

**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

## 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 merozoítio [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 merozoítio - 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 merozoítio 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 merozoítio 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.

# **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, róprias 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.

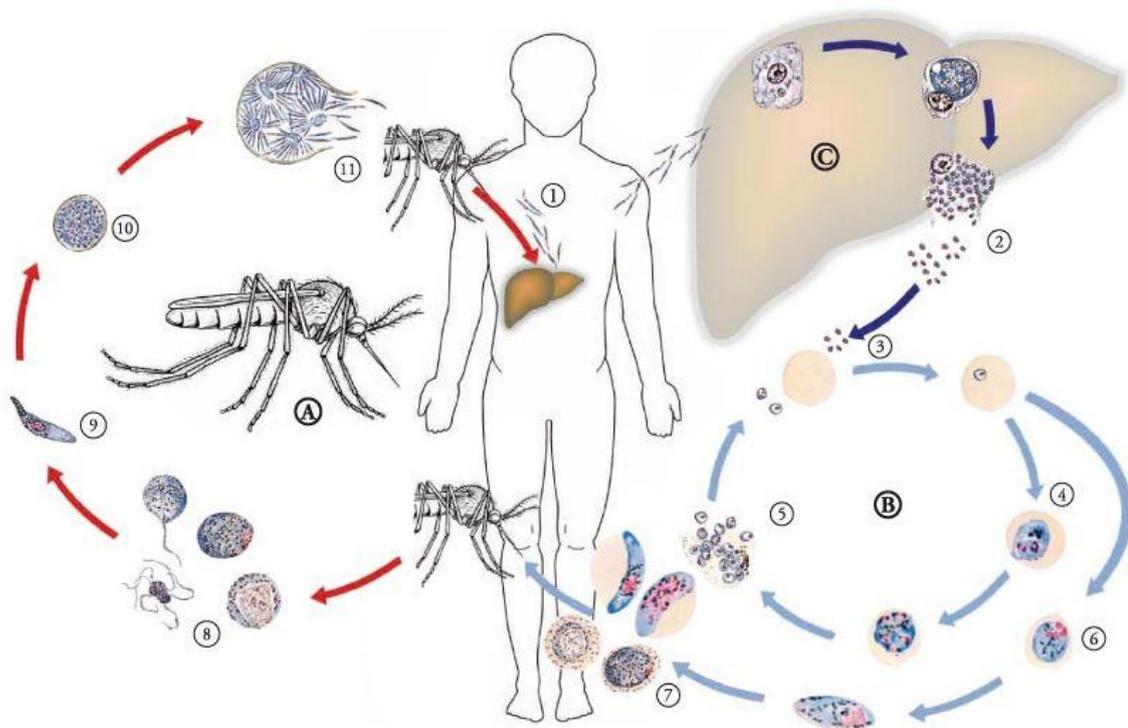
Evidências apontam que merozoítos de *P. falciparum* presentes no esquizonte tardio, iniciam a diferenciação para a forma sexuada em conjunto e logo no primeiro ciclo de replicação assexuada, sem a necessidade de invasão eritrocitária para uma posterior diferenciação. Porém, as formas gametocidas imaturas 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, trofozoíto maduro e esquizonte (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.

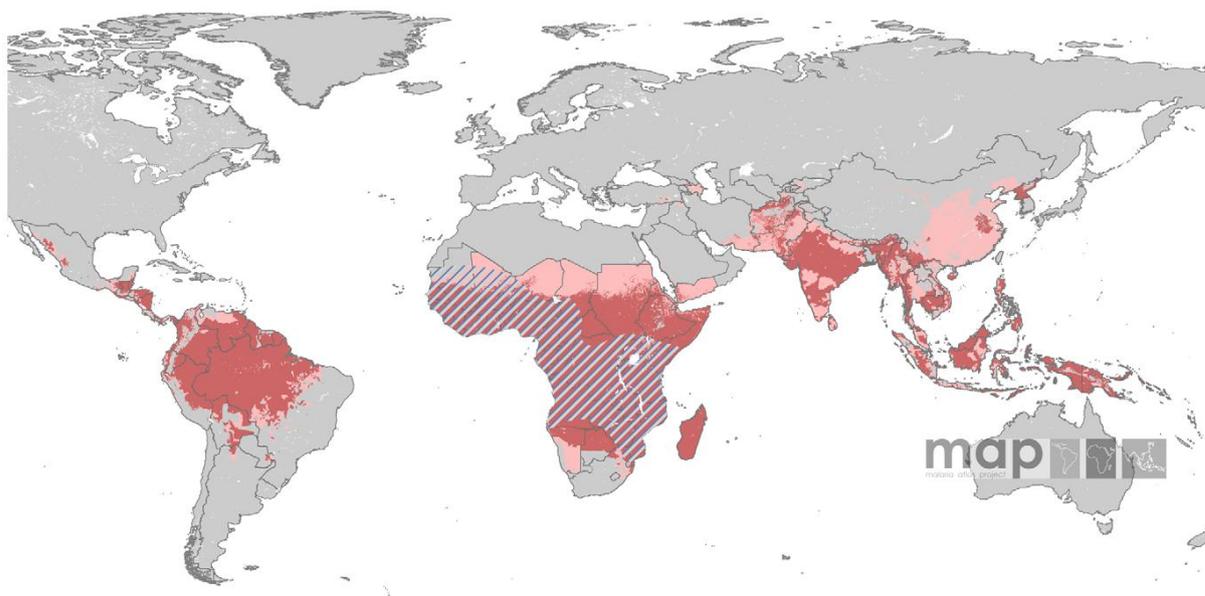
Entre o período de 1945 a 2010, 79 países conseguiram eliminar a malária, porém, ela continua endêmica em 99 países distribuídos entre a faixa intertropical do planeta (53).

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).

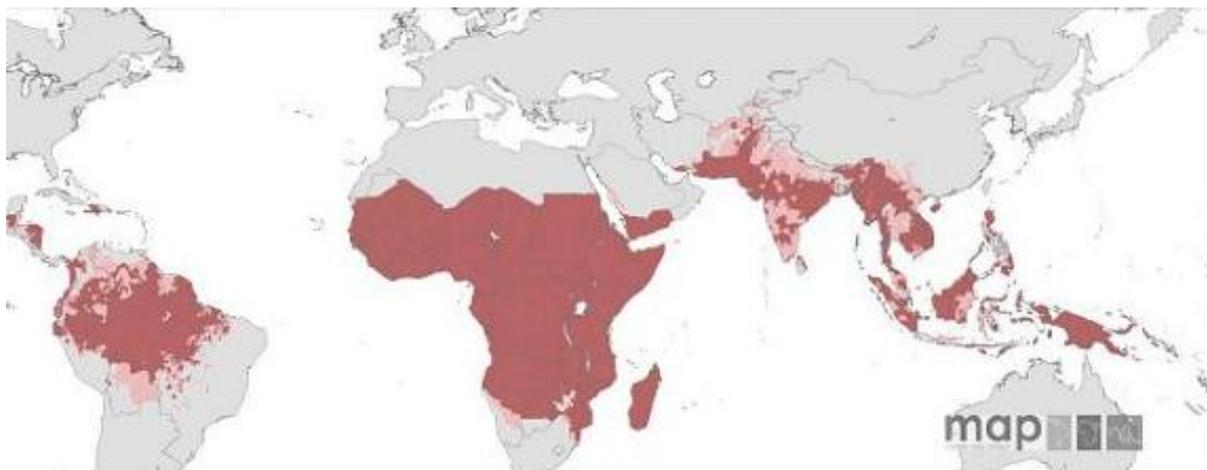
A OMS tem preconizado o tratamento combinado com artemisina para o tratamento dos casos de malária falciparum, a fim de evitar o surgimento de resistência a essa droga, quando utilizada como monoterapia (segundo as recomendações da segunda edição do manual de tratamento de malária, disponível no endereço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

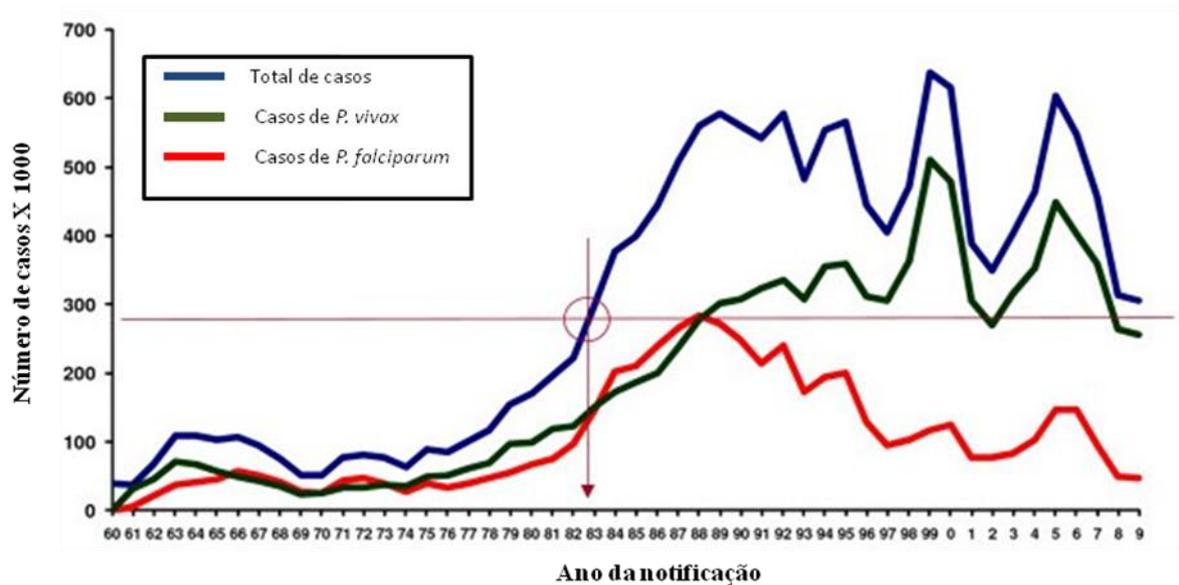
Em 1970, a doença havia sido controlada em boa parte do país. Naquele ano, foram registrados 52 mil casos, o menor número desde o início da aplicação do DDT, porém a maioria na região Amazônica. Nos anos seguintes, o governo militar priorizou as ações de controle nas áreas de possível erradicação da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

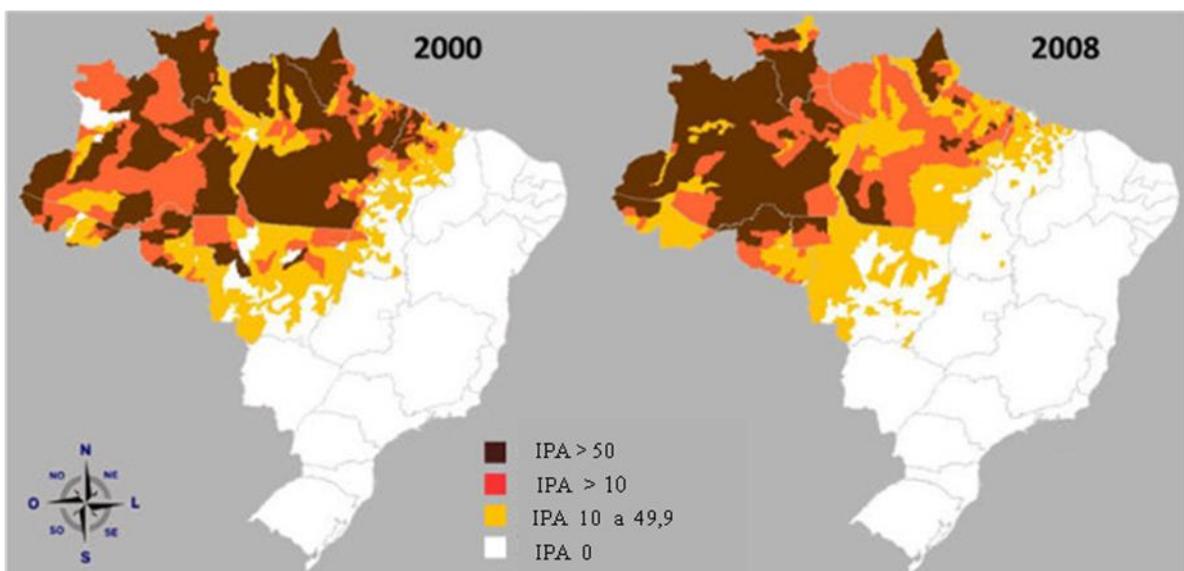
Em 2009, foram registrados no Brasil, aproximadamente 306 mil casos da doença, sendo que o *P. vivax* foi responsável por 83,7% dos casos e o *P. falciparum* por 16,3% dos casos. A Figura abaixo mostra o número de casos registrados no Brasil de 1960 a 2009. Podemos observar a prevalência de casos por *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  $T_{\text{helper}}$ . Posteriormente, ocorre a ativação de células  $T_{\text{naive}}$  ou células  $T_{\text{helper}}$  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  $\alpha$ -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- $\beta$ . 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- $\beta$ , pelo aumento da expressão da cadeia  $\alpha$

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- $\beta$ , 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- $\beta$  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- $\beta$ , 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- $\beta$  na forma ativa, favorecendo a diferenciação de células T *naive*, para um fenótipo T reg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>). 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- $\gamma$ , 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- $\gamma$  e aumento dos níveis de IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- $\beta$ , este último, podendo direcionar a diferenciação de células T<sub>naive</sub> 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<sub>total</sub> (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,

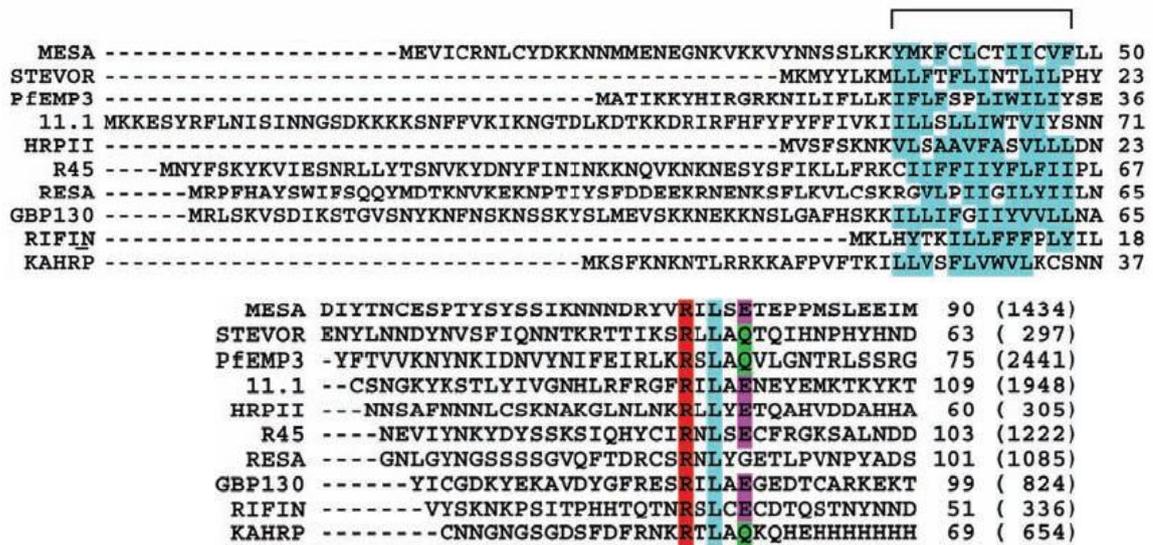
que diferem pelos adjuvantes utilizados e pela forma como os antígenos são disponibilizados. Algumas formulações contêm antígenos recombinantes, outras contêm antígenos sintéticos e outras são vacinas de DNA (12).

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).



**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*.

## **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, MSP1<sub>19</sub>, 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.

\*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].

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.

\*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].

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, Darrier 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.

\*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].

56. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto 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. Doodoo 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

\*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].

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. Stanicic 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

\*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].

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.

\*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].

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, Deining 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. Helmby 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.

\*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].

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.

\*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].

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.

\*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].

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

\*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].

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, Roussillon 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.

\*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].

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

\*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].

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, Doumtabe 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.

\*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].

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

\*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].

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. Roussilhon 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

\*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].

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.

\*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].

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, Massougbdji 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.

\*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].

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's 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.

\*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].

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.

\*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].