Senegalese village. *J Infect Dis.* 2005 Jan 15;191(2):264-71.
192. Fowkes FJ, Richards JS, Simpson JA, Beeson JG. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 7(1):e1000218.
193. Weiss GE, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo S, Doumtable D, et al. The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS Pathog.* May;6(5):e1000912.
194. Kadekoppala M, Ogun SA, Howell S, Gunaratne RS, Holder AA. Systematic genetic analysis of the *Plasmodium falciparum* MSP7-like family reveals differences in protein expression, location, and importance in asexual growth of the blood-stage parasite. *Eukaryot Cell.* Jul;9(7):1064-74.
195. Pachebat JA, Kadekoppala M, Grainger M, Dluzewski AR, Gunaratne RS, Scott-Finnigan TJ, et al. Extensive proteolytic processing of the malaria parasite merozoite surface protein 7 during biosynthesis and parasite release from erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol.* 2007 Jan;151(1):59-69.
196. Silmon de Monerri NC, Flynn HR, Campos MG, Hackett F, Koussis K, Withers-Martinez C, et al. Global identification of multiple substrates for *Plasmodium falciparum* SUB1, an essential malarial processing protease. *Infect Immun.* 2011 Mar;79(3):1086-97.
197. Kadekoppala M, O'Donnell RA, Grainger M, Crabb BS, Holder AA. Deletion of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 7 gene impairs parasite invasion of erythrocytes. *Eukaryot Cell.* 2008 Dec;7(12):2123-32.

198. Singh S, Soe S, Weisman S, Barnwell JW, Perignon JL, Druilhe P. A conserved multi-gene family induces cross-reactive antibodies effective in defense against *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*. 2009;4(4):e5410.
199. Roussillon C, Brasseur P, Agnamey P, Perignon JL, Druilhe P. Understanding human-*Plasmodium falciparum* immune interactions uncovers the immunological role of worms. *PLoS One*. 2010;5(2):e9309.
200. Stahl HD, Bianco AE, Crewther PE, Burkot T, Coppel RL, Brown GV, et al. An asparagine-rich protein from blood stages of *Plasmodium falciparum* shares determinants with sporozoites. *Nucleic Acids Res*. 1986 Apr 11;14(7):3089-102.
201. Goel VK, Li X, Chen H, Liu SC, Chishti AH, Oh SS. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 29;100(9):5164-9.
202. Nwagwu M, Haynes JD, Orlandi PA, Chulay JD. *Plasmodium falciparum*: chymotryptic-like proteolysis associated with a 101-kDa acidic-basic repeat antigen. *Exp Parasitol*. 1992 Dec;75(4):399-414.
203. Roggwiler E, Betoulle ME, Blisnick T, Braun Breton C. A role for erythrocyte band 3 degradation by the parasite gp76 serine protease in the formation of the parasitophorous vacuole during invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996 Nov 12;82(1):13-24.
204. Sharma P, Kumar A, Singh B, Bharadwaj A, Sailaja VN, Adak T, et al. Characterization of protective epitopes in a highly conserved *Plasmodium falciparum* antigenic protein containing repeats of acidic and basic residues. *Infect Immun*. 1998 Jun;66(6):2895-904.
205. Metzger WG, Okenu DM, Cavanagh DR, Robinson JV, Bojang KA, Weiss HA, et al. Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasite Immunol*. 2003 Jun;25(6):307-12.
206. Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck HP, Snounou G, et al. *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. *Malar J*. 2011;10:79.
207. Scopel KK, da Silva-Nunes M, Malafronte RS, Braga EM, Ferreira MU. Variant-specific antibodies to merozoite surface protein 2 and clinical expression of *Plasmodium falciparum* malaria in rural Amazonians. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Jun;76(6):1084-91.
208. Osier FH, Murungi LM, Fegan G, Tuju J, Tetteh KK, Bull PC, et al. Allele-specific antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-2 and protection against clinical malaria. *Parasite Immunol*. 2010 Mar;32(3):193-201.
209. Marshall VM, Tieqiao W, Coppel RL. Close linkage of three merozoite surface protein genes on chromosome 2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Jul 1;94(1):13-25.

