ANGÉLICA DOMINGUES HRISTOV

Ocorrência de *Plasmodium* e suas consequências em gestantes residentes em áreas de baixa transmissão de malária no Estado de São Paulo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi

São Paulo
2014

ANGÉLICA DOMINGUES HRISTOV

Ocorrência de *Plasmodium* e suas consequências em gestantes residentes em áreas de baixa transmissão de malária no Estado de São Paulo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi

**São Paulo
2014**

*Às gestantes do município de Juitiba, que gentilmente concordaram em
participar desse estudo, apoiando-o desde o início.*

Agradecimentos

A Deus, por guiar passo a passo minha trajetória acadêmica e pessoal, tornando possível tudo o que conquistei até aqui.

A minha família, em especial aos meus pais, Angela M. D. Hristov e Válter Hristov, por acreditarem no que faço e darem alicerce a mim e as minhas escolhas.

Ao meu marido, Fábio E. Christov, por me apoiar incondicionalmente em cada decisão. Por acreditar em mim e nas minhas escolhas. Pela admiração que tem por esse trabalho, enxergando-o desde o início como uma grande contribuição para a Ciência.

A minha orientadora, Dra. Silvia Maria Di Santi, por enxergar em mim o que muitas vezes nem eu mesma conseguia. Pelas incontáveis horas de dedicação a esse trabalho e por acreditar nele. Pela vontade de ensinar, paciência e ajuda constante durante todas as etapas do estudo. Finalmente, por todo e constante aprendizado sobre a malária que me proporciona a cada dia.

A Dra. Carmen Arroyo Sanchez, pela grande ajuda com os ensaios imunológicos e com as análises estatísticas. Por abrir as portas do seu laboratório sempre que precisei e pelo carinho e atenção dedicados a esse trabalho.

Aos Profs. Drs. Eliseu Alves Waldman, Camila Romano e Ronaldo Borges Gryschek, pelas valiosas sugestões como membros da Banca de Qualificação.

Ao Dr. Jarbas Bittencourt Ferreira, por possibilitar as coletas em Juquitiba, nos auxiliando sempre que necessário.

As queridas amigas Giselle F.M.C Lima, Juliana Inoue e Maria de Jesus Costa-Nascimento, não apenas pela grande ajuda com as coletas, processamento das amostras e leitura de lâminas, mas principalmente pelas palavras de incentivo, conselhos, preocupações, união e amizade.

As amigas do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN, que contribuíram com esse estudo durante as coletas em Juquitiba, com o preparo dos materiais e com palavras de incentivo: Otacília da Rocha Cravo, Maria Silvia P. de Paula, Christina R. C.Toniolo, Juliana de Castro e Miluska R.C.V. Rodriguez.

As enfermeiras das Unidades de Saúde da Família e aos agentes de saúde de Juquitiba, pela grande ajuda durante as coletas, contribuindo enormemente para que esse estudo pudesse ser realizado.

A secretária da Pós-Graduação, Roseli A. dos Santos pela indispensável ajuda com as documentações e informações relacionadas ao Mestrado.

Ao XVI Seminário Laveran e Deane sobre Malária, pelas importantes contribuições para esse estudo quando ainda estava em fase inicial, tornando possível seu aprimoramento.

A Pró-Reitoria de Pós Graduação da Universidade de São Paulo pelo financiamento para apresentação dos resultados preliminares desse estudo no 8º Congresso Europeu de Medicina Tropical e Saúde Internacional, realizado em Copenhague, Dinamarca.

A Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) pelo financiamento desse estudo e por possibilitar às saídas de campo para Juquitiba.

As agências de financiamento da bolsa de Mestrado: CAPES e CNPq.

MUITO OBRIGADA!

***“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes”
Cora Coralina***

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Histórico da malária no mundo	02
1.2 O <i>Plasmodium</i> e o vetor	06
1.2.1 Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i>	09
1.3 Aspectos epidemiológicos da malária	12
1.3.1 Malária no mundo	12
1.3.2 Malária no Brasil	13
1.3.3 Malária na região Extra-Amazônica	15
1.4 Malária em gestantes	19
1.4.1 Diagnóstico de <i>Plasmodium</i> em gestantes	21
1.5 Justificativa	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Geral	26
2.2 Específicos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Área e população do estudo	28
3.2 Desenho do estudo	31
3.3 Aspectos éticos da pesquisa	31

3.4 Coleta e processamento das amostras	32
3.5 Exame hemoscópico por gota espessa.....	33
3.6 Extração de DNA genômico	34
3.7 Ensaios moleculares	34
3.7.1 PCR em tempo real	35
3.7.2 <i>Nested</i> PCR	36
3.8 Ensaios imunológicos.....	37
3.8.1 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	37
3.8.2 Imunofluorescência Indireta (IFI)	40
3.8.3 Teste imunocromatográfico (SD Bioline <i>Pf/Pv</i>)	40
3.9 Análise estatística	41
4 RESULTADOS	42
4.1 Amostras coletadas	43
4.2 Exame hemoscópico por gota espessa.....	45
4.3 PCR em tempo real e <i>nested</i> PCR.....	47
4.4 ELISA	53
4.4.1 ELISA <i>P. vivax</i>	54
4.4.2 ELISA <i>P. falciparum</i>	58
4.5 IFI – <i>P. malariae</i>	61
4.6 SD Bioline.....	63
4.7 Aspectos clínicos.....	65
4.7.1 Aspectos clínicos das gestantes positivas.....	65
4.8 Características das gestantes positivas	66
4.9 Concordância entre as técnicas	67
5 DISCUSSÃO	69

6 CONCLUSÕES	78
7 ANEXOS	80
8 REFERÊNCIAS.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

CSP	<i>circumsporozoite protein</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DDT	dicloro-difenil-tricloroetano
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	e outros
GE	Gota Espessa
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IFI	Imunofluorescência Indireta
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ssrRNA	<i>small subunit of ribossomal RNA</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMB	Tetrametilbenzidina
USF	Unidade de Saúde da Família
UV	Ultra-violeta

LISTA DE SIGLAS

CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
OMS	Organização Mundial da Saúde
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
USP	Universidade de São Paulo
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos autóctones de malária registrados na região Extra- Amazônica por Unidade Federada, no período de 1999 a 2007	15
Tabela 2 - Coletas de sangue periférico no seguimento trimestral de gestantes de Juquitiba, São Paulo, Brasil, de acordo com o momento de inclusão no estudo	33
Tabela 3 - Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> e sonda empregados na PCR em tempo real gênero-específica	35
Tabela 4 - Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> gênero-específicos e espécie-específicos empregados na 1ª e 2ª reações da <i>nested</i> PCR	36
Tabela 5 - Número de coletas realizadas por Unidade de Saúde da Família (USF) durante o seguimento das gestantes de Juquitiba entre outubro de 2012 e novembro de 2013	43
Tabela 6 - Médias dos valores de Ct obtidos na PCR em tempo real e espécies identificadas pela <i>nested</i> PCR durante o acompanhamento das gestantes de Juquitiba, São Paulo, Brasil	47
Tabela 7 - Amostras de plasma positivas nos ensaios de ELISA para anticorpos IgG contra <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> ao longo do acompanhamento das gestantes das cinco Unidades de Saúde da Família (USFs) de Juquitiba, São Paulo, Brasil	54
Tabela 8 - Amostras de plasma positivas por ELISA para anticorpos IgG contra <i>P. vivax</i> no acompanhamento de gestantes das Unidades de Saúde da Família (USFs) de Juquitiba, São Paulo, Brasil	54
Tabela 9 - Amostras de plasma positivas por ELISA para anticorpos IgG contra <i>P. falciparum</i> no acompanhamento de	

gestantes das Unidades de Saúde da Família (USFs) de Juquitiba, São Paulo, Brasil.....	58
Tabela 10 - Amostras de plasma positivas na Imunofluorescência indireta para anticorpos IgG contra <i>P. malariae</i> ao longo do acompanhamento de gestantes das cinco Unidades de Saúde da Família (USFs) do município de Juquitiba, São Paulo, Brasil	62
Tabela 11 - Amostras de plasma positivas no teste SD Bioline para anticorpos IgG contra <i>P. vivax</i> ao longo do acompanhamento de gestantes das cinco Unidades de Saúde da Família (USFs) do município de Juquitiba, São Paulo, Brasil	63
Tabela 12 - Amostras de plasma positivas no teste SD Bioline para anticorpos IgG contra <i>P. falciparum</i> ao longo do acompanhamento de gestantes das cinco Unidades de Saúde da Família (USFs) do município de Juquitiba, São Paulo, Brasil	64
Tabela 13 - Acompanhamento das gestantes positivas pela PCR em uma ou mais coletas, mostrando também resultados das demais técnicas empregadas. As células coloridas indicam resultados positivos.....	67
Tabela 14 - Concordância entre os resultados dos ensaios de ELISA- <i>Pv</i> com antígeno recombinante His ₆ - <i>PvMSP1</i> ₁₉ e SD Bioline- <i>Pv</i> com antígenos recombinantes CSP e MSP, considerando as 220 amostras coletadas durante o seguimento de todas as gestantes.....	68
Tabela 15 - Concordância entre os resultados dos ensaios de ELISA- <i>Pf</i> com antígeno total <i>Pf-Zw</i> , SD Bioline- <i>Pf</i> com antígenos recombinantes CSP e MSP e IFI- <i>Pm</i> , considerando as 220 amostras coletadas durante o seguimento de todas as gestantes.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Charles Louis Alphonse Laveran (A) e Ronald Ross (B)	04
Figura 2 - Imagens ao microscópio óptico em imersão, de <i>P. vivax</i> (A), <i>P. falciparum</i> (B), <i>P. malariae</i> (C), <i>P. ovale</i> (D) e <i>P. knowlesi</i> (E)	07
Figura 3 - Fêmea do mosquito <i>Anopheles</i> realizando repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado	08
Figura 4 - Fêmea do mosquito <i>Anopheles</i> injetando as formas infectantes de <i>Plasmodium</i> (esporozoítos) no hospedeiro vertebrado	09
Figura 5 - Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> mostrando as fases de reprodução assexuada (hospedeiro vertebrado) e sexuada (hospedeiro invertebrado)	11
Figura 6 - População mundial sob risco de adquirir malária em 2014	12
Figura 7 - Áreas de transmissão de malária de baixo, médio e alto risco no Brasil em 2010	13
Figura 8 - Distribuição de casos de malária por espécie de <i>Plasmodium</i> na região Amazônica em 2011	14
Figura 9 - Número de casos de malária notificados por ano entre 2000 e 2011 na região Amazônica	14
Figura 10 - Casos de malária autóctone registrados em 13 municípios do Estado de São Paulo entre 1980 e 2007	16
Figura 11 - Localização de Juquitiba, Estado de São Paulo, Brasil, (A) e imagem da cobertura vegetal em área rural do município	28
Figura 12 - Unidades de Saúde da Família do município de Juquitiba: Centro (A), Barnabés (B), Jardim das Palmeiras (C), Justino (D) e Palmeiras (E), responsáveis	

pelo acompanhamento de gestantes em sua área de abrangência.....	29
Figura 13 - Localização geográfica das Unidades de Saúde da Família localizadas em cinco bairros do município de Juquitiba, São Paulo, Brasil.....	30
Figura 14 - Coleta de sangue venoso em residência de gestante do bairro Barnabés, Juquitiba, São Paulo, Brasil	43
Figura 15 - Coleta de sangue por punção no calcanhar de bebês de gestantes com malária, residentes no bairro Barnabés, Juquitiba, São Paulo, Brasil.....	44
Figura 16 - Fluxograma apresentando o número total de amostras de gestantes acompanhadas em todas as USFs de Juquitiba, São Paulo, Brasil e todos os processos realizados, com os respectivos resultados.....	45
Figura 17 - Confeção de duas lâminas de gota espessa com sangue endovenoso colhido de gestante residente no município de Juquitiba, São Paulo, Brasil	46
Figura 18 - Trofozoítos de <i>P. vivax</i> (A) e <i>P. malariae</i> (B) detectados em lâminas de gota espessa de gestantes residentes em Juquitiba, São Paulo, Brasil. Imagem ao microscópio óptico (1000x) de sangue corado com Giemsa.....	46
Figura 19 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra B-12 em duplicata, com média dos Cts=36,16	48
Figura 20 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra B-24 em duplicata, com média dos Cts=34,19	48
Figura 21 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra B-59 em duplicata, com média dos Cts=36,34	48
Figura 22 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra B-65 em duplicata, com média dos Cts=33,22	49

Figura 23 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra B-72 em duplicata, com média dos Cts=35,22	49
Figura 24 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra C-3 em duplicata, com média dos Cts=34,14	49
Figura 25 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra B-8 em duplicata, com média dos Cts=37,06	50
Figura 26 - Amplificação das quatro amostras da curva padrão diluídas a razão 10 e do controle de 1parasito/ μ L.....	50
Figura 27 - Curva padrão mostrando o log da quantidade inicial de DNA (eixo-x) e Ct (eixo-y). O valor de inclinação de - 3,32 representa 100% de eficiência da reação	51
Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com amostras positivas pela <i>nested</i> PCR para <i>P. vivax</i> (B-12 e C-3), cujo fragmento amplificado é de 120 bp. Controle positivo <i>P. vivax</i> (C+), controle negativo (C-), marcador de peso molecular de 100 bp (M).....	52
Figura 29 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com amostras positivas pela <i>nested</i> PCR para <i>P. vivax</i> (B-8), cujo fragmento amplificado é de 120 bp e para <i>P. malariae</i> (B-24, B-59, B-72 e B-65), fragmento de 144 bp. Controle positivo <i>P. vivax</i> e <i>P. malariae</i> (C+), controle negativo (C-), marcador de peso molecular de 100 bp (M).....	52
Figura 30 - Curva ROC obtida a partir da absorbância de amostras de pacientes com gota espessa positiva (n=43) e negativa (n=43) para <i>P. vivax</i> , gerando um <i>cut-off</i> de 0,090	53
Figura 31 - Curva ROC obtida a partir da absorbância de amostras de pacientes com gota espessa positiva (n=30) e negativa (n=30) para <i>P. falciparum</i> , gerando um <i>cut-off</i> de 0,200	53

- Figura 32 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 1ª coleta das gestantes acompanhadas nas cinco USFs de Jucitaba. Processamento por ELISA-IgG para *P. vivax*, com n=11 (Centro), n=75 (Barnabés), n=31 (Justino), n=2 (Palmeiras) e n=6 (Jd. das Palmeiras)55
- Figura 33 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 2ª coleta das gestantes acompanhadas nas cinco USFs de Jucitaba. Processamento por ELISA-IgG para *P. vivax*, com n=10 (Centro), n=45 (Barnabés), n=20 (Justino), n=2 (Palmeiras) e n=1 (Jd. das Palmeiras)55
- Figura 34 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 3ª coleta das gestantes acompanhadas nas cinco USFs de Jucitaba. Processamento por ELISA-IgG para *P. vivax*, com n=1 (Centro), n=13 (Barnabés) e n=3 (Justino)56
- Figura 35 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 1ª coleta das gestantes acompanhadas na USF Barnabés em comparação com as outras USFs. Processamento por ELISA-IgG para *P. vivax*, com n=75 (Barnabés) e n=50 (outros)56
- Figura 36 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 2ª coleta das gestantes acompanhadas na USF Barnabés em comparação com as outras USFs. Processamento por ELISA-IgG para *P. vivax*, com n=45 (Barnabés) e n=33 (outros)57
- Figura 37 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 3ª coleta das gestantes acompanhadas na USF Barnabés em comparação com as outras USFs. Processamento por ELISA-IgG para *P. vivax*, com n=13 (Barnabés) e n=4 (outros)57

- Figura 38 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 1ª coleta das gestantes acompanhadas nas cinco USFs de Jucitaba. Processamento por ELISA-IgG para *P. falciparum*, com n=11 (Centro), n=75 (Barnabés), n=31 (Justino), n=2 (Palmeiras) e n=6 (Jd. das Palmeiras)58
- Figura 39 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 2ª coleta das gestantes acompanhadas nas cinco USFs de Jucitaba. Processamento por ELISA-IgG para *P. falciparum*, com n=10 (Centro), n=42 (Barnabés), n=20 (Justino), n=2 (Palmeiras) e n=1 (Jd. das Palmeiras)59
- Figura 40 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 3ª coleta das gestantes acompanhadas nas cinco USFs de Jucitaba. Processamento por ELISA-IgG para *P. falciparum*, com n=1 (Centro), n=13 (Barnabés) e n=3 (Justino)59
- Figura 41 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 1ª coleta das gestantes acompanhadas na USF Barnabés em comparação com as outras USFs. Processamento por ELISA-IgG para *P. falciparum*, com n=75 (Barnabés) e n=50 (outros)60
- Figura 42 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 2ª coleta das gestantes acompanhadas na USF Barnabés em comparação com as outras USFs. Processamento por ELISA-IgG para *P. falciparum*, com n=42 (Barnabés) e n=33 (outros)60
- Figura 43 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 3ª coleta das gestantes acompanhadas na USF Barnabés em comparação com as outras USFs. Processamento por ELISA-IgG para *P. falciparum*, com n=13 (Barnabés) e n=4 (outros)61

- Figura 44 - Ensaio de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos IgG contra *P. malariae*, com controle negativo (A), controle positivo (B) e duas amostras de gestantes (C e D) residentes em Juquitiba, São Paulo, Brasil 62
- Figura 45 - Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos contra antígenos recombinantes CSP e MSP de *P. vivax* e *P. falciparum*, mostrando resultados negativos (A, B) e positivo (C) de gestante de Juquitiba, São Paulo, Brasil, que adquiriu *Plasmodium* durante o acompanhamento trimestral 64

RESUMO

Estudos relacionados à malária autóctone em regiões de baixa transmissão no Brasil ganham cada vez mais relevância científica e epidemiológica, pois revelam a manutenção desse cenário em regiões de Mata Atlântica remanescente. No sudeste do Estado de São Paulo, a ocorrência de surtos no município de Juquitiba tem sido foco de pesquisas sobre a prevalência de *Plasmodium* na população, com registros de casos assintomáticos. Relatos de ocorrência da doença ou da presença de anticorpos antiplasmodiais em gestantes nessa região não haviam sido descritos anteriormente. Embora infecções por *P. falciparum* em gestantes tenham sido amplamente abordadas na literatura, a interação entre *P. vivax* e *P. malariae* com esta coorte imunodeprimida foi pouco explorada até o momento. Nesse estudo nós monitoramos trimestralmente a circulação de *Plasmodium* em gestantes atendidas em cinco Unidades de Saúde de Juquitiba. Para isso foi empregado o diagnóstico por gota espessa e metodologias moleculares sensíveis para detecção do parasito, além de ensaios imunológicos para avaliação de parâmetros imunes humorais. Desse modo, foram detectadas infecções por *P. vivax* e *P. malariae* em gestantes, incluindo casos assintomáticos. A alta prevalência de anticorpos IgG nesta população mostrou importante exposição das gestantes ao *Plasmodium*. Em regiões com perfil semelhante ao apresentado neste estudo, o diagnóstico de malária poderia ser indicado no seguimento pré-natal.

