FABIANA MARIA DE SOUZA LEORATTI

Resposta imune humoral na malária
humana: quantidade e qualidade de
anticorpos anti-*Plasmodium falciparum*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiopatologia
Experimental da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientador: Dra. Sandra do Lago Moraes

SÃO PAULO
2004

"Nada acontece por acaso.
Não existe a sorte.
Há um significado por detrás
de cada pequeno ato.
Talvez não possa ser visto
com clareza imediatamente,
mas sê-lo-á antes que
se passe muito tempo."

Richard Bach

À Deus,

por nunca me desamparar nos momentos mais difíceis da vida. Conduzir-me com amor e sabedoria, deixando-me trilhar mais suave nesta longa jornada da vida.

À MINHA MÃE querida Rosa Maria pela dedicação, força, amor e a esperança de uma vida melhor. Mostrando que vale a pena lutar pelos nossos ideais e acreditar que sempre exista uma solução para tudo em nossas vidas.

À MINHA DINDA Iolanda, ao **SEU ESPOSO** Marcos e também ao **FILHO** deles, Luís Eduardo, pela amizade incondicional e mostrando que as grandes batalhas na vida são enfrentadas com humildade e muito amor.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e incentivo...

À minha orientadora Sandra do Lago Moraes pela oportunidade dada para a realização deste trabalho, carinho, afeto, apoio e ensinamentos. Conduzindo-me com amor nesta longa jornada científica, mostrando que é possível construir e concretizar um sonho.

Ao Dr. Antônio Walter Ferreira pela amizade, pelos ensinamentos e um exemplo a seguir...

Ao Dr. Cristóvão Luis Pitangueira Manguiera, Flávia Cristina Kinskowski e a Milca Geane de Lamos Valim por participarem na realização deste trabalho.

Ao grupo da Prof^a. Dra. Maria das Graças Alecrim por terem cedido às amostras de malária complicada.

Aos membros da Banca de Qualificação Dra. Adelaide José Vaz, Dra. Irene Soares e Dr. Magnus Gidlund pelas sugestões dadas durante o Exame de Qualificação.

À minha querida amiga Sandra Trevisan Beck que iluminava o nosso laboratório com alegria.

À minha querida Kelly Aparecida Kanunfre, pela paciência e carinho comigo e minha mãe nos momentos de nossas vidas.

Aos meus queridos amigos Adriano Cappellazzo Coelho e Erika Hellena Esther Hoffmann da biologia molecular pelo companheirismo e pela amizade.

À Dra. Maria Carmem Arroyo Sanchez, pelas criteriosas correções de português da minha tese, paciência e carinho esses anos de convivência.

Às meninas do Laboratório de Malária, Janaina Bezerra Miranda, Melissa Bastos, Amanda Farage Frade, Mônica Kudó, Patrícia Araújo, Elaine Antunes Lemos, Juliana Coelho, Kelly Dias Coura, pelos momentos agradáveis e descontraídos vividos nesses últimos anos, aprendendo a cada dia um pouquinho sobre a convivência humana. E agora temos uma nova companheira Guita Rubinsky Elefant que se tornou uma amiga. Também ao Flávio Augusto Alves que fez parte deste laboratório, mesmo apesar de uma breve passagem.

À Sônia Pedrozo Gomes, bibliotecária do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – IMT/SP pela disposição em sempre ajudar-me na procura de tantos artigos para a realização deste trabalho.

A todo pessoal do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia do IMT/SP, Paulo, Ione, Artur, Renato, Eunice, Débora, Rogério, Mussya, Juliana, Selma, Edite, Sueli, Dr. Paulo César Cotrim, Mariko, Edna, Fábio, Fabrício, Maria Paulina, Célia, Márcia, Prianti, Ângelo, Beatriz, Dr. Hiro Goto.

A todos que de algum modo me incentivaram e contribuíram na realização deste trabalho.

Muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Laboratório de Investigação Médica (LIM-48) da Faculdade de Medicina.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	VII
UNIDADES DE MEDIDA	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVII
I. INTRODUÇÃO.....	19
1. Malária – A história.....	20
2. Malária – O agente etiológico.....	21
3. Malária – Distribuição no mundo.....	25
4. Malária – Características epidemiológicas.....	27
5. Malária – Doença	29
6. Imunidade naturalmente adquirida.....	31
6.1. Imunidade específica no estágio pré-eritrocítico.....	32
6.2. Imunidade no estágio eritrocítico sexuado.....	34
6.3. Imunidade no estágio eritrocítico assexuado.....	34
Resposta humoral no estágio eritrocítico assexuado.....	36
7. Polimorfismo do gene do receptor FcγRIIA ¹³¹	47
II. OBJETIVOS.....	51
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
1. Áreas de Estudo.....	54
1.1. Peixoto de Azevedo, MT.....	54
1.2. Manaus, AM.....	55

2. Casuística.....	55
3.Aspectos éticos da pesquisa.....	58
4. Antígenos de <i>P. falciparum</i>	58
4.1. Manutenção de <i>P. falciparum</i>	58
4.2. Cultivo de <i>P. falciparum</i>	59
4.2.1.Preparo do extrato antigênico somático de <i>P. falciparum</i>	60
5. Obtenção de Anticorpos.....	61
6. Obtenção de Conjugados.....	61
6.1. Conjugado enzimático proteína – peroxidase.....	61
6.2. Conjugado proteína – biotina.....	62
7. Pesquisa de subclasses de IgG anti-formas eritrocitárias de <i>P.falciparum</i>	63
7.1.Padronização do ELISA.....	63
7.2. Estudo da Afinidade Funcional ou Avidéz das Subclasses de IgG anti- <i>P. falciparum</i>	64
8. Pesquisa de anticorpos IgE antiformas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i>	65
8.1. Escolha do conjugado anti-IgE humana.....	65
8.2. Padronização do ELISA – IgE.....	67
9. Pesquisa de Anticorpos IgM anti – <i>P. falciparum</i>	69
9.1.Otimização do ELISA – IgM Indireto.....	69
10.Pesquisa de anticorpos IgA anti – <i>P. falciparum</i>	71
10.1.Otimização do ELISA –IgA.....	71

11.Determinação de IgE e IgA Totais.....	73
11.1.IgE total.....	73
11.2.IgA total.....	73
12. Determinação do polimorfismo do gene do receptor FcγRIIA ¹³¹	74
12.1. Método de Extração de DNA com Fenol/ Clorofórmio.....	74
12.2. Oligonucleotídeos.....	75
12.3. Amplificação por PCR.....	75
12.4. Eletroforese em Gel de Agarose.....	76
12.5. Digestão do produto de PCR com enzima de restrição.....	76
12.6.Eletroforese em Gel de Agarose.....	77
13. Análise Estatística dos Resultados	77
IV. RESULTADOS.....	79
1.Padronização dos Testes Imunoenzimáticos para a Pesquisa de Diferentes Classes e Subclasses de anticorpos anti- <i>P. falciparum</i>	80
1.1. Subclasses de IgG.....	80
1.2. Anticorpos IgE.....	81
1.3. Anticorpos IgM.....	83
1.4. Anticorpos IgA.....	84

1.5. Outras patologias testadas nos ELISAs.....	85
2. Quantidade e Qualidade dos Anticorpos.....	86
2.1. Anticorpos IgG e subclasses de IgG	87
2.2. Anticorpos IgE, IgM, e IgA.....	100
2.3. Determinação do perfil de resposta humoral em diferentes formas clínicas da malária.....	107
3. Determinação do Polimorfismo do Receptor $Fc\gamma$ RIIA H/R ¹³¹	116
V. DISCUSSÃO.....	119
VI. CONCLUSÕES.....	138
VII. ANEXOS.....	141
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148

ABREVIATURAS

ACCD	Citotoxicidade Dependente de Anticorpos
ADCI	Antibody-dependent Cellular Inhibition
ASLO	Anticorpos anti-estreptolisina O
CDC	“Center Disease Control”
CSA	Sulfato de Condroitina A
CSP	Proteína circumsporozoíta
DMF	dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	desorribonucleosídeos Trifosfatos
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
ELISA	“Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay”- ensaio imunoenzimático
FAN	Fator anti-núcleo
FR	Fator Reumatóide
GLURP	Proteína rica – glutamato
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
IA	Índice de Aidez
IFN- γ	Interferon- γ
IFN- α	Interferon- α
NOS	Óxido nítrico sintase
IR	Índice de Reatividade
KCl	Cloreto de Potássio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MSP-1	Proteína de Superfície do Merozoíta-1
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHB ₄	Boridreto de sódio
NaHCO ₃	Carbonato de Sódio
NaIO ₄	Metaperiodato de Sódio
NK	<i>Natural killer</i>

NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	“Phosphate Buffer Saline” – solução salina tamponada com fosfato
PBS-Tw20	PBS contendo Tween 20 0,05%
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR	Proteína C Reativa
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
PIACM	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária
PM	Matriz peritrófica
Pm	<i>Plasmodium malariae</i>
PMSF	Fluoreto de metilsufonila
Pv	<i>Plasmodium vivax</i>
QBC [®]	Quantitative Butty Coat
qsp	quantidade suficiente para
RESA	Antígeno da Superfície do Eritrócito Infectado por Trofozoítos jovens
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SLR	Soro Limiar de Reatividade
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador- β
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TRAP	Trombospondina
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
TSP	Trombospondina
UAR	Unidade de Alto Risco
UV	Luz ultravioleta

UNIDADES DE MEDIDA

bp	par de base
<i>g</i>	aceleração da gravidade ($\cong 9,8\text{m/s}^2$)
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
μg	micrograma
μL	microlitro
N	normal
ng	nanograma
U	Unidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	23
Figura 2	Possíveis mecanismos de clareamento de eritrócitos infectados por <i>P. falciparum</i> mediados por anticorpos citofílicos	42
Figura 3	Estruturas e características dos diferentes receptores para a região Fc de IgG (FcγR)	48
Figura 4	Frequências dos anticorpos IgG e das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> de baixa avidéz e de alta avidéz no total de indivíduos (n=270) de área endêmica de malária e agrupados entre os indivíduos infectados por plasmódios (INF) (n=233) e os não infectados (NÃO INF) (n=37) testados no ELISA.	91
Figura 5	Frequências de amostras de soro positivas para anticorpos IgG e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> no ELISA no total de 270 indivíduos e considerando a presença ou não de infecção por <i>Plasmodium</i> distribuídas entre os grupos de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores (>5) (n=138), de uma a cinco malárias anteriores (1 a 5) (n=86) e de primo-infectados (primo) (n=30).	94
Figura 6	Comparação dos níveis dos anticorpos IgG (em índice de reatividade (IR)) e das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> (em concentração, µg/mL) entre os grupos de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores (>5) (n=138), de uma a cinco malárias anteriores (1 a 5) (n=86) e de primo-infectados (primo) (n=30) obtidos no ELISA.	96
Figura 7	Comparação dos níveis de avidéz (IA) dos anticorpos IgG e das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> entre os grupos de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores (>5) (n=138), de uma a cinco malárias anteriores (1 a 5) (n=86) e de primo-infectados (primo) (n=30) obtidos no ELISA.	99

Figura 8	Frequências de amostras de soros positivas anticorpos IgM, IgA e IgE anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> no ELISA no total de 270 indivíduos e considerando a presença ou não de infecção por <i>Plasmodium</i> distribuídas entre os grupos de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores (>5) (n=138), de uma a cinco malárias anteriores (1 a 5) (n=86) e de primo-infectados (primo) (n=30).	104
Figura 9	Comparação dos níveis dos anticorpos IgM (IR) e IgA (IR) e de IgE (µg/mL) anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> entre os grupos de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores (>5) (n=138), de uma a cinco malárias anteriores (1 a 5) (n=86) e de primo-infectados (primo) (n=30) obtidos no ELISA.	105
Figura 10	Frequências dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> no ELISA com 233 amostras de soro de indivíduos com malária, 70 com complicações clínicas por malária (MC), 148 sem complicações clínicas (MNC) e 15 assintomáticos (AS).	108
Figura 11	Frequências das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e de IgG anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> de baixa avidéz e de alta avidéz divididas entre os indivíduos com malária complicada (MC) (n=70), indivíduos sem complicações clínicas por malária (MNC) (n=148) e indivíduos infectados assintomáticos (AS) (n=15) testados no ELISA.	110
Figura 12	Distribuição dos níveis dos anticorpos IgG (IR) e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (µg/mL) anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> no ELISA, entre os indivíduos com malária complicada (MC) (n=70), indivíduos sem complicações clínicas por malária (MNC) (n=148) e indivíduos com malária assintomáticos (AS) (n=15).	112
Figura 13	Distribuição dos níveis dos anticorpos IgM (IR), IgA (IR) e IgE (µg/mL) anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> no ELISA, entre os indivíduos com malária complicada (MC) (n=70), indivíduos sem complicações clínicas por malária (MNC) (n=138) e indivíduos com malária assintomática (AS) (n=15).	113

Figura 14	Resultados individuais da pesquisa de anticorpos IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE divididos pela forma clínica de malária: malária complicada (n=70), malária não complicada (n=148) e malária assintomática (n=15).	114
Figura 15	Resultados da digestão do produto de PCR digerido com a enzima de restrição <i>Bsh1236I</i> (FnuDII) de algumas amostras com a presença ou ausência do polimorfismo no receptor $Fc\gamma$ RIIA H/R ¹³¹ .	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados da padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti- <i>P. falciparum</i> em 12 amostras de soros positivos e 12 negativos para anticorpos IgG anti- <i>P. falciparum</i> .	81
Tabela 2	Resultados do ELISA para pesquisa de anticorpos IgE específicos com conjugados anti-IgG humana peroxidase (α -IgG-Po), anti-IgE humana marcado com peroxidase (α -IgE-Po), anti-IgE humana marcada com biotina (α -IgE-B).	82
Tabela 3	Frequências de amostras de soro de indivíduos com outras patologias positivas nos ELISA para pesquisa de diferentes classes e subclasses de anticorpos anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> .	85
Tabela 4	Resultados das medianas dos níveis e da avidéz dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> obtidos no ELISA com 270 amostras de soro de indivíduos de área endêmica de malária.	89
Tabela 5	Resultados das frequências de amostras de soros positivas no ELISA para anticorpos IgG e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> no total de 270 indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária e agrupadas pelos resultados da pesquisa de plasmódios pela gota espessa e QBC®.	90
Tabela 6	Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman e das probabilidades que foram significantes a 95% quando correlacionados variáveis preditoras de exposição à malária (idade, número de episódios anteriores de malária) e os níveis de anticorpos IgG e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias e os respectivos níveis de avidéz no ELISA.	93

Tabela 7	Resultados das frequências (%) de positivos e dos índices de reatividade (IR) (em mediana) de anticorpos IgM, IgA e IgE anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> obtidos no ELISA com amostras de soros de indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária divididos pelos resultados da pesquisa de plasmódios pela gota espessa e QBC [®] .	100
Tabela 8	Resultados das medianas dos níveis de anticorpos IgE anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> no ELISA com 238 amostras de soro de indivíduos de área endêmica de malária.	101
Tabela 9	Interações entre os níveis de diferentes classes e subclasses de anticorpos anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> entre os grupos de indivíduos com malária complicada, com malária não complicada e com malária assintomática.	115
Tabela 10	Resultados do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG2 anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i> divididos nos grupos de indivíduos positivos para <i>Plasmodium</i> por <i>Nested-PCR</i> sintomáticos e assintomáticos e com (H/H ou H/R) e sem (R/R) o polimorfismo no receptor Fc γ RIIA H ¹³¹ , determinado por PCR após digestão com enzima de restrição alelo específica.	117

RESUMO

LEORATTI, F. M. S. **Resposta imune humoral na malária humana: quantidade e qualidade de anticorpos anti – *Plasmodium falciparum*.** São Paulo, 2004. p.165 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A aquisição de imunidade na malária é lenta e para ser mantida requer a exposição a variantes antigênicas múltiplas dos plasmódios e a maturação do sistema imune com a idade. Muitos dos estudos da resposta imune humoral na malária se concentraram na avaliação da especificidade antigênica da resposta, mas evidências de que a imunidade protetora estaria associada à mudança de classes e subclasses dos anticorpos mostraram a importância de se considerar a qualidade dos anticorpos produzidos, que envolve a afinidade da porção F_{ab} pelo antígeno e a natureza da região F_c que determina a função do anticorpo.

Neste estudo determinamos o padrão de resposta imune humoral específica de indivíduos naturalmente expostos à malária residentes em área endêmica no Brasil. As classes IgG, IgM, IgE, IgA e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum* foram determinadas por teste ELISA usando como antígeno formas eritrocitárias de *P.falciparum*. Os resultados foram analisados em função (a). da presença ou não de infecção por plasmódios; (b). de variáveis preditoras de exposição à malária como idade, número de episódios anteriores de malária e tempo de permanência na área endêmica; (c) de diferentes formas clínicas da malária, malária complicada (MC), não complicada (MNC) e assintomática (AS).

Maiores níveis de anticorpos IgG, IgG1, IgG2 e IgG3 foram observados nos indivíduos não infectados do que nos indivíduos infectados e o oposto foi observado para IgG4. Os resultados dos anticorpos também foram avaliados em relação ao número de episódios anteriores de malária, e os níveis de IgG1, IgG2 e IgG3 foram maiores nos indivíduos que relataram mais de 5

malárias, enquanto os níveis de IgM, IgA e IgE foram maiores nos indivíduos primo-infectados.

Entre os indivíduos com melhor resposta à infecção, ou seja, sem complicações de malária ou assintomáticos, foi observado o predomínio dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2 de alta avidéz e IgG3 de baixa avidéz. Já os indivíduos com complicações clínicas por malária apresentaram o predomínio de anticorpos IgG4, IgE e IgM.

Também determinamos em parte da população o polimorfismo H131 do gene do receptor Fc γ RIIA que permite a ligação à F_c de IgG2 humana, conferindo assim a capacidade citofílica a essa subclasse. A alta frequência (67,9%) encontrada e os maiores níveis de IgG2 nos indivíduos infectados assintomáticos que carregavam o polimorfismo, sugere o papel protetor de IgG2 nesta população.

Nossos resultados mostram que mesmo em populações de regiões com transmissão instável de malária pode ser observado o desenvolvimento de um certo grau de imunidade protetora quando anticorpos apropriados são produzidos.

ABSTRACT

LEORATTI, F. M. S. **Humoral immune response in human: quantity and quality anti-*Plasmodium falciparum* antibodies.** São Paulo, 2004. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

The development of protective immunity against malaria is slow and to be maintained requires to the exposure to multiple antigenic variants malaria parasites and age-associated maturation of the immune system. Many studies in the humoral immune response have focused on the antigenic specificity of the response. But evidences that the protective immunity is associated to different classes and subclasses antibodies show the importance to consider the quality of the response, which involves both the affinity of the F_{ab} receptor for the antigen and the nature F_c region, which determines antibody function.