210. Wang L, Richie TL, Stowers A, Nhan DH, Coppel RL. Naturally acquired antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 4 in a population living in an area of endemicity in Vietnam. *Infect Immun*. 2001 Jul;69(7):4390-7.
211. Sanders PR, Kats LM, Drew DR, O'Donnell RA, O'Neill M, Maier AG, et al. A set of glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane proteins of *Plasmodium falciparum* is refractory to genetic deletion. *Infect Immun*. 2006 Jul;74(7):4330-8.
212. Woodberry T, Minigo G, Piera KA, Hanley JC, de Silva HD, Salwati E, et al. Antibodies to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 5 in Indonesia: species-specific and cross-reactive responses. *J Infect Dis*. 2008 Jul 1;198(1):134-42.
213. Burgess BR, Schuck P, Garboczi DN. Dissection of merozoite surface protein 3, a representative of a family of *Plasmodium falciparum* surface proteins, reveals an oligomeric and highly elongated molecule. *J Biol Chem*. 2005 Nov 4;280(44):37236-45.
214. Mills KE, Pearce JA, Crabb BS, Cowman AF. Truncation of merozoite surface protein 3 disrupts its trafficking and that of acidic-basic repeat protein to the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Microbiol*. 2002 Mar;43(6):1401-11.
215. Soulama I, Bigoga JD, Ndiaye M, Bougouma EC, Quagraine J, Casimiro PN, et al. Genetic diversity of polymorphic vaccine candidate antigens (apical membrane antigen-1, merozoite surface protein-3, and erythrocyte binding antigen-175) in *Plasmodium falciparum* isolates from western and central Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Feb;84(2):276-84.
216. Greenhouse B, Ho B, Hubbard A, Njama-Meya D, Narum DL, Lanar DE, et al. Antibodies to *Plasmodium falciparum* Antigens Predict a Higher Risk of Malaria But Protection From Symptoms Once Parasitemic. *J Infect Dis*. 2011 Jul;204(1):19-26.
217. Carvalho LJ, Alves FA, Bianco C, Jr., Oliveira SG, Zanini GM, Soe S, et al. Immunization of *Saimiri sciureus* monkeys with a recombinant hybrid protein derived from the *Plasmodium falciparum* antigen glutamate-rich protein and merozoite surface protein 3 can induce partial protection with Freund and Montanide ISA720 adjuvants. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005 Feb;12(2):242-8.
218. Tetteh KK, Stewart LB, Ochola LI, Amambua-Ngwa A, Thomas AW, Marsh K, et al. Prospective identification of malaria parasite genes under balancing selection. *PLoS One*. 2009;4(5):e5568.
219. Howell SA, Well I, Fleck SL, Kettleborough C, Collins CR, Blackman MJ. A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. *J Biol Chem*. 2003 Jun 27;278(26):23890-8.
220. Puentes A, Ocampo M, Rodriguez LE, Vera R, Valbuena J, Curtidor H, et al. Identifying *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-10 human erythrocyte specific binding regions. *Biochimie*. 2005 May;87(5):461-72.
221. Triglia T, Healer J, Caruana SR, Hodder AN, Anders RF, Crabb BS, et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol Microbiol*. 2000 Nov;38(4):706-18.