Descritores: Malária; Gravidez; Infecções Assintomáticas, Técnicas de Diagnóstico Molecular; Imunidade Humoral; *Plasmodium malariae*; *Plasmodium vivax*.

SUMMARY

Studies related to autochthonous malaria in low transmission areas in Brazil have acquired scientific and epidemiological relevance, since they suggest continued transmission in remaining Atlantic Forest regions. In the Southeast of São Paulo State, outbreaks in the municipality of Juquitiba has been focus of studies on the prevalence of *Plasmodium* in the population, with reports of asymptomatic cases. Data on the occurrence of the disease or presence of antiplasmodial antibodies in pregnant women in this region were not described previously. Although *P. falciparum* infections in pregnant women have been widely addressed in the literature, the interaction of *P. vivax* and *P. malariae* with this immunocompromised cohort were poorly explored to date. In this study, we monitored quarterly the circulation of *Plasmodium* in pregnant women in five health facilities in Juquitiba. For this purpose, we performed diagnosis by thick blood film and sensitive molecular protocols for parasite DNA detection, as well immunological assays in order to evaluate humoral immune parameters. Through these tools, it was possible to detect infections due to *P. vivax* and *P. malariae* in pregnant women, including asymptomatic cases. The high prevalence of IgG antibodies showed a significant exposure of this population to *Plasmodium*. In regions with a similar profile presented in this study, the diagnosis of malaria might be indicated in prenatal care.

Descriptors: Malaria; Pregnancy; Asymptomatic Infections; Molecular Diagnostic Techniques; Immunity; Humoral; *Plasmodium malariae*; *Plasmodium vivax*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da malária no mundo

A malária acompanha a história do homem desde a Antiguidade e acredita-se que tenha sido a principal causa de morte entre os primatas que originaram os *Homo sapiens* (BRUCE-CHWATT et al., 1988 apud FRANÇA et al., 2008). Não se sabe precisamente em que ponto da história ou em qual grupo étnico ocorreram os primeiros acometimentos pela doença. Especula-se que a África, considerada o “berço da humanidade”, possa ser esse local devido à comprovada e superior resistência dos africanos em relação à parasitose (FERREIRA, 1982).

Documentos chineses que datam de 2700 a.C e placas de argila da Mesopotâmia de 2000 a.C são as referências mais antigas que descrevem sintomas compatíveis com a doença, como esplenomegalia e febre (Cox, 2010). Embora não esteja comprovado se realmente se referem à malária, textos antigos religiosos e médicos de assírios, chineses e indianos, descrevem febres sazonais e intermitentes, que eram associadas à punição de deuses e presença de maus espíritos (DI SANTI; BOULOS, 2002).

Na Grécia, século V a.C, Hipócrates foi o primeiro médico a associar a enfermidade às estações do ano e aos locais frequentados pelos doentes. Ele descreveu detalhes do quadro clínico e complicações da doença, como o paroxismo periódico da febre malárica, as fases de acesso (calafrios, febre e sudorese), esplenomegalia, edemas e caquexia. Seus seguidores relataram o caráter estacional da doença, ressaltando o perigo das primaveras chuvosas e dos verões secos, supondo que transmissão ocorresse devido à ingestão da água do pântano. Os gregos Platão, Aristóteles, Aristeu e Galeno também

associavam a malária à insalubridade do meio. Em Roma foram registradas epidemias na região do Lácio e em toda a extensão do Império. Os romanos urbanizavam as cidades que dominavam e pensavam contribuir para o controle da doença construindo casas e vias públicas distantes dos pântanos, protegendo assim a população de suas emanções (MATOS, 2000).

Após o século II d.C, por cerca de 1500 anos, pouquíssimo conhecimento sobre a malária e seu tratamento foi acrescentado. No século XIV d.C, os italianos passaram a descrever a enfermidade como “ária cativa” ou “mal’aria” (ar ruim), termo que deu origem ao seu nome atual, pois também acreditavam que os miasmas provenientes de locais pantanosos eram a causa da doença (FRANÇA et al., 2008). Somente nos séculos XV e XVI, devido ao Renascimento e ao impulso gerado pelas viagens de descobrimento, surgiram novas contribuições ao estudo da doença. Entretanto, até quase o final do século XIX, a teoria mais aceita a respeito da transmissão da malária, ainda delegava sua causa à inalação de vapores, miasmas e emanções de pântanos, embora existisse o contágio em áreas muito distantes dessas regiões (MATOS, 2000).

Apesar dos inúmeros casos de malária relacionados intrinsecamente com a história do homem, foi somente após a descoberta das bactérias em 1676 e o desenvolvimento da teoria microbiana de Louis Pasteur e Robert Koch em 1878, que as investigações sobre a doença foram intensificadas. No ano de 1880, na Argélia, o médico do exército francês Charles Louis Alphonse Laveran (Figura 1A) observou pela primeira vez parasitos vivos no sangue de um soldado e revelou a existência de quatro formas: anel, trofozoíto, esquizonte e gametócito. Devido a sua descoberta, Laveran foi condecorado com o Prêmio Nobel de Medicina em 1907. Em 1886, Camillo Golgi descreveu a reprodução

assexuada do parasito e provou que a febre coincidia com a ruptura das hemácias. Em 1897, Ronald Ross (Figura 1B) usou o modelo de malária aviária para demonstrar que a transmissão se dava através da picada do mosquito, o que após cinco anos lhe rendeu um Prêmio Nobel de Medicina (BRUCE-CHWATT, 1972; FRANÇA et al., 2008; COX, 2010).

Figura 1 - Charles Louis Alphonse Laveran (A) e Ronald Ross (B)

FONTE: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1907/laveran-facts.html; BRUCE-CHWATT, 1972

A malária teve papel decisivo em inúmeros conflitos ao longo da história. No século XIX, Napoleão Bonaparte deliberadamente provocou inundações no interior da Holanda, disseminando a doença e tirando de combate mais de 40% dos soldados do exército britânico que iriam auxiliar os austríacos contra as tropas francesas. Na Primeira Guerra Mundial, como consequência das febres debilitantes, os exércitos britânico, francês e alemão ficaram impedidos de combater durante três anos na Macedônia. Na Segunda Guerra Mundial,

apenas as tropas dos Estados Unidos registraram mais de 500 mil casos, e em algumas frentes, as mortes pela doença foram superiores às provocadas pelos combates (FERREIRA, 1982; FRANÇA, 2008). A malária decidiu outros conflitos bélicos, como a Guerra de Secessão nos Estados Unidos, matando dois terços dos combatentes, e a guerra do Vietnã, que vitimou grande número de norte-americanos. Foi durante este último conflito que houve novamente interesse em pesquisas sobre a doença, que estavam abandonadas desde o fim da Segunda Grande Guerra. Em 1940 dois terços da população mundial viviam sob risco de contrair malária e em 1955 a Organização Mundial da Saúde (OMS) deu início a um programa global de erradicação da endemia. Utilizou-se inseticida de ação residual em larga escala, o que contribuiu para uma diminuição marcante do número de casos e levou à interrupção da transmissão da doença na maior parte das regiões temperadas. A partir do final da década de 60 houve nova ascensão da malária, com índice de prevalência próximo ao observado em 1940. O ressurgimento da transmissão da doença no mundo fez com que a ideia de que essa endemia pudesse ser combatida através de um programa de rociado com dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), em conjunto com o uso de quimioprofilaxia, fosse abandonada (DI SANTI; BOULOS, 2002).

Apesar dos esforços mundiais de erradicação nas décadas de 50 e 60 do século passado, a malária permanece entre as principais doenças tropicais da atualidade (FERREIRA et al., 2003).

1.2 O *Plasmodium* e o vetor

O agente etiológico da malária pertence ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. São cinco as espécies que parasitam o homem: *P. vivax* (Figura 2A), *P. falciparum* (Figura 2B), *P. malariae* (Figura 2C), *P. ovale* (Figura 2D), e mais recentemente descrito no ser humano, *P. knowlesi* (Figura 2E). *P. falciparum* causa a febre terçã maligna com quadros clínicos em que os acessos febris se repetem ciclicamente em intervalos de trinta e seis a quarenta e oito horas. Nos casos com alta parasitemia a febre é constante, pois o crescimento assincrônico dos parasitos acarreta a ruptura constante de hemácias. É a espécie predominante na África Subsaariana, responsável pela maioria dos óbitos. *P. vivax* é a espécie com maior predominância no mundo e causa a febre terçã benigna, com ciclo febril que retorna a cada quarenta e oito horas. *P. ovale* tem distribuição limitada ao continente africano, algumas regiões da Ásia e ilhas do Pacífico (COLLINS; JEFFERY, 2005) e também é responsável pela febre terçã benigna, com ciclo de quarenta e oito horas. *P. malariae*, que causa febre quartã, se caracteriza pela ocorrência de acessos febris a cada setenta e duas horas (REY, 2008; DI SANTI; BOULOS, 2002; WHO, 2013). *P. knowlesi*, descrito pela primeira vez em humanos no sudeste asiático, é morfologicamente indistinguível de *P. malariae*, embora se comporte fisiologicamente como *P. falciparum*. Seu ciclo assexuado de apenas vinte e quatro horas permite atingir altas parasitemias rapidamente, aumentando significativamente as chances de óbito. As espécies de *Plasmodium* de ocorrência no Brasil são:

P. vivax, *P. falciparum* e *P. malariae* (DI SANTI; BOULOS, 2002; COX-SINGH et al., 2008).

Figura 2 - Imagens ao microscópio óptico em imersão de *P. vivax* (A), *P. falciparum* (B), *P. malariae* (C), *P. ovale* (D) e *P. knowlesi* (E)

FONTE: CDC, 2014; Cox-SINGH et al., 2008

Plasmodium é transmitido através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* (Figura 3). Cerca de 400 espécies de anofelinos estão distribuídas no mundo, mas apenas 30 tem maior importância como vetores de *Plasmodium* (DI SANTI; BOULOS, 2002; WHO, 2013).

Figura 3 - Fêmea do mosquito *Anopheles* realizando repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado

FONTE: CDC, 2014

No Brasil, as principais espécies relacionadas à transmissão da malária pertencem ao subgênero *Nyssorhynchus* (*An. darlingi*, *An. albitarsis* e *An. aquasalis*) e *Kerteszia* (*An. cruzii* e *An. bellator*), sendo *An. darlingi* e *An. cruzii* os principais vetores (RAMIREZ; DESSEN, 1994; TADEI; DUTARY-THATCHER, 2000; FERREIRA; LUZ, 2003). Na região da Serra do Mar com cobertura de Mata Atlântica há grande quantidade de anofelinos do subgênero *Kerteszia*. Eles se desenvolvem principalmente em água acumulada nas axilas das bromélias e estão fortemente associados à transmissão da malária autóctone na região Extra-Amazônica (SALLUM et al., 2008). *An. cruzii* é a principal espécie associada à transmissão da malária autóctone no sudeste do país (ARRUDA et al., 1986) e à manutenção da malária assintomática em áreas de Mata Atlântica de São Paulo e do Rio de Janeiro (CARVALHO et al., 1988; BRANQUINHO et al.,

1997). *An. cruzii* também é vetor de *P. simium* e *P. brasilianum*, ambos causadores da malária simiana. *An. homunculus* também é considerado importante transmissor de *Plasmodium* humano no sudeste brasileiro, embora atue como vetor secundário na região (DEANE, 1992; FORATTINI, 1996; CALADO; NAVARRO-SILVA, 2005; REZENDE et al., 2009).

1.2.1 Ciclo biológico de *Plasmodium*

O ciclo de vida de *Plasmodium* possui duas fases em relação à reprodução: assexuada (no hospedeiro vertebrado) e sexuada (no vetor). A infecção começa com a picada da fêmea do mosquito *Anopheles* infectada, que realiza repasto sanguíneo para maturação de seus ovos. Os esporozoítos presentes em suas glândulas salivares são injetados no hospedeiro (Figura 4) e cerca de 70% atingem a corrente sanguínea, alcançando o fígado. O restante é eliminado pelo sistema linfático (PRUDÊNCIO et al., 2006; Cox, 2010).

Figura 4 - Fêmea do mosquito *Anopheles* injetando as formas infectantes de *Plasmodium* (esporozoítos) no hospedeiro vertebrado

FONTE: PRUDÊNCIO et al., 2006.

A invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos depende principalmente da *circumsporozoite protein* (CSP), que tem papel fundamental na interação com receptores das células do fígado. No interior dos hepatócitos inicia-se a primeira reprodução assexuada do parasito (esquizogonia hepática ou exoeritrocítica), formando milhares de merozoítos que são liberados na circulação por meio da formação vesículas denominadas merossomos (PRUDÊNCIO et al., 2006; STURM et al., 2006).

Cada merozoíto invade um eritrócito e em seu interior ocorre a segunda reprodução assexuada do ciclo (esquizogonia eritrocítica). Dependendo da espécie de *Plasmodium*, o esquizonte produz de 6 a 40 merozoítos. As manifestações clínicas da malária, como febre e calafrios, estão associadas à ruptura sincronizada das hemácias contendo os esquizontes. A maior parte dos merozoítos liberados na circulação invade outros eritrócitos, dando continuidade ao ciclo com a formação de trofozoítos, esquizontes e novos merozoítos. Entretanto, alguns trofozoítos se diferenciam em formas sexuais masculinas e femininas: os microgametócitos e macrogametócitos. Os gametócitos permanecem na corrente sanguínea e são ingeridos pela fêmea de *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Nesta etapa se inicia o ciclo de reprodução sexual do parasito. No intestino delgado do mosquito o microgametócito se divide e origina oito microgametas flagelados que fertilizam os macrogametas e formam os oocinetos. Esses atravessam a parede do intestino e transformam-se nos oocistos. Em poucos dias os oocistos se rompem liberando centenas de esporozoítos que migram para as glândulas salivares do mosquito e são injetados em outro hospedeiro vertebrado, dando continuidade à transmissão (Figura 5). Os esporozoítos de todas as espécies

de *Plasmodium* invadem os hepatócitos, entretanto *P. ovale* e *P. vivax* podem apresentar formas latentes do parasito no fígado (hipnozoítos) que podem levar às recaídas (BRASIL, 2005; ALY et al., 2009; Cox, 2010).

Figura 5 - Ciclo biológico de *Plasmodium* mostrando as fases de reprodução assexuada (hospedeiro vertebrado) e sexuada (hospedeiro invertebrado)

FONTE: http://www.scripps.edu/newsandviews/e_20021007/Mosquito_cycle.jpg

1.3 Aspectos epidemiológicos da malária

A malária está distribuída em 104 países, mas afeta principalmente o continente africano, onde são registradas 80% das infecções e 90% dos óbitos, principalmente em crianças menores de cinco anos (WHO, 2013).

1.3.1 Malária no mundo

A atual situação epidemiológica da malária classifica esta endemia como a mais disseminada doença parasitária, que coloca em risco 3,4 bilhões de pessoas no mundo (Figura 6).