In this study, we have evaluated the humoral immune response of naturally exposed individuals to malaria living in endemic areas of Brazil. We determined IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 IgM, IgE, IgA antibodies against *Plasmodium falciparum* blood stages by ELISA. The results were analyzed in function of: (a) presence or not of *Plasmodium* infection ; (b) factors related to prior malaria exposure such as age, number of previous clinical malaria attacks and the time living in malaria endemic areas; (c) different forms of malaria such as, complicated , uncomplicated and asymptomatic.

The highest levels of IgG, IgG1, IgG2 and IgG3 antibodies were observed in infected individuals than uninfected individuals and the opposite was observed to IgG4 antibodies. Individuals reporting more than five previous clinical malaria attacks have showed predominance of IgG1, IgG2 and IgG3 antibodies, while individuals reporting five or less previous clinical malaria showed predominance of IgM, IgA and IgE antibodies.

Among individuals with uncomplicated and asymptomatic malaria was observed predominance of high-avidity IgG, IgG1,IgG2 antibodies and low-

avidity IgG3 antibodies in levels and frequencies, while IgG4, IgE and IgM antibodies were predominant in individuals with complicated malaria.

Since our results have pointed to a protective role of IgG2 antibodies and IgG2 can act as cytophilic antibodies in individuals carrying the H131 polymorphism of the Fc γ IIA receptor, we also investigated the occurrence of this polymorphism in part of the population. We found the H131 polymorphism in 67,9% of the individuals, and the highest IgG2 levels were observed among asymptomatic individuals carrying this allele, suggesting the protective role of IgG2 in this population.

Taken together the results showed that even in unstable transmission of malaria it with can be observed of protective immunity against malaria when antibodies appropriated are produced.

I. INTRODUÇÃO

1. MALÁRIA - A História

A malária originou-se provavelmente na África há milhões de anos e se espalhou para regiões tropicais, subtropicais e temperadas do Velho Mundo através das migrações e então para o Novo Mundo com os exploradores, missionários e escravos. Há 4700 anos atrás, um cânone da medicina chinesa *Nei Ching* referiu-se a ocorrências epidêmicas de episódios febris e o aumento do baço, que provavelmente se tratava de malária. Episódios febris são relatados também em manuscritos de outras civilizações como grega, romana, assíria, indiana, árabe (BRUCE-CHWATT, 1985; CARTER & MENDIS, 2002; COX, 2002).

Estas febres intermitentes receberam o nome de malária, em decorrência da associação entre a doença e os miasmas provenientes de áreas alagadas que tinham “maus ares”, no italiano “mal’aria”, pois se acreditava que a doença era transmitida através do ar (BRUCE-CHWATT, 1985).

O primeiro evento importante na história da malária foi a descoberta da “Cinchona” para o tratamento das febres, no século XVII. Seu uso se espalhou rapidamente por toda Europa e era conhecida pelo nome de “pó dos jesuítas”. Apenas em 1820 *Pelletier* e *Caventou* isolaram os alcalóides, quinino e cinchonina (BRUCE-CHWATT, 1985; KNELL, 1991).

O parasita da malária foi visto pela primeira vez em 1880, por um cirurgião militar francês, *Alphonse Laveran*, que estava procurando por uma causa bacteriana da malária em necropsias de pacientes e imediatamente percebeu

que os parasitas eram os responsáveis pela doença (KNELL, 1991; COX, 2002).

Em 1897, *Ronald Ross* em Secunderabad na Índia, provou que mosquitos *Culex* transmitiam a malária aviária e demonstrou o ciclo de vida completo do parasita utilizando como modelo, a malária aviária. Esta descoberta levou *Ross* à conclusão de que a malária humana poderia ser transmitida da mesma maneira (KNELL, 1991; DOBSON, 1999).

No mesmo ano, os malariologistas italianos *Giovanni Battista Amico Bignami* e *Giuseppe Bastianelli* conduziram seus experimentos na transmissão da malária humana, mostrando o ciclo de vida completo do parasita e que os mosquitos anofelinos eram os responsáveis pela transmissão da doença (DOBSON, 1999).

2. MALÁRIA - O AGENTE ETIOLÓGICO

A malária é uma doença infecciosa causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, da família *Plasmodiidae*, filo *Apicomplexa*, que infecta alternadamente um hospedeiro vertebrado e um hospedeiro invertebrado. O gênero *Plasmodium* foi definido baseando-se no ciclo de vida do parasita (Figura 1), com uma fase de reprodução sexuada seguida por três fases de reprodução assexuada. A fase sexuada (fertilização) ocorre no lúmen do estômago do mosquito e a primeira fase assexuada (esporogonia), no epitélio do estômago e corpo do mosquito *Anopheles*; as outras duas fases ocorrem em um hospedeiro vertebrado, a segunda fase ocorre no fígado

(esquizogonia exoeritrocítica) e a terceira fase ocorre na circulação sangüínea (esquizogonia eritrocítica) (KNELL, 1991).

Os esporozoítos são transmitidos ao hospedeiro vertebrado pela picada da fêmea do gênero *Anopheles* e caem rapidamente na circulação sangüínea até chegarem aos hepatócitos. Recentes descobertas demonstraram que os esporozoítos passam por vários hepatócitos antes da invasão e o subsequente desenvolvimento hepático (MOTA *et al*, 2001). O processo de invasão envolve proteínas de superfície do esporozoíto, como domínios de trombospondina na proteína circumsporozoíta (CSP) e a proteína relacionada à adesão à trombospondina (TRAP) e moléculas de superfície do hospedeiro vertebrado (FUJIOKA *et al*, 2002; WEATHERALL *et al*, 2002). Estes domínios ligam-se especificamente a sulfato de proteoglicanos nos hepatócitos no endotélio sinusoidal e nas células de Kupffer (MILLER *et al*, 2002). Após a invasão, os esporozoítos se transformam em trofozoítos hepáticos que amadurecem e formam milhares de merozoítos, os quais são liberados na circulação sangüínea e invadem os eritrócitos, iniciando a fase eritrocítica. No caso de *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos não se desenvolvem e podem formar um estágio dormente, chamado hipnozoíto, que pode permanecer no fígado por semanas a anos, e quando reativado provoca recidivas da doença.

No ciclo eritrocítico, os merozoítos passam por um processo de amadurecimento para formação de trofozoítos, que realizam várias divisões para formação de esquizontes. Os esquizontes rompem os eritrócitos e assim recomeça uma nova invasão nos eritrócitos. Concomitantemente, uma

pequena proporção de merozoítos diferencia-se em gametócitos macho e fêmea. Estes, ao serem ingeridos pelo mosquito se transformam em gametas e ocorre a fertilização no lúmen do estômago do mosquito com a formação dos oocinetos. Os oocinetos atravessam duas barreiras, a matriz peritrófica (PM) e o epitélio do estômago, para a formação dos oocistos, que passam por um processo complexo de desenvolvimento para a produção de milhares de esporozoítos e chegam à glândula salivar do mosquito (BRUCE-CHWATT, 1985; FUJIOKA *et al*, 2002). Quando o mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, carregando esporozoítos nas glândulas salivares, se alimentar novamente, irá infectar outro hospedeiro e desta maneira iniciará um novo ciclo.

Figura. 1. Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* infectantes ao homem (adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov>)

Existem aproximadamente 156 espécies de plasmódios, mas somente quatro espécies são infectantes ao homem: *P. vivax*, descrito por Grassi e Feletti em 1890, *P. falciparum* descrito por Welch em 1897, *P. malariae* descrito por Laveran em 1881 e *P. ovale* descrito por Stephens em 1922. Vários nomes foram dados à doença causada por esses parasitas de acordo, com o tipo de febre intermitente que ocasionavam, como terçã benigna, terçã simples ou somente terçã para *P. vivax*; terçã para *P. ovale*; quartã para *P. malariae* e maligna terçã, subterçã, perniciosa, tropical para *P. falciparum*. Atualmente esses nomes não são mais utilizados (BRUCE-CHWATT, 1985).

Plasmodium vivax é uma espécie amplamente distribuída no mundo ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais e raramente em regiões temperadas. *P. falciparum* predomina na África e sudeste da Ásia. Estas duas espécies coexistem em muitas partes do mundo, mas *P. vivax* é raro no oeste da África. *P. malariae* tem uma prevalência menor que no passado, com distribuição limitada à África e mais raramente no Oeste Pacífico e na América do Sul. *P. ovale* é o que tem a mais limitada distribuição, restringindo-se à África sub-saariana e à Ásia e sendo sabidamente endêmico somente na Papua Nova Guiné e Filipinas (CARTER & MENDIS, 2002).

3. MALÁRIA – DISTRIBUIÇÃO NO MUNDO

A malária ainda é a maior endemia do mundo e um grande obstáculo ao desenvolvimento econômico de comunidades e nações. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde de 1998, 40% da população mundial habitam áreas de risco da doença, que causa de 300 a 500 milhões de casos clínicos por ano, com mais de um milhão de mortes, principalmente de crianças com menos de cinco anos de idade. Embora a África detenha 90% dos casos, a globalização da doença é um fato atual que preocupa autoridades dos países desenvolvidos.

A malária é também uma doença re-emergente em áreas onde estava sob controle ou erradicada, como em repúblicas da Ásia Central e na Coreia (WHO, 2003). Nos últimos anos, o número de casos de malária tem aumentado em países onde a doença não é endêmica, devido à mobilidade de populações, como viajantes, migrantes, tropas e refugiados, caracterizando a chamada malária importada. Um estudo realizado nos países da União Européia, no período de 1999 a 2000, mostrou a incidência de 1.659 casos de malária *falciparum* importada. Destes, 27 apresentavam infecção mista (*P. falciparum* e *P. vivax* em 11 casos, *P. falciparum* e *P. ovale* em 10 casos e *P. falciparum* e *P. malariae* em 6 casos). Cinco indivíduos morreram após retornarem de países africanos (JELINEK *et al*, 2002). Nos Estados Unidos ocorrem em média 1.300 casos de malária importada ao ano (www.ahcpub.com).

Casos de malária transfusional também têm sido relatados em diferentes partes do mundo. Nos Estados Unidos, a incidência de casos notificados de

malária transfusional, no período de 1963 a 1999, foi de 93 indivíduos, dos quais 10 morreram (6 por *P. falciparum*, 2 por *P. vivax* e 2 por *P. malariae*) (MUNGAI *et al*, 2001). Em países onde existem áreas com diferentes situações epidemiológicas de malária (sem transmissão, baixa transmissão e alta transmissão), como o Brasil, o risco de malária transfusional é considerável devido ao fluxo de populações, porém a sua real incidência é desconhecida (SAÉZ-ALQUÉZAR *et al*, 1998).

As campanhas de erradicação realizadas no Brasil a partir da década de 40 fizeram cair de seis milhões de casos estimados anualmente, na década de 1940, para 52.469 casos em 1970. O aumento gradual que aconteceu, para a Região Amazônica, a partir de então foi decorrente das migrações de populações atraídas inicialmente pelos projetos de colonização, construção de rodovias e hidrelétricas, mineração e agricultura (DEANE, 1988).

Em 2000, os últimos dados oficiais relataram 615.245 casos de malária no Brasil, sendo que mais de 99% dos casos ocorreram na Região Amazônica. Em 2001, registraram-se 388.807 casos de malária, representando uma redução de cerca de 40%. Esta redução de casos de malária foi decorrente da implantação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM) pelo Ministério da Saúde, desencadeando uma série de ações na região Amazônica (FUNASA, 2003).

Os números alarmantes de casos de malária e a complexidade dos fatores relacionados ao controle levaram a OMS a realizar em outubro de 1992, em Amsterdã-Holanda, uma Conferência Ministerial em Malária. Nessa conferência foi elaborada uma declaração mundial em relação ao

controle da doença, apontando quatro elementos básicos que deveriam ser aplicados a qualquer local independente das condições existentes:

- Diagnóstico precoce e tratamento rápido;
- Planificação e implementação de medidas preventivas e seletivas, incluindo o controle do vetor;
- Detecção, controle e prevenção de epidemias;
- Reforço da capacidade local em pesquisa básica e aplicada aliada a uma avaliação regular da situação da malária em nível nacional (WHO, 1992).

Em outubro de 1998, a OMS lançou uma campanha global intitulada “Roll back malaria” (RBM), traduzida para o português como “Retroceder a Malária”, que tem como objetivo buscar um maior comprometimento não apenas do setor de saúde, mas também dos setores governamentais e privados onde as atividades pudessem, direta ou indiretamente, afetar a situação da malária, de organizações não-governamentais e das próprias comunidades afetadas. Com as ferramentas disponíveis e o desenvolvimento de novas pretende-se diminuir a mortalidade causada pela malária em 50% até o ano 2010 (WHO, 1999).

4. MALÁRIA – CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

A Organização Mundial da Saúde definiu quatro diferentes situações epidemiológicas, para avaliar a prevalência de malária em uma definida população (KNELL, 1991):

- Hipoendêmica: índice esplênico que menor 10%. Transmissão da malária é baixa e poucos efeitos na população.
- Mesoendêmica: índice esplênico entre 11 e 50%. É típica em vilas rurais e zonas subtropicais.
- Hiperendêmica: índice esplênico maior que 50% em crianças e acima de 25% em adultos. Transmissão é intensa, mas sazonal.
- Holoendêmica: índice esplênico em crianças é maior que 75%, mas baixo em adultos. A transmissão é intensa e contínua.

Atualmente, tem sido mais usada a classificação de endemicidade da malária no mundo em três categorias (segundo MACDONALD, 1957): malária endêmica estável, malária endêmica instável e malária epidêmica. As diferenças na estabilidade da transmissão da malária são conseqüências das características biológicas das espécies e comportamentais dos vetores *Anopheles* e também do meio ambiente nas diferentes regiões (CARTER & MENDIS, 2002).

Malária endêmica estável ocorre em regiões onde a população está continuamente exposta a uma taxa constante de inoculação de parasitas por mosquitos infectados; é comum na África sub-saariana. O principal vetor da doença é *A. gambiae*. A transmissão estável é mantida pelo contato homem-mosquito e devem-se considerar também as condições climáticas, calor e umidade com poucas flutuações que favorecem a longevidade e o rápido desenvolvimento dos parasitas no interior dos mosquitos.

Na malária endêmica instável, a população está sujeita a grandes flutuações nas taxas de inoculação dos parasitas. A transmissão é focal,

sazonal e relacionada à atividade ocupacional. Ocorre diversidade de espécies envolvidas, sendo *P. falciparum* e *P. vivax* as mais comuns.

A malária epidêmica é uma forma extrema de malária instável. Ocorre quando uma população não imune está sujeita à transmissão da malária acima da que ocorre normalmente. Epidemias causadas por *P. falciparum* podem ter altos índices de mortalidade (CARTER & MENDIS, 2002).

5. MALÁRIA – DOENÇA

O período de incubação da doença varia de acordo com a espécie infectante, a média é de 12 dias para *P. falciparum*, 14 dias para *P. vivax* e 30 dias para *P. malariae*. Com algumas cepas de *P. vivax*, zonas temperadas ou subtropicais pode haver um período de incubação prolongado, 8 a 10 meses. Nos casos em que a causa de infecção é uma transfusão de sangue, o período de incubação geralmente é breve, mas varia de acordo com o número de parasitas contidos no sangue (FUNASA, 1999). Os sintomas mais freqüentes na malária são febres e calafrios, que podem ser acompanhados por dores de cabeça, mialgia, fraqueza, náuseas e vômitos. Outros sintomas clínicos podem estar presentes como esplenomegalia, anemia, trombocitopenia, hipoglicemia, disfunção renal ou pulmonar e mudanças neurológicas. O quadro clínico depende da espécie infectante, nível da parasitemia e da resposta imune do indivíduo.

Infecções causadas por *P. falciparum* podem ser graves quando ocorrem alterações neurológicas (incluindo coma), falência renal aguda, hipoglicemia, edema pulmonar e/ou anemia grave. Anemia grave também

pode ser uma complicação clínica causada por *P. vivax*. A infecção crônica por *P. malariae* pode levar a síndrome nefrótica que pode ser fatal.

A habilidade de invasão de eritrócitos de todas as idades causando altas parasitemias e a capacidade de aderir ao endotélio vascular, bem como aos eritrócitos não parasitados (formando rosetas) e à placenta são características da infecção por *P. falciparum* que favorecem a ocorrência de formas clínicas graves (HEDDINI, 2002).

A aderência de eritrócitos infectados é um fenômeno complexo envolvendo interações moleculares entre antígenos localizados nas protusões eletrodensas de eritrócitos parasitados como PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1) e receptores do hospedeiro, como CD36, Trombospondina (TSP), ICAM-I, VCAM, E-selectina, Sulfato de Condroitina A (CSA) (principal receptor de citoaderência na placenta), CD-21 e P-selectina. O seqüestro dos eritrócitos infectados por *P. falciparum* evita que sejam destruídos no baço (NEWBOLD *et al*, 1999; CHEN *et al*, 2000).

A obstrução vascular mecânica causada pela aderência de eritrócitos infectados ao endotélio vascular com a formação de rosetas é uma das causas da patogênese na malária grave. A resposta inflamatória de citocinas tais como TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α) e IFN- γ (Interferon- γ) produzidas por células T ativadas e macrófagos regulam a expressão de moléculas de adesão que participam do processo de aderência da PfEMP1 (HEDDINI, 2002).

6. IMUNIDADE NATURALMENTE ADQUIRIDA

Em áreas de alta transmissão de malária, observa-se o desenvolvimento gradual de imunidade clínica nos indivíduos com múltiplas infecções pregressas. A aquisição deste tipo de proteção natural é lábil e é dependente da duração da exposição do indivíduo ao parasita (GREENWOOD, 1999), da exposição a variantes antigênicas múltiplas dos plasmódios e da maturação do sistema imune. Nos primeiros meses de vida, as crianças são protegidas da morbidade, provavelmente devido à transferência de anticorpos maternos (EDOZIEN *et al*, 1962; MCGREGOR, 1964) e à persistência da hemoglobina fetal (PASVOL *et al*, 1977). Após seis meses de vida, as crianças são suscetíveis à malária, conseqüentemente apresentam sinais e sintomas clínicos e altas parasitemias. A incidência de anemia grave e mortalidade alcançam índices máximos (GREENBERG *et al*, 1989; SNOW *et al*, 1994). Por volta dos cinco anos de idade as crianças começam a desenvolver imunidade antitóxica, que é a diminuição das manifestações clínicas da doença, mesmo com altas densidades parasitárias.

Os adultos, com exceção de gestantes, desenvolvem uma imunidade não esterilizante com níveis sub-patentes de parasitemias e sem sintomas da doença (GREENWOOD, 1987). As gestantes são suscetíveis à malária, especialmente na primeira gravidez, ocorrendo uma depressão transitória da imunidade celular. Existem também evidências de proteção em adultos não imunes, com exceção de crianças, após um ano de muita exposição,

sugerindo um modo alternativo de aquisição de imunidade antimalárica (BAIRD, 1995; BAIRD 1998).