222. Hehl AB, Lekutis C, Grigg ME, Bradley PJ, Dubremetz JF, Ortega-Barria E, et al. Toxoplasma gondii homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. *Infect Immun*. 2000 Dec;68(12):7078-86.
223. Lamarque M, Besteiro S, Papoin J, Roques M, Vulliez-Le Normand B, Morlon-Guyot J, et al. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog*. 2011;7(2):e1001276.
224. Howell SA, Withers-Martinez C, Kocken CH, Thomas AW, Blackman MJ. Proteolytic processing and primary structure of Plasmodium falciparum apical membrane antigen-1. *J Biol Chem*. 2001 Aug 17;276(33):31311-20.
225. Narum DL, Thomas AW. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of Plasmodium falciparum merozoites. *Mol Biochem Parasitol*. 1994 Sep;67(1):59-68.
226. Kocken CH, Narum DL, Massougbojji A, Ayivi B, Dubbeld MA, van der Wel A, et al. Molecular characterisation of Plasmodium reichenowi apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with P. falciparum AMA-1, and antibody-mediated inhibition of red cell invasion. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Jul;109(2):147-56.
227. Bai T, Becker M, Gupta A, Strike P, Murphy VJ, Anders RF, et al. Structure of AMA1 from Plasmodium falciparum reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 6;102(36):12736-41.
228. Cortes A, Mellombo M, Masciantonio R, Murphy VJ, Reeder JC, Anders RF. Allele specificity of naturally acquired antibody responses against Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1. *Infect Immun*. 2005 Jan;73(1):422-30.
229. Osier FH, Weedall GD, Verra F, Murungi L, Tetteh KK, Bull P, et al. Allelic diversity and naturally acquired allele-specific antibody responses to Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 in Kenya. *Infect Immun*. 2010 Nov;78(11):4625-33.
230. Mahdi Abdel Hamid M, Remarque EJ, van Duivenvoorde LM, van der Werff N, Walraven V, Faber BW, et al. Vaccination with Plasmodium knowlesi AMA1 Formulated in the Novel Adjuvant Co-Vaccine HT Protects against Blood-Stage Challenge in Rhesus Macaques. *PLoS One*. 2011;6(5):e20547.
231. Biswas S, Dicks MD, Long CA, Remarque EJ, Siani L, Colloca S, et al. Transgene Optimization, Immunogenicity and In Vitro Efficacy of Viral Vected Vaccines Expressing Two Alleles of Plasmodium falciparum AMA1. *PLoS One*. 2011;6(6):e20977.
232. Preiser P, Renia L, Singh N, Balu B, Jarra W, Voza T, et al. Antibodies against MAEBL ligand domains M1 and M2 inhibit sporozoite development in vitro. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3604-8.
233. Saenz FE, Balu B, Smith J, Mendonca SR, Adams JH. The transmembrane isoform of Plasmodium falciparum MAEBL is essential for the invasion of Anopheles salivary glands. *PLoS One*. 2008;3(5):e2287.

234. Ocampo M, Curtidor H, Vera R, Valbuena JJ, Rodriguez LE, Puentes A, et al. MAEBL Plasmodium falciparum protein peptides bind specifically to erythrocytes and inhibit in vitro merozoite invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Mar 5;315(2):319-29.
235. Binks RH, Conway DJ. The major allelic dimorphisms in four Plasmodium falciparum merozoite proteins are not associated with alternative pathways of erythrocyte invasion. *Mol Biochem Parasitol*. 1999 Sep 20;103(1):123-7.
236. Soubes SC, Wellem TE, Miller LH. Plasmodium falciparum: a high proportion of parasites from a population of the Dd2 strain are able to invade erythrocytes by an alternative pathway. *Exp Parasitol*. 1997 May;86(1):79-83.
237. Verra F, Chokejindachai W, Weedall GD, Polley SD, Mwangi TW, Marsh K, et al. Contrasting signatures of selection on the Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen gene family. *Mol Biochem Parasitol*. 2006 Oct;149(2):182-90.
238. Cowman AF, Baldi DL, Healer J, Mills KE, O'Donnell RA, Reed MB, et al. Functional analysis of proteins involved in Plasmodium falciparum merozoite invasion of red blood cells. *FEBS Lett*. 2000 Jun 30;476(1-2):84-8.
239. Maier AG, Duraisingh MT, Reeder JC, Patel SS, Kazura JW, Zimmerman PA, et al. Plasmodium falciparum erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nat Med*. 2003 Jan;9(1):87-92.
240. El Sahly HM, Patel SM, Atmar RL, Lanford TA, Dube T, Thompson D, et al. The Safety and Immunogenicity of Recombinant EBA 175-RII NG Malaria Vaccine in Healthy Adults Living in a Non-Endemic Area. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Oct;17(10):1552-9.
241. Mayer DC, Mu JB, Kaneko O, Duan J, Su XZ, Miller LH. Polymorphism in the Plasmodium falciparum erythrocyte-binding ligand JESEBL/EBA-181 alters its receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 24;101(8):2518-23.

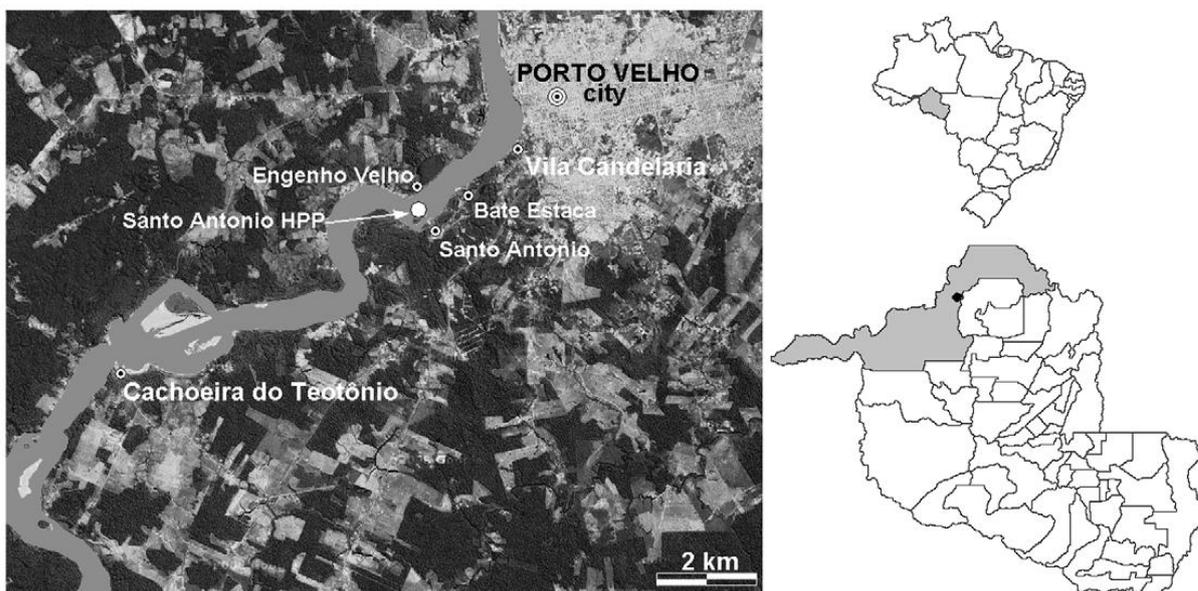
ANEXOS

ANEXO A – Mapa das localidades

Mapa das localidades do estudo por satélite.

As localidades Bate-Estaca, Engenho Velho, Santo Antônio e Vila Candelária são discriminadas no mapa. Nota-se a proximidade com o centro de Porto Velho.

Atualmente, essa região do Rio Madeira sofreu enormes transformações devido à construção das hidrelétricas do Rio Madeira, em Santo Antônio. O ponto destacado no estado de Rondônia corresponde às localidades do estudo visualizadas no mapa à esquerda. (168).



ANEXO B - Ficha para atendimento clínico

Ficha de atendimento clínico.

Registro: ___/___

data: ___/___/___

Nome: _____

Endereço: _____

Local de nascimento: _____

Procedência remota: _____

Tempo em Rondônia: _____ Tempo no endereço atual: _____

Viagem nos últimos 30 dias: _____ Local: _____

Sexo: F M Idade: _____ Etnia: _____

Ocupação principal: _____ Ocupação ocasional: _____

Antecedentes pessoais:

1. Malária

S	N	N de Ep	N de V	N de F	Última há quanto tempo?	Tipo da última

2. Dengue

S	N	Tipo 1 2 3 4	Junto com malária?

3. Hepatite

S	N	Tipo A B C D E	Junto com malária?

4. Anemia

S	N	Recebeu sangue?	Por causa de malária?

5. Gravidez

G	P	A	BPN	PP	Teve malária em alguma?

ANEXO C - Ficha de acompanhamento

Ficha de acompanhamento de pacientes infectados por *P. falciparum* e sem sintomas.

Nome do paciente: _____

Localidade: _____

Data da coleta: _____

Sintomas na coleta? _____

Viajou nos últimos 15 dias? _____

Para onde? _____

Sintomas	Dias de acompanhamento														
Febre															
Dor de cabeça															
Dor no corpo															
Vontade de vomitar															
Vômitos															
Diarréia															
Urina escura															
Temperatura															
Lâmina															
Resultado da lâmina (P ou N)															

Coloque X no quadradinho se o paciente apresentou o sintoma. Não se esqueça de marcar o dia em que você verificou. Se você colheu uma lâmina, marque um X no quadradinho. Não se esqueça de marcar se foi positiva (P) ou negativa (N) embaixo. Marque a temperatura como aparece no TERMÔMETRO. A TEMPERATURA DEVERÁ SER VERIFICADA EM TODA A VISITA.

Qualquer dúvida ligue: 069-9952-9673 ou 069-3225-3304

Dra. Márcia

ANEXO D - Termo de consentimento para maiores de 18 anos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Maiores de 18 anos

ESTUDO: Estudos da resposta humoral contra antígenos variantes e polimórficos em infecções naturais da Amazônia e aspectos moleculares da variação antigênica do protozoário causador da malária trópica, *Plasmodium falciparum*.

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, (inserir o nome, profissão), residente e domiciliado na....., portador da Cédula de identidade, RG, e inscrito no CPF nascido(a) em / / , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo "**Estudos da resposta humoral contra antígenos variantes e polimórficos em infecções naturais da Amazônia e aspectos moleculares da variação antigênica do protozoário causador da malária trópica, *Plasmodium falciparum***".

Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo é necessário para esclarecer o desenvolvimento de imunidade protetora contra a malária nesta região, e para isso serão avaliados vários aspectos, tais como: verificar se há casos sem sintomas, pois pessoas podem ser portadoras de parasitas e transmitir a doença para outros; verificar as espécies de parasitas no sangue humano. O conhecimento sobre como esta doença infecciosa ocorre na região poderá auxiliar no controle da doença.
- II) Será feita 1 coleta de 5 ml de sangue;
- III) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o meu tratamento; não vai me curar; não vai me causar nenhum problema, exceto o pequeno

Termo de consentimento para maiores de 18 anos (continuação).

incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue);

- IV) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento novo para malária, bem como não me acarretará qualquer ônus pecuniário com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados com o estudo;
- V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VIII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa;
- IX) Estou de acordo que o organismo encontrado no meu sangue pode ser utilizado para outros projetos de pesquisa, desvinculado de meus dados pessoais.

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Porto Velho, de de 200_

Paciente / Responsável

Testemunha 1 : _____

Nome/RG/Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome/RG/Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

Médico Responsável (Nome, CRM)

Telefone para contato:

ANEXO E - Termo de consentimento para menores de 18 anos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: Estudos da resposta humoral contra antígenos variantes e polimórficos em infecções naturais da Amazônia e aspectos moleculares da variação antigênica do protozoário causador da malária trópica, *Plasmodium falciparum*.

Seu filho está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo, então leia atentamente e caso tenha dúvidas, vou esclarecê-las (se não souber ler, fique tranqüilo(a) que leio para você). Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início a pesquisa. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você, nem ao seu (sua) filho(a).

Eu, RG, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a), nascido(a) em ____ / ____ / _____, seja voluntário do estudo "Estudos da resposta humoral contra antígenos variantes e polimórficos em infecções naturais da Amazônia e aspectos moleculares da variação antigênica do protozoário causador da malária trópica, *Plasmodium falciparum*"; esclareço que obtive todas informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo é necessário para esclarecer o desenvolvimento de imunidade protetora contra a malária nesta região, e para isso serão avaliados vários aspectos, tais como: verificar se há casos sem sintomas, pois pessoas podem ser portadoras de parasitas e transmitir a doença para outros; verificar as espécies de parasitas no sangue humano. O conhecimento sobre como esta doença infecciosa ocorre na região poderá auxiliar no controle da doença.
- II) Será feita 1 coleta de 5 ml de sangue do(a) meu(minha) filho(a) maior de 2 anos.
- III) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará no tratamento de meu (minha) filho(a); não causará nenhum problema, exceto a dor da picada da agulha.

Termo de consentimento para menores de 18 anos (continuação).

no local da coleta; e a coleta será realizada por um profissional da área médica, habilitado para este procedimento;

- IV) A participação neste projeto não tem o objetivo de submeter meu filho(a) a um tratamento terapêutico novo para malária e será sem custo algum para ele e para mim;
- V) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a), e interferirá no atendimento ou tratamento médico;
- VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu filho(a) sejam mencionados;
- VIII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa.
- IX) Estou de acordo que o patógeno *Plasmodium* e imunoglobulinas encontrados no sangue de meu filho(a) sejam utilizados para futuros experimentos não especificados no projeto, sempre desvinculado de seus dados pessoais.

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Porto Velho, _____ de _____ de 200__.

Paciente / Responsável

Testemunha 1: _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2: _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

Médico Responsável (Nome, CRM)

Telefone para contato: _____