Figura 6 - População mundial sob risco de adquirir malária em 2014

FONTE: <http://www.worldmalaria-report.org/>

De acordo com a OMS, em 2012 foram registrados 207 milhões de casos e 627 mil óbitos em todos os continentes. Neste período, 77% das mortes ocorreram em crianças menores de cinco anos, que com as gestantes, formam os principais grupos de risco para a malária (WHO, 2009a; 2013). MURRAY e colaboradores (2012) defendem que o cenário epidemiológico mundial da malária é muito mais grave do que o descrito pela OMS, com o número de óbitos anuais atingindo 1,24 milhões, sendo 714 mil crianças menores de cinco anos.

1.3.2 Malária no Brasil

Entre 2000 e 2011, 99,7% dos casos de malária se concentraram na Região Amazônica (Figura 7), com média de 422.858 ocorrências anuais. As infecções por *P. vivax* contribuíram com 78,7% do total (BRASIL, 2013).

Figura 7 - Áreas de transmissão de malária de baixo, médio e alto risco no Brasil em 2010

FONTE: BRASIL, 2013

Em 2011 os registros de infecções por *P. vivax* foram superiores a 86% na Região Amazônica (Figura 8).

Figura 8 – Distribuição de casos de malária por espécie de *Plasmodium* na Região Amazônica em 2011

FONTE: BRASIL, 2013

A partir de 2006 iniciou-se uma tendência de redução de casos na Região Amazônica (Figura 9). Em média, foram registradas 56.866 ocorrências a menos por ano até 2011 (BRASIL, 2013). Em 2013 ocorreram 166.864 casos na região (BRASIL, 2014a).

Figura 9 - Número de casos de malária notificados por ano entre 2000 e 2011 na Região Amazônica

FONTE: BRASIL, 2013

1.3.3 Malária na Região Extra-Amazônica

Embora a malária não seja considerada endêmica na Região Extra-Amazônica, casos autóctones são registrados em áreas cobertas pela Mata Atlântica (WANDERLEY et al., 1994). Esse bioma está distribuído em 17 estados da costa brasileira e constitui um ecossistema único, onde se localizam importantes serras, como a de Paranapiacaba e a do Mar (VELOSO et al., 1991; RIBEIRO, 2009). No período de 1999 a 2007 foram relatados 2.023 casos autóctones na Região Extra-Amazônica (BRASIL, 2008). Paraná, São Paulo e Espírito Santo notificaram 88% do total de casos em 2007 (Tabela 1).

Tabela 1 - Casos autóctones de malária registrados na Região Extra-Amazônica por Unidade Federada, no período de 1999 a 2007

Estados	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bahia	0	1	72	14	71	0	7	2	1
Ceará	0	2	0	402	4	6	5	4	1
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Espírito Santo	13	5	14	0	26	82	94	48	42
Goiás	2	24	0	5	3	7	18	1	1
Mato Grosso do Sul	1	0	133	38	9	8	4	1	2
Minas Gerais	1	0	2	1	31	3	20	3	2
Paraíba	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Paraná	47	16	27	106	11	13	11	12	60
Pernambuco	0	0	0	0	0	7	2	1	1
Piauí	3	29	13	9	20	90	17	20	6
Rio de Janeiro	1	0	0	1	19	8	8	2	3
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	2	3	2	3	0
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	1	1	0	1	2
Santa Catarina	0	0	0	0	2	2	0	0	1
São Paulo	0	3	0	4	20	13	32	77	50
Sergipe	0	0	0	0	0	1	0	0	0
TOTAL	68	80	261	580	220	245	221	176	172

FONTE: SISMAL (1999 a 2003), SINAN/SVS/MS (2004 a 2007)

Dados mais recentes apontam a ocorrência de 188 casos autóctones entre 2012 e 2013. Os estados de Espírito Santo, São Paulo e Piauí notificaram 72,3% das infecções, com 74, 43 e 19 casos, respectivamente (BRASIL, 2014b).

No Estado de São Paulo, em estudo retrospectivo realizado a partir de notificações de malária autóctone entre 1980 e 2007, foram reportados 816 casos, distribuídos conforme apresentado na Figura 10. *P. vivax* foi responsável por 97,2% das infecções e outras espécies totalizaram 2,8%, sendo 14 os casos de *P. falciparum*, cinco de *P. malariae* e três de infecção mista (*P. vivax* e *P. falciparum*). Os sintomas mais comuns foram febre (85,3%), cefaléia (72,1%) e calafrios (59,7%); 9,6% dos casos foram assintomáticos (COUTO et al., 2010).

Figura 10 - Casos de malária autóctone registrados em 13 municípios do Estado de São Paulo entre 1980 e 2007

FONTE: COUTO et al., 2010 (modificado)

Em 2006, o Estado de São Paulo notificou 77 casos autóctones, que representaram 43% do total da região sudeste, um aumento de 90% em relação ao ano anterior (BRASIL, 2008). Desse total, 39 ocorreram em área com cobertura de Mata Atlântica do município de São Paulo, no Bairro Parelheiros, que no ano seguinte apresentou 24 ocorrências. Em Juquitiba também foram registrados surtos, sendo 10 casos em 2005, 16 em 2006 e 13 em 2007. Em 2009 foram registrados 32 casos, sendo 14 em Itanhaém, quatro em São Paulo e quatro em Juquitiba (SÃO PAULO, 2011). É importante observar que entre 2005 e 2007 foram realizadas atividades de pesquisa científica por nosso grupo no município de Juquitiba. Amostras da população foram coletadas mesmo na ausência de sintomas e sinais de malária, o que possibilitou a detecção de casos assintomáticos de *P. vivax* e *P. malariae* (COSTA-NASCIMENTO et al., 2006).

O município de Juquitiba está localizado no sudeste do Estado de São Paulo, em bioma de Mata Atlântica. A região é foco de pesquisas sobre a ocorrência de *Plasmodium*, com registros de parasitemias submicroscópicas e casos de decurso clínico atípico, brando ou assintomático (BRANQUINHO et al., 1997). Nessa região, onde estudos anteriores estabeleceram a ocorrência de *P. vivax* (CARVALHO et al., 1985; 1988), nosso grupo detectou pela primeira vez infecção por *P. malariae* através de ferramentas moleculares (KIRCHGATTER et al., 2005). Ao longo das atividades desse estudo no município, 196 indivíduos foram investigados, sendo 50,5% do sexo feminino. Embora a população masculina tenha apresentado uma prevalência maior (23%) de positividade para *Plasmodium* pelo teste parasitológico (gota espessa) e/ou molecular (*nested* PCR), na população feminina a prevalência foi de 6%, taxa importante

para a caracterização da transmissão local, visto que dentre os indivíduos positivos foi observado alto percentual de infecções assintomáticas ou oligossintomáticas, estas últimas com sintomas bastante inespecíficos. Os títulos de anticorpos antiplasmodiais IgG ≥ 64 foram de 60% na população masculina e 47% na feminina. Quanto à IgM ≥ 32 , na população masculina foram de 24% e na feminina 17%. Embora o diagnóstico parasitológico aponte prevalência de *P. vivax* na região de Mata Atlântica (COUTO et al., 2010), o estudo realizado em Juquitiba com base na detecção molecular mostrou maior prevalência de *P. malariae* (3,2%) contra 1,6% de *P. vivax*, com infecções assintomáticas nas duas espécies (dados não publicados).

Os casos autóctones registrados em regiões de Mata Atlântica apresentam em geral baixas parasitemias, com quadros de curta duração que frequentemente clareiam antes mesmo de se iniciar o tratamento (CARVALHO et al., 1988). A dinâmica de transmissão de malária nessas regiões sugere a transferência vetorial de parasitos de origem simiana como *P. brasilianum* e *P. simium* ao hospedeiro humano (CURADO et al., 2006, DUARTE et al., 2008), o que pode contribuir com o perfil clínico pouco exuberante dos casos diagnosticados. Primatas não humanos dos gêneros *Alouata* e *Cebus*, são encontrados nas florestas dessa região. *P. simium* foi descrito pela primeira vez em bugio (*Alouatta fusca*) de São Paulo (DEANE, 1988; 1992).

Os vetores primários desse cenário de transmissão são *An. cruzii* e *An. bellator*, embora *An. marajoara* também possa estar envolvido. *An. cruzii* tem ocorrência principalmente nas encostas de florestas da Serra do Mar, *An. bellator* na região costeira e *An. marajoara* em áreas desmatadas (LAPORTA et al., 2011).

1.4 Malária em gestantes

As gestantes e as crianças são os principais grupos de risco para a malária no mundo. A cada ano 125 milhões de mulheres de países endêmicos engravidam, sendo a maioria de regiões da África, com intensa transmissão de *P. falciparum*. Anualmente 10 mil mulheres grávidas e 75 a 200 mil crianças morrem devido à malária gestacional (WHO, 2004; 2013; DELLICOUR et al., 2010; EIJK et al., 2012). A taxa de aborto em gestantes com a doença chega a 30% durante os quatro primeiros meses. Nas gestações que prosseguem ocorre imunossupressão materna por uma adaptação imune para impedir a rejeição do feto, com progressão mais acentuada da doença. A criança pode adquirir a parasitose no interior do útero da mulher infectada não imune devido a lesões placentárias ou no momento do parto (DI SANTI; BOULOS, 2002; WHO, 2004). Durante a gestação a imunossupressão é observada na resposta celular em função do aumento da produção de hormônios, principalmente cortisol e estrogênio (MENENDEZ, 1995). Com relação à imunidade humoral, a queda de títulos de IgG é justificada pela hemodiluição e transferência para o feto. Em áreas de baixa transmissão de *P. falciparum* as mulheres apresentam pouca ou nenhuma imunidade e geralmente sofrem episódios severos de malária, com anemia materna grave, atraso do crescimento fetal, parto prematuro, aborto espontâneo, infecção congênita e morte da mãe e da criança. Segundo dados relatados por Luxemburger e colaboradores (1997) na Tailândia, o risco de gestantes desenvolverem o quadro grave da doença foi duas a três vezes maior que o das demais mulheres do mesmo local. Em áreas de alta ou moderada transmissão de *P. falciparum* os níveis de imunidade adquirida são

significativos e os efeitos da malária tanto na mãe como no feto são geralmente menos severos. Embora gestantes dessas regiões desenvolvam infecções assintomáticas, podem ocorrer quadros de anemia materna grave. A anemia é mais comum em grávidas devido aos efeitos de diluição do volume intravascular, bem como o aumento da demanda dos estoques de Ferro e ácido fólico (WHO, 2004; 2007). Este fato, aliado à presença de parasitos na placenta, contribui para o risco de baixo peso ao nascimento por comprometer a nutrição e desenvolvimento do feto (MENENDEZ, 1995; STEKETEE et al., 1996). Na malária por *P. falciparum* este quadro é caracterizado pelo sequestro de eritrócitos infectados nas intervilosidades placentárias, mediante aderência das hemácias parasitadas ao sulfato de condroitina A (SCA) expresso pelo sinciciotrofoblasto (FRIED; DUFFY, 1996; FRIED et al., 2006). A adesão ao SCA é mediada por antígenos de superfície variantes (ASVs), expressos nos eritrócitos infectados. Parasitos placentários se ligam especificamente ao SCA e não a outros ligantes dos ASVs. Essa é a causa da maior suscetibilidade de primigestas, uma vez que elas não têm imunidade específica, pois não foram expostas a esses parasitos. Já as multigestas de áreas endêmicas apresentam imunidade adquirida devido às gestações anteriores e seus anticorpos inibem a citoaderência dos parasitos ao sinciciotrofoblasto (FIEVET et al., 2002).

P. vivax é a espécie responsável pela maioria dos casos de malária na Ásia e nas Américas, com relatos de infecções levando à morbidade em gestantes e sérias consequências, como anemia materna e baixo peso na criança (NOSTEN et al., 1999; HAY et al., 2004). Visto que esta espécie pode promover recaída durante a gestação, o risco de infecção congênita tende a aumentar. Por outro lado, como há casos de infecções assintomáticas por *P.*

vivax, este fato pode dificultar a suspeita de malária na criança (MARQUES et al., 1996; FERRARINI et al., 2009).

A distribuição geográfica das infecções por *P. malariae* em gestantes, bem como os efeitos adversos na saúde materna e do recém-nascido são desconhecidos (DELLICOUR et al., 2010). De acordo com a OMS, são necessários mais estudos para melhor definir os efeitos de *P. vivax* e *P. malariae* na saúde de mulheres grávidas e de recém-nascidos (WHO, 2004).

1.4.1 Diagnóstico de *Plasmodium* em gestantes

Walker-Abbey e colaboradores (2005) analisaram amostras de sangue periférico e placentário de gestantes de Camarões por microscopia e PCR. A gota espessa revelou 22,6% de positividade para *P. falciparum* no sangue periférico e a PCR detectou 76,1%. No sangue placentário a microscopia detectou 26,8% e a PCR 52,9%. Os casos detectados por PCR corresponderam a 82,4% de *P. falciparum*, 7,6% de *P. malariae*, 2,5% de *P. ovale* e 9,4% de infecções mistas, mostrando que a gota espessa levou a uma subnotificação de *P. malariae* e *P. ovale* em gestantes. No Quênia, Tobian e colaboradores (2000) analisaram por gota espessa a prevalência de malária no sangue materno e no cordão umbilical em gestantes, detectando *P. falciparum* apenas no sangue periférico (3,4%). Por outro lado, a PCR mostrou uma prevalência de 48% de *P. falciparum*, 25% de *P. malariae* e 24% de *P. ovale* no sangue materno e 32%, 23% e 21%, respectivamente, no cordão umbilical. Em estudo conduzido em Moçambique com amostras de 272 gestantes os ensaios ELISA e SD Bioline para detecção do antígeno HRP2 de *P. falciparum* foram

positivos em 49 (18%) e 51 (18,7%) mulheres, respectivamente, mostrando boa concordância entre os testes. Entretanto, a positividade da PCR foi de 44,8% (MAYOR et al., 2012). Desta forma, justifica-se o uso de métodos diagnósticos baseados na detecção do DNA do parasito para a identificação mais precisa das espécies de *Plasmodium* (BROWN et al., 1992; SNOUNOU et al., 1993). Técnicas complementares podem ser utilizadas para diagnóstico de casos assintomáticos em gestantes. Embora o uso de sorologia não se aplique ao diagnóstico da malária, em situações específicas esta ferramenta pode ser útil na determinação da exposição e interação parasito-hospedeiro. Junqueira e colaboradores (2007) relataram caso de infecção assintomática por *P. vivax* em gestante de Tapiraí, área de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. A sorologia materna foi reagente com antígeno de *P. vivax* para anticorpos IgM e IgG e a dos gemelares reagente para IgG. Após o parto a PCR e a gota espessa resultaram negativa para mãe e crianças, porém, o exame anátomo-placentário mostrou congestão das vilosidades e a pesquisa imuno-histoquímica para antígeno de *Plasmodium* resultou positiva, confirmando a adequação de diferentes metodologias para detecção de malária em gestantes assintomáticas. Um caso de malária congênita por *P. malariae* foi descrito nos Estados Unidos em criança com 10 semanas, com hemoglobina de 6,6 g/dL e plaquetas de 109.000/ μ L. Os pais emigraram da República Democrática do Congo cinco anos antes e negaram malária, doença febril, deslocamentos ou transfusão sanguínea após o ingresso nos Estados Unidos (CDC, 2002).

1.5 Justificativa

Segundo a OMS, são necessários mais estudos para melhor definir os efeitos de *P. vivax* e *P. malariae* na saúde de mulheres grávidas e de recém-nascidos. Estudos realizados entre 2005 e 2007 no município de Juquitiba, onde foram coletadas amostras da população mesmo na ausência de sintomas e sinais de malária, revelaram a transmissão local de *P. vivax* e *P. malariae*. Dentre os infectados foram encontrados casos assintomáticos que não seriam detectados segundo os critérios utilizados no Programa de Controle da Malária do Estado de São Paulo, que preconiza a aplicação do teste hemoscópico pela gota espessa em indivíduos com sintomas da doença. Esta transmissão, apontada como residual, apenas recentemente teve aspectos importantes esclarecidos, como a confirmação molecular das espécies envolvidas e a clara interferência da malária simiana na manutenção do cenário. Esta hipótese foi confirmada com a detecção pioneira por nosso grupo, da presença de *P. malariae* nos moradores da área em foco. Apesar da descrição destes eventos em habitantes desta área de baixa endemicidade de malária, não há dados sobre a ocorrência de infecções em coortes imunodeprimidas dessa população, como no caso de gestantes. O estudo realizado, cuja metodologia envolveu o diagnóstico padrão-ouro para detecção do parasito, ferramentas moleculares sensíveis para detecção de DNA do *Plasmodium* e técnicas imunológicas para avaliação da exposição aos plasmódios, permitiu estabelecer o perfil de gestantes da região, expostas ao risco de adquirir malária. Embora a sorologia não seja indicada para o diagnóstico da malária, em situações específicas essa ferramenta pode ser útil na investigação da resposta do hospedeiro ao

antígeno parasitário e na determinação da exposição, como descrito em gestante de Tapiraí (JUNQUEIRA et al., 2007). Os resultados obtidos com as diferentes abordagens metodológicas podem impactar diretamente nas atividades de controle da doença no Estado de São Paulo, repercutindo em outras regiões da costa brasileira com Mata Atlântica remanescente. Os resultados obtidos poderão ser disseminados nos serviços responsáveis pelo acompanhamento de gestantes, disponibilizando informações sobre a prevalência de casos nestas regiões e métodos de diagnóstico adotados para detecção de casos assintomáticos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Verificar a circulação de *Plasmodium* em gestantes residentes em áreas de baixa transmissão de malária em Juquitiba, Estado de São Paulo.

2.2 Específicos

- Investigar trimestralmente a frequência de infecção por *Plasmodium* nas gestantes por PCR em tempo real.
- Investigar a distribuição das espécies de *Plasmodium* por *nested* PCR nas gestantes positivas na PCR em tempo real.
- Investigar trimestralmente alterações nos parâmetros imunes humorais, verificando a presença de anticorpos IgG contra antígenos de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*.
- Investigar a presença de *Plasmodium* em recém-nascidos de gestantes positivas pela PCR em tempo real e/ou gota espessa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área e população do estudo

A Mata Atlântica cobre importantes áreas de 17 estados brasileiros (VELOSO et al., 1991), incluindo a Reserva da Biosfera do Cinturão Verde da Região Metropolitana de São Paulo. Essa área de preservação ambiental é considerada patrimônio da humanidade pela UNESCO e forma um ecossistema único paralelo à costa, que inclui a Serra da Mantiqueira, Serra Geral e Serra do Mar. Juquitiba é um dos 73 municípios localizados no Cinturão Verde, em Bioma de Mata Atlântica, a uma altitude de 685m e a 71 km da capital do Estado de São Paulo (Figura 11A). Possui 67% de cobertura vegetal com áreas de mata nativa preservada (Figura 11B) que são frequentadas devido ao ecoturismo, como o Parque Estadual da Serra do Mar e o Parque Ecológico de Juquitiba (RIBEIRO, 2009; PREFEITURA DE JUQUITIBA, 2011).

Figura 11 - Localização de Juquitiba, Estado de São Paulo, Brasil, (A) e imagem da cobertura vegetal em área rural do município (B)

FONTE: IBGE, 2010

Juquitiba possui 28.737 habitantes, 49,42% do sexo feminino. Anualmente são registradas cerca de 450 gestantes no município (IBGE 2010, PREFEITURA DE JUQUITIBA, 2011). A maioria realiza acompanhamento pré-natal em unidades públicas de saúde localizadas nos bairros. São cinco as Unidades de Saúde da Família (USFs) de Juquitiba: Centro (Figura 12A), Barnabés (Figura 12B), Jardim das Palmeiras (Figura 12C), Justino (Figura 12D) e Palmeiras (Figura 12E). As USFs se diferenciam em relação à infraestrutura, capacidade de atendimentos e localização geográfica (Figura 13).

Figura 12 - Unidades de Saúde da Família do município de Juquitiba: Centro (A), Barnabés (B), Jardim das Palmeiras (C), Justino (D) e Palmeiras (E), responsáveis pelo acompanhamento de gestantes em sua área de abrangência

Figura 13 - Localização geográfica das Unidades de Saúde da Família localizadas em cinco bairros do município de Juquitiba, São Paulo, Brasil

FONTE: GOOGLE mapas (modificado)

As USFs dos bairros Centro e Barnabés são maiores e realizam mais atendimentos às gestantes que as demais. Devido à localização, na USF do Centro são acompanhadas principalmente gestantes residentes na área urbana central do município, que possuem menor contato direto com regiões de mata. Por outro lado, a maior parte das gestantes atendidas na USF Barnabés reside em áreas estritamente rurais. As USFs Justino, Palmeiras e Jardim das Palmeiras se encontram no perímetro urbano e as gestantes atendidas nessas unidades residem tanto em áreas urbanas mais afastadas do centro, quanto rurais.

As gestantes que residem no bairro Centro possuem, em geral, boas condições de moradia e infraestrutura. Em relação aos outros bairros existem diferentes perfis de residências. Há casas semelhantes às do Centro, chácaras e sítios, nas quais as gestantes muitas vezes trabalham como caseiras,

pequenas casas de alvenaria localizadas em morros e barracos de madeira. Poucas residências dos bairros afastados do Centro apresentam água e esgoto encanados.

3.2 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de coorte analítico prospectivo, com amostragem não probabilística consecutiva. Foram incluídas no estudo gestantes acompanhadas pela Secretaria de Saúde de Jucituba, independentemente do trimestre da gestação em que se encontravam e foram excluídas as gestantes portadoras de doenças infecciosas. Para cada gestante foi elaborada uma ficha contendo informações sobre o seguimento das coletas (Anexo A). Todas responderam um questionário (Anexo B) com auxílio do profissional de saúde, registrando endereço, telefone, idade, estado civil, raça, história de gestação anterior, de doença infecciosa pregressa, malária pessoal e familiar e outros problemas de saúde.

3.3 Aspectos éticos da pesquisa

As coletas foram realizadas mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo C), cumprindo as determinações do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da USP e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), que aprovaram esse estudo. Foi garantida a preservação do anonimato das gestantes, bem como a conservação e utilização eticamente corretas dos

materiais e das informações obtidas, de acordo com a Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011. Todas as amostras coletadas especificamente para este estudo obedeceram aos critérios da Resolução nº 196/96, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

3.4 Coleta e processamento das amostras

As saídas de campo para coleta das amostras foram realizadas quinzenalmente pela equipe da SUCEN e Faculdade de Medicina da USP. As coletas foram feitas nas cinco USFs de Juquitiba e/ou nas residências das gestantes, por biólogas, técnicas de enfermagem e enfermeiras. Os agendamentos das primeiras coletas das gestantes foram realizados pelos funcionários das USFs, que buscaram conciliar o dia da coleta para este estudo com a data dos exames do acompanhamento pré-natal, para que fosse aproveitada a mesma punção endovenosa. As segundas e terceiras coletas, bem como as coletas pós-parto, foram agendadas pela equipe do estudo por meio de contato telefônico, para realização nas USFs ou nas residências das gestantes.

Foram coletados 5 mL de sangue venoso periférico em tubo com anticoagulante EDTA no 1º, 2º e 3º trimestres de gestação. O número de coletas variou de acordo com o momento de inclusão da gestante no estudo (Tabela 2).

Tabela 2 - Coletas de sangue periférico no seguimento trimestral de gestantes de Juititaba, São Paulo, Brasil, de acordo com o momento de inclusão no estudo

Inclusão	Coletas		
	1º trimestre	2º trimestre	3º trimestre
1º trimestre	●	●	●
2º trimestre		●	●
3º trimestre			●

Logo após a coleta, uma alíquota do material foi utilizada para dosagem de hemoglobina em Hemocue[®] e para a confecção da gota espessa. O material coletado foi armazenado a 4°C para conservação até o processamento no laboratório. Após centrifugação, o pellet de hemácias e o plasma foram aliquotados e estocados a -20°C para posterior realização dos ensaios moleculares e imunológicos. Dos recém-nascidos das gestantes positivas na PCR e/ou gota espessa foi coletada uma amostra de sangue por punção na face lateral do calcanhar para confecção da gota espessa e aplicação em papel filtro Whatman 3[®] (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA) para extração de DNA para a realização de PCR.

3.5 Exame hemoscópico por gota espessa

Foram confeccionadas duas lâminas de gota espessa por gestante. O material foi submetido à desmembrinização com azul de metileno fosfatado e coloração com Giemsa, por 7 minutos. A leitura foi realizada em microscopia de imersão (1000x), até atingir a contagem de 500 glóbulos brancos, o que

corresponde a 25 minutos de observação (WHO, 2009b). As amostras foram examinadas independentemente por dois pesquisadores, sem o conhecimento sobre o resultado dos outros ensaios.

3.6 Extração de DNA genômico

As amostras de hemácias foram lisadas com saponina a 1% (Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, EUA), obtendo-se um pellet concentrado do qual foram retirados 200µL para extração do DNA genômico com QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen[®], Hilden, Alemanha), conforme instruções do fabricante. O DNA foi eluído em 50µL de tampão e estocado a -20°C.

As amostras plotadas em papel filtro Whatman 3[®] (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA) foram extraídas com Chelex 100[®] (Bio-Rad[™], Hercules, CA, EUA), seguindo o protocolo de Plowe e colaboradores (1995).

3.7 Ensaios moleculares

Foram empregados ensaios moleculares para a detecção do DNA genômico de *Plasmodium*. A PCR em tempo real foi utilizada para triagem de todas as amostras, uma vez que amplifica fragmento gênero-específico do DNA do parasito. A *nested* PCR foi empregada para a identificação da espécie de *Plasmodium*.

3.7.1 PCR em tempo real

Foi empregado o protocolo de Lima e colaboradores (2011) para amplificação gênero-específica, tendo como alvo o gene que codifica a *ssrRNA* de *Plasmodium*. Foram utilizados *primers* M60 e M61 e sonda M62 (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequência nucleotídica dos *primers* e sonda empregados na PCR em tempo real gênero-específica

<i>Primers e sonda</i>	<i>Sequência</i>
<i>foward</i> M60	5'ACATGGCTATGACGGGTAACG3'
<i>reverse</i> M61	5'TGCCTTCCTTAGATGTGGTAGCTA3'
Sonda M62	5'FAM-TCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGA-TAMRA3'

A reação foi realizada com 2,5µL de DNA genômico, 12,5µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x, 500nM de cada primer e 300nM da sonda marcada com FAM™ e TAMRA™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Amplificação e detecção: 50°C por 2 minutos, 95°C por 15 minutos seguidos de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. As amostras foram ensaiadas em duplicata no ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems), com controle negativo (água ultrapura) e controle positivo (DNA de *Plasmodium*). O *Cycle Threshold* (Ct) foi estabelecido por meio da média $\pm$ 2 DP dos Cts obtidos com amostras de cultura de *P. falciparum* com 1 parasito/µL, empregadas como controles positivos em cada reação. Em todas as placas também foram ensaiados controles de cultura de *P. falciparum* diluídos seriadamente à razão 10, que deram origem a uma curva padrão gerada pelo Software ABI PRISM. O valor de inclinação (*slope*) da curva padrão foi utilizado para estimar a eficiência da amplificação da reação. Os valores iguais a -3,32

indicaram reações de PCR com 100% de eficiência e os mais negativos, indicaram reações com eficiência inferior.

3.7.2 Nested PCR

As amostras positivas na PCR em tempo real foram processadas por *nested* PCR (SNOUNOU et al., 1993), tendo como alvo genes da subunidade menor do RNA ribossomal (ssrRNA). A primeira reação empregou *primers* gênero-específicos rPLU5 e rPLU6 que amplificam um fragmento de 1.2 Kb. A segunda reação (*nested*), foi realizada com *primers* espécie-específicos para *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum* (Tabela 4), que amplificam um fragmento de 120 bp, 144 bp e 205 bp, respectivamente.

Tabela 4 - Sequência nucleotídica dos *primers* gênero-específicos e espécie-específicos empregados na 1ª e 2ª reações da *nested* PCR

<i>Primers</i>	Sequência
<i>forward</i> rPLU6	5'TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG3'
<i>reverse</i> rPLU5	5'CCTGTTGTTGCCTTA AACTTC3'
<i>foward</i> rVIV1	5'CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC3'
<i>reverse</i> rVIV2	5'ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA3'
<i>foward</i> rMAL1	5'ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC3'
<i>reverse</i> rMAL2	5'AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA3'
<i>foward</i> rFAL1	5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT3'
<i>reverse</i> rFAL2	5'ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC3'

A reação foi preparada com 25µL: 250nM de cada *primer*, 125µM dNTPs, 2mM MgCl₂, 50mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3, 0,4 U de *Taq* polimerase e 2µL de DNA genômico. Em todos os ensaios foram incluídos controles positivos (DNA

genômico de *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*) e negativos (água ultrapura), com: 1 ciclo de denaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 58°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos e então 24 ciclos a 94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, com um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Na segunda reação, foi utilizado 1µL do DNA amplificado obtido na primeira reação e foram realizados 30 ciclos de amplificação nas mesmas condições. Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (0,089M Trizma Base, 0,089M Ácido Bórico, 0,002M EDTA), marcador de peso molecular de 100 bp e visualizados com Brometo de Etídio através de luz UV.

3.8 Ensaios imunológicos

Foram empregados ensaios imunológicos durante o acompanhamento trimestral das gestantes para detecção de anticorpos da classe IgG. Amostras de plasma foram testadas para investigar a presença de anticorpos contra *P. vivax* e *P. falciparum* por ELISA e pelo teste imunocromatográfico SD Bioline. Imunofluorescência Indireta (IFI) foi utilizada com antígenos de formas sanguíneas de *P. malariae*.

3.8.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Foi utilizada metodologia padronizada, com modificações para a pesquisa de anticorpos IgG para *P. vivax* e *P. falciparum* (SANCHEZ et al., 1993; COELHO et al., 2007). Para os ensaios de *P. vivax*, placas Costar 3590 (Corning Inc.,

Nova Iorque, EUA) foram sensibilizadas com 50 µL/poço do antígeno recombinante His₆-PvMSP1₁₉ a 4 µg/mL em tampão carbonato (KUDÓ, 2006; COELHO et al., 2007) e para *P. falciparum*, placas *Nunc Polysorp* (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca) foram sensibilizadas com 100 µL/poço do antígeno bruto Pf-Zw a 5 µg/mL em PBS. O tempo de sensibilização foi de 2 horas a 37°C e overnight a 4°C, em câmara úmida. O bloqueio foi feito com 200 µL/poço de leite desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) a 5% em PBS (PBS-L), por 2 horas a 37°C e as amostras de plasma foram diluídas a 1/100 em PBS-L e incubadas por 30 minutos a 37°C. O conjugado anti-IgG humano produzido em cabra (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foi utilizado a 1/20.000 em PBS-L e incubado por 30 minutos a 37°C. Para revelação da reação, as placas foram incubadas com 100 µL do cromógeno 3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina (TMB)/H₂O₂ (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A reação foi interrompida após 7 minutos nos ensaios de *P. vivax* e após 10 minutos nos de *P. falciparum*, com 30µL/poço de 2N H₂SO₄ (Merck, Darmstadt, Alemanha). A leitura foi feita a 450 nm no Titertek Multiskan MCC/340 (Labsystems Diagnostics Group, Vantaa, Finlândia). Para a determinação do *cut-off* de cada reação foram construídas curvas ROC (*receiver operating characteristic*) a partir das absorbâncias de amostras de pacientes com e sem anticorpos para malária (GREINER et al., 2000; MARTINEZ et al., 2003). Para cada amostra foi calculado o índice de reatividade (IR) dividindo-se o valor da absorbância da amostra pelo *cut-off*, sendo consideradas reagentes as amostras que apresentaram IR ≥ 1.

O antígeno recombinante de *P. vivax* (His₆-PvMSP1₁₉) foi gentilmente cedido pela Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez. Foi produzido empregando-se

o plasmídeo pET14b-*PvMSP1*₁₉ (gentilmente fornecido pela Dra. Irene Silva Soares) com transformação em *E. coli* DH5 α (CUNHA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2003), seguida de transformação em *E. coli* BL21-CodonPlus[®] (DE3)-RIL (Stratagene, La Jolla, CA, EUA) para expressão proteica e subsequente purificação. *E. coli* BL21-CodonPlus[®] (DE3)-RIL inserida com o plasmídeo pET14b-*PvMSP1*₁₉ foi cultivada a 37°C em meio LB com ampicilina a 100 μ g/mL e cloranfenicol a 50 μ g/mL. Quando a densidade óptica a 600 nm atingiu 0,6-0,8, a expressão proteica foi induzida com 0,01 mM de IPTG (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) por 4 horas. Para lise das bactérias e purificação da proteína, empregou-se o kit ProBond[™] Purification System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em condições desnaturantes: lise das bactérias em tampão contendo guanidina 6M em disruptor ultrassônico; purificação por cromatografia de afinidade utilizando-se ureia 8M pH 4,0. As alíquotas coletadas foram analisadas em gel SDS-PAGE a 12% e as que continham a fração de 19 kDa foram dialisadas contra tampão 10mM Tris-HCl e Triton X-100 a 0,1%. Após a diálise foi realizada a dosagem de proteínas pelo método BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca) e os recombinantes foram conservados a 4°C até o momento do uso.

O extrato de *P. falciparum* (Pf-Zw) foi preparado com hemácias parasitadas com predominância de esquizontes obtidas em cultivo *in vitro* de *P. falciparum* (TRAGER; JENSEN, 1976). O extrato foi preparado como descrito por Coelho e colaboradores (2007), empregando como agente solubilizante Zwittergent[®] (Calbiochem, Billerica, MA, EUA) a 2% em PBS, contendo os

seguintes inibidores de proteases: aprotinina 0,5 U/mL, leupeptina 1 µg/mL, antipaina 1 µg/mL e PMSF 1 mM (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA).

3.8.2 Imunofluorescência Indireta (IFI)

A imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos IgG anti-formas eritrocitárias de *Plasmodium* foi realizada de acordo com o protocolo de Ferreira e Sanchez (1988) em lâminas multispot preparadas com antígeno de *P. malariae* de paciente primo-infectado. As amostras de plasma foram diluídas a 1/40 em PBS contendo 1% de Tween 80 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), aplicadas nas lâminas e incubadas por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Após três lavagens de 10 minutos em PBS e secagem, foi realizada incubação com o conjugado isotiocianato de fluoresceína a 1/200 (Fluoline G; BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) nas mesmas condições. As lâminas foram montadas com glicerina alcalina e observadas ao microscópio de fluorescência. Foram utilizadas amostras de plasma positivas para anticorpos IgG contra *P. malariae* e negativas, como controle em cada lâmina.

3.8.3 Teste imunocromatográfico (SD Bioline Pf/Pv)

O teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgG contra os antígenos recombinantes CSP e MSP de *P. falciparum* e *P. vivax* foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Foram aplicados 10 µL de plasma na cavidade do dispositivo, seguido de 110 µL (quatro gotas) de diluente e a

interpretação foi realizada após 15 minutos. A coloração presente na linha controle indicou se o teste funcionou corretamente.

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada empregando os programas Microsoft Excel 2013, Sigma Stat 3.5, GraphPad Prism 5.0 e GraphPad. Os níveis de significância dos testes foram fixados aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha = 0,05$). A sensibilidade e especificidade do teste ELISA e os intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) foram calculados pela curva ROC. Para a comparação entre proporções empregou-se o método de Qui-quadrado (χ^2). O teste exato de Fisher foi utilizado quando o número de amostras foi insuficiente para aplicar o χ^2 . As medianas foram comparadas pelo método de Mann Whitney Rank Sum Test (dois grupos) e análise de variância por postos de Kruskal-Wallis seguida pelo método de Dunn (três ou mais grupos). Para a comparação entre as técnicas, empregou-se o teste de McNemar. O grau de concordância entre os resultados obtidos pelas diferentes técnicas empregadas foi estimado pelo índice *Kappa* de Cohen (K) e seus IC 95%.

4. RESULTADOS

4.1 Amostras coletadas

As coletas foram realizadas nas USFs do município e/ou nas residências (Figura 14), entre outubro de 2012 e novembro de 2013. Foram incluídas no estudo 125 gestantes, distribuídas nas cinco unidades de atendimento: Centro (11), Barnabés (75), Justino (31), Palmeiras (2) e Jardim das Palmeiras (6). A idade média das gestantes foi 24,2 anos ($\pm 6,02$) e variou de 13 a 40 anos. O número de coletas realizadas durante o estudo está detalhado na Tabela 5.

Figura 14 - Coleta de sangue venoso em residência de gestante do bairro Barnabés, Jujutiba, São Paulo, Brasil

Tabela 5 – Número de coletas realizadas por Unidade de Saúde da Família (USF) durante o seguimento das gestantes de Jujutiba entre outubro de 2012 e novembro de 2013

USFs	COLETAS					TOTAL
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	Pós-parto	Recém-nascidos	
Centro	11	10	1	1	1	24
Barnabés	75	45	13	4	4	141
Justino	31	20	4	0	0	55
Palmeiras	2	2	0	0	0	4
Jd. das Palmeiras	6	1	0	0	0	7
TOTAL	125	78	18	5	5	231

Durante o seguimento, cinco crianças nascidas a termo tiveram uma amostra de sangue colhida do calcanhar para realização de gota espessa e plotagem em papel filtro para extração de DNA (Figura 15).

Figura 15 - Coleta de sangue por punção no calcanhar de bebês de gestantes com malária, residentes no bairro Barnabés, Juquitiba, São Paulo, Brasil.

A Figura 16 apresenta um fluxograma com o número de amostras processadas pelas técnicas empregadas no estudo: PCR em tempo real, *nested* PCR, gota espessa, ELISA-*P. vivax*, ELISA-*P. falciparum*, SD Bioline-*P. vivax*, SD Bioline-*P. falciparum* e IFI-*P. malariae*. O número total (n) de amostras ensaiadas representa o número de gestantes incluídas durante todo o período de seguimento.

Figura 16 - Fluxograma apresentando o número total de amostras de gestantes acompanhadas em todas as USFs de Juquitiba, São Paulo, Brasil e todos os processos realizados, com os respectivos resultados

4.2 Exame hemoscópico por gota espessa

No local da coleta foram confeccionadas duas lâminas de gota espessa por gestante (Figura 17). Das 125 amostras de primeira coleta, duas foram diagnosticadas com *Plasmodium* pela microscopia e a positividade (IC 95%) da técnica foi de 1,60% (0,44-5,65). Uma das gestantes foi positiva para *P. vivax*

(Figura 18A) e a outra para *P. malariae* (Figura 18B). Não foram encontrados parasitos em quaisquer outras amostras do seguimento destas gestantes. A parasitemia das duas gotas espessas foi de 24 parasitos/ μ L. O cálculo foi realizado através da seguinte fórmula:

$$p = \frac{\text{n}^\circ \text{ glóbulos brancos}/\mu\text{L} \times \text{n}^\circ \text{ de parasitos}/500 \text{ glóbulos brancos}}{500}$$

Figura 17 - Confecção de duas lâminas de gota espessa com sangue endovenoso colhido de gestante residente no município de Juitiba, São Paulo, Brasil

Figura 18 – Trofozoítos de *P. vivax* (A) e *P. malariae* (B) detectados em lâminas de gota espessa de gestantes residentes em Juitiba, São Paulo, Brasil. Imagem ao microscópio óptico (1000x) de sangue corado com Giemsa

4.3 PCR em tempo real e *nested* PCR

Sete gestantes apresentaram amostras amplificadas na PCR em tempo real e na *nested* PCR em uma ou mais coletas (Tabela 6). Dessas, seis faziam acompanhamento na USF Barnabés e uma na USF Centro. Considerando as 125 gestantes incluídas no estudo, a positividade (IC 95%) dos dois ensaios foi de 5,60% (1,72-9,02). Na PCR em tempo real foram consideradas positivas amostras cuja média dos valores de Ct obtidos estava abaixo de 37,28 (Figuras 19-25). Nenhum recém-nascido das gestantes positivas na PCR em tempo real apresentou amplificação de DNA genômico de *Plasmodium*.

Tabela 6 - Médias dos valores de Ct obtidos na PCR em tempo real e espécies identificadas pela *nested* PCR durante o acompanhamento das gestantes de Juquitiba, São Paulo, Brasil

Amostra	1ª coleta		2ª coleta		3ª coleta		Pós-parto	
	real time (Ct)	<i>nested</i> sp	real time (Ct)	<i>nested</i> sp	real time (Ct)	<i>nested</i> sp	real time (Ct)	<i>nested</i> sp
B 12	36,16	<i>Pv</i>	neg	neg	NR	NR	neg	neg
B 24	34,19	<i>Pm</i>	36,01	neg	37,02	<i>Pm</i>	35,98	<i>Pm</i>
B 59	36,91	<i>Pm</i>	36,34	<i>Pm</i>	35,19	<i>Pm</i>	NR	NR
B 65	33,22	<i>Pm</i>	NR	NR	NR	NR	32,39	<i>Pm</i>
B 72	35,23	<i>Pm</i>	neg	neg	NR	NR	NR	NR
C 3	neg	neg	34,14	<i>Pv</i>	32,45	<i>Pv</i>	neg	neg
B 8	neg	neg	NR	NR	NR	NR	37,06	<i>Pv</i>

NR = coletas não realizadas

Pv= *P. vivax*

Pm= *P. malariae*

Figura 19 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra B-12 em duplicata, com média dos Cts=36,16

Figura 20 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra B-24 em duplicata, com média dos Cts=34,19

Figura 21 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra B-59 em duplicata, com média dos Cts=36,34

Figura 22 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra B-65 em duplicata, com média dos Cts=33,22

Figura 23 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra B-72 em duplicata, com média dos Cts=35,22

Figura 24 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra C-3 em duplicata, com média dos Cts=34,14

Figura 25 - Amplificação por PCR em tempo real da amostra B-8 em duplicata, com média dos Cts=37,06

As amplificações do controle de 1 parasito/ μ L e das amostras da curva padrão estão indicadas na Figura 26.

Figura 26 - Amplificação das quatro amostras da curva padrão diluídas a razão 10 e do controle de 1 parasito/ μ L

Foram encontrados valores de inclinação (*slope*) que variaram de -3,32 a - 4,03 nas curvas-padrão, mostrando eficiência de 100% ou abaixo desse valor nas reações (Figura 27). É importante notar que mesmo reações com *slope* apresentando valores mais negativos, resultaram em amplificação de DNA genômico, mostrando eficiência do ensaio.

Figura 27 – Curva padrão mostrando o log da quantidade inicial de DNA (eixo-x) e Ct (eixo-y). O valor de inclinação de -3,32 representa 100% de eficiência da reação

Dentre as sete gestantes positivas, a *nested* PCR identificou três com *P. vivax* e quatro com *P. malariae* (Figuras 28 e 29). As gestantes foram tratadas de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde: dose total de cloroquina de 25 mg/kg em três dias (BRASIL, 2010). O tratamento foi realizado após a finalização dos ensaios de *nested* PCR, que definiram a espécie parasitária.

Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com amostras positivas pela *nested* PCR para *P. vivax* (B-12 e C-3), cujo fragmento amplificado é de 120 bp. Controle positivo *P. vivax* (C+), controle negativo (C-), marcador de peso molecular de 100 bp (M).

Figura 29 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com amostras positivas pela *nested* PCR para *P. vivax* (B-8), cujo fragmento amplificado é de 120 bp e para *P. malariae* (B-24, B-59, B-72 e B-65), fragmento de 144 bp. Controle positivo *P. vivax* e *P. malariae* (C+), controle negativo (C-), marcador de peso molecular de 100 bp (M).

4.4 ELISA

Por meio da curva ROC foram estabelecidos valores de *cut-off* de 0,090 para *P. vivax* (Figura 30) e 0,200 para *P. falciparum* (Figura 31).

Figura 30 - Curva ROC obtida a partir da absorbância de amostras de pacientes com gota espessa positiva (n=43) e negativa (n=43) para *P. vivax*, gerando um *cut-off* de 0,090

Figura 31 - Curva ROC obtida a partir da absorbância de amostras de pacientes com gota espessa positiva (n=30) e negativa (n=30) para *P. falciparum*, gerando um *cut-off* de 0,200

A positividade de anticorpos IgG para o antígeno recombinante His₆-PvMSP1₁₉ de *P. vivax* foi dez vezes maior do que para o antígeno bruto de *P. falciparum* nas amostras de primeira coleta (χ^2 , $P < 0,0001$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Amostras de plasma positivas nos ensaios de ELISA para anticorpos IgG contra *P. vivax* e *P. falciparum* ao longo do acompanhamento das gestantes das cinco Unidades de Saúde da Família (USFs) de Juquitiba, São Paulo, Brasil

	Coletas		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a
ELISA <i>P. vivax</i>	50/125 (40,0%)	27/78 (34,6%)	7/17 (41,2%)
ELISA <i>P. falciparum</i>	5/125 (4,0%)	5/75 (6,7%)	2/17 (11,7%)
Teste χ^2 / exato de Fisher	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P = 0,1175$

4.4.1 ELISA - *P. vivax*

Considerando as 125 gestantes incluídas no estudo, a positividade (IC 95%) pelo ensaio de ELISA-Pv foi de 44,0% (35,6-52,7). As gestantes do bairro Barnabés apresentaram maiores positivities e níveis mais elevados de anticorpos IgG ($IR \geq 1$) que as atendidas nas demais USFs (Tabela 8 e Figuras 32 a 37).

Tabela 8 – Amostras de plasma positivas por ELISA para anticorpos IgG contra *P. vivax* no acompanhamento de gestantes das Unidades de Saúde da Família (USFs) de Juquitiba, São Paulo, Brasil

USFs	1 ^a coleta	2 ^a coleta	3 ^a coleta
Centro	2/11 (18,2%)	2/10 (20,0%)	1/1 (100,0%)
Barnabés	43/75 (57,3%)	23/45 (51,1%)	5/13 (38,5%)
Justino	4/31 (12,9%)	2/20 (10,0%)	1/3 (25,0%)
Palmeiras	0/02 (0,0%)	0/2 (0,0%)	NR
Jd. das Palmeiras	1/6 (16,7%)	0/1 (0,0%)	NR
TOTAL	50/125 (40,0%)	27/78 (34,6%)	7/17 (41,2%)
Teste χ^2 / exato de Fisher*	$P < 0,0001$	$P = 0,0003$	$P = 1,000$

* Comparando USF Barnabés com as outras USFs em conjunto

NR = coletas não realizadas

Figura 32 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 1ª coleta das gestantes acompanhadas nas cinco USFs de Juitiba. Processamento por ELISA-IgG para *P. vivax*, com n=11 (Centro), n=75 (Barnabés), n=31 (Justino), n=2 (Palmeiras) e n=6 (Jd. das Palmeiras)

Figura 33 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 2ª coleta das gestantes acompanhadas nas cinco USFs de Juitiba. Processamento por ELISA-IgG para *P. vivax*, com n=10 (Centro), n=45 (Barnabés), n=20 (Justino), n=2 (Palmeiras) e n=1 (Jd. das Palmeiras)

Figura 34 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 3ª coleta das gestantes acompanhadas nas cinco USFs de Jucitaba. Processamento por ELISA-IgG para *P. vivax*, com n=1 (Centro), n=13 (Barnabés) e n=3 (Justino)

Figura 35 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 1ª coleta das gestantes acompanhadas na USF Barnabés em comparação com as outras USFs. Processamento por ELISA-IgG para *P. vivax*, com n=75 (Barnabés) e n=50 (outros)

Figura 36 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 2ª coleta das gestantes acompanhadas na USF Barnabés em comparação com as outras USFs. Processamento por ELISA-IgG para *P. vivax*, com n=45 (Barnabés) e n=33 (outros)

Figura 37 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 3ª coleta das gestantes acompanhadas na USF Barnabés em comparação com as outras USFs. Processamento por ELISA-IgG para *P. vivax*, com n=13 (Barnabés) e n=4 (outros)

4.4.2 ELISA - *P. falciparum*

ELISA com antígeno total de *P. falciparum* foi realizado em vista de reações cruzadas com outras espécies de *Plasmodium*, visto que não há relato dessa espécie na região. Das 125 gestantes, oito foram reagentes pelo ELISA-*Pf*, com positividade (IC 95%) de 6,4% (3,3-12,1). A presença de anticorpos IgG (IR $\geq$ 1) foi baixa nas amostras das cinco USFs (Tabela 9 e Figuras 38 a 43). As oito gestantes também foram reagentes por ELISA-*Pv*.

Tabela 9 - Amostras de plasma positivas por ELISA para anticorpos IgG contra *P. falciparum* no acompanhamento de gestantes das Unidades de Saúde da Família (USFs) de Juquitiba, São Paulo, Brasil

USFs	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Centro	0/11 (0,0%)	0/10 (0,0%)	0/1 (0,0%)
Barnabés	4/75 (5,4%)	5/42 (11,1%)	2/13 (15,4%)
Justino	1/31 (3,2%)	0/20 (0,0%)	0/3 (0,0%)
Palmeiras	0/2 (0,0%)	0/2 (0,0%)	NR
Jd. das Palmeiras	0/6 (0,0%)	0/1 (0,0%)	NR
TOTAL	5/125 (4,0%)	5/75 (6,7%)	2/17 (11,7%)
Teste χ^2 / exato de Fisher*	P= 0,3515	P= 0,063	P= 0,5048

* Comparando USF Barnabés com as outras USFs em conjunto

NR = coletas não realizadas

Figura 38 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 1ª coleta das gestantes acompanhadas nas cinco USFs de Juquitiba. Processamento por ELISA-IgG para *P. falciparum*, com n=11 (Centro), n=75 (Barnabés), n=31 (Justino), n=2 (Palmeiras) e n=6 (Jd. das Palmeiras)

Figura 39 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 2ª coleta das gestantes acompanhadas nas cinco USFs de Jucitaba. Processamento por ELISA-IgG para *P. falciparum*, com n=10 (Centro), n=42 (Barnabés), n=20 (Justino), n=2 (Palmeiras) e n=1 (Jd. das Palmeiras)

Figura 40 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 3ª coleta das gestantes acompanhadas nas cinco USFs de Jucitaba. Processamento por ELISA-IgG para *P. falciparum*, com n=1 (Centro), n=13 (Barnabés) e n=3 (Justino)

Figura 41 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 1ª coleta das gestantes acompanhadas na USF Barnabés em comparação com as outras USFs. Processamento por ELISA-IgG para *P. falciparum*, com n=75 (Barnabés) e n=50 (outros)

Figura 42 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 2ª coleta das gestantes acompanhadas na USF Barnabés em comparação com as outras USFs. Processamento por ELISA-IgG para *P. falciparum*, com n=42 (Barnabés) e n=33 (outros)

Figura 43 - Índices de reatividade das amostras de plasma de 3ª coleta das gestantes acompanhadas na USF Barnabés em comparação com as outras USFs. Processamento por ELISA-IgG para *P. falciparum*, com n=13 (Barnabés) e n=4 (outros)

4.5 IFI- *P. malariae*

Na imunofluorescência indireta para a pesquisa de anticorpos contra formas eritrocitárias de *P. malariae* (Figura 44) foram encontradas 19 gestantes positivas dentre as mulheres que realizaram a primeira coleta (Tabela 10), o que corresponde a uma positividade (IC 95%) de 15,20% (9,95-22,52). Quatro gestantes negativas na primeira coleta se tornaram positivas na segunda, totalizando 23 gestantes reagentes durante o seguimento completo, com positividade (IC 95%) igual a 18,40% (12,60-26,10). Dessas 23 amostras, 21 também foram positivas pelo ELISA-Pv e sete pelo ELISA-Pf.

Figura 44 - Ensaio de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos IgG contra *P. malariae*, com controle negativo (A), controle positivo (B) e duas amostras de gestantes (C e D) residentes em Juquitiba, São Paulo, Brasil

Tabela 10 - Amostras de plasma positivas na Imunofluorescência indireta para anticorpos IgG contra *P. malariae* ao longo do acompanhamento de gestantes das cinco Unidades de Saúde da Família (USFs) do município de Juquitiba, São Paulo, Brasil

USFs	Coletas		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a
Centro	0/11 (0,0%)	0/10 (0,0%)	0/1 (0,0%)
Barnabés	18/75 (24,0%)	11/47 (23,4%)	2/13 (15,4%)
Justino	1/31 (3,2%)	01/21 (4,7%)	0/3 (0,0%)
Palmeiras	0/2 (0,0%)	0/2 (0,0%)	NR
Jd. das Palmeiras	0/6 (0,0%)	0/1 (0,0%)	NR
TOTAL	19/125 (15,2%)	12/81 (14,8%)	2/17 (11,7%)
Teste χ^2 / exato de Fisher*	P= 0,0008	P= 0,0113	P= 1,000

* Comparando USF Barnabés com as outras USFs em conjunto

NR = coletas não realizadas

4.6 SD Bioline

Considerando as 125 gestantes incluídas no estudo, a positividade (IC 95%) pelo SD Bioline para detecção de anticorpos IgG contra *P. vivax* foi de 38,40% (30,3-47,1). A positividade (IC 95%) encontrada pelo SD Bioline para anticorpos contra *P. falciparum* foi de 2,40% (0,8-6,8). O número de gestantes positivas no teste durante o seguimento completo encontra-se nas tabelas 11 (SD Bioline-Pv) e 12 (SD Bioline-Pf). A Figura 45 mostra os resultados dos testes realizados com amostras de plasma de gestante que adquiriu *P. vivax*, durante o acompanhamento trimestral.

Tabela 11 - Amostras de plasma positivas no teste SD Bioline para anticorpos IgG contra *P. vivax* ao longo do acompanhamento de gestantes das cinco Unidades de Saúde da Família (USFs) do município de Juquitiba, São Paulo, Brasil

USFs	Coletas		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a
Centro	0/11 (0,0%)	0/10 (0,0%)	1/1 (100,0%)
Barnabés	43/75 (57,3%)	21/45 (46,7%)	6/13 (46,1%)
Justino	3/31 (9,7%)	1/20 (5,0%)	0/3 (0,0%)
Palmeiras	0/2 (0,0%)	0/2 (0,0%)	NR
Jd. das Palmeiras	1/6 (16,7%)	0/1 (0,0%)	NR
TOTAL	47/125 (37,6%)	22/78 (28,2%)	7/17 (41,2%)
Teste χ^2 / exato de Fisher*	P < 0,0001	P < 0,0001	P = 0,6029

* Comparando USF Barnabés com as outras USFs em conjunto

NR = coletas não realizadas

Tabela 12 - Amostras de plasma positivas no teste SD Bioline para anticorpos IgG contra *P. falciparum* ao longo do acompanhamento de gestantes das cinco Unidades de Saúde da Família (USFs) do município de Juititaba, São Paulo, Brasil

Unidade de atendimento	Coletas		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a
Centro	0/11 (0,0%)	0/10 (0,0%)	1/1 (100,0%)
Barnabés	2/75 (2,7%)	0/45 (0,0%)	0/13(0,0%)
Justino	0/31 (0,0%)	0/20 (0,0%)	0/3 (0,0%)
Palmeiras	0/2 (0,0%)	0/2 (0,0%)	NR
Jd. das Palmeiras	0/6 (0,0%)	0/1 (0,0%)	NR
TOTAL	2/125 (1,6%)	0/78 (0,0%)	1/17 (5,9%)
Teste χ^2 / exato de Fisher*	P= 0,2444	NC	P= 0,2778

* Comparando USF Barnabés com as outras USFs em conjunto

NR = coletas não realizadas

NC = não calculado

Figura 45 - Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos contra antígenos recombinantes CSP e MSP de *P.vivax* e *P. falciparum*, mostrando resultados negativos (A, B) e positivo (C) de gestante de Juititaba, São Paulo, Brasil, que adquiriu *Plasmodium* durante o acompanhamento trimestral

4.7 Aspectos clínicos

A maioria das gestantes (68,7%) (59,7-76,4) relatou um ou mais sintomas que podem estar relacionados à malária, embora não exclusivamente. Os mais relatados foram cefaleia 62,6% (53,5-70,9) e cansaço (47,0%) (38,0-56,0). Considerando que febre e tremores são sintomas característicos de malária, 14,8% (9,4-22,4) das gestantes relataram pelo menos um episódio de febre e 12,2% (7,4-19,4) tiveram tremores, sendo que algumas referiram tremores relacionados à hipoglicemia. Embora cinco gestantes (4,3%) (1,8-9,8) tenham relatado os dois sintomas, nenhuma foi positiva para *Plasmodium*. Ausência dos sintomas acima descritos foi relatada por 31,3% (23,5-40,2) das gestantes e 8,7% (4,8-15,2) não souberam responder. A dosagem de hemoglobina variou de 7,2 a 16,6 g/dL.

4.7.1 Aspectos clínicos das gestantes positivas

As sete gestantes positivas para *Plasmodium* pelo diagnóstico molecular e/ou gota espessa relataram cefaleia. Duas reportaram cansaço e uma tremores. Nenhuma gestante referiu febre durante o acompanhamento ou seis meses antes. A taxa de hemoglobina esteve dentro da normalidade (≥ 12 g/dL) durante o seguimento de seis gestantes. A gestante C-3 apresentou Hb=11,4g/dL na primeira coleta, quando a PCR e a gota espessa estavam negativas para *Plasmodium* e Hb=9,8g/dL após infecção por *P. vivax*.

4.8 Características das gestantes positivas

Gestante C-3

- Residente no Centro, trabalha como agente de saúde e se desloca por todo o município, inclusive pelas áreas rurais.
- Infectada durante a gestação, na primeira coleta apresentou resultados negativos em todos os ensaios e na segunda, PCR positivo para *P. vivax*; terceira coleta com ensaios moleculares mantendo-se positivos e aparecimento de anticorpos IgG contra *P. vivax*; no pós-parto apenas os anticorpos foram mantidos.

Gestante B-8

- Incluída no estudo dez semanas antes do parto. Apresentou PCR positivo e anticorpos para *P. vivax* apenas na coleta realizada duas semanas após o parto, indicando infecção no final da gestação ou logo após o parto.

Gestantes B-59 e B-65

- Positivas para *P. malariae* pela PCR, apresentaram títulos de anticorpos para esse parasito durante todo o seguimento; apresentaram também anticorpos para *P. vivax*, mostrando exposição anterior a esta espécie.

Gestantes B-12 e B-72

- Positivas na primeira coleta para *Plasmodium* por PCR e sorologia; nas demais coletas apenas os anticorpos foram mantidos.

Gestante B-24

- Positiva para *P. malariae* pela PCR em todas as coletas, exceto na segunda. Títulos de anticorpos foram mantidos ao longo do seguimento.

O acompanhamento das gestantes positivas em relação aos resultados das técnicas empregadas pode ser visualizado na Tabela 13.

Tabela 13 - Acompanhamento das gestantes positivas pela PCR em uma ou mais coletas, mostrando também resultados das demais técnicas empregadas. As células coloridas indicam resultados positivos

Amostra	Coleta	GE	PCR		Imunoensaios				
			real time	nested	SD Bioline Pv	SD Bioline Pf	ELISA Pv	ELISA Pf	IFI Pm
B-8	1ª								
	pós-parto			Pv					
B-12	1ª	Pv		Pv					
	2ª								
	pós-parto								
B-24	1ª			Pm					
	2ª								
	3ª			Pm					
	pós-parto			Pm					
B-59	1ª			Pm					
	2ª			Pm					
	3ª			Pm					
B-65	1ª	Pm		Pm					
	pós-parto			Pm					
B-72	1ª			Pm					
	2ª								
C-3	1ª								
	2ª			Pv					
	3ª			Pv					
	pós-parto								

4.9 Concordância entre as técnicas

Ao longo do acompanhamento das gestantes, os ensaios de ELISA-Pv e SD Bioline-Pv mostraram as maiores positivities, seguidos do IFI-Pm (χ^2 , $P < 0,05$). A concordância entre os dois ensaios que detectaram anticorpos IgG para *P. vivax*, foi considerada ‘muito boa’ ($Kappa=0,823$) como apresentado na Tabela 14.

Tabela 14 – Concordância entre os resultados dos ensaios de ELISA-*Pv* com antígeno recombinante His₆-*PMSP*₁₉ e SD Bioline-*Pv* com antígenos recombinantes CSP e MSP, considerando as 220 amostras coletadas durante o seguimento de todas as gestantes

SD Bioline- <i>Pv</i>	ELISA- <i>Pv</i>			P McNemar	Kappa	IC (95%)	
	Positivo - n (%)	Negativo - n (%)	TOTAL - n (%)			Inferior	Superior
Positivo - n (%)	71 (32,3)	5 (2,3)	76 (34,6)	<0,099	0,823	0,746	0,901
Negativo - n (%)	13 (5,9)	131 (59,5)	144 (65,4)				
TOTAL - n (%)	84 (38,2)	136 (61,8)	220 (100,0)				

Já a concordância entre os ensaios de ELISA e SD Bioline para detecção de anticorpos IgG contra *P. falciparum* foi considerada 'ruim' ($Kappa = -0,022$). A concordância entre o ensaio de ELISA-*Pf* e IFI-*Pm* apresentou índice $Kappa = 0,444$, sendo, portanto, 'moderada' (Tabela 15).

Tabela 15 – Concordância entre os resultados dos ensaios de ELISA-*Pf* com antígeno total *Pf*-Zw, SD Bioline-*Pf* com antígenos recombinantes CSP e MSP e IFI-*Pm*, considerando as 220 amostras coletadas durante o seguimento de todas as gestantes

SD Bioline- <i>Pf</i>	ELISA- <i>Pf</i>			P McNemar	Kappa	IC (95%)	
	Positivo - n (%)	Negativo - n (%)	TOTAL - n (%)			Inferior	Superior
Positivo - n (%)	0 (0,0)	12 (5,4)	12 (5,4)	<0.039	-0,022	-0,043	-0,002
Negativo - n (%)	3 (1,3)	205 (93,2)	208 (94,6)				
TOTAL - n (%)	3 (1,3)	217 (98,7)	220 (100,0)				
IFI							
Positivo - n (%)	11 (5,0)	22 (10,0)	33 (15,0)	<0,001	0,444	0,264	0,625
Negativo - n (%)	1 (0,04)	186 (84,6)	187 (85,0)				
TOTAL - n (%)	12 (5,4)	208 (94,6)	220 (100,0)				

5. DISCUSSÃO

Esse estudo demonstrou pela primeira vez a ocorrência de *Plasmodium* em gestantes residentes em área de baixa endemicidade de malária da costa sudeste do Brasil. Embora casos da doença tenham sido relatados em moradores de regiões cobertas pela Mata Atlântica (CARVALHO et al., 1985; 1988, CURADO, 1997; 2006), a presença infecções por *P. vivax* e *P. malariae* em gestantes sem histórico de qualquer deslocamento para fora do Estado de São Paulo, ainda não havia sido investigada e detectada. A maior parte dos casos de malária registrados na região Extra-Amazônica é importada de área endêmica brasileira ou de outros países (CARVALHO et al., 1988). Em 2013 foram diagnosticados pela gota espessa 691 casos nessa região, sendo 87% importados, com os sintomas clássicos da doença. Os 13% restantes eram autóctones, sendo 84% notificados nos estados do Espírito Santo, São Paulo, Piauí e Rio de Janeiro (BRASIL, 2014b). Essas ocorrências são geralmente oligossintomáticas ou assintomáticas, com baixas parasitemias e dificilmente são detectadas pela hemoscopia. O diagnóstico pela gota espessa permite diferenciação das espécies e quantificação da carga parasitária, entretanto, a sensibilidade depende da experiência do microscopista e pode variar de 5-500 parasitos/ μ L (MILNE et al., 1994; MOODY, 2002). Nesse contexto, as ferramentas moleculares baseadas na detecção do DNA do parasito devem ser consideradas no diagnóstico da doença (BROWN et al., 1992; SNOUNOU et al., 1993; LIMA et al., 2011).

No Estado de São Paulo casos autóctones foram detectados em estudos conduzidos nos litorais norte e sul. Nesses locais a malária foi associada ao contato entre o homem e a Mata Atlântica, bem como à exposição aos mosquitos do gênero *Anopheles*, cujos criadouros são as bromélias presentes

em grande quantidade nesse bioma (DEANE, 1992; CURADO et al., 2006; MARQUES et al., 2008). Cerutti e colaboradores (2007) sugerem duas hipóteses para a transmissão da doença em cenário similar ao descrito. A primeira é que pode haver um número muito maior de casos não detectados e autolimitados ou assintomáticos. A segunda envolve a presença de símios na região, que atuariam como reservatórios dos parasitos e fonte de infecção para o homem. Essa hipótese é corroborada pela detecção de casos autóctones de *P. malariae* no Estado de São Paulo em estudo conduzido por nosso grupo. É importante ressaltar que *P. malariae* que infecta humanos não pode ser diferenciado de *P. brasilianum* de símios, sugerindo uma transferência de hospedeiro (ESCALANTE et al., 1998). O mesmo ocorre em relação ao *P. vivax* e *P. simium* (ESCALANTE et al., 2005). Deane (1992) conduziu um estudo sobre a presença de símios atuando como reservatórios de *Plasmodium* no Brasil, e encontrou a maior taxa de infecção na região sudeste (35,6%), sendo 46,3% dos casos causados por *P. brasilianum* e 37,5% por *P. simium*.

Embora realizado por microscopistas experientes, o diagnóstico hemoscópico nesse estudo mostrou positividade de apenas 1,6%. A parasitemia das duas gestantes positivas pela gota espessa foi de 24 parasitos/ μ L. Esses relatos corroboram com os achados de estudo anterior, em que 61% das infecções autóctones no Estado de São Paulo apresentaram parasitemias muito baixas (COUTO et al., 2010).

Nesse estudo, a positividade dos ensaios moleculares foi 5,6%. Dentre as sete gestantes positivas seis residem no bairro Barnabés, localizado em área rural do município, próximo à Mata Atlântica. A gestante C-3, embora residente em região central, trabalha como agente de saúde em Juquitiba e

provavelmente adquiriu malária por *P. vivax* durante os deslocamentos realizados para as áreas rurais do município.

Em relação ao diagnóstico hemoscópico, *P. vivax* foi reportado como o parasito com maior prevalência na transmissão autóctone do Estado de São Paulo (CARVALHO et al., 1988; MARQUES et al., 2008; COUTO et al., 2010). Entretanto, Kawamoto e colaboradores (2002) relatam que é frequente a subnotificação de casos de *P. malariae*, em decorrência do diagnóstico equivocado como *P. vivax* pela hemoscopia. Sendo assim, em regiões onde esta espécie está envolvida na dinâmica de transmissão, ferramentas moleculares adquirem papel fundamental na diferenciação das espécies, atribuindo importância à frequência de *P. malariae*, não identificado anteriormente na região (KIRCHGATTER et al., 2005).

O presente estudo encontrou maior positividade para *P. malariae* (3,2%) do que *P. vivax* (2,4%) pela *nested* PCR. O percentual de infecções por *P. malariae* foi 3,5 vezes maior que o reportado no Espírito Santo (CERUTTI et al., 2007). Brutus e colaboradores (2013), em estudo realizado com gestantes na Bolívia, encontrou uma positividade de 7,9% de *P. vivax* em região de baixa endemidade. Em Honduras o percentual desta espécie em gestantes foi de 9,1% (RIVERA et al., 1993; BRUTUS et al., 2013).

A sorologia não se aplica ao diagnóstico da malária, mas pode fornecer dados importantes sobre a exposição ao *Plasmodium*, como descrito por Junqueira e colaboradores (2007) em gestante assintomática residente em região de Mata Atlântica do Estado de São Paulo. A paciente apresentou títulos de anticorpos IgG e IgM para *P. vivax*. Entretanto, a gota espessa e a PCR foram negativas e a presença do parasito foi detectada apenas pela análise

imunohistoquímica da placenta. Os resultados negativos pela microscopia e pela PCR podem ser explicados pelo clareamento espontâneo após o parto, descrito por Nguyen-Dinh e colaboradores (1988). O mesmo evento pode ter ocorrido em gestante acompanhada nesse estudo. *P. vivax* foi detectado pelos ensaios moleculares a partir da segunda coleta da gestante C-3, que apresentou anticorpos IgG apenas na terceira. Após o parto somente anticorpos foram detectados. A positividade do ensaio de ELISA para detecção de anticorpos IgG contra *P. vivax* foi de 44%, estando em ótima concordância com o teste imunocromatográfico SD Bioline-Pv (38,4%), o que indica alta taxa de exposição das gestantes ao parasito. É importante ressaltar que o antígeno recombinante His₆-PvMSP1₁₉ utilizado no ELISA-Pv promove uma resposta específica contra a proteína MSP1, presente no estágio intraeritrocitário do parasito. Essa resposta indica que de fato ocorreu a infecção, e não apenas a inoculação de esporozoítos, como detectado em protocolos de ELISA que utilizam o antígeno CSP.

No Estado de São Paulo, Curado e colaboradores (1997) relataram em residentes de Juquitiba, alta prevalência de anticorpos contra *P. vivax* por IFI. O percentual variou de 21% em Shangrilá a 52% em Juquiazinho. Esse resultado foi surpreendente já que a região não é considerada endêmica e apresenta baixa prevalência de casos notificados da doença. Os casos autóctones ocorreram principalmente em proprietários de casas de campo que frequentaram o local aos finais de semana e em períodos de férias. Esses indivíduos relataram sintomas de gripe, cefaleia e febre baixa e apresentaram baixos níveis de anticorpos contra *P. vivax*. Já os residentes dessas áreas, por estarem constantemente expostos aos anofelinos e a parasitos circulantes,

apresentaram altos níveis de anticorpos e sintomas menos acentuados. Estudos conduzidos em cenários similares reportaram positivities variando de 32-49% (CURADO et al., 2006) e 37,7% (CERUTTI et al., 2007) para a detecção de anticorpos IgG na IFI para *P. vivax*.

Em relação à resposta imune ao *P. malariae*, nossos dados mostram que a IFI foi reagente em 18,4% das amostras, muito semelhante às frequências de 16% e 19,3% observadas por Curado e colaboradores (2006) em parques ecológicos dos municípios de Guapiara e Iporanga, respectivamente. Esses municípios estão localizados em área de Mata Atlântica do Estado de São Paulo, com cenário semelhante ao de Juitiba. É importante destacar que no Espírito Santo a PCR mostrou positividade de 0,9% para *P. malariae*, enquanto que a IFI foi positiva em 7,9% dos moradores da região, sugerindo que indivíduos poderiam apresentar cura espontânea, ou seja, sem tratamento específico, uma vez que eles eram assintomáticos. Outra hipótese seria que o número de parasitos circulantes poderia estar abaixo do limiar de detecção até mesmo de técnicas tão sensíveis como a PCR. Os resultados obtidos com as gestantes de Juitiba mostraram maiores positivities tanto na PCR para *P. malariae* (3,2%) quanto na IFI- *Pm* (18,4%).

Os testes positivos para detecção de anticorpos contra *P. falciparum* não indicam que haja transmissão dessa espécie na região estudada. Anticorpos dirigidos contra determinada espécie de *Plasmodium* podem apresentar reações cruzadas com outras espécies desse parasito. Esse fenômeno é comum nas reações de IFI e apesar de não indicar resposta à determinada espécie, fornece dados importantes sobre a exposição de populações a antígenos plasmodiais.

É importante ressaltar que a população investigada por esse estudo é considerada uma coorte imunossuprimida, uma vez que as mulheres grávidas tem seu sistema imunológico adaptado para evitar a rejeição do feto (HUNT, 1992). Esse fenômeno é tanto específico, para manter o feto, como inespecífico, por aumentar o risco de desenvolver a doença (WEINBERG, 1984). Mayor e colaboradores (2013) compararam a resposta humoral de anticorpos IgG em gestantes infectadas com *P. falciparum* em fase aguda, crônica ou após infecção placentária e em grávidas não infectadas. Os maiores níveis de anticorpos IgG contra o parasito e contra os antígenos recombinantes testados, incluindo o *PPMSP1*₁₉, foram encontrados nas gestantes infectadas. Embora a resposta humoral em gestantes com malária seja aumentada, Riley e colaboradores (1989) relatam ocorrência de depressão da resposta imune celular, associada ao aumento da produção de hormônios essenciais para manter a gestação. O aumento dos níveis de cortisol foi detectado em mulheres grávidas que posteriormente desenvolveram parasitemia, propondo uma associação causal (VLEUGELS et al., 1987; 1989).

A baixa parasitemia e os sintomas inespecíficos observados nas gestantes positivas podem estar relacionados com a alta frequência de anticorpos IgG, indicando a constante exposição aos parasitos. Além disso, os aspectos subclínicos observados podem ser explicados pelo perfil zoonótico das infecções, com a transferência de parasitos não adaptados entre primatas e hospedeiros humanos. O comportamento de mosquitos *An. cruzii* contribui com a manutenção da transmissão, uma vez que sua dispersão vertical resulta na alimentação tanto na copa das árvores como no solo (DEANE et al., 1992).

Na área estudada foram descritas anteriormente infecções oligossintomáticas e assintomáticas por *P. vivax* e *P. malariae* (COUTO et al., 2010). Essas infecções tem impacto na transmissão da doença, visto que esses parasitos podem permanecer por longos períodos sem diagnóstico na circulação periférica. Há relatos de *P. vivax* assintomático por até cinco anos e de *P. malariae*, 44 anos (MUNGAI et al., 2001). Devido à falta de sintomas específicos de malária, casos transfusionais foram relatados em doadores que transmitiram *P. malariae* para receptores, mesmo transcorrido um longo período após deslocamento para regiões de Mata Atlântica (KIRCHGATTER et al., 2005; SCURACCHIO et al., 2011).

Os achados desse estudo tem impacto sobre a vigilância da transmissão autóctone em gestantes residentes em áreas de Mata Atlântica, com ênfase na necessidade de acompanhamento desse grupo a fim de detectar a infecção no período pré-natal. A oportunidade de diagnóstico permite o tratamento específico e interfere no ciclo de transmissão, minimizando o risco de surtos.

Considerando as baixas parasitemias e o perfil assintomático, o diagnóstico deve aplicar ferramentas muito sensíveis como PCR em tempo real e/ou *nested* PCR, uma vez que a detecção de parasitos no sangue periférico é dificultada pela baixa sensibilidade da gota espessa nesses casos.

Essa é a primeira descrição de gestantes infectadas com *P. vivax* ou *P. malariae* em área de baixa transmissão de malária autóctone da costa sudeste brasileira. Pela primeira vez foi descrito um caso de gestante dessa região que adquiriu *P. vivax* durante a gravidez, como demonstrado no acompanhamento trimestral realizado. Os resultados aqui obtidos devem incentivar outras pesquisas em áreas semelhantes, em que a transmissão poderia ocorrer sem o

conhecimento dos programas de controle. Outros aspectos sobre a relação entre gestantes e *P. vivax* e *P. malariae* devem ser estudados, como a resposta imune mediada por células e as abordagens imunohistoquímicas para investigação de malária placentária.

6. CONCLUSÕES

- Foi comprovada a ocorrência de *Plasmodium* em gestantes residentes em região de baixa transmissão de malária autóctone do Estado de São Paulo.
- Foi realizado acompanhamento trimestral das gestantes e a PCR em tempo real mostrou que 5,6% das gestantes estavam positivas para *Plasmodium*.
- Foram identificados pela *nested* PCR quatro casos de *P. malariae* e três de *P. vivax*.
- A positividade do ensaio de ELISA para detecção de anticorpos IgG contra *P. vivax* foi de 44% e do teste imunocromatográfico SD Bioline- *Pv* foi de 38,4%, indicando alta taxa de exposição das gestantes a essa espécie de *Plasmodium*. A imunofluorescência indireta para *P. malariae* mostrou positividade de 18,4%.
- Os recém-nascidos de gestantes positivas pela PCR em tempo real e/ou gota espessa não apresentaram infecção por *Plasmodium*.

7. ANEXOS

Anexo A

FICHA DE COLETA – PROJETO GESTANTES

PROTOCOLO DE PESQUISA: Ocorrência de *Plasmodium* e suas consequências em gestantes residentes em áreas de baixa transmissão de malária no Estado de São Paulo.

1. DADOS RESUMIDOS DA GESTANTE

NOME: _____ DATA NASCIMENTO: ____/____/____
 RG: _____ ENDEREÇO: _____
 Nº _____ COMPLEMENTO _____ BAIRRO: _____ CIDADE: _____
 FONE: DDD (____) _____ CEL: DDD (____) _____

2. PRIMEIRA COLETA - 1º TRIMESTRE de gestação (1 a 12 semanas).

Local da coleta _____ Data: ____/____/____

- ☐ A. Sangue venoso em tubo com EDTA
☐ B. Sangue venoso em tubo seco
☐ C. Sangue periférico em papel filtro
☐ D. Realizada a Gota Espessa
☐ E. Nenhuma coleta realizada

Não foi/foram realizada(s) a(s) coleta(s) _____ Motivo _____

Tempo gestacional _____

Hemoglobina _____

Sintomas/Observações: _____

3. SEGUNDA COLETA - 2º TRIMESTRE de gestação (13 a 28 semanas).

Local da coleta _____ Data: ____/____/____

- ☐ A. Sangue venoso em tubo com EDTA
☐ B. Sangue venoso em tubo seco
☐ C. Sangue periférico em papel filtro
☐ D. Realizada a Gota Espessa
☐ E. Nenhuma coleta realizada

Não foi/foram realizada(s) a(s) coleta(s) _____ Motivo _____

Tempo gestacional _____

Hemoglobina _____

Sintomas/Observações: _____

4. TERCEIRA COLETA - 3º TRIMESTRE de gestação (29 a 40 semanas).

Local da coleta _____ Data: ____/____/____

- ☐ A. Sangue venoso em tubo com EDTA
☐ B. Sangue venoso em tubo seco
☐ C. Sangue periférico em papel filtro
☐ D. Realizada a Gota Espessa
☐ E. Nenhuma coleta realizada

Não foi/foram realizada(s) a(s) coleta(s) _____ Motivo _____

Tempo gestacional _____

Hemoglobina _____

Sintomas/Observações: _____

5. QUARTA COLETA – Parto.

Local da coleta _____ Data: ____/____/____

- ☐ A. Sangue venoso em tubo com EDTA
- ☐ B. Sangue venoso em tubo seco
- ☐ C. Sangue periférico em papel filtro
- ☐ D. Sangue do cordão umbilical
- ☐ E. Fragmento da Placenta
- ☐ F. Realizada a Gota Espessa
- ☐ G. Sangue do calcanhar do recém-nascido
- ☐ H. Nenhuma coleta realizada

Não foi/foram realizada(s) a(s) coleta(s) _____ Motivo _____

Tempo gestacional _____

Hemoglobina _____

Sintomas/Observações: _____

OBSERVAÇÕES:

6. QUINTA COLETA - RECÉM-NASCIDO (3 semanas após nascimento)

Local da coleta _____ Data: ____/____/____

- ☐ A. Sangue do calcanhar do recém-nascido para GE
- ☐ B. Sangue periférico em papel filtro
- ☐ C. Não foi realizada a coleta. Motivo _____

Peso do recém-nascido _____ kg

Anexo B

Questionário - Gestantes		
Projeto de Pesquisa "Ocorrência de <i>Plasmodium</i> e suas consequências em gestantes residentes em áreas de baixa transmissão de malária no Estado de São Paulo"		
Pesquisador responsável: Silvia M. Di Santi		
1. Nome:		
2. Idade:		
3. Nome da mãe:		
4. Estado civil:		
5. Raça/Cor:		
6. Tempo de gestação (semanas):		
7. Faz acompanhamento pré-natal desde o início?	SIM	NÃO
8. Já teve gestação anterior a essa?	SIM	NÃO
9. Se sim, quantas?		
10. Já teve aborto espontâneo?		
11. Já teve problema no parto?	SIM	NÃO
12. Se sim, qual (is)?		
13. Tem história familiar de problemas no parto?		
14. Tem alguma doença infecciosa?	SIM	NÃO
15. Se sim, qual(is)?		
16. Tem diabetes?		
17. Tem pressão alta?	SIM	NÃO
18. Assinalar se nos últimos seis meses apresentou:		
Febre	SIM	NÃO
Tremores	SIM	NÃO
Dor de cabeça	SIM	NÃO
Cansaço	SIM	NÃO
19. Já teve malária?	SIM	NÃO
20. Se sim, quantas vezes?		
21. Alguém da sua família já teve malária?		
22. Outras observações:	SIM	NÃO
22. Data do preenchimento deste questionário: ____/____/____		
Nome/assinatura do responsável pelo preenchimento		

Anexo C

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE: CEP: FONE: DDD(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE: CEP: FONE: DDD(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Ocorrência de *Plasmodium* e suas consequências em gestantes residentes em áreas de baixa transmissão de malária no Estado de São Paulo.

PESQUISADOR: Sílvia Maria Di Santi CARGO: Pesquisador Científico INSCRIÇÃO CRBio: 01078-01

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO (x) RISCO MÉDIO () RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses.

1 – Estas informações estão sendo fornecidas para convidá-la a participar de modo voluntário neste estudo, que quer verificar se há parasitos da malária no sangue de gestantes que residem em locais onde há casos desta doença. O estudo vai acompanhar gestantes de Juquitiba e Tapirai, SP, a cada três meses durante toda a gestação e no parto. Será preenchido um questionário com o auxílio do profissional de saúde com alguns dados como idade, estado civil, raça, história de gestação anterior, história de doença infecciosa, malária pessoal e familiar e outros problemas de saúde como diabetes, pressão alta e história familiar de problemas no parto. A senhora tem o direito de recusar-se a responder se considerar que as perguntas são constrangedoras.

2 – Serão feitos exames de sangue para ver se há parasitos. Alguns exames são diferentes daqueles usados para diagnóstico de malária como rotina, e os resultados somente serão conhecidos no final do estudo.

3 – A cada três meses serão coletados dois tubos de sangue da veia do antebraço, sendo um de 5 mL (aproximadamente uma colher de sopa rasa) e outro de 10mL (aproximadamente duas colheres de sopa rasa), e todo o material utilizado é descartável. Após o parto será coletada uma amostra da placenta (um pedacinho de 2cm³, mais ou menos do tamanho de uma uva) e uma amostra de sangue de 15 mL do cordão umbilical. Uma amostra de sangue (aproximadamente 10 gotas) do calcanhar do recém-nascido será coletada aproveitando a picada feita para o “teste do pezinho”.

4 – A senhora sentirá o desconforto da picada da agulha no momento da coleta do sangue, que será realizada por profissional capacitado; em poucos casos, pode ocorrer desmaio, mancha roxa e inchaço no local da picada, que desaparecem sozinhos.

[Digite texto]

Rubrica da gestante/representante legal: _____

Rubrica do responsável: _____

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

2

5 – Embora não haja benefício direto para a participante, no final do estudo poderemos concluir se houve benefício para as gestantes que residem nestes locais onde tem malária.

6 – Não há outro procedimento que possa ser vantajoso para a senhora optar quanto à coleta de sangue.

7 – Em qualquer etapa do estudo a senhora poderá entrar em contato com a profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, que é a Dra. Silvia M. Di Santi, que pode ser encontrada na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 1º andar, Núcleo de Estudos em Malária, tel. 3061-7019 ou 3081-8039. Se a senhora tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455 Cerqueira César-São Paulo-SP, CEP: 01246-903, Fone/Fax: (11) 3061-8004, e-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br ou cep.fm@usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu acompanhamento na Instituição. Neste caso, sua amostra será destruída.

9 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras gestantes, não sendo divulgada a identificação de nenhuma.

10 – A senhora terá o direito de ser mantida atualizada sobre os resultados parciais da pesquisa.

11 – Não há despesas pessoais para a senhora em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há pagamento financeiro por sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Esta amostra será utilizada para este estudo, sendo que parte dele será realizado no exterior, seguindo as normas para remessa de material biológico para fora do país. O armazenamento de sua amostra de sangue para uso em outros projetos no futuro, bem como os resultados deste trabalho seriam úteis para realizar pesquisas sobre outros assuntos que sejam interessantes para conhecer melhor a doença, sem necessidade de colher novas amostras, mesmo que seja daqui a muitos anos. Sua amostra será guardada em um Biorrepositório, no Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN/Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, de forma segura e adequada, sob a responsabilidade da Dra. Silvia Maria Di Santi. A senhora pode concordar ou não que a amostra seja armazenada para estudos posteriores, com a garantia que estes serão submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa. Se a senhora não concordar com o armazenamento, sua amostra será descartada. Para escolher, indique uma das alternativas abaixo:

☐ Não concordo ☐ Concordo

No caso de concordar, a senhora será contatada para consentir ou não que sua amostra seja utilizada em outros estudos, mediante outro Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

13 – Em caso de morte, seus familiares ou outros que a senhora indicar poderão decidir sobre o destino do material armazenado: _____

14 – O estudo é considerado de risco mínimo, porém a senhora será indenizada por quaisquer danos decorrentes da pesquisa.

15 – Este Termo de Consentimento é redigido em duas vias, sendo que uma fica com o pesquisador responsável e a outra será entregue à senhora.

[Digite texto]

Rubrica da gestante/representante legal: _____

Rubrica do responsável: _____

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

3

“Estou ciente das informações que li ou que foram lidas para mim, sobre o estudo “Ocorrência de *Plasmodium* e suas consequências em gestantes residentes em áreas de baixa transmissão de malária no Estado de São Paulo”. Eu discuti com pelo menos um dos responsáveis sobre minha decisão em participar do estudo. Ficaram claros para mim seus propósitos, os procedimentos a serem realizados, desconfortos e riscos, garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho acesso a tratamento hospitalar quando necessário, com o compromisso do responsável que terei assistência e acompanhamento por danos decorrentes da pesquisa. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço”.

Assinatura da gestante/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Para casos de gestantes analfabetas, semi-analfabetas ou portadoras de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desta gestante ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

[Digite texto]

Rubrica da gestante/representante legal: _____

Rubrica do responsável: _____

REFERÊNCIAS

- Aly AS, Vaughan AM, Kappe SH. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol.* 2009; 63:195-221.
- Arruda M, Carvalho MB, Nussenzweig RS, Maracic M, Ferreira AW, Cochrane AH. Potential vectors of malária and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *Am J Trop Med Hyg.* 1986; 35: 873-881.
- Branquinho MS, Marrelli MT, Curado I, Natal D, Barata JM, Tubaki R, Carréri-Bruno GC, de Menezes RT, Kloetzel JK. Infection of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium vivax* variant VK247 in the municipalities of São Vicente and Juquitiba, São Paulo. *Rev Panam Salud Publica.* 1997; 2:189-193.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. 112 p. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2005.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf (acesso em 25 de maio de 2012). Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária. Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2010.

Brasil. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011 - Vol. 44 nº1. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2013.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica-Malária. Boletim malária. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2014a.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: http://public.tableausoftware.com/views/RotinaExtra/1_Serie_ano?:embed=y#1(acesso em 18 de fevereiro de 2014). Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2014b.

Brown AE, Kain CK, Pipithkul J, Webster HK. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* undetected by conventional microscopy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992; 86:609-612.

Bruce-Chwatt LJ. Transmission of Malaria. 75th Anniversary of Ronald Ross's Great Discovery. *BMJ.* 1972; 3:464-466.

Brutus L, Santalla J, Schneider D, Avila JC, Deloron P. *Plasmodium vivax* malaria during pregnancy, Bolivia. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:1605-1611.

Calado DC, Navarro-Silva MA. Identification of *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzei* Dyar & Knab and *Anopheles* (*Kerteszia*) *homunculus* Komp (Diptera, Culicidae, Anophelinae) by molecular markers (RAPD and RFLP). *Rev Bras Zool.* 2005; 22:1127-1133.

- Carvalho ME, Glasser CM, Ciaravolo RMC, Santos LA. Nota sobre o encontro de casos autóctones de malária *vivax* por meio de técnica sorológica, em São Paulo. *Cad Saúde Públ.* 1985; 1:250-252.
- Carvalho ME, Glasser CM, Ciaravolo RMC, Etzel A, Santos LA, Ferreira CS. Sorologia de malária *vivax* no foco Aldeia dos Índios, município de Peruíbe, Estado de São Paulo, Brasil, 1984 a 1986. *Cad Saúde Públ.* 1988; 3:276-292.
- CDC. Congenital malaria as a result of *Plasmodium malariae* - North Carolina, 2000. *MMWR.* 2002; 51:164-165.
- Cerutti CJR, Boulos M, Coutinho AF, Hatab MC, Falqueto A, Rezende HR, Duarte AM, Collins W, Malafronte RS. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malar J.* 2007; 6:33.
- Coelho JS, Soares IS, Lemos EA, Jimenez MC, Kudó ME, Moraes SL, Ferreira AW, Sanchez MCA. A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous detection of malaria, Chagas disease, and syphilis-specific IgG antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 58:223-230.
- Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium ovale*: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 570-581.
- Costa-Nascimento MJ, Toniolo CR, Lima GF, Araújo RAS, Kirchgatter K, Wunderlich G, Di Santi SM. Malária autóctone em Região de Mata Atlântica do Estado de São Paulo: benignidade ou risco oculto? In: Resumos do III

- Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia (CSPP). 13 de outubro, 2006. São Paulo, Brasil. *Parasitol Saúde Ambiental*. 2006; 1-1.
- Couto RD, Latorre MRDO, Di Santi SM, Natal D. Malária autóctone notificada no Estado de São Paulo: aspectos clínicos e epidemiológicos 1980 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43:52-58.
- Cox, FEG. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. (review). *Cox Parasites & Vectors*. 2010; 3:5.
- Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS, Shamsul SSG, Matusop A, Atnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. *P. knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*. 2008; 46:165-171.
- Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉, expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine*. 2001; 20:385-396.
- Curado I, Duarte AM, Lal AA, Oliveira SG, Kloetzel JK. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*/*P. brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92:235-243.
- Curado I, Dos Santos Malafronte R, de Castro Duarte AM, Kirchgatter K, Branquinho MS, Bianchi Galati EA. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. *Acta Trop*. 2006; 100:54-62.

- Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1988; 38:223-230.
- Deane LM. Simian malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992; 87:1-20.
- Dellicour S, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW, ter Kuile FO. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: A Demographic Study. *PLoS Med.* 2010; 7:1.
- Di Santi SM, Boulos M. Protozoários – Malaria. In: EB Cimerman, S Cimerman. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais.* São Paulo: Atheneu; 2002. p.139-155.
- Duarte AM, Malafronte RS, Cerutti C Jr, Curado I, de Paiva BR, Maeda AY, Yamasaki T, Summa ME, Neves DV, Oliveira SG, Gomes AC. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop.* 2008; 107:179-185.
- Eijk AM, Hill J, Povall S, Reynolds A, Wong H, ter Kuile FO. The Malaria in Pregnancy Library: a bibliometric review. *Malar J.* 2012; 11:1-12.
- Escalante AA, Cornejo OE, Freeland DE, Poe AC, Durrego E, Collins WE, Lal AA. A monkey's tale: the origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102:1980-1985.
- Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:8124-8129.

Ferrarini MAG, Lazzetti AV, Ferreira S, Di Santi SM, Wigman LT, Silveira MBV.

Malária congênita: descrição de um caso e revisão da literatura. *Pediatrics Moderna*. 2009; 45: 140-145.

Ferreira AW, Sanchez MCA. Malária humana: Padronização e otimização de testes sorológicos para diagnóstico individual e inquéritos epidemiológicos.

Rev Inst Med trop Sao Paulo. 1988; 30:137-146.

Ferreira, EI. *Malária - Aspectos gerais e quimioterapia*. São Paulo: Atheneu; 1982.

Ferreira MU, FORONDA AS, SCHUMAKER TTS. *Fundamentos Biológicos da parasitologia humana*. São Paulo: Manole; 2003.

Ferreira SR, Luz N. Malária no estado do Paraná – aspectos históricos e prognose. *Acta Biol Par*. 2003; 32: 129-156.

Fievet N, Tami G, Maubert B, Moussa M, Shaw IK, Cot M, Holder AA, Chaouat G, Deloron P. Cellular immune response to *Plasmodium falciparum* after pregnancy is related to previous placental infection and parity. *Malar J*. 2002; 1:16.

Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. Biting activity and blood-seeking parity of *Anopheles (Kerteszia)* in South-Eastern Brazil. *Rev. Saúde Pública*. 1996; 30:107-114.

França TCC, Santos MG, Figueroa-Villar JD. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quim Nova*. 2008; 31:1271-1278.

- Fried M, Domingo GJ, Gowda CD, Mutabingwa TK, Duffy PE. *Plasmodium falciparum*: chondroitin sulfate A is the major receptor for adhesion of parasitized erythrocytes in the placenta. *Exp Parasitol*. 2006; 113: 36-42.
- Fried M, Duffy PE. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science*. 1996; 272:1502–1504.
- Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Me*. 2000; 45:23-41.
- Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4:327–336.
- Hunt JS. Immunobiology of pregnancy. *Curr Opin Immunol*. 1992; 4:591-596.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. São Paulo: IBGE; 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/tabelas_pdf/total_populacao_sao_paulo.pdf. (acesso em 24 de maio de 2013).
- Junqueira FM, Tangerino JC, Silva MV, Rocha MCP, Nogueira SLR, Nascimento LGG, Carvalho M, Kirchgatter K, Araújo RAS, Lima GFMC, Nascimento MJC, Di Santi SM, Duarte MIS. Malária em gestante do município de Tapiraí SP - Relato de caso. In: Resumos do XLVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (CSBMT). 11-15 de março, 2007. São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40:143.

- Kawamoto F, Win TT, Mizuno S, Lin K, Tantulart IS, Mason DP, Kimura M, Wongsrichanalai C. Unusual *Plasmodium malariae*-like parasites in southeast Asia. *J Parasitol.* 2002; 88:350-357.
- Kirchgatter K, Nogueira SL, Padilha A, Curado I, Boulos M, Di Santi SM. Lethal malaria caused by *Plasmodium malariae* in an splenic patient in Brazil. *BMJ.* 2005; 331:576b.
- Kudó ME. *Níveis e avidéz de anticorpos IgG específicos para a porção de 19kDa da região C-terminal da proteína-1 de superfície de merozoítos de P. vivax (MSP1₁₉) em grupos populacionais expostos à malária* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2006.
- Laporta GZ, Ramos DG, Ribeiro MC, Sallum MA. Habitat suitability of *Anopheles* vector species and association with human malaria in the Atlantic Forest in south-eastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106:239-245.
- Lima GFMC, Levi JE, Geraldi MP, Sanchez MCA, Segurado AAC, Hristov AD, Inoue J, Costa-Nascimento MJ, Di Santi SM. Malaria diagnosis from pooled blood samples: comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunoassay as a platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large -scale. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106:691-700.
- Luxemburger C, Ricci F, Nosten F, Raimond D, Bathet S, White NJ. The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997; 91: 256-262.
- Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cadernos Saúde Coletiva.* 2003; 11:7-31.

- Marques HH, Vallada MG, Sakane PT, Boullos M. Malária congênita. Descrição de casos e breve revisão da literatura. *Jornal de Pediatria*. 1996; 72:103-105.
- Marques GRAM, Condino MLF, Serpa LLN, Cursino TVM. Aspectos epidemiológicos de malária autóctone na mata atlântica, litoral norte, Estado de São Paulo, 1985 – 2006. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41:386-389.
- Matos, MR. *Malária em São Paulo - Epidemiologia e História*. São Paulo: Funcraf; 2000.
- Mayor A, Moro L, Aguilar R, Bardají A, Cisteró P, Serra-Casas E, Sigaúque B, Alonso PL, Ordi J, Menéndez C. How hidden can malaria be in pregnant women? Diagnosis by microscopy, placental histology, polymerase chain reaction and detection of histidine-rich protein 2 in plasma. *Clin Infect Dis*. 2012; 54:1561-1568.
- Mayor A, Kumar U, Bardají A, Gupta P, Jiménez A, Hamad A, Sigaúque B, Singh B, Quintó L, Kumar S, Gupta PK, Chauhan VS, Dobaño C, Alonso PL, Menéndez C, Chitnis CE. Improved pregnancy outcomes in women exposed to malaria with high antibody levels against *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis*. 2013; 207: 1664-1674.
- Menendez C. Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. Review. *Paras Today*. 1995; 11:178–183.
- Milne LM, Kyi MS, Chiodini PL, Warhurst DC Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J Clin Pathol*. 1994; 47:740-742.
- Moody A. Rapid diagnostic test for parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15:66-78.

- Mungai M, Tegtmeyer G, Chamberland M, Parise M. Transfusion-transmitted malaria in the United States from 1963 through 1999. *N Engl J Med*. 2001; 344:1973-1978.
- Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2012; 379:413-431.
- Nosten F, McGready R, Simpson JA, Thwai KL, Balkan S, Cho T, Hkirijaroen L, Looareesuwan S, White NJ. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Lancet*. 1999; 354:546–549.
- Nguyen-Dinh P, Steketee RW, Greenberg AE, Wirima JJ, Mulenda O, Williams SB. Rapid spontaneous postpartum clearance of *Plasmodium falciparum* parasitaemia in African women. *Lancet*. 1988; 2:751-752.
- Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 1995; 52:565-568.
- Prefeitura de Juquitiba, 2011. Disponível em: <http://www.juquitiba.sp.gov.br> (acesso em 24 de maio de 2013).
- Prudêncio M, Rodríguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoítos: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Rev Microb*. 2006; 4:849-856.
- Ramirez CCL, Dessen EMB. Cytogenetic analysis of a natural population of *Anopheles cruzii*. *Rev Bras Genét*. 1994; 17:42-46.

- Rezende HR, Soares RM, Cerutti-Junior C, Alves IC, Natal D, Urbinatti PR, Yamazaki T, Falqueto A, Malafronte RS. Caracterização entomológica e infecção natural de anofelinos em área de Mata Atlântica, com casos autóctones de malária, em regiões montanhosas do Espírito Santo. *Neotrop Entomol.* 2009; 38:127-131.
- Rey, Luís. *Bases da Parasitologia Médica*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Ribeiro WC. Governança da reserva da biosfera do Cinturão verde da cidade de São Paulo. *Rev Geograf UFC*. 2009; 16:29-32.
- Riley EM, Schneider G, Sambou I, Greenwood BM Suppression of cell-mediated immune responses to malaria antigens in pregnant Gambian women. *Am J Trop Med Hyg*. 1989; 40:141-144.
- Rivera AJ, Rivera LL, Dubon JM, Reyes ME. Effect of *Plasmodium vivax* malaria on perinatal health. *Revista Honduras Pediátrica*. 1993;16:7-10
- Rodrigues MHC, Cunha MG, Machado RLD, Ferreira Jr OC, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* using recombinant of the merozoite surface protein-1. *Malaria J*. 2003; 2:39-45.
- Sallum MAM, Urbinatti PR, Malafronte RS, Resende HR, Cerutti-Junior C, Natal D. Primeiro registro de *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp (Diptera, Culicidae) no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Rev Bras Entomol*. 2008; 52:671-673.
- Sanchez MCA, Avila SLM, Quartier-Oliveira VP, Ferreira AW. Malaria serology: performance of six *Plasmodium falciparum* antigen extracts and of three

ways of determining serum titers in IgG and IgM-ELISA. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993; 35:495-502.

SÃO PAULO 2011. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/malaria_cautoctone.htm. (acesso em 24 de maio de 2013).
São Paulo (SP): Secretaria de Estado da Saúde; 2011.

Scuracchio P, Vieira SD, Dourado DA, Bueno LM, Colella R, Ramos-Sanchez EM, Lima GC, Inoue J, Sanchez MCA, Di Santi SM. Transfusion transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring *Plasmodium malariae*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2011; 53:55-59.

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; 58:283-289.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006; 313:1287-1290.

Steketee RW, Wirima JJ, Campbell CC. Developing effective strategies for malaria prevention programs for pregnant African women. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 55:95-100.

Tadei, WP, Dutary-Thatcher B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2000; 42:87-94.

- Tobian AA, Mehlotra RK, Malhotra I, Wamachi A, Mungai P, Koech D, Ouma J, Zimmerman P, King CL. Frequent umbilical cord-blood and maternal-blood infections with *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, and *P. ovale* in Kenya. *J Infect Dis.* 2000; 182:558-563.
- Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 1976; 193:673-675.
- Veloso HP, Rangel-Filho ALR, Lima JCA. *Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal.* Rio de Janeiro: Fundação IBGE; 1991.
- Vleugels MP, Eling WM, Rolland R, de Graaf R. Cortisol and loss of malaria immunity in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1987; 94:758-764.
- Vleugels MP, Brabin B, Eling WM, Graaf R. Cortisol and *Plasmodium falciparum* infection in pregnant women in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989; 83:173-177.
- Walker-Abbey A, Djokam RRT, Eno A, Leke RFG, Titanji VPK, Fogako J, Sama G, Thuita LH, Beardslee E, Snounou G, Zhou A, Taylor DW. Malaria in pregnant cameroonian women: the effect of age and gravidity on submicroscopic and mixed-species infections and multiple parasite genotypes. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 3:229-235.
- Wanderley DMV, Silva RA, Andrade JCR. Aspectos epidemiológicos da malária no Estado de São Paulo, Brasil, 1983 a 1992. *Rev Saúde Públ.* 1994; 28: 192-197.
- Weinberg ED. Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. *Rev Infect Dis.* 1984; 6:814-831.

WHO. World Health Organization. A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the African Region. Brazzaville. Regional Office for Africa (AFR/MAL/04/01). 2004; 27 p.

WHO. World Health Organization. Malaria in Pregnancy. Guidelines for measuring key monitoring and evaluation indicators. 2007; 44 p.

WHO. World Health Organization. World Malaria Report 2009. (WHO/HTM/GMP). 2009a; 66 p.

WHO. World Health Organization. Malaria Microscopy Quality Assurance Manual. 2009b; 149 p.

WHO. World Health Organization. World Malaria Report 2013. (WHO/HTM/GMP). 2013; 253 p.