Em áreas de transmissão instável de malária, a população em geral não é imune, ocorrendo casos de doença clínica em adultos jovens, principalmente homens, provavelmente pela exposição ocupacional, e muitas infecções se tornam graves e complicadas. Os sintomas da doença podem surgir antes da parasitemia ser detectável microscopicamente, e qualquer parasitemia, mesmo muito baixa, pode implicar em doença.

Múltiplos mecanismos efetores tanto dependentes de anticorpos como não dependentes, são induzidos no complexo ciclo de vida do parasita em que cada estágio apresenta diferentes antígenos, e estão envolvidos na imunidade naturalmente adquirida, tais como: mecanismos efetores da imunidade anti-esporozoítos (anticorpos e citocinas produzidas por células T CD4⁺), anticorpos contra estágios eritrocíticos e células T citotóxicos dirigidos contra estágios hepáticos.

6.1. Imunidade específica no estágio pré-eritrocítico

Foi demonstrada pela primeira vez, em 1979, a presença de anticorpos anti-esporozoítos, ou seja, anticorpos contra a membrana externa de esporozoítos de *P. falciparum*, em soros de indivíduos moradores na Gâmbia, Oeste da África, área com transmissão estável de malária. Os títulos desses anticorpos aumentam com a idade, em paralelo com a aquisição de resistência à infecção (NARDIN *et al*, 1979).

Vários estudos posteriores têm mostrado que anticorpos contra diversas proteínas da superfície do esporozoítio podem imobilizar os esporozoítos e neutralizar sua infectividade, bloqueando a invasão do parasita nos hepatócitos (POTOCNJAK *et al*, 1980; STEWART *et al*, 1986; SINNIS & NUSSENZWEIG, 1996).

Células T CD8⁺ específicas para antígenos do estágio pré-eritrocítico quando ativadas têm ação citotóxica, destruindo o hepatócito infectado e secretam citocinas que atuam sobre os parasitas intracelulares (HOFFMAN & FRANKE, 1994; GOOD & DOOLAN, 1999). Existem evidências para o envolvimento de células T CD8⁺ na proteção, como: (a). a depleção *in vivo* de células T CD8⁺ anula proteção; (b). a transferência adotiva de células T CD8⁺ confere proteção a camundongos *naïve*; (c). camundongos transgênicos β -2- microglobulina ^{-/-} (não expressam moléculas MHC classe I) não são protegidos pela imunização ativa ou pela transferência adotiva de células T esplênicas de camundongos imunes selvagens (WHITE *et al*, 1996).

As células CD4⁺ auxiliares específicas também exercem um papel importante na imunidade anti-esporozoítia com a secreção de citocinas como IFN- γ que é um potente ativador de monócitos e macrófagos, induzindo aumento da fagocitose, morte dos parasitas, e secreção de citocinas, como IL-1 e IL-6, que inibem o desenvolvimento intra-hepático do parasita em humanos e murinos (HOFFMAN & FRANKE, 1994).

6.2. Imunidade no estágio eritrocítico sexuado

A imunidade contra os estágios eritrocíticos sexuados pode reduzir a infectividade dos gametas aos mosquitos e bloquear a transmissão da doença (CARTER & CHEN, 1976).

Após a picada de um indivíduo infectado, os anticorpos contra antígenos da superfície dos gametas entram em contato com os gametas quando estes são liberados das hemácias do hospedeiro no intestino do mosquito. Os principais mecanismos efetores são mediados por anticorpos anti-gametócitos que bloqueiam a fertilização (READ *et al*, 1994) ou mediam lise dos gametas por complemento e por anticorpos anti-oocinetos que podem bloquear a passagem para o estômago (CARTER *et al*, 1989; SHAHABUDIN *et al*, 1993). Provavelmente, os gametócitos não ingeridos pelos mosquitos são removidos pelo sistema retículo-endotelial. Experimentos *in vitro* mostraram que TNF- α pode destruir gametócitos (NAOTUNNE *et al*, 1991).

6.3. Imunidade no estágio eritrocítico assexuado

A resposta imune contra os estágios eritrocíticos assexuados também envolve mecanismos dependentes e independentes de anticorpos e as células T CD4⁺ têm um papel crucial na indução e na manutenção desta resposta.

Células T CD4⁺ podem ser divididas em duas sub-populações, dependendo do perfil de secreção de citocinas: células “T helper 1” (Th1) e células “T helper 2” (Th2). As células Th1 induzem preferencialmente a resposta imune celular com produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-2,

IFN- γ , TNF- α , IL-12, que levam à ativação de macrófagos e outras células efectoras. As células Th2 induzem preferencialmente a resposta imune humoral com produção das citocinas, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que antagonizam a ação das citocinas pró-inflamatórias (ABBAS *et al*, 2000).

As células Th1 aumentam a produção de anticorpos citofílicos, principalmente IgG2a e IgG3 em camundongos e IgG1 e IgG3 em humanos. As células Th2 promovem a produção de subclasses de IgG que estão associadas a alergias e infecções helmínticas, tais como IgG1 em camundongos e IgG4 em humanos (ABBAS *et al*, 2000).

A existência de subpopulações de células T CD4⁺ específicas para antígenos de plasmódios tem sido demonstrada *in vitro*, tanto em camundongos como em humanos. O estudo da reatividade de clones de células CD4⁺ respondedores a antígenos eritrocíticos do parasita em camundongos infectados por *P. chabaudi* mostrou heterogeneidade consistente com a idéia de dois subtipos de células CD4⁺ diferentes funcionalmente. Células derivadas de infecção primária recente secretaram IL-2 e IFN- γ após o estímulo antigênico *in vitro*, portanto, apresentavam um repertório de citocinas típico de células CD4⁺ Th1 e contribuíram para o clareamento precoce da parasitemia. Com o decorrer da infecção, foi observado um declínio da subpopulação Th1 e aumento de células tipo Th2, ou seja, produtoras de IL-4 e com função de células auxiliares da síntese de anticorpos *in vitro*, agindo no controle da infecção e clareamento da parasitemia (TAYLOR-ROBINSON & PHILIPS, 1993).

O curso da infecção por plasmódios é dependente do equilíbrio entre as citocinas secretadas por vários tipos de células quando ativadas. A exacerbação da produção destes mediadores pode causar efeitos sistêmicos tais como anemia grave e malária cerebral (MCGUIRE *et al*, 1994; TROYE-BLOMBERG *et al*, 1999; LUTY *et al*, 2000; MALAGUARNERA *et al*, 2002).

No quadro 1 resumizamos as ações das principais citocinas produzidas durante a resposta imune à infecção por plasmódios.

Resposta Humoral no estágio eritrocítico assexuado

Um dos aspectos mais característicos da infecção por plasmódios é a hipergamaglobulinemia, marcada pela elevação dos níveis séricos de IgM e IgG. Contudo apenas 5 a 10% dessas imunoglobulinas reagem com antígenos do parasita, sendo os demais anticorpos não específicos ao plasmódio, como anticorpos heterófilos e auto-anticorpos contra hemácias, linfócitos, complemento, ou fator reumatóide e fatores antinucleares. Esta reatividade não específica ocorre provavelmente pela ação mitogênica de antígenos solúveis de plasmódios que leva à ativação policlonal de linfócitos B (FERREIRA *et al*, 1988).

Os anticorpos específicos podem ser dirigidos contra antígenos dos diferentes estágios eritrocíticos assexuados (esquizontes, trofozoítos jovens e maduros).

Quadro 1. Papel das principais citocinas produzidas durante a resposta imune do hospedeiro à infecção por plasmódios (baseado em RICHARDS, 1997; MALAGUARNERA *et al*, 2002).

Citocina	Recurso	Função
TNF- α	Produzido por macrófagos e monócitos	Aumenta a capacidade fagocitária de monócitos e regula produção de IL-12 dos macrófagos. Otimiza produção de NO, e juntos são responsáveis pelo clareamento da parasitemia e pela resolução das febres, mas em excesso causa patogênese. regula produção de IL-12 dos macrófagos.
IFN- γ	Produzido por células T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ e	Ativa macrófagos a liberarem TNF- α , TGF- β , IL-1, IL-6, ROI, NOI que agem individualmente ou conjuntamente para matar e inibir o crescimento do parasita. Em excesso leva à patogênese
Linfotoxina	Produzida por células Th1.	Gera NO, induz hipoglicemia e aumento dos níveis de IL-6.
IL-1	Produzida por monócitos/ macrófagos, NK, células B, células dendríticas	Estimula a proliferação de células T e induz a expressão de IL-2 e produção de IL-2. Induz ROI <i>in vivo</i> . Aumenta a expressão de células endoteliais e aumenta a habilidade de células endoteliais de cultura a se ligarem a eritrócitos infectados.
IL-2	Produzida por células Th1 e CD8 ⁺ ativadas	Fator de crescimento para linfócitos T e NK e importante na ativação destas células e de macrófagos
IL-4	Produzida por células Th2 e basófilos/mastócitos ativados.	Induz a mudança da resposta imune para cima resposta Th2 e inibe a Th1, diminuindo a produção e atividade de IFN- γ . Importantes na resposta de anticorpos A produção de IL-4 por células Th2 estimuladas com antígenos de <i>plasmódios in vitro</i> aumenta as concentrações de anticorpos.
IL-5	Produzida por células Th2 e basófilos/mastócitos	Fator de estimulação de colônias, diferenciação e ativação de eosinófilos, que estão associados com morte de <i>P.falciparum</i>
IL-6	Produzida por macrófagos e células Th2	Inibe crescimento de parasitas por meio de NOI e/ou ROI, correlacionada com níveis de TNF e densidade parasítica e gravidade da doença na malária.
IL-8	Produzida por macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, cel. endoteliais, queratinócitos, NK e células T	Pode se ligar ao antígeno duffy/ receptor de quimiocinas na hemácia, inibe competitivamente a ligação e invasão de <i>P. knowlesi</i> em hemácias, mas não tem nenhum efeito sozinho no parasita. É um fator de ativação de neutrófilo.
IL-12	Produzida por fagócitos mononucleares e células dendríticas	Promove a diferenciação de células T para o tipo Th1 e induzindo células Th1 a produzirem IFN- γ . Modula a atividade de macrófagos.
IL-18	Produzida por macrófagos, células de Kupffer, queratinócitos, osteoclastos	Ativa macrófagos a produzirem TNF- α , IFN- γ , IL-1 e induz a citotoxicidade de células NK e aumenta a diferenciação de células T para o tipo Th1. O sincronismo na produção entre IL-18 e IL-12 apresenta um papel importante na defesa contra o plasmódio.
GM-CSF	Produzida por linfócitos T, fagócitos mononucleares, células endoteliais, fibroblastos.	Age na fagocitose por neutrófilos e morte <i>in vitro</i> . Aumenta expressão de CR3, Fc γ RII e Fc γ RIII nos neutrófilos o que aumenta aderência e fagocitose aumenta acúmulo de macrófagos e produção de TNF- α em um modelo de malária cerebral.
TGF- β	Produzido por macrófagos, células NK, T e B	Ativa macrófagos/ monócitos e induz a fagocitose de eritrócitos parasitados e a morte dos parasitas ingeridos.

Anticorpos são geralmente marcadores de infecção. A convencional evolução em relação à resposta de anticorpos a patógenos induz uma resposta inicial com a produção de anticorpos IgM, que é substituída pela produção de outras classes como IgG, IgA, IgE, devido à mudança da cadeia pesada da imunoglobulina com a maturação da resposta de anticorpos (MANIS *et al*, 2002). Além de marcadores de infecção, também são efetores na proteção em muitas circunstâncias da infecção.

Existem evidências *in vitro* que anticorpos podem mediar proteção contra estágio eritrocítico de *P. falciparum* (BOUHAROUN-TAYOUN *et al*, 1990).

O papel dos anticorpos antiformas eritrocitárias de plasmódios, principalmente da classe **IgG**, na imunidade protetora tem sido demonstrado por: (a). transferência passiva de imunidade por soro de doadores imunes a recipientes não imunes (homem, macacos, e alguns roedores) (BROWN, 1969); (b). transferência adotiva de células B (GRAVELY & KREIER, 1976); (c). suscetibilidade à infecção aumentada de aves bursectomizadas (RANK & WEINDANZ, 1976) e camundongos *mu* suprimidos (ROBERTS & WEINDANZ, 1978); (d). inibição *in vitro* da invasão dos eritrócitos por merozoítos e do desenvolvimento intra-eritrocítico por anticorpos neutralizantes (MITCHELL *et al*, 1976; BROWN *et al*, 1983) e (e). Mediação da opsonização de eritrócitos infectados facilitando a fagocitose dos mesmos por monócitos ou polimorfonucleares (KHUSMITH & DRUILHE, 1983; GROUX & GYSIN, 1990).

Anticorpos contra formas eritrocitárias também estão envolvidos na inibição do crescimento do parasita dependente de células e anticorpos, numa reação conhecida como ADCI (antibody-dependent cellular inhibition) (CELADA *et al*, 1983).

Dentre os anticorpos IgG, as diferentes subclasses podem exercer diferentes papéis na resposta imune aos plasmódios. Vários estudos mostram que anticorpos protetores agem sinergisticamente com outras células efectoras, como monócitos e outros leucócitos (BOUHAROUN-TAYOUN *et al*, 1990; GROUX & GYSIN, 1990), ou seja, devem ter ação citofílica.

Anticorpos citofílicos **IgG1** e **IgG3** podem se ligar aos antígenos de superfície do eritrócito (opsonização) e auxiliar na fagocitose via receptores FcγRI e FcγRII, ou participar da inibição celular dependente de anticorpos (ACDI), responsável pelo aparecimento da forma “crisis” do parasita (JENSEN *et al*, 1982; BOUHAROUN-TAYOUN *et al*, 1992; GREENBERG & SLVERSTEIN, 1993) ou ainda participam da citotoxicidade dependente de anticorpos (ACCD). O efeito neutralizante na inibição celular dependente de anticorpo (ACDI) é mediado principalmente por fatores solúveis liberados pelos monócitos. Esses fatores solúveis, provavelmente TNF-α e óxido nítrico, bloqueiam a divisão nuclear dos parasitas do estágio intraeritrocítico (BOUHAROUN-TAYOUN *et al*, 1995). O predomínio de anticorpos citofílicos em áreas endêmicas é associado com baixa parasitemia (ARIBOT *et al*, 1996) ou baixo risco de ataque clínico da malária (SHI *et al*, 1996).

Anticorpos não citofílicos, **IgG2** e **IgG4**, podem inibir as respostas efectoras dos anticorpos citofílicos pela competição pelos mesmos domínios ou por domínios vizinhos, desencadeando um desequilíbrio e conseqüentemente sendo responsáveis pela formação de um *status* de resistência e/ou suscetibilidade à malária (GROUX & GYSIN, 1990; BOUHAROUN-TAYOUN & DRUILHE, 1992).

Na figura 2 temos um esquema dos possíveis mecanismos de clareamento dos eritrócitos infectados por *P. falciparum*, mediados por anticorpos citofílicos, que têm sido demonstrados *in vivo* e *ex vivo*: fagocitose imune e ACDI. Nos dois mecanismos, anticorpos específicos contra os eritrócitos infectados formam uma ponte entre o eritrócito infectado e a célula efectora, que deve expressar receptores para F_c de imunoglobulina (FcRs) que se liguem bem a imunocomplexos. Na fagocitose imune, os eritrócitos infectados ligados pelos anticorpos às células efectoras, por exemplo, macrófagos, são fagocitados. Na ACDI, anticorpos citofílicos IgG1 e principalmente IgG3 ligam o eritrócito infectado a uma célula efectora (monócito, macrófago ou neutrófilo), que então produz um fator lítico ainda não identificado, mas que não é TNF- α nem linfotoxinas. O uso preferencial de um desses mecanismos estaria sendo dirigido pela natureza do antígeno (GARRAUD *et al*, 2003).

Em camundongos, anticorpos citofílicos, IgG2a, estão associados com proteção contra a infecção causada por *Plasmodium* (SMITH *et al*, 1997; MATSUMOTO *et al*, 2000; SU & STEVENSON, 2000; SMITH & TAYLOR-ROBINSON, 2003). IgG2a é predominante durante a fase aguda, em

camundongos infectados com *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS, seguida por uma resposta IgG1, durante a fase crônica, demonstrando a dicotomia da resposta imune de células Th1/ Th2 (TAYLOR-ROBINSON, 2002). IgG1 e IgG2 podem conferir proteção contra infecção letal com *Plasmodium yoelli* YM em camundongos imunizados com proteína principal da superfície do merozoíta 19 (Merozoite Surface Protein 19 - MSP₁₉) (HIRUNPETCHARAT *et al*, 1997). A transferência passiva de anticorpos IgG3 anti – MSP₁₉ para recipientes *naïve*, torna-os capazes de resolver a infecção causada por *Plasmodium yoelii* (MAJARIAN *et al*, 1984; VUKOVIC *et al*, 2000).

A associação de anticorpos citofílicos com proteção não é observada em todos os estudos epidemiológicos, pois pode depender da cepa, antígenos do parasita utilizados na análise ou fatores genéticos do hospedeiro (AUCAN *et al*, 2000). Em particular, anticorpos IgG3 direcionados para os antígenos da superfície do eritrócito infectado por trofozoítos jovens de *P. falciparum* (RESA -Ring Erythrocyte Surface Antigen), antígeno MSP-1 de *P. falciparum* (Merozoite Surface Protein-1) e exoantígenos não estava associado à proteção em Madagáscar e Papua Nova Guiné (SHI *et al*, 1996), enquanto extrato bruto do estágio eritrocítico de *P. falciparum* estava associado com proteção clínica no Senegal (ARIBOT *et al*, 1996; SARTHOU *et al*, 1997).

Fig. 2. Possíveis mecanismos de clareamento de eritrócitos infectados por *P. falciparum* mediados por anticorpos citofílicos (Adaptado de Garraud, 2003).

Do mesmo modo, os níveis de IgG1 para extrato bruto, RESA e MSP1 de *P. falciparum* atingiam níveis mais altos em indivíduos não protegidos do que em indivíduos protegidos, em Madagacar (DUBOIS *et al*, 1993), enquanto IgG1 contra exoantígenos de *P. falciparum* estava associado com proteção clínica (CHUMPITAZI *et al*, 1996).

Na malária, Aucan *et al.* (2000) observaram uma associação de altos níveis de anticorpos IgG2 anti – RESA e MSP2, com baixo risco de infecção, em uma população de área holoendêmica, Burkina Faso, e sugeriram que nessa população, anticorpos IgG2 estariam agindo como citofílicos e contribuindo para o clareamento da parasitemia. Assim, eles investigaram a ocorrência na população estudada do polimorfismo H131 no gene do receptor FcγRIIA nas células fagocitárias, que codifica um receptor capaz de se ligar à fração F_c de IgG2, conferindo-lhe ação citofílica (maiores detalhes abaixo). Eles encontraram o polimorfismo H131 em 70 % dos indivíduos, o que estaria fortalecendo a participação de IgG2 na proteção contra a malária.

Deloron *et al.* (1997) mostraram uma associação entre altos níveis de IgG2 e baixo risco de infecção por *P. falciparum*, em crianças de 6 meses. Os níveis de anticorpos IgG4 não citofílicos foram correlacionados com risco de ataque clínico da malária, pois podem bloquear a ADCI (AUCAN *et al.*, 2000).

A presença de anticorpos **IgE** anti-plasmódios, em população de área endêmica e o papel destes anticorpos em proteção e/ ou patogênese não estão bem esclarecidos. Desowitz (1989) estudando indivíduos adultos moradores de região holoendêmica, Nova Guiné, encontrou aproximadamente 30% de positividade para IgE anti- *Plasmodium falciparum*. Em outro estudo, com amostras pareadas de soro e cordão, o mesmo autor observou correlação inversa entre as taxas de parasitemia na placenta, paridade e a soropositividade maternal para IgE específica

(DESOWITZ *et al*, 1993). Investigações imunohistoquímicas também revelaram a deposição de IgE na placenta, inibindo o crescimento parasitário no espaço entre as vilosidades (MAENO *et al*, 1993). Perlmann *et al*. (1994), encontraram elevados níveis de anticorpos IgE total e anticorpos IgE específicos anti- *P. falciparum* em, respectivamente 85% e quase 60% da população de áreas de alta endemicidade na África e Ásia. Por “Immunoblotting”, eles observaram que, diferentemente dos anticorpos IgG que reagem com um grande número de bandas, os anticorpos IgE reagem contra algumas bandas apenas, com o aparecimento precoce de reatividade contra um antígeno de 45 kDa, que também reage com IgG4. Em geral, níveis elevados de IgE refletem um desequilíbrio nas células T CD4⁺ auxiliares (Th), com polarização da resposta imune para Th2 que produzem citocinas, tais com IL-4 e IL-13, que são responsáveis pela mudança de IgM/IgG para IgE. A produção de IL-4 pelas células T CD4⁺ de indivíduos primo-infectados naturalmente expostos à infecção está associada com elevados níveis de anticorpos específicos a antígenos de *P. falciparum* (TROYE-BLOMBERG *et al*, 1990).

Helmby e Troye-Blomberg (2002) encontraram elevados níveis de IL-4 e IgE em camundongos BALB/c infectados com *P. chabaudi chabaudi* e os níveis elevados de IgE não estavam associados com patologia, mas particularmente com o desenvolvimento de imunidade. Camundongos C57Bl/6 não secretaram IL-4, mas houve um aumento significativo nos níveis de IgE demonstrando que outros fatores, como IL-13 ou mecanismos independentes de IL-4 poderiam induzir a produção de IgE. Embora

camundongos C57Bl/6 não tivessem desenvolvido elevados níveis de IgE, estavam completamente protegidos contra malária, indicando que anticorpos IgE não são cruciais para a imunidade nessa linhagem de camundongos em particular.

Linfoma de Burkitt induzido pelo vírus Epstein Barr, carcinoma nasofaríngeo, leucemia linfática aguda e linfoma não Hodgkin e não Burkitt são mais freqüentes em pacientes com malária. Um aumento nessas formas de câncer tem sido atribuído a uma mudança no padrão para Th2, e essa mudança pode ser sugerida por aumento de anticorpos IgE, o que é observado em indivíduos de áreas endêmicas de malária, tanto em relação à IgE total como IgE específico e subclasses IgG2 e IgG4 (TAYLOR-ROBINSON, 1998).

Algumas evidências sugerem o envolvimento dos anticorpos **IgM** anti – *P. falciparum*, na proteção contra a malária, como: (a). camundongos incapazes de produzir IgM, por uma deficiência de células B recessiva ligada ao X, são suscetíveis a *Plasmodium yoelii* (JAYAWARDENA *et al*, 1979); (b). adição de anticorpos IgM monoclonais aumentaram as propriedades protetoras de uma vacina de malária (HARTE *et al*, 1983); (c). estudos em áreas de alta endemicidade têm mostrado que enquanto anticorpos IgG apresentam correlação positiva com os níveis de parasitemia, os anticorpos IgM, se relacionam com redução de parasitemia em Burkina Faso (BOUDIN *et al*, 1993).

Luty *et al*. (1994) estudando moradores no sudeste do Gabão observaram níveis elevados de anticorpos IgM específicos a exoantígenos

em indivíduos com parasitemia, contradizendo os achados de Boudin *et al.* Essa discrepância pode ser resultante das diferenças na endemicidade e da dinâmica de transmissão entre as áreas de estudo.

Em Dielmo, no Senegal, os níveis dos anticorpos IgM estavam gradualmente e consistentemente aumentados durante a estação de alta transmissão (ARIBOT *et al.*, 1996). Isto sugere um contato recente com novos isolados de parasitas e/ou reconhecimento imune destes novos isolados de parasitas, pelos hospedeiros, e desencadeando uma resposta imunológica independente de células T (LUTY *et al.*, 1994; NTOUMI *et al.*, 1995).

Estudos, de acompanhamento sorológico de indivíduos com malária *falciparum* sob tratamento com terapêutica específica, realizados em nosso laboratório, mostraram que tanto os níveis iniciais de anticorpos da classe IgG, como o nível máximo de IgM atingido durante o acompanhamento apresentaram associação inversa e estatisticamente significativa com o tempo de clareamento da parasitemia (DURLACHER, 1998).

Muito pouco se sabe sobre os anticorpos **IgA** na malária. Um estudo do perfil sorológico de grupos populacionais, bem definidos, de área de transmissão moderada de malária, mostrou maior frequência de anticorpos IgA no grupo de indivíduos primo-infectados (ÁVILA *et al.*, 1993; ÁVILA *et al.*, 1999).

7. POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR Fc γ RIIA¹³¹

Os receptores para região Fc de imunoglobulinas (FcR) estão presentes na membrana de células acessórias e mediam respostas funcionais como: fagocitose, citotoxicidade dependente de anticorpo (ADDC), produção de citocinas, degranulação, apresentação de antígeno e regulação na produção de anticorpos. Os receptores FcR são expressos em macrófagos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, células NK, células T e B, plaquetas e células endoteliais e a sua expressão é regulada por citocinas ou fatores de crescimento. A ativação das células acessórias ocorre com a agregação dos FcRs pela ligação a múltiplas regiões Fc de moléculas de anticorpos ligadas a um microrganismo. (revisado em VAN SORGE *et al*, 2003).

Os FcRs pertencem à superfamília de imunoglobulinas (Ig), portanto com domínios Ig na superfície extracelular os quais eles utilizam para se ligarem às regiões Fc e outras cadeias que são requeridas para transporte para a superfície celular e para transdução de sinais quando se liga à região Fc. São moléculas estrutural e bioquimicamente distintas, que diferem na distribuição celular e na afinidade para os diferentes isotipos de imunoglobulina, Fc γ R para IgG, Fc ϵ R para IgE e Fc α R para IgA. Os receptores Fc γ Rs são divididos em três classes, Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16). Os Fc γ R são ainda divididos em Fc γ RII (Fc γ RIIA, Fc γ RIIB e Fc γ RIIC) e Fc γ RIII (Fc γ RIIIA e Fc γ RIIIB) (RAVETCH & KINET, 1991). Na figura 3 mostramos os diferentes Fc γ R, as células que os expressam e as suas especificidades isotípicas.

RECEPTOR	FcγRI (CD64)	FcγRII (CD32)			FcγRIII (CD16)	
Classe do receptor		FcγRIIA	FcγRIIB	FcγRIIC	FcγRIIIA	FcγRIIIB
Estrutura
Distribuição	Células mielóides Neutrófilos*	Células mielóides Plaquetas Células T e endoteliais	Células B Monócitos macrófagos	Células NK	Macrófagos monócitos	Neutrófilos Eosinófilos*
Polimorfismo		R131/ H131			V158/ F158	NA1/ NA2
Especificidade para subclasse de IgG	3>1>4>>>2	R131: 3>1>>>2,4 H131: 3>1,2>>>4	3>1>4>>2	ND	1=3>>>2,4 ^a	1=3>>>2,4 ^b
Afinidade para hIgG (K _a)	10 ⁸ -10 ⁹ M ⁻¹	<10 ⁷ M ⁻¹			3 x 10 ⁷ M ⁻¹	10 ⁸ M ⁻¹

Fig. 3. Estruturas e características dos diferentes receptores para a região F_c de IgG (FcγR): distribuição celular, polimorfismos descritos, especificidades isotípicas e afinidade. ND= não determinado; * células que apresentam apenas após indução (baseado em FOSSATI *et al*, 2001; VAN SORGE *et al*, 2002, PLEASS & WOLF, 2001)

Como podemos observar na figura 3, em geral, os receptores FcγR não se ligam à região F_c de IgG2 ou o fazem com muito baixa afinidade. Entretanto, Warmerdam *et al.* (1991) detectaram um polimorfismo no gene do receptor FcγRIIA, uma mudança de arginina (R) para histidina (H) na posição 131, que o capacita a se ligar na cadeia pesada de IgG2 humana. Este polimorfismo (H131) tem sido implicado em muitas desordens de defesa do hospedeiro, doenças imunohematológicas e doenças autoimunes sistêmicas (JIANG *et al*, 1996). O alelo FcγIIA-R¹³¹ está associado ao

aumento da suscetibilidade a infecções causadas por bactérias encapsuladas tais como *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (PLEASS & WOOF, 2001).

Na malária, Shi *et al.* (2001) observaram que crianças do Quênia que apresentavam alelo homozigoto $Fc\gamma IIA-R^{131}$ reportavam apresentavam menor risco de altas parasitemias de *P. falciparum* quando comparadas a crianças com o alelo heterozigoto $Fc\gamma IIA-H/R^{131}$, sugerindo um papel protetor deste genótipo. Embora não tenha sido observada diferença significativa nas crianças que apresentavam o alelo homozigoto $Fc\gamma IIA-H^{131}$ em relação ao risco de infecção.

Como citado acima, também Aucan *et al.* (2000) observaram baixo risco de infecção em uma população de Burkina Faso com alta frequência do polimorfismo H131 e ainda associado a altos níveis de anticorpos IgG2 anti – RESA e MSP2.

Mais recentemente, Cooke *et al.* (2004) encontraram associação da presença do alelo homozigoto $Fc\gamma IIA-H^{131}$ a um aumento de suscetibilidade à malária grave no oeste da África. Mas, neste trabalho não foram analisados os níveis de anticorpos IgG2.

Baseado no exposto até aqui, fica clara a importância do estudo das diferentes classes de anticorpos na resposta imune humoral a plasmódios, desde que mecanismos efetores dependentes de anticorpos têm significado em proteção na malária.

Muitos dos estudos existentes nessa área foram feitos apenas com a pesquisa de anticorpos IgG e mais recentemente, têm sido bastante estudadas as subclasses de IgG. Em menor frequência encontramos os estudos dos anticorpos IgM e IgE. Também pouco se conhece sobre a avidéz ou afinidade funcional das diferentes classes e subclasses de anticorpos a antígenos de plasmódios.

Ainda, a grande maioria das investigações foi feita com amostras de soro de populações de áreas de alta endemicidade de malária, onde é muito claro o desenvolvimento de imunidade naturalmente adquirida. Estudos semelhantes em áreas com transmissão instável de malária são raros.

No presente trabalho, fizemos um amplo estudo do perfil sorológico da malária humana em indivíduos moradores em área endêmica com transmissão instável de malária na Amazônia Brasileira, avaliando não apenas a quantidade, mas também a qualidade dos anticorpos contra formas eritrocitárias de *P.falciparum*.

A determinação de todas as classes e subclasses de anticorpos em uma mesma população bem definida clínica, parasitológica e epidemiologicamente, pode fornecer informações importantes para um melhor entendimento do envolvimento dos anticorpos contra formas eritrocitárias no desenvolvimento de imunidade naturalmente adquirida mesmo em áreas com transmissão instável.

II. OBJETIVOS

GERAL:

Estudar o padrão de resposta dos anticorpos IgG e subclasses, IgE, IgM e IgA contra antígenos de formas eritrocitárias de *Plasmodium falciparum* de indivíduos naturalmente expostos à malária no Brasil.

ESPECÍFICOS:

1. Padronizar técnicas imunoenzimáticas para a pesquisa das classes de anticorpos IgE, IgA e IgM e das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum* e da avidéz das subclasses de IgG.
2. Aplicar as técnicas padronizadas em amostras de soro de grupos bem definidos clínica, parasitológica e epidemiologicamente de indivíduos expostos naturalmente à infecção por plasmódios em áreas endêmicas de malária no Brasil.
3. Analisar os resultados obtidos em relação à presença ou não de infecção, às diferentes formas clínicas de malária e às variáveis preditoras de exposição à malária.
4. Determinar a presença do polimorfismo H131 do receptor FcγRIIA em um determinado número de amostras de indivíduos da área endêmica.

VI. MATERIAL E MÉTODOS

1. Áreas de Estudo

1.1. Peixoto de Azevedo, MT.

A cidade de Peixoto de Azevedo fica localizada na região norte do Estado do Mato Grosso à aproximadamente 700 km da capital, Cuiabá. O clima da região é equatorial quente e úmido, característico de floresta tropical, com estação chuvosa de novembro a abril (temperatura entre 21 a 34° C) e estação seca de maio a outubro (temperatura entre 17 a 34° C). Na época em que as amostras foram coletadas a transmissão de malária era perene, com um aumento durante a estação chuvosa.

Com o surgimento dos garimpos nas décadas de 70 e 80 ocorreram intensos fluxos migratórios para a região de indivíduos do norte, nordeste e sul do país, levando a um aumento no número de casos de malária, sem possibilidade do controle da doença. A população de Peixoto de Azevedo, de acordo com o censo de 1996, era de 29.237 habitantes.

Mato Grosso teve 59.089 e 37.638 casos de malária relatados em 1995 e 1996, respectivamente, ocupando em 1996, o primeiro lugar em índice de lâminas positivas (40,3%). Em 1996, foram examinadas 32.072 lâminas nos municípios de Peixoto de Azevedo e Matupá, das quais 7.641 foram positivas para malária (24%). A espécie predominante nos municípios foi *P. vivax* com 56,3% de positividade (4.301 casos), seguido pelo *P. falciparum* com 43,4% (3.317 casos) e apenas 0,3% de positividade para malária mista (23 casos).

O principal transmissor de *P. falciparum* na região de Peixoto de Azevedo era o mosquito *Anopheles darlingi*, que apresentava índice de

picadas por homem por hora de 13,5 nas regiões de garimpo e 3,1 na região periurbana.

Atualmente com o desaparecimento dos garimpos, tende a surgir uma nova situação epidemiológica de malária na região. A atividade agrícola aumentou com o incentivo dado pela administração municipal ao pequeno produtor e culminou no assentamento de colonos às margens da BR – 080, local hoje denominado “P.A. Cachimbo” ou “Gleba Leonislândia”.

1.2. Manaus, AM.

Amostras colhidas de pacientes admitidos na Unidade de Alto Risco (UAR) da Fundação de Medicina Tropical de Manaus (FMT/IMT-AM). Na FMT/IMT-AM, os sintomas clínicos mais freqüentes de malária complicada e aceitos como indicativos de terapia intensiva e admissão na UAR: sinais de colapso circulatório, insuficiência renal aguda, insuficiência respiratória aguda, distúrbio metabólico grave (LACERDA *et al*, 2001).

2. Casuística

2.1. Amostras de soros-padrão positivos (n =12) e negativos (n =12) para anticorpos anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum* para padronização dos testes imunoenzimáticos para pesquisa de anticorpos IgE, IgM, IgA e subclasses de IgG.

2.2. Amostras de soro de indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária analisadas para a pesquisa das imunoglobulinas IgE, IgA, IgM e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (n=270).

= 233 amostras de soro de indivíduos com resultado de plasmódio positivo pela gota espessa e/ou QBC[®]

- 153 *P. falciparum*
- 27 *P. falciparum* e *P. vivax*
- 51 *P. vivax*
- 2 *P. malariae*

Dessas 70 amostras eram de indivíduos com complicações clínicas por malária (MC) (52 *P. falciparum* e 18 *P. vivax*), 148 de indivíduos com malária, mas sem complicações clínicas (MNC) (92 *P. falciparum*, 32 *P. vivax*, 23 *P. falciparum* e *P. vivax* e 1 *P. malariae*) e 15 de indivíduos infectados, mas assintomáticos (AS) (9 *P. falciparum*, 1 *P. vivax*, 4 *P. falciparum* e *P. vivax* e 1 *P. malariae*).

= 37 amostras de soro de indivíduos com resultado de pesquisa de plasmódio negativo pela gota espessa e QBC[®] (18 com sintomas clínicos de malária e 19 sem sintomas).

Foram disponíveis os dados das seguintes variáveis preditoras de exposição à malária:

- Idade (μ = 30 anos)
- Número de episódios anteriores de malária (μ = 11), categorizados em:

- ≡ Nenhum episódio de malária anterior (n= 2)
- ≡ Primo-infectados (n= 30)
- ≡ De 1 a 5 malárias anteriores (n= 86)
- ≡ Mais de 5 malárias anteriores (n= 138)
- ≡ Dados não disponíveis (n=16)
- Tempo de permanência em áreas endêmicas de malária (μ = 9 anos)
- Tempo decorrido desde a última malária (Md =1 mês)

2.3. Amostras de soros de outras patologias (n =64):

- ≡ Soros positivos para Chagas (n=9)
- ≡ Soros positivos para Leishmania (n=8)
- ≡ Soros positivos para Toxoplasmose (n=8)
- ≡ Soros positivos para Sífilis (n=6)
- ≡ Soros positivos para Proteína C Reativa (PCR) (n=5)
- ≡ Soros positivos para ASLO (n=8)
- ≡ Soros positivos para Fator Reumatóide (FR) (n=10)
- ≡ Soros de pacientes com Doença Auto-Imune (n=10)

2.4. Amostras de soros de doadores de sangue foram obtidas junto à Fundação Pró-sangue/ Hemocentro de São Paulo (n= 89).

3. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da FMUSP, pela Comissão de Ética da Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT/SP) e pela Comissão de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT/IMT-AM).

As amostras biológicas utilizadas pertenciam à soroteca do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT/SP, originalmente colhidos no contexto de pesquisas afins.

Todos os cuidados necessários em relação aos aspectos éticos da utilização de material biológico estocado foram respeitados, ou seja, foi garantida a preservação rigorosa do anonimato dos indivíduos originariamente envolvidos e o material foi devidamente conservado e utilizado eticamente, bem como as informações obtidas a partir dele.

4. ANTÍGENOS de *P. falciparum*

4.1. Manutenção de *P. falciparum*

Isolado ADA de *P. falciparum* é mantido no Laboratório de Imunologia e Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por cultivo *in vitro* e por congelamento em nitrogênio (N₂) líquido.

(a). Congelamento

Eritrócitos de cultivo foram centrifugados e para cada 1mL de sedimento foi adicionado 0,34mL de "glycerolyte" na velocidade de uma gota/ segundo sob leve agitação. Após 5 minutos de repouso foram adicionados mais 1,36mL de "glycerolyte", nas mesmas condições anteriores. O produto final foi aliqotado em 1 mL em ampola de congelamento, mantido a -80° C por 18 horas e posteriormente, armazenado em "container" contendo N₂ líquido.

(b). Descongelamento

Os eritrócitos foram descongelados por 2 minutos, em banho-maria a 37° C, e colocadas em tubo estéril. Foram adicionados sob agitação, 0,2mL de NaCl 12%, para cada 1 mL de células congeladas. Após 5 minutos de repouso, foram adicionados 10 mL de NaCl 1,6% com uma agulha de 21 G (1 a 2 gotas/ segundo). O produto foi centrifugado a 1500 x g por 10 minutos e o sedimento ressuspenso com 10mL de NaCl 0,9% e dextrose 0,2%. Após nova centrifugação, o sedimento de eritrócitos foi adicionado ao meio de cultura, para recuperação dos parasitos.

4.2. Cultivo de *P. falciparum*

Cultivo de *P. falciparum* foi realizado como descrito por Trager & Jensen, 1976. Cepas foram cultivadas assincronicamente em eritrócitos humanos tipo "O", Rh positivo na concentração final de 4%, em placas de Petri contendo 8mL de meio RPMI 1640 completo em ambiente a 5% de CO₂. A troca do meio de cultura foi feita diariamente, e quando a parasitemia

alcançar um mínimo de 4% ou a cada quatro dias, foi feito o repique para duas placas de Petri, contendo meio de cultura.

4.2.1. Preparo do extrato antigênico somático de *P. falciparum* (PfZw)

Quando a parasitemia atingiu cerca de 10%, com formas predominantes de esquizontes, os eritrócitos foram retirados das placas e centrifugados a 1500 x *g* por 10 minutos. O líquido sobrenadante foi descartado, e o sedimento, lavado por três vezes com solução fisiológica tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7.2 (PBS). Após a última centrifugação, o sedimento de eritrócitos foi lisado pela adição de saponina a 0,04% em PBS, por 20 minutos. Os parasitos liberados foram centrifugados a 3000 x *g* por 15 minutos e lavados 3 vezes com PBS. O sedimento obtido foi armazenado a -80° C, até o momento do uso.

Antígenos somáticos foram extraídos com detergente anfótero Zwittergent a 10% em PBS contendo os seguintes inibidores de proteases: aprotinina (50µg/mL), leupeptina (1µg/mL) e antipaina (1µg/mL) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (phenylmethyl sulfonyl fluoride - PMSF) 1mM. Para aproximadamente 100mg (peso úmido) de sedimento de parasitos foram adicionados 200 µL de Zw e 1,0 mL de PBS. O conteúdo protéico do extrato antigênico de *P. falciparum* foi dosado pelo método de Lowry.

5. Obtenção de Anticorpos

5.1. Soro de carneiro anti-IgA, anti-IgG e anti-IgM humanas, fração F_{ab} (específica para fração F_c) foram cedidos gentilmente pela BioMérieux.

5.2. Anticorpos monoclonais anti-IgG1 (clone 8c/6-39), anti-IgG2 (clone HP6014), anti-IgG3 (clone HP6050) e anti-IgG4 (clone HP6025) humanas foram obtidos comercialmente da Sigma Chemical Co.

5.3. Soro de carneiro e de cabra anti-IgE humana foram obtidos comercialmente da Cappel e da Sigma Chem. Co, respectivamente.

5.4. Proteínas de Mieloma purificadas das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e de IgE foram obtidas comercialmente da Sigma Chem. Co.

6. Obtenção de Conjugados

6.1. Conjugado enzimático proteína – peroxidase

Os anticorpos anti-IgA, anti-IgG e anti-IgM foram conjugados a peroxidase, segundo metodologia descrita por Wilson & Nakane, 1978.

Para tanto, peroxidase tipo VI (5mg/mL) foi oxidada com uma solução de NaIO_4 0,1M por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após diálise contra tampão acetato 0,001M, pH 4,4 por 24 horas, a 4°C, foi feita a alcalinização da peroxidase oxidada e do soro a ser conjugado com adição de 50 μ L de tampão carbonato/ bicarbonato 0,5M, pH 9,5, em cada solução. Proceder-se-á a conjugação pela adição lenta da solução protéica a peroxidase e incubação por 2 horas, à temperatura ambiente. Para estabilização do conjugado foi adicionado NaHB_4 0,1M. Após nova incubação por 2 horas, à

temperatura ambiente e diálise contra PBS por 24 horas, a 4°C, o conjugado foi diluído (v/v) em glicerina bidestilada, aliquotado e conservado a -20°C, até o momento do uso.

O conjugado anti-IgE humana – peroxidase foi obtido comercialmente da Sigma Chem. Co. e estreptavidina – peroxidase foi obtido comercialmente da Amershan – LIFESCIENCE.

6.2. Conjugado proteína – biotina

Anticorpos de anti-IgE humana foram marcados com biotina como descrito por Diamandis & Cristopoulos, 1991.

Dez microlitros de éster de biotinamidocaproato N-hidroxisuccinamida 0,1M em dimetilformamida (DMF) foram adicionados a 1 mL da solução de anticorpo de anti-IgE (a 4 mg/mL em PBS), previamente dialisada contra NaHCO₃ 0,1M por 24 horas, a 4°C. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 4 horas, sob leve agitação. Após nova diálise contra PBS por 24 horas, a 4°C foi centrifugada a 500 x g por 15 minutos, diluída a 1:2 em glicerina destilada e mantida a -20°C protegida da luz.

Os conjugados anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 humanas marcada com biotina foram obtidos comercialmente da Sigma Chem. Co. A especificidade e os títulos desses conjugados foram determinados por titulação em bloco com os mielomas de cada subclasse de IgG (Anexo I).

7. PESQUISA DE SUBCLASSES DE IgG ANTI-FORMAS ERITROCITÁRIAS DE *P.falciparum*

7.1. Padronização do ELISA

Placas NUNC (polysorb) foram sensibilizadas com antígeno de *P. falciparum* a 5 µg/ mL (50 µL/ cavidade) em PBS por 2 horas a 37°C e 18 horas a 4°C. Após, as placas foram lavadas uma vez com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tw) e foram bloqueadas com leite desnatado a 5% (100 µL/ cavidade) por 2 horas a 37°C e as placas foram novamente lavadas 2 vezes com PBS-Tw e uma vez com água de MilliQ, secas, embrulhadas uma a uma em papel de filtro e armazenadas a 4°C em bolsas de alumínio com dessecante até o momento do uso. Para realização da reação imunoenzimática as placas foram mantidas à temperatura ambiente. Foram adicionados 50 µL de cada diluição dos 12 soros-padrão controles positivos e negativos para subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 (1/25, 1/50, 1/100) e para IgG4 (1/5, 1/10 e 1/20) anti – *P. falciparum* em leite desnatado a 2% em PBS-Tw, nas cavidades das placas, que foram incubadas por 40 minutos a 37°C. Após 3 lavagens com PBS-Tw, foram adicionados à cada cavidade 50 µL das diluições do conjugado específico anti-IgG1 (1/1000), anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 (1/500), respectivamente e diluídos em leite desnatado a 2% em PBS-Tw. As placas foram incubadas novamente por 40 minutos a 37°C e lavadas 3 vezes com PBS-Tw. Foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (50µL/ cavidade), s placas foram incubadas a 37° C por 40 minutos. Após, foi feito novo ciclo de lavagens de 3 vezes com

PBS-Tw, foram adicionados à cada cavidade 50 µL substrato cromogênico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina H₂O₂ (TMB-Sigma Chem. Co) e as placas foram incubadas por 30 minutos a 37° C. A reação foi interrompida com 25 µL de H₂SO₄ 2N. A densidade óptica (D.O.) do produto colorido obtido foi feita em leitor de microplacas Titertek Multiskan MCC340 a 450 nm.

Após a padronização do ELISA, foram testadas as amostras de soro de área endêmica e dos doadores de sangue. Os resultados foram expressos como índices de reatividade (I.R.), sendo IR= densidade óptica (D.O.) da amostra/ D.O. do “cut-off”. O “cut-off” foi calculado pela média das D.O.s de 89 amostras de soro de doadores de sangue mais duas vezes o desvio padrão.

Em cada placa, foram adicionadas diluições dos mielomas de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas (5120, 1280, 320,80 20 e 5 ng/ mL) para a construção de curvas-padrão que foram utilizada no programa ELISA para o cálculo da concentração de subclasses de IgG anti – *P. falciparum*.

7.2. Estudo da Afinidade Funcional ou Avidéz das Subclasses de IgG anti- *P. falciparum*

A técnica ELISA foi realizada conforme descrito acima, sendo que após a incubação das amostras de soros em duplicata, a primeira lavagem de uma duplicata foi feita com solução de uréia 8M por 5 minutos (100 µL/ cavidade). O índice de avidéz (I.A.) foi calculado pela relação da D.O. da

amostra tratada com uréia pela D.O. da amostra sem o tratamento com uréia, multiplicada por 100.

$$\text{I.A.} = \frac{\text{D.O. com uréia} \times 100}{\text{D.O. sem uréia}}$$

8. PESQUISA DE ANTICORPOS IgE ANTIFORMAS ERITROCITÁRIAS DE *P. falciparum*

8.1. Escolha do conjugado anti-IgE humana

Foram testados em diferentes ELISAs os seguintes soros anti-IgE humana:

- Soro de carneiro anti-IgE humana (6/7/82) (A)
- Soro de carneiro anti-IgE humana (Cappel) (B)
- Soro de cabra anti-IgE humana marcado com peroxidase Sigma Chem. Co (11/11/96) (C)
- Soro de cabra anti-IgE humana (específica para cadeia ϵ) marcado com peroxidase Sigma Chem. Co (A 9667, lote 029H4887) (D)
- Soro de cabra anti-IgE humana Sigma Chem. Co (55,3 mg/ mL) marcada com biotina (E)

Placa NUNC (polysorb) foi sensibilizada com mieloma de IgE humana Sigma Chem. Co (1,3mg/ mL) a 5 μ g/ mL em PBS por 2 horas a 37°C e 18 horas a 4°C. A placa foi lavada uma vez com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tw) e foi bloqueada com leite desnatado a 5%. Após o bloqueio a placa foi lavada 2 vezes com PBS-Tw e uma vez com água de MilliQ. Foram adicionados 100 μ L dos soros anti-IgE nas diluições 1/100,

1/500, 1/1000 e 1/5000 (soros A a D) e 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800 (E) em leite desnatado a 2% em PBS-Tw e incubados a 37°C por 40 minutos. Após novo ciclo de lavagens com PBS-Tw foram adicionados 100 µL de anti-IgG de carneiro marcada com peroxidase diluída a 1/1000 em leite desnatado a 2% em PBS-Tw às cavidades testadas com soros A e B; 100 µL do substrato cromogênico TMB H₂O₂ (Sigma Chem. Co) às cavidades com soros C e D e 100 µL de conjugado estreptavidina – peroxidase diluído a 1/1000 em leite desnatado a 2 % em PBS-Tw às cavidades testadas com soro E, incubados a 37°C por 40 minutos (soros A, B e E) e por 30 minutos (soros C e D). Nas cavidades testando os soros C e D foram adicionados 50 µL de H₂SO₄ 2N para interromper a reação enzimática e a leitura das densidades ópticas foram feitas em leitor de microplacas Titertek Multiskan MCC340 a 450 nm. As cavidades correspondentes aos soros A, B e E foram novamente lavadas e incubadas a 37°C por 30 minutos com 100 µL/cavidade de substrato cromogênico TMB H₂O₂ e posteriormente a reação foi interrompida com 50 µL/ cavidade de H₂SO₄ 2N e foi feita a leitura da densidade óptica como citado acima (Anexo II).

Foram escolhidos dois conjugados para serem testados na posterior padronização do ELISA-IgE: soro de cabra anti-IgE humana marcado com biotina (E) diluído a 1/500 e soro de cabra anti-IgE humana (específica para cadeia ε) marcado com peroxidase (D) diluído a 1/1000.

8.2. Padronização do ELISA – IgE

8.2.1. Absorção dos soros com Rf-absorbent

Diluições iniciais do soro 1/5, 1/10 e 1/20 em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tw) foram adicionados a volumes iguais de soro de carneiro anti-IgG humana (Rf-absorbent, DadeBehring, Germany), resultando em diluições a 1/10, 1/20 e 1/40, respectivamente.

8.2.2. ELISA – IgE

Placas NUNC (polysorb) foram sensibilizadas com antígeno de *P. falciparum* a 5 µg/ mL (100 µL/ cavidade) em PBS por 2 horas a 37°C e 18 horas a 4°C. Após, as placas foram lavadas uma vez com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tw) e foram bloqueadas com leite desnatado a 5% (100 µL/ cavidade) por 2 horas a 37°C e as placas foram novamente lavadas 2 vezes com PBS-Tw e uma vez com água de MilliQ. Para realização da reação imunoenzimática as placas foram mantidas à temperatura ambiente. Os soros puros e diluídos a 1/2, 1/5, 1/10, 1/20 e 1/40 em leite desnatado a 2% em PBS-Tw e diluições dos soros a 1/10, 1/20 e 1/40 após absorção com Rf-absorbent foram adicionados em triplicata à placa (100 µL/ cavidade) e incubados a 37°C por 40 minutos. Após ciclo de 3 lavagens com PBS-Tw foram adicionados em cada uma das triplicatas soro de carneiro anti-IgG humana marcado com peroxidase ou soro de cabra anti-IgE humana marcado com peroxidase ou soro de cabra anti-IgE humana marcado com biotina diluídos a 1/10000, 1/1000 e 1/500 em leite desnatado a 2% em PBS-Tw, respectivamente (100 µL/ cavidade). As placas foram

incubadas a 37°C por 40 minutos e foi feito um novo ciclo de 3 lavagens. Foi adicionado o substrato cromogênico TMB H₂O₂ (100 µL/ cavidade) as replicatas correspondentes aos conjugados com peroxidase e após incubação a 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz, a reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ 2N e a leitura das densidades ópticas foram feitas em leitor de microplacas Titertek Multiskan MCC340 a 450 nm. Foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase diluído a 1/1000 em leite desnatado a 2% em PBS-Tw a replicata correspondente ao conjugado com biotina e incubada a 37°C por 40 minutos. Após, foram feitos novo ciclo de lavagens de 3 vezes com PBS-Tw, foram adicionados à cada cavidade 100 µL substrato cromogênico TMB H₂O₂ (Sigma Chem. Co) e as placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C , a reação foi interrompida com 50 µL/ cavidade de H₂SO₄ 2N e foi feita a leitura da densidade óptica como citado acima.

Após a padronização do ELISA, foram testadas as de soro de área endêmica e dos doadores de sangue. Os resultados foram expressos como índices de reatividade (I.R.), sendo I.R.= densidade óptica da amostra (D.O.)/ D.O. do “cut-off”. O “cut-off” de cada placa foi calculado a partir da média + duas vezes o desvio padrão das D.O.s de seis soros controles negativos.

Em cada placa, foram adicionadas diluições do mieloma de IgE humana (5120, 1280, 320, 80, 20 e 5 ng/ mL) para a construção de curvas-padrão que foram utilizadas no programa ELISA para o cálculo da concentração de anticorpos IgE anti- *P. falciparum*.

9. PESQUISA DE ANTICORPOS IgM ANTI-FORMAS ERITROCITÁRIAS DE *P. falciparum*

9.1. Otimização do ELISA – IgM Indireto

Placas NUNC (polysorb) foram sensibilizadas com antígeno de *P. falciparum* a 5 µg/ mL (100 µL/ cavidade) em PBS por 2 horas a 37°C e 18 horas a 4°C. Após, as placas foram lavadas uma vez com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tw) e foram bloqueadas com leite desnatado a 5%, variando o tempo de bloqueio e o modo de estabilização das placas:

- Variáveis A e B: leite desnatado a 5% em PBS por 2 horas a 37°C (200 µL/ cavidade);
- Variáveis C e D: leite desnatado a 5% em PBS por 18 horas a 4°C (200 µL/ cavidade);

Variáveis A e C: após o bloqueio, as placas foram lavadas por 2 vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-Tw) e uma vez com água de MilliQ e tratadas com 150 µL/ cavidade de solução estabilizadora de proteínas (BioMérieux) por 2 horas, secas, embrulhadas uma a uma em papel de filtro e armazenadas a 4°C em bolsas de alumínio com dessecante até o momento do uso.

Variáveis B e D: após o bloqueio, as placas foram lavadas por 2 vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-Tw) e uma vez com água de MilliQ, secas, embrulhadas uma a uma em papel de filtro e armazenadas a 4°C em bolsas de alumínio com dessecante até o momento do uso.

Para realização da reação imunoenzimática as placas foram mantidas à temperatura ambiente. Foram adicionados 100 µL de cada diluição dos 12

soros-padrão controles positivos e negativos em leite desnatado a 2% em PBS-Tw (1/25, 1/50, 1/100, 1/200) nas cavidades das placas, que foram incubadas por 40 minutos a 37°C. Após 3 lavagens com PBS-Tw, foram adicionados à cada cavidade 100 µL das diluições do conjugado específico anti-IgM (1/5000, 1/10000, 1/20000, 1/30000) e foi realizada nova incubação por 40 minutos a 37°C. Após novo ciclo de lavagens de 3 vezes com PBS-Tw, foram adicionados à cada cavidade 100 µL de substrato cromogênico TMB H₂O₂ (Sigma Chem. Co) e as placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 2N. A densidade óptica (D.O.) do produto colorido obtido foi feita em leitor de microplacas Titertek Multiskan MCC340 a 450 nm.

9.1.1. Determinação da Densidade Óptica Limiar

A partir dos resultados obtidos com os soros-padrão, estabelecemos melhor diluição dos soros e do conjugado e o melhor bloqueio. Com o ELISA otimizado foram testadas 88 amostras de soro de doadores de sangue para determinação da densidade óptica (D.O.) limiar, que foi calculado pela média das D.O.s dessas 88 amostras mais duas vezes o desvio padrão.

9.1.2. Preparação do soro limiar de reatividade

Foi diluído um “pool” de soros positivos para anticorpos IgM antiformas eritrocitárias em um “pool” de soros negativos a 1/2, 1/3, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 e 1/128. Cada soro artificialmente preparado foi testado no ELISA - IgM indireto otimizado. O soro que fornecer a D.O. mais próxima da D.O. limiar foi escolhido como soro limiar de reatividade (SLR). O SLR foi utilizado em triplicata em todas as placas, com controle de variação intertestes. A média da D.O.s das triplicatas do SLR foi considerada como o corte da reação (“cut-off”) de cada placa.

9.1.3. Aplicação do ELISA – IgM

Amostras de soro de área endêmica foram testadas em duplicata no ELISA–IgM indireto otimizado. Os resultados de cada amostra foram fornecidos com índice de reatividade (I.R.)_m, calculado como a razão entre a média das D.O.s das duplicatas da amostra pela D.O. “cut-off” (D.O. média do SLR).

10. PESQUISA DE ANTICORPOS IgA ANTI –FORMAS ERITROCITÁRIAS DE *P. falciparum*

10.1. Otimização do ELISA –IgA

Placas NUNC (polysorb) foram sensibilizadas com antígeno de *P. falciparum* a 5 µg/ mL (100 µL/ cavidade) em PBS por 2 horas a 37°C e 18 horas a 4° C. Após, as placas foram lavadas uma vez com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tw) e foram bloqueadas com leite desnatado a

5% (200 μ L/ cavidade) por 2 horas a 37°C e as placas foram novamente lavadas 2 vezes com PBS-Tw e uma vez com água de MilliQ, secas, embrulhadas uma a uma em papel de filtro e armazenadas a 4°C em bolsas de alumínio com dessecante até o momento do uso. Para realização da reação imunoenzimática as placas foram mantidas à temperatura ambiente.

Foram adicionados 100 μ L de cada diluição dos 12 soros-padrão controles positivos e negativos em leite desnatado a 2% em PBS - Tween 0,05% (PBS-Tw) (1/25, 1/50, 1/100 e 1/200) nas cavidades das placas, que foram incubadas a 37°C por 40 minutos. Após 3 lavagens com PBS-Tw, foram adicionados à cada cavidade 100 μ L das diluições do conjugado específico anti-IgA (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1000 e 1/2000) diluídos em leite desnatado a 2% em PBS-Tw e foi realizada nova incubação a 37°C por 40 minutos. Após novo ciclo de lavagens de 3 vezes com PBS-Tw, foram adicionados à cada cavidade 100 μ L de substrato cromogênico TMB H_2O_2 (Sigma Chem. Co) e as placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 50 μ L de H_2SO_4 2N. A densidade óptica (D.O.) do produto colorido obtido foi feita em leitor de microplacas Titertek Multiskan MCC340 a 450 nm.

10.2. Determinação da densidade óptica limiar

A partir dos resultados obtidos com os soros-padrão, estabelecemos a melhor diluição dos soros e do conjugado. Com ELISA otimizado foram testadas 88 amostras de soros de doadores de sangue para determinação

da densidade óptica (D.O.) limiar, que foi calculado pela média das D.O.s dessas 88 amostras mais duas vezes o desvio padrão.

Os resultados de cada amostra foram fornecidos como índice de reatividade (I.R.)_m, calculado como a razão entre a média da D.O. das duplicatas da amostra pela D.O. “cut-off”.

11. DETERMINAÇÃO DE IgE e IgA TOTAIS

11.1. IgE total

IgE total foi determinado nos soros por método nefelométrico com partículas de poliestireno com o kit N Látex IgE mono (Dade Behring), no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (LAC/HC/FMUSP), por Flávia Cristina Kinskowski.

11.2. IgA total

IgA total foi determinada nos soros por método nefelométrico com o kit N Látex Anti-soros contra imunoglobulinas humanas (Dade Behring), no LAC/HC/FMUSP, por Flávia Cristina Kinskowski.

12. DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR

Fc γ RIIA¹³¹

12.1. Método de Extração de DNA genômico com Fenol/ Clorofórmio

O DNA de 53 amostras foi extraído segundo protocolo descrito por Snounou *et al*, 1993 e modificado por Ferreira *et al*, 1998. Duzentos microlitros de sangue total foram adicionados a 10 μ L de saponina (Sigma Chem. Co) 1% e 1 mL de PBS estéril, e incubados a 37° C por 5 minutos, sendo posteriormente centrifugados a 2000 x *g* por 15 minutos. O sobrenadante foi lavado com 1mL de PBS estéril, centrifugado a 2000 x *g* por 15 minutos. Esta lavagem foi repetida por mais duas vezes. Após a última lavagem, foram adicionados ao sedimento 200 μ L de solução de lise (Tris-HCl 1 M pH 8,0, EDTA 500 mM pH 8,0, NaCl 2,5 M, SDS 10%, proteinase K (Sigma Chem Co) 20 mg/mL, qsp 200 μ L de água estéril). A mistura foi incubada a 56° C por 3 horas e em seguida, a proteinase K foi inativada a 95° C por 10 minutos.

Foram adicionados 250 μ L de fenol equilibrado (Gibco), misturando gentilmente por 10 minutos. Após a centrifugação 10.000 x *g* por 5 minutos, a fase aquosa foi removida. Posteriormente 250 μ L de fenol/ clorofórmio (1:1) foram adicionados à amostra, centrifugados a 10.000 x *g* por 5 minutos, e a fase aquosa foi novamente removida. Este procedimento foi repetido com 250 μ L de clorofórmio (Merck). Para precipitar o DNA, a fase aquosa foi retirada e colocada em um novo tubo contendo 25 μ L de acetato de sódio

3M pH 5,2 e 600 µL de etanol (Merck) gelado (100%) e incubada a -20°C “overnight”.

Após a incubação, o material foi centrifugado a 14.000 x *g* por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o sedimento de DNA foi lavado com 600 µL de etanol 80% e novamente centrifugado como descrito acima. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 100µL de água estéril.

12.2. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos para amplificação do PCR foram escolhidos especialmente para amplificar o gene $Fc\gamma$ RIIA -H/ R¹³¹ e não os genes homólogos $Fc\gamma$ RIIB e $Fc\gamma$ RIIC, como descrito por Jiang *et al.* (1996) e foram obtidos comercialmente da Invitrogen do Brasil.

SENSE: 5'- GGAAAATCCCAGAAATTCTCGC-3'

ANTISENSE: 5'-CAACAGCCTGACTACCTATTACGCGGG-3'

12.3. Amplificação por PCR

A amplificação por PCR foi preparada com 100 ng de DNA genômico, 200 pmol de cada oligonucleotídeo, 200 µM dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1.7 U *Taq* polimerase (Invitrogen), tampão de *Taq* polimerase contendo 200 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂. O volume foi completado para 100 µL com água bidestilada, deionizada e autoclavada. Após uma denaturação inicial a 95° C por 5 minutos, 32 ciclos de PCR (denaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 30

segundos, extensão a 72°C por 40 segundos) e uma extensão final a 72°C por 10 minutos foram feitos em aparelho Master Cycler Gradient (Eppendorf). Como controle negativo interno de reação foi utilizado água bidestilada, deionizada e autoclavada.

12.4. Eletroforese em Gel de Agarose

Foi utilizada agarose 2% (Sigma Chem. Co) dissolvida em Tampão de corrida TAE 1x (Tris acetato 40 mM, EDTA 2 mM) e solubilizada por aquecimento. As amostras foram analisadas para verificar se ocorreu amplificação do produto de 366 pares de base (bp). A todas as amostras foi adicionado tampão de amostra de DNA (0,5% de azul de bromofenol, 100 mM EDTA e 50% de glicerol). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/ mL) durante 40 minutos ao abrigo da luz. O padrão de bandas foi analisado em transluminador sob fonte de luz UV e o gel foi fotografado em aparelho Stratagene Eagle Eye^R.

12.5. Digestão do produto de PCR com enzima de restrição

Para digestão do produto de PCR foi realizada uma mistura contendo 10µL do produto de PCR (366 pares de base (bp)), 0,5U/ µL *Bsh1236I* (FnuDII) (Fermentas), 0,5 µL de tampão R⁺ contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl e 0,1 ng/ mL BSA (Fermentas). O volume foi completado para 20 µL com água bidestilada, deionizada e autoclavada. A mistura foi incubada a 37°C por 4 horas e após a incubação a enzima de restrição foi inativada a 65°C por 20 minutos. Após a digestão com *Bsh1236I*

(FnuDII), produz um fragmento de 343 pares de base (bp) (H/ H¹³¹) ou um fragmento de 322 pares de base (bp) (R/ R¹³¹) ou um fragmento de cada 343bp e 322bp, respectivamente (H/ R¹³¹).

12.6. Eletroforese em Gel de Agarose

Foi utilizada agarose 3% (Sigma Chem. Co) dissolvida em Tampão de corrida TAE 1x (Tris acetato 40 mM, EDTA 2 mM) e solubilizada por aquecimento. O padrão de peso molecular utilizado foi o 100bp DNA Ladder (Gibco). A todas as amostras foi adicionado tampão de amostra de DNA (0,5% de azul de bromofenol, 100 mM EDTA e 50% de glicerol). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/ mL) durante 40 minutos ao abrigo da luz. O padrão de bandas foi analisado em transluminador sob fonte de luz UV e o gel foi fotografado em aparelho Stratagene Eagle Eye^R.

13. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas e dos dados descritivos foram realizados no Programa Sigma Stat (Jandel Scientific) e Prysma. Os resultados dos índices de reatividade e da concentração de anticorpos foram apresentados em medianas. As comparações entre dois grupos para amostras independentes foram feitas pelo teste paramétrico não paramétrico Mann-Whitney. As comparações entre grupos múltiplos para amostras independentes foram feitas pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis. As comparações entre as freqüências e proporções foram feitas pelo teste do

Qui-quadrado (χ^2) e teste de Fischer (para pequenas casuísticas). Todas as probabilidades dos testes foram feitas para um nível de significância de 95%.

Os resultados em concentração das imunoglobulinas IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgE foram determinados a partir de curvas-padrão dos respectivos mielomas usando-se o programa ELISA desenvolvido por Plikyatis *et al*, 1995 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). O programa usa uma função log – logística de quatro parâmetros para descrever dados de padrões e formar as curvas de calibração.

V. RESULTADOS

1. PADRONIZAÇÃO DOS TESTES IMUNOENZIMÁTICOS PARA A PESQUISA DE DIFERENTES CLASSES E SUBCLASSES DE IMUNOGLOBULINAS ANTI-*Plasmodium falciparum*

1.1 Subclasses de IgG

Na tabela 1 mostramos os resultados da padronização do ELISA para pesquisa de subclasses de anticorpos IgG anti-*P. falciparum* usando 12 soros positivos e 12 soros negativos para IgG anti-*P. falciparum*.

Pelos resultados apresentados na tabela 1, escolhemos a diluição dos soros a 1/50 para pesquisa de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 anti-*P. falciparum*. A pesquisa de anticorpos IgG4 foi avaliada com diluições dos soros a 1/5, 1/10 e 1/20, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a diluição a 1/5. A diluição do conjugado anti-IgG1 a 1/1000 e para as demais subclasses a diluição a 1/500, estabelecidas a partir da titulação dos conjugados com mielomas das respectivas subclasses de IgG (Anexo I).

Foram testadas 89 amostras de soro de doadores de sangue, sendo que a média mais duas vezes o desvio padrão das D.O.s obtidas com essas amostras foram 0,077 para IgG1, 0,108 para IgG2, 0,023 para IgG3 e 0,029 para IgG4. Calculamos o IR de cada soro negativo, e a partir desses calculamos o IR limiar que foi de 1,0 para todas as subclasses. Assim, todas as amostras com $IR \geq 1,0$ foram consideradas positivas.

Tabela 1. Resultados da padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-*P. falciparum* em 12 amostras de soros positivos e 12 negativos para anticorpos IgG anti-*P. falciparum*.

Subclasses		Resultados do ELISA (D.O.)								
de	Soros	1/25			1/50			1/100		
anticorpos		Méd	máx	mín	Méd	Max	mín	Méd	máx	mín
IgG1	Pos	2,099	2,514	1,750	1,987	2,370	1,580	1,830	2,444	1,010
	Neg	0,081	0,252	0,010	0,035	0,107	0,000	0,010	0,070	0,000
IgG2	Pos	0,605	1,222	0,130	0,480	0,964	0,060	0,373	0,771	0,030
	Neg	0,029	0,069	0,010	0,017	0,044	0,000	0,008	0,022	0,000
IgG3	Pos	0,334	1,059	0,060	0,253	0,794	0,030	0,193	0,573	0,020
	Neg	0,003	0,007	0,000	0,003	0,007	0,000	0,002	0,005	0,000
IgG4	Pos	1/5			1/10			1/20		
		Méd	máx	mín	Méd	Max	mín	Méd	máx	mín
	Pos	0,089	0,989	0,000	0,077	0,871	0,000	0,067	0,756	0,000
	Neg	0,004	0,014	0,000	0,002	0,004	0,000	0,001	0,001	0,000

1.2. Anticorpos IgE

Na tabela 2 apresentamos os resultados da padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos IgE anti-*P. falciparum* com dois soros controles positivos e três soros de doadores de sangue de área não endêmica e testando dois conjugados anti-IgE humana e o conjugado anti-IgG humana.

Tabela 2. Resultados do ELISA para pesquisa de anticorpos IgE específicos com conjugados anti-IgG humana peroxidase (α -IgG-Po), anti-IgE humana marcado com peroxidase (α -IgE-Po), anti-IgE humana marcada com biotina (α -IgE-B). RF= pré-absorção dos anticorpos IgG com RF-absorbent.

Soro	Conjugado	Diluições do soro					
		puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40
P8	α -IgG-Po	0,125	0,341	-0,021	0,492	0,588	0,24
	RF	-	-	-	0,315	0,333	0,425
	α -IgE-Po	0,034	0,182	-0,006	0,019	0,002	0,042
	RF	-	-		0,059	0,058	0,198
	α -IgE-B	0,022	0,038	0,017	0,002	-0,01	-0,021
	RF	-	-	-	0,058	0,14	0,119
P29	α -IgG-Po	-0,086	0,303	0,417	0,361	0,393	0,261
	RF	-	-	-	0,368	0,348	0,426
	α -IgE-Po	-0,01	-0,002	-0,008	-0,028	0,005	-0,011
	RF	-	-	-	0,013	0,097	0,095
	α -IgE-B	0,049	0,041	0,005	-0,008	-0,023	-0,028
	RF	-	-	-	0,071	0,157	0,235
N1	α -IgG-Po	0,051	-0,111	-0,102	-0,148	-0,119	-0,117
	α -IgE-Po	-0,067	-0,042	-0,072	-0,086	-0,075	-0,053
	α -IgG-Po	0,009	-0,064	-0,097	-0,113	-0,097	-0,094
N2	α -IgE-Po	-0,072	-0,039	-0,044	-0,08	-0,093	-0,094
N3	α -IgG-Po	-0,006	-0,095	-0,087	-0,106	-0,108	-0,097
	α -IgE-Po	-0,082	-0,068	-0,078	-0,088	-0,057	-0,082

Baseados nos resultados acima, escolhemos o conjugado anti-IgE humana marcada com biotina e a diluição dos soros a 1/40 após tratamento

com RF-Absorbent para a execução do ELISA para pesquisa de anticorpos IgE anti-*P. falciparum*.

Assim padronizada, foram testadas 84 amostras de soros de doadores de sangue de área não endêmica e calculados os IRs de cada um. A média mais duas vezes o desvio padrão dos IRs dos controles negativos foi considerado como o IR limiar, que foi 1,00. Assim, todas as amostras com $IR \geq 1,0$ foram consideradas positivas.

1.3.Anticorpos IgM

Foi feita a otimização do ELISA-IgM indireto, testando-se 4 diluições dos 12 soros controles positivos e negativos (1/25, 1/50, 1/100 e 1/200) e 4 diluições do conjugado anti-IgM humana (1/5.000, 1/10.000, 1/20.000 e 1/30.000), com quatro variáveis do tempo de bloqueio e armazenamento das placas após o bloqueio (Anexo III).

As condições escolhidas foram: bloqueio por 2 horas a 37°C, com secagem direta das placas para o posterior armazenamento (variável B), diluição a 1/100 dos soros e diluição a 1/20.000 do conjugado para a continuação dos experimentos. Definidas essas variáveis, foram testadas 88 amostras de soro de doadores de sangue, para a determinação da D.O. limiar ("cut-off"). A média das D.O.s desses soros foi 0.123, com um desvio padrão (DP) de 0.096, assim, o cálculo da D.O. limiar ("cut-off") foi:

$$\text{"cut-off"} = \text{média das D.O.s} + 2 \times \text{DP} = 0,123 + 2 \times 0,096 = 0,315$$

Considerando esse “cut-off”, 3 amostras de soro de doadores de sangue foram positivas ($DO > 0,315$), portanto, a especificidade foi de 97%.

Para a preparação do soro limiar de reatividade, foi diluído um “pool” de soros positivos para anticorpos IgM anti-formas eritrocitárias em um “pool” de soros negativos a 1/2, 1/3, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 e 1/128. Cada soro artificialmente preparado foi testado no ELISA-IgM indireto otimizado. O soro que forneceu a D.O. mais próxima a D.O.limiar foi escolhido como soro limiar de reatividade (SLR), que foi o “pool” de soros positivos diluídos a 1/3 em “pool” de soros negativos (Anexo III).

1.4. Anticorpos IgA

1.4.1. ELISA-IgA indireto

A padronização do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgA anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum* foram testadas 4 diluições de 6 soros controles positivos e 6 negativos (1/25, 1/50, 1/100 e 1/200) e 6 diluições do conjugado anti-IgA humana (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1000 e 1/2000).

Foram escolhidas as diluições 1/25 dos soros e 1/2000 do conjugado para continuação dos experimentos. Foram testadas 88 amostras de doadores de sangue, sendo que a média mais duas vezes o desvio padrão das D.O.s obtidas com essas amostras foi 0.432. Calculamos o IR de cada soro negativo, e a partir desses calculamos o IR limiar que foi de 1,0. Assim, todas as amostras com $IR \geq 1,0$ foram consideradas positivas.

1.5. Outras patologias testadas nos ELISAs

Foram testadas amostras de soro de outras patologias nos ELISAs para pesquisa dos anticorpos IgG e IgM e das subclasses de IgG e os resultados obtidos são apresentados na tabela 3. Uma amostra de indivíduo com FAN reagente foi positivo para anticorpos IgM ; uma amostra de indivíduo com Doença de Chagas, PCR e FAN e duas amostras de indivíduo com Leishmaniose Cutânea foram positivas para IgG; uma amostra de indivíduo com Doença de Chagas, Toxoplasmose, PCR, ASLO e FAN foi positiva para IgG1; uma amostra de indivíduo com Leishmaniose Cutânea, Sífilis, PCR, ASLO e FAN foi positiva para IgG2; uma amostra de indivíduo com Leishmaniose Cutânea, Toxoplasmose, PCR, ASLO e FR foi positiva para IgG3 e uma amostra de indivíduo com Toxoplasmose foi positiva para IgG4. No entanto, estas amostras apresentaram sempre índices de reatividade baixos, muito próximo do limiar considerado.

Tabela 3. Frequências de amostras de soro de indivíduos com outras patologias positivas nos ELISA para pesquisa de diferentes classes e subclasses de anticorpos anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum*.

Outras patologias	ELISA (% de amostras de soro positivas)					
	IgM	IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Chagas (n=9)	0,0	11,1	11,1	0,0	0,0	0,0
Leishmaniose (n=8)	0,0	25,0	25,0	12,5	12,5	0,0
Toxoplasmose (n=8)	0,0	0,0	12,5	0,0	12,5	12,5
Sífilis (n=6)	0,0	0,0	16,7	16,7	0,0	0,0
PCR (n=5)	0,0	20,0	20,0	20,0	20,0	0,0
ASLO (n=8)	0,0	0	12,5	12,5	12,5	0,0
FR (n=10)	0,0	0,0	10,0	0,0	10,0	0,0
FAN (n=10)	10,0	10,0	10,0	10,0	0,0	0,0

2. QUANTIDADE E QUALIDADE DOS ANTICORPOS

A quantidade das diferentes classes e subclasses de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum* produzidas durante a resposta imune ao plasmódio foi expressa em (a). Níveis de anticorpos, calculados em índices de reatividade (IR) ou em concentração ($\mu\text{g/mL}$) e em (b). Frequência de amostras de soros positivos. A quantidade foi analisada no total das amostras e considerando-se a presença de infecção por plasmódio detectada por métodos parasitológicos, gota espessa e QBC[®].

A qualidade dos anticorpos foi avaliada (a). Pela determinação do índice de avidéz dos anticorpos; (b). Pelas diferenças no padrão de resposta humoral entre os indivíduos com complicações clínicas causadas pela malária, os infectados sem nenhuma complicação clínica e os infectados assintomáticos; (c). Pelas correlações com variáveis preditoras de exposição prévia à malária.

2.1. Anticorpos IgG e subclasses de IgG

Na tabela 4 apresentamos os níveis dos anticorpos IgG (em índice de reatividade (IR)) e das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (em IR e concentração $\mu\text{g/mL}$) anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum* no total de 270 indivíduos de área endêmica e considerando a presença ou não de infecção por plasmódio. Observamos que maiores níveis de IgG (em IR), IgG1, IgG2 e IgG3 (em concentração) ocorreram significativamente nos indivíduos não infectados em relação aos infectados, e o inverso foi observado para IgG4, cujos maiores níveis foram encontrados entre os indivíduos infectados do que nos não infectados. Quanto ao índice de avides, maiores índices de avides de IgG foram observados nos indivíduos não infectados significativamente e para as subclasses, as diferenças na foram significantes.

Considerando os seguintes níveis normais das subclasses de IgG no soro: IgG1, 9mg/mL, IgG2 3mg/mL, IgG3 1mg/mL e IgG4 0,5mg/mL (ABBAS *et al*, 2000), as concentrações medianas das subclasses específicas para formas eritrocitárias de *P.falciparum* encontradas na população estudada representaram 16,4%, 11,7%, 11,4% e 0,2% das IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 totais, respectivamente.

As freqüências de amostras de soros positivos para anticorpos IgG e das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 no total das 270 amostras de soro de indivíduos de área endêmica e considerando a presença ou não de infecção por plasmódios são apresentadas na tabela 5. Não houve diferença significativa das freqüências de positivos entre os indivíduos infectados e não

infectados ($P>0,05$). Quando consideramos a espécie de *Plasmodium* infectante, foi observada diferença significativa das freqüências de positivos para os anticorpos IgG1 entre os indivíduos infectados por *P. falciparum* (78,43%) e os infectados por *P. vivax* (62,7%) ($\chi^2= 4,16$; $P=0,04$), e também houve uma diferença significativa entre os indivíduos infectados por *P. vivax* (62,7%) e os infectados com malária mista (92,6%) ($\chi^2= 6,55$; $P=0,01$), mas não para os anticorpos IgG e as demais subclasses ($P>0,05$).

Na figura 4 apresentamos as freqüências dos anticorpos IgG e das subclasses de IgG de baixa avidéz e de alta avidéz no total de amostras estudadas e agrupadas entre os indivíduos infectados e os não infectados.

No total de indivíduos predominam anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 de alta avidéz, enquanto anticorpos IgG3 e IgG4 predominam os de baixa avidéz. Entre os indivíduos infectados por plasmódio, predominaram anticorpos IgG, IgG1, IgG2 e IgG3 de baixa avidéz e anticorpos IgG4 de alta avidéz; o oposto sendo observado entre os indivíduos não infectados, em que predominaram anticorpos IgG, IgG1, IgG2 e IgG3 de alta avidéz e anticorpos IgG4 de baixa avidéz, apesar de existir diferença significativa apenas para os anticorpos IgG ($\chi^2=4,34$; $P=0,037$).

Tabela 4. Resultados das medianas dos níveis e da avidéz dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* obtidos no ELISA com 270 amostras de soro de indivíduos de área endêmica de malária. IR= índice de reatividade (DO da amostra/ DO do “cut-off”); [Ig]= concentração da subclasse em µg/mL; IA= índice de avidéz (DO da amostra tratada com uréia/DO amostra tratada com PBS)x100; P= probabilidade a 95% de existir diferença entre os grupos (teste de Mann-Whitney). Em vermelho estão os resultados com diferença significativa.

Anticorpo	População	Níveis de anticorpos				IA	
		[Ig] (µg/mL)	P	IR	P	%	P
IgG	total	-	-	3,01		62,0	
	infectados	-	-	2,97	0,0395	60,3	0,0426
	não infectados	-	-	3,83		68,6	
IgG1	total	14,8		6,72		64,0	
	infectados	13,0	0,0115	5,99	0,0425	62,1	0,0652
	não infectados	28,4		11,06		76,4	
IgG2	total	3,50		0,59		60,6	
	infectados	3,35	<0,0001	0,55	0,0076	58,5	0,2999
	não infectados	7,55		1,43		67,0	
IgG3	total	1,14		1,43		43,6	
	infectados	1,09	0,0061	1,35	0,079	42,9	0,6886
	não infectados	2,97		1,65		52,6	
IgG4	total	0,01		0,2		44,8	
	infectados	0,02	0,0261	0,225	0,0393	48,9	0,6031
	não infectados	0,01		0,15		38,7	

Tabela 5. Resultados das frequências de amostras de soros positivas no ELISA para anticorpos IgG e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* no total de 270 indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária e agrupadas pelos resultados da pesquisa de plasmódios pela gota espessa e QBC®.

ANTICORPOS			RESULTADOS DA PARASITEMIA						
			<i>Plasmodium</i> +	Pf+	PfPv+	Pv	Pm	Neg	Total
IgG	Total		233	153	27	51	2	37	270
	Pos	N	178	115	23	38	2	31	209
		%	76,4	75,2	85,2	74,5	100	83,8	77,4
IgG1	Total		233	153	27	51	2	37	270
	Pos	N	179	120	25	32	2	33	212
		%	76,8	78,4	92,6	62,7	100	89,2	78,5
IgG2	Total		233	153	27	51	2	37	270
	Pos	N	96	66	12	16	2	22	118
		%	41,2	43,1	44,4	31,4	100	59,5	43,7
IgG3	Total		233	153	27	51	2	37	270
	Pos	N	133	91	14	27	1	24	157
		%	57,1	59,5	51,9	52,9	50	64,9	58,1
IgG4	Total		198	130	19	47	2	35	233
	Pos	N	32	21	3	8	-	3	35
		%	16,2	16,2	15,8	17,0	-	8,6	15,0

(Pf: *P. falciparum*; Pv: *P. vivax*; Pm: *P. malariae*; Neg: negativo).

Fig. 4. Frequências dos anticorpos IgG e das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* de baixa avidéz e de alta avidéz no total de indivíduos (n=270) de área endêmica de malária e agrupados entre os indivíduos infectados por plasmódios (INF) (n=233) e os não infectados (NÃO INF) (n=37) testados no ELISA.

Correlacionamos os índices de reatividade de IgG, as concentrações das subclasses e os níveis de avides dos anticorpos IgG e das subclasses com as variáveis preditoras de exposição à malária, como idade, número de malárias anteriores e tempo de permanência na área endêmica. Correlações positivas e significantes entre a idade e os níveis de IR-IgG, IgG1, IgG2, IA-IgG, IA-IgG1 e IA-IgG4 (resultados significantes das correlações de Spearman na tabela 6). O tempo de permanência não apresentou nenhuma correlação significativa com os resultados de anticorpos ($P>0,05$).

Correlações positivas e significantes foram obtidas no teste de correlação de Spearman entre número de malárias anteriores e níveis de IgG, IgG1, IgG2 e IgG3 (tabela 6).

No gráfico da figura 5 apresentamos as freqüências dos anticorpos IgG e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 para anticorpos anti-*P. falciparum* considerando o número de malárias anteriores relatadas pelos indivíduos estratificados em: mais de cinco malárias anteriores (**>5**) ($n=138$), de uma a cinco malárias anteriores (**1 a 5**) ($n=86$) e primo-infectados (**primo**) ($n=30$).

As freqüências de amostras positivas para anticorpos IgG1 diferiram significativamente entre os grupos com mais de 5 malárias anteriores, de 1 a 5 e primo-infectados, 94,2%, 69,8% e 36,7%, respectivamente ($\chi^2= 56,3\%$, $P<0,0001$), apesar de não terem diferido se os indivíduos estavam ou não infectados ($P>0,05$).

Tabela 6. Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman e das probabilidades que foram significantes a 95% quando correlacionados variáveis preditoras de exposição à malária (idade, número de episódios anteriores de malária) e os níveis de anticorpos IgG e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias e os respectivos níveis de avides no ELISA.

Correlação (Spearman)		r	P
Idade	IR-IgG	0,13	0,033
	IA-IgG	0,19	0,009
	IgG1	0,17	0,008
	IA-IgG1	0,15	0,031
	IgG2	0,16	0,008
	IA-IgG4	0,35	0,041
Número de Malárias anteriores	IR-IgG	0,30	0,000
	IA-IgG	0,16	0,028
	IgG1	0,51	0,000
	IA-IgG1	0,30	0,000
	IgG2	0,45	0,000
	IgG3	0,33	0,000
	IgG4	-0,23	0,000

Fig. 5. Frequências de amostras de soro positivas para anticorpos IgG e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* no ELISA no total de 270 indivíduos e considerando a presença ou não de infecção por *Plasmodium* distribuídas entre os grupos de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores (>5) (n=138), de uma a cinco malárias anteriores (1 a 5) (n=86) e de primo-infectados (primo) (n=30).

A frequência de amostras positivas para anticorpos IgG2 foi significativamente maior no grupo de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores do que nos grupos de 1 a 5 e primo-infectados, 60,9%, 27,2% e 26,7%, respectivamente ($\chi^2= 29,7\%$, $P<0,0001$), apesar de não terem diferido se os indivíduos estavam ou não infectados ($P>0,05$).

As frequências de amostras positivas para anticorpos IgG3 também foi significativamente maior no grupo de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores do que nos grupos de 1 a 5 e primo-infectados, 67,4%, 50,0% e 43,3% respectivamente ($\chi^2= 9,90\%$, $P=0,007$), apesar de não terem diferido se os indivíduos estavam ou não infectados ($P>0,05$).

O oposto foi observado entre as frequências de amostras positivas para anticorpos IgG4, que apesar de não diferirem significativamente foram maiores nos grupos de indivíduos relatando de 1 a 5 malárias anteriores e de primo-infectados, 16,4% 24,1 % respectivamente do que no grupo com mais de 5 malárias anteriores, 13,1% ($\chi^2= 2,48\%$, $P =0,290$).

As frequências de amostras positivas para anticorpos IgG também foi significativamente maior no grupo de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores do que nos grupos de 1 a 5 e primo-infectados, 93,5%, 61,7% e 66,7%, respectivamente ($\chi^2=36,5$, $P<0,0001$). Também não houve diferença significativa entre os indivíduos infectados e não infectados ($P>0,05$).

Também analisamos os níveis de anticorpos IgG em índice de reatividade e das subclasses de IgG em concentração e os níveis de avides nos diferentes grupos de malárias anteriores. As figuras 6 e 7 apresentam os resultados dessas análises.

Fig. 6. Comparação dos níveis dos anticorpos IgG (em índice de reatividade (IR)) e das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* (em concentração, µg/mL) entre os grupos de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores (>5) (n=138), de uma a cinco malárias anteriores (1 a 5) (n=86) e de primo-infectados (primo) (n=30) obtidos no ELISA.

Observamos na figura 6 que os níveis de anticorpos IgG expressos como medianas dos IRs aumentaram significativamente em relação ao número de malárias anteriores, sendo 3,86 no grupo de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores, 2,06 no grupo de uma a cinco malárias e 2,13 grupo de primo-infectados. Apesar de diferenças terem sido significantes apenas entre os grupos com mais de 5 malárias anteriores em relação aos outros dois grupos ($P < 0,0001$).

Os níveis de anticorpos IgG1 expressos como medianas das concentrações aumentaram significativamente em relação ao número de malárias anteriores, sendo 29,7 $\mu\text{g/mL}$ no grupo de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores, 8,07 $\mu\text{g/mL}$ no grupo de uma a cinco malárias e 1,29 $\mu\text{g/mL}$ no grupo de primo-infectados ($P < 0,0001$).

Os níveis de anticorpos IgG2 e IgG3 também aumentaram com o número de malárias anteriores, medianas de IgG2, 7,68, 2,33, 1,03 $\mu\text{g/mL}$ e de IgG3, 1,77, 0,90 e 0,51 $\mu\text{g/mL}$ nos grupos com mais de 5 malárias anteriores, de uma a cinco malárias e de primo-infectados, respectivamente. Apesar de diferenças terem sido significantes apenas entre os grupos com mais de 5 malárias anteriores em relação aos outros dois grupos ($P < 0,0001$).

Os níveis de anticorpos IgG4 diminuíram com o número de malárias anteriores, 0,011, 0,011 e 0,1145 $\mu\text{g/mL}$ nos grupos com mais de 5 malárias anteriores, de uma a cinco malárias e de primo-infectados, respectivamente ($P=0,0004$). Resultados também significantes de correlação negativa entre anticorpos IgG4 e número de malárias anteriores no teste de correlação de Spearman (tabela 6).

Observamos na figura 7 que os níveis de avidéz dos anticorpos IgG1 aumentaram significativamente em relação ao número de malárias anteriores, sendo 71,7% no grupo de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores, 52,2% no grupo de uma a cinco malárias e 22,9% no grupo de primo-infectados ($P<0,0001$). Correlação positiva e significativa também foi obtida no teste de correlação de Spearman entre número de malárias anteriores e níveis de avidéz de IgG1 e de IgG (tabela 6).

Já os níveis de avidéz dos anticorpos IgG, IgG2, IgG3 e IgG4 não diferiram com o número de malárias anteriores ($P>0,05$).

Fig. 7. Comparação dos níveis de avides (IA) dos anticorpos IgG e das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* entre os grupos de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores (>5) (n=138), de uma a cinco malárias anteriores (1 a 5) (n=86) e de primo-infectados (primo) (n=30) obtidos no ELISA.

2.2. ANTICORPOS IgE, IgM, IgA

Na tabela 7 apresentamos os resultados de anticorpos IgM, IgA e IgE quando testadas todas as amostras de soro das áreas endêmicas de malária, considerando a presença de plasmódio, definida pela positividade em pelo menos um método para pesquisa de plasmódios, gota espessa e/ou QBC®.

Tabela 7. Resultados das frequências (%) de positivos e dos índices de reatividade (IR) (em mediana) de anticorpos IgM, IgA e IgE anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* obtidos no ELISA com amostras de soros de indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária divididos pelos resultados da pesquisa de plasmódios pela gota espessa e QBC®.

ANTICORPOS		RESULTADOS DA PARASITEMIA							
		<i>Plasmodium</i> +							
			Pf+	PfPv+	Pv	Pm	Neg	Total	
IgM	Total		233	153	27	51	2	37	270
	IR		0,95	1,00	0,73	0,93	1,15	1,04	0,95
	Pos	N	108	75	8	24	1	20	128
		%	46,4	49,0	29,6	47,1	50,0	54,1	47,4
IgA	Total		119	91	13	15	-	6	125
	IR		0,90	0,96	0,74	0,97	-	0,82	0,90
	Pos	N	51	42	2	7	-	3	54
		%	42,9	46,2	15,4	46,7	-	50,0	43,2
IgE	Total		208	130	26	51	1	30	238
	IR		0,64	0,75	0,21	0,57	0,08	1,41	0,66
	Pos	N	79	53	8	18	-	15	94
		%	37,9	40,8	30,8	35,3	-	50,0	39,5

(Pf: *P. falciparum*; Pv: *P. vivax*; Pm: *P. malariae*; Neg: negativo).

As freqüências de anticorpos IgM, IgA e IgE foram maiores nos indivíduos não infectados do que nos indivíduos infectados, mas sem diferença significativa ($P>0,05$). Quando consideramos a espécie de *Plasmodium* infectante, também não foram observadas diferenças significantes das freqüências de positivos para os anticorpos IgM, IgA e IgE ($P>0,05$).

Os níveis de anticorpos IgM e IgA, calculados em IRs, não diferiram entre os indivíduos infectados e os indivíduos não infectados ($P>0,05$). Os níveis de anticorpos IgE calculados em concentração ($\mu\text{g/mL}$), também não diferiram entre infectados e os não infectados (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados das medianas dos níveis de anticorpos IgE anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* no ELISA com 238 amostras de soro de indivíduos de área endêmica de malária. IR=índice de reatividade; [Ig]= concentração da subclasse em $\mu\text{g/mL}$; P = probabilidade a 95% de existir diferença entre os grupos (teste de Mann-Whitney).

anticorpo	População	Níveis de anticorpos			
		[Ig] ($\mu\text{g/mL}$)	P	IR*	P
IgE	total	0,05		0,68	
	infectados	0,05	0,697	0,64	0,701
	não infectados	0,07		1,41	

Correlacionamos os índices de reatividade de IgM, IgA e IgE, as concentrações dos anticorpos IgE com as variáveis preditoras de exposição à malária, como idade, número de malárias anteriores e tempo de permanência na área endêmica não observamos nenhuma correlação significativa com os resultados de anticorpos ($P>0,05$) (Correlação de Spearman).

Na figura 8 mostramos as freqüências de anticorpos IgM, IgA e IgE de acordo com o número de episódios anteriores de malária relatados pelos indivíduos.

Os primo-infectados apresentaram maior freqüência de anticorpos IgM (70%) dos que os que relataram de 1 a 5 malárias (47,7%) e os que relataram mais de 5 malárias (42,8%) ($\chi^2=7,33$; $P = 0,026$). Apesar de não terem diferido se os indivíduos estavam ou não infectados ($P>0,05$).

A freqüência de anticorpos IgA não diferiu com o número de malárias anteriores ($P>0,05$).

A freqüência de amostras positivas para os anticorpos IgE foi significativamente maior no grupo de indivíduos com mais de 5 malárias do que nos grupos de 1 a 5 malárias e primo-infectados, 56,5%, 33,8% e 41,4%, respectivamente ($\chi^2=11,6$ $P=0,003$). Apesar de não terem diferido se os indivíduos estavam ou não infectados ($P>0,05$).

Também analisamos os níveis de anticorpos IgM e IgA em índice de reatividade e de IgE em concentração ($\mu\text{g/mL}$) nos diferentes grupos de malárias anteriores (figura 9).

Os níveis de anticorpos IgM e IgA diminuíram com número de malárias anteriores, medianas de IgM 0,90, 0,98 e 1,28 e de IgA 0,82, 0,96 e 1,02 nos grupos com mais de 5 malárias anteriores, de uma a cinco malárias e de primo-infectados, respectivamente, apesar que não foram observadas diferenças significantes entre os grupos ($P>0,05$).

Os níveis de anticorpos IgE diminuíram com o número de malárias anteriores, 0,049, 0,049 e 0,063 $\mu\text{g/mL}$ nos grupos de 5 malárias anteriores, de uma a cinco malárias e de primo-infectados, respectivamente, também sem diferenças significantes entre os grupos ($P>0,05$).

Fig. 8. Frequências de amostras de soros positivas anticorpos IgM, IgA e IgE anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* no ELISA no total de 270 indivíduos e considerando a presença ou não de infecção por *Plasmodium* distribuídas entre os grupos de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores (>5) (n=138), de uma a cinco malárias anteriores (1 a 5) (n=86) e de primo-infectados (primo) (n=30).

Fig. 9. Comparação dos níveis dos anticorpos IgM e IgA (em índice de reatividade (IR)) e de IgE anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* (em concentração, $\mu\text{g/mL}$) entre os grupos de indivíduos com mais de 5 malárias anteriores (**>5**) (n=138), de uma a cinco malárias anteriores (**1 a 5**) (n=86) e de primo-infectados (**primo**) (n=30) obtidos no ELISA.

De 66 amostras de soro foram determinados os níveis de IgE e IgA totais por nefelometria. A mediana dos níveis de IgE foi de 1.095 UI/mL, muito acima dos níveis normais que são abaixo de 100 UI/mL; apenas quatro amostras mostraram níveis normais de IgE total. Entre as 62 amostras com níveis elevados, 40 foram positivas para anticorpos IgE anti-*P. falciparum* (64,5%) e 22 foram negativas (35,5%) ($z= 3.05$; $P= 0,002$).

Os níveis de IgA total ficaram dentro da normalidade com mediana de 2,00 g/L, sendo que os níveis normais estão entre 0,7 a 4 g/L. Apenas três amostras de soro estavam abaixo da normalidade e quatro acima de 4 g/L.

2.3. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA HUMORAL EM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA MALÁRIA

Para analisar as diferenças de resposta humoral entre indivíduos com diferentes formas clínicas de malária, foram determinadas todas as classes e subclasses de imunoglobulinas específicas para *P. falciparum* em 233 amostras de soro de indivíduos infectados divididos em:

- a) Indivíduos com complicações clínicas por malária (n=70), 52 infectados por *P. falciparum* e 18 por *P. vivax* (**MC= malária complicada**);
- b) Indivíduos sem complicações clínica (n=148), 92 infectados por *P. falciparum*, 32 por *P. vivax*, 1 por *P. malariae* e 23 por *P. falciparum* e *P. vivax* (**MNC= malária não complicada**);
- c) Indivíduos assintomáticos (n=15), 9 infectados por *P. falciparum*, 1 por *P. vivax*, 1 por *P. malariae* e 4 por *P. falciparum* e *P. vivax* (**AS= malária assintomática**).

Os resultados em frequências de amostras positivas para as diferentes classes e subclasses de anticorpos anti-*P. falciparum* são apresentados na figura 10.

Fig. 10. Frequências dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* no ELISA com 233 amostras de soro de indivíduos com malária, 70 com complicações clínicas por malária (**MC**), 148 sem complicações clínicas (**MNC**) e 15 assintomáticos (**AS**).

Os anticorpos IgG1 predominaram nos grupos MNC e AS, 89,9% e 73,3%, respectivamente com diferença significativa em relação ao grupo MC, 50,0% ($\chi^2 = 42,5$; $P < 0,0001$).

Os anticorpos IgG2 predominaram nos grupos MNC e AS, 47,3% e 60,0%, respectivamente com diferença significativa em relação ao grupo MC, 24,3% ($\chi^2 = 12,7$; $P = 0,0017$).

Os anticorpos IgG3 predominaram nos grupos MNC e AS, 64,2% e 60,0%, respectivamente com diferença significativa em relação ao grupo MC, 41,4% ($\chi^2 = 10,1$; $P = 0,0064$).

O oposto foi observado para os anticorpos IgG4 que predominaram nos grupos MNC e MN, 18% e 16,5%, respectivamente, em relação ao grupo AS, 6,7%, apesar da diferença não ter sido significativa ($\chi^2 = 1,14$; $P = 0,57$).

Os anticorpos IgM predominaram no grupo MC, 58,6% com diferença significativa em relação aos grupos MNC e AS, 39,9% e 53,3%, respectivamente ($\chi^2 = 7,00$; $P = 0,030$).

Em relação aos anticorpos IgG, IgA e IgE não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Na figura 11 apresentamos as frequências de cada subclasse e de IgG de alta avidéz e baixa avidéz divididos pelos grupos de diferentes formas clínicas de malária. Anticorpos IgG e IgG1 de alta avidéz predominaram significativamente nos grupos MNC e AS e de baixa avidéz, predominaram no grupo MC (IgG, $\chi^2 = 16,5$, $P = 0,0003$ e IgG1, $\chi^2 = 16,4$, $P = 0,0003$). O mesmo foi observado para os anticorpos IgG2, apesar da diferença não ter sido significativa ($P > 0,05$). Entre os anticorpos IgG3 predominaram os de baixa avidéz independente da forma clínica, apesar de não significativa ($P > 0,05$). Os níveis de avidéz dos anticorpos IgG4 não diferiram no grupo MNC, e no grupo MC predominaram os de baixa avidéz, mas sem significância ($P > 0,05$). Apenas um dos indivíduos assintomáticos foi positivo para anticorpos IgG4, e estes foram de alta avidéz.

Fig. 11. Frequências das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e de IgG anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* de baixa avidéz e de alta avidéz divididas entre os indivíduos com malária complicada (**MC**) (n=70), indivíduos sem complicações clínicas por malária (**MNC**) (n=148) e indivíduos infectados assintomáticos (**AS**) (n=15) testados no ELISA.

Nas figuras 12 e 13 apresentamos a distribuição dos resultados das diferentes imunoglobulinas nos grupos MC, MNC e AS.

O perfil diferencial entre os grupos foi semelhante ao observado em frequências de positividade para cada imunoglobulina. Os níveis de IgG1, IgG2, IgG3 foram maiores nos grupos MNC e AS do que no grupo MC ($P<0,0001$). Os níveis de IgG4 não diferiram entre os grupos ($P>0,05$). Já os níveis de IgM e IgE foram maiores no grupo MC ($P=0,107$, $P=0,069$, respectivamente) e os níveis de IgG e IgA não diferiram entre os grupos ($P>0,05$).

No quadro da figura 14 apresentamos os resultados das 233 amostras analisadas para cada imunoglobulina e divididas entre os três grupos de formas clínicas da malária. Assim, visualizamos o perfil de resposta humoral de cada indivíduo, reforçando as observações de um perfil de resposta predominante de IgG1, IgG2 e IgG3 nos grupos AS e MNC e de IgG4, IgE e IgM no grupo MC.

Fig. 12. Distribuição dos níveis dos anticorpos IgG e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* no ELISA. Resultados de IgG expressos em índices de reatividade (IR) e as subclasses expressos em concentração ($\mu\text{g/mL}$) entre os indivíduos com malária complicada (**MC**) (n=70), indivíduos sem complicações clínicas por malária (**MNC**) (n=148) e indivíduos com malária assintomáticos (**AS**) (n=15) .

Fig. 13. Distribuição dos níveis dos anticorpos IgM, IgA e IgE anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* no ELISA. Resultados de IgM e IgA estão expressos em índices de reatividade (IR) e de IgE em concentração (µg/mL) entre os indivíduos com malária complicada (**MC**) (n=70), indivíduos sem complicações clínicas por malária (**MNC**) (n=138) e indivíduos com malária assintomática (**AS**) (n=15).

Fig. 14. Resultados individuais da pesquisa de anticorpos IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE divididos pela forma clínica de malária: malária complicada (n=70), malária não complicada (n=148) e malária assintomática (n=15).

Analizamos também as interações entre as diferentes classes e subclasses de anticorpos frente aos três grupos de formas clínicas de malária (Tabela 9).

Tabela 9. Interações entre os níveis de diferentes classes e subclasses de anticorpos anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* entre os grupos de indivíduos com malária complicada, com malária não complicada e com malária assintomática. G=IgG, G1= IgG1, G2= IgG2, G3= IgG3, G4= IgG4, E= IgE, M=IgM.

Interações	Forma clínica da malária			Kruskal
	complicada	não complicada	assintomática	Wallis (p)
G1G3/G2G4	2,16	3,35	1,70	0,061
G1G2G3/G4	0,36	9,12	32,1	<0,001
G1G3	1,45	10,94	23,94	<0,0001
G2G4	0,91	2,12	4,92	<0,0001
EG4	0,16	0,06	0,06	0,0100
G2/G4	12,2	154,1	482,7	<0,0001
G3/G4	4,29	39,79	82,83	<0,0001
EG4/G2	0,106	0,008	0,01	<0,0001
MEG4	2,81	1,91	1,52	0,16
M/G	0,565	0,39	0,36	0,032
G/M	1,77	2,56	2,81	0,031
G1G2G3/MEG4	5,32	13,87	18,87	<0,0001
E/G	0,31	0,18	0,29	0,021
G/E	2,70	2,98	3,80	0,078

Observamos que nos grupos MNC e AS predominaram as interações dos anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3, enquanto no grupo MC complicada predominaram as interações entre IgG4 e IgE. Maiores razões dos níveis de IgG2 em relação a IgG4 predominam nos indivíduos assintomáticos e com malária não complicada.

3. DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR Fc γ RIIA H/R¹³¹

Foi realizado um método de digestão com enzima de restrição específica do alelo para determinarmos a existência do polimorfismo Fc γ RIIA H/R¹³¹ em 53 indivíduos. A frequência do alelo H131 foi 67,9% (n=36), sendo 22,6% H/H (n=12) e 45,3% H/R (n=24). O aminoácido arginina na posição (R/R) foi encontrado em 17 indivíduos (32,1%) R/R.

Na figura 15 apresentamos os resultados da digestão do produto de PCR digerido com a enzima de restrição *Bsh1236I* (FnuDII) de algumas amostras com a presença ou ausência do polimorfismo no receptor Fc γ RIIA H/R131.

As amostras de DNA dos 53 indivíduos foram testadas também por *Nested-PCR* para a pesquisa de *Plasmodium*, sendo que foram todas positivas. Assim, os pacientes foram divididos em dois grupos em relação à presença ou não de sintomas: sintomáticos (n=35) e assintomáticos (n=18).

Na tabela 10 apresentamos os resultados dos anticorpos IgG2 divididos entre os grupos de indivíduos sintomáticos e assintomáticos com e sem a presença do polimorfismo H131.

Ao analisarmos estatisticamente os dados da tabela, encontramos que a frequência de anticorpos IgG2 foi significativamente maior nos indivíduos assintomáticos (76,9%) do que nos sintomáticos (39,1%) ($P=0,041$, teste de Fisher). Ao compararmos as medianas das concentrações de IgG2 nos grupos, observamos que essas foram maiores no grupo de indivíduos assintomáticos, com diferença significativa entre os indivíduos que carregam o polimorfismo H131 (78,7 µg/mL nos assintomáticos e 3,35 µg/mL nos sintomáticos) ($T=311$, $P=0,02$, teste de Mann-Whitney).

Tabela 10. Resultados do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG2 anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* divididos nos grupos de indivíduos positivos para *Plasmodium* por *Nested-PCR* sintomáticos e assintomáticos e com (H/H ou H/R) e sem (R/R) o polimorfismo no receptor FcγRIIA H¹³¹, determinado por PCR após digestão com enzima de restrição alelo específica.

Grupos	Alelo	Anticorpos IgG2		
		Fcγ RIIA H131	[] Md	N pos % pos
sintomáticos (n=35)	R/R (n=12)		4,0	5 41,7
	H/H ou H/R (n=23)		3,4	9 39,1
assintomáticos (n=18)	R/R (n=5)		38,1	4 80,0
	H/H ou H/R (n=13)		78,6	10 76,9

Md= mediana das concentrações em µg/mL

Fig.16. Eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio contendo os produtos de amplificação e da digestão do DNA com a enzima *Bsh1236I* (FnuDII). Linhas 2 e 8 representam amostras (H/R), linha 4 representa amostra (H/H) e as linhas 6 e 10 representam amostras (R/R), digeridas com a enzima de restrição. As linhas 1, 3, 5, 7 e 9 (C) representam o produto de PCR sem digestão com a enzima de restrição. Abreviação: PM: padrão de tamanho molecular (100bp DNA Ladder).

V. DISCUSSÃO

Em geral, a aquisição de imunidade na malária é lenta e para ser mantida requer a exposição a variantes antigênicas múltiplas dos plasmódios e a maturação do sistema imune. Com a idade diminui a incidência de mortalidade e morbidade e aumentam os níveis de anticorpos. Portanto, após várias infecções, pode-se observar em nível populacional, o aumento da prevalência de anticorpos a antígenos específicos e em nível individual, o reconhecimento de maior número de variantes de um antígeno em particular (DAY & MARSH, 1991; BAIRD, 1995).

Durante muito tempo, os estudos da resposta imune humoral na malária se concentraram na avaliação da especificidade antigênica da resposta, mas muitas evidências de que a imunidade protetora estaria associada à mudança de classes e subclasses dos anticorpos mostraram a importância de se considerar a qualidade dos anticorpos produzidos, que envolve a afinidade da porção F_{ab} pelo antígeno e a natureza da região F_c que determina a função do anticorpo.

No nosso trabalho, avaliamos a resposta imune humoral de indivíduos naturalmente expostos à malária, de diferentes regiões do Brasil, a antígenos somáticos de *P. falciparum*. Em áreas de transmissão instável, como nas regiões endêmicas do Brasil, é mais difícil a associação da resposta humoral com proteção pela dificuldade em se encontrar grupos populacionais protegidos. Assim, associamos os resultados dos anticorpos com infecção patente por plasmódios, a exposição prévia à malária estratificada, em três grupos (mais de 5 malárias anteriores, 1 a 5 malárias

anteriores e primo-infectados) e diferentes formas clínicas da malária (malária complicada, não complicada e assintomática).

Inicialmente, foram padronizadas técnicas imunoenzimáticas para a pesquisa de diferentes classes e subclasses (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgE) de imunoglobulinas específicas para formas eritrocíticas de *P. falciparum*. Também foi otimizado o ELISA para pesquisa de anticorpos da classe IgM.

Os anticorpos conjugados à biotina usados no ELISA para detecção das subclasses de IgG foram testados contra mielomas de cada subclasse e os resultados mostraram boa especificidade (anexo I), o que nos assegurou confiabilidade nos resultados obtidos.

A diluição dos soros a 1/50 foi a escolhida para as subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 por ser a menor diluição que permitia clara distinção entre as amostras positivas das negativas. Para a detecção de anticorpos IgG4, que estão presentes em concentrações muito baixas no soro, a diluição de soros escolhida foi de 1/5.

Para a pesquisa de anticorpos IgE foi necessária a absorção prévia dos anticorpos IgG com o reagente RF-Absorbent, que consiste de um anticorpo anti-IgG humana. Após a absorção o soro resultante apresenta nenhuma ou pouca concentração de IgG, o que diminui a probabilidade de falsos resultados negativos pela competição de altos níveis de IgG com IgE ou de falsos resultados positivos por possível reação cruzada de anticorpos IgG com o conjugado anti-IgE humana marcada com biotina. Após a absorção, o soro fica diluído a 1/40. Para a pesquisa dos anticorpos IgG e IgM os soros

foram diluídos a 1/100 e para os anticorpos IgA os soros foram diluídos a 1/25.

Algumas amostras de soro de indivíduos com outras patologias foram positivas para determinadas classes e subclasses de anticorpos. As amostras positivas apresentaram sempre índices de reatividade baixos, muito próximos ao limiar considerado. Esses resultados podem ser devidos a reações inespecíficas, como auto-anticorpos das amostras de soro de indivíduos com doenças auto-imunes (FAN positivas, FR ou PCR) reagindo com componentes celulares das hemácias; ou devido a reações cruzadas, como a reatividade de amostras de soro de indivíduos com Doença de Chagas, Leishmaniose Cutânea, Toxoplasmose ou Sífilis. Ainda não podemos excluir a possibilidade de algumas amostras de soro serem realmente positivas para anticorpos anti-*P. falciparum*, visto que não conhecemos a história epidemiológica de cada doador.

Após a padronização dos testes, as amostras de soro de indivíduos de área endêmica foram testadas para todas as classes e subclasses de anticorpos. A casuística estudada consistiu de 233 indivíduos infectados por plasmódios diagnosticados pela gota espessa e/ou QBC® e apenas 37 indivíduos não infectados.

Os níveis de anticorpos IgG, determinados em índice de reatividade (IR), e IgG1, IgG2, IgG3, em concentração (µg/mL), foram maiores entre os indivíduos não infectados do que nos indivíduos infectados. Para a subclasse IgG4, verificamos maior nível entre os infectados.

A frequência de positividade e os níveis dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2 e IgG3 foram maiores nos grupos de indivíduos com maior número de episódios anteriores de malária, sendo que as concentrações desses anticorpos apresentaram correlação positiva significativa com o número de malárias anteriores. A idade dos indivíduos correlacionou-se positivamente com significância com os anticorpos IgG, IgG1 e IgG2.

Considerando que o desenvolvimento de imunidade protetora depende do grau de exposição prévia, as correlações positivas com variáveis preditoras de exposição à malária sugerem o possível envolvimento dessas classes de anticorpos na proteção. Estas observações podem também explicar o fato de que apesar da grande maioria dos indivíduos estudados relatarem muitos episódios anteriores de malária (em média, 10), os níveis de IgG, IgG1, IgG2 e IgG3 foram maiores nos indivíduos não infectados do que nos infectados. Provavelmente os indivíduos não infectados estariam mais protegidos de novas infecções.

Também o papel protetor das subclasses pode ser evidenciado pelos maiores níveis encontrados nos indivíduos com malária não complicada e assintomática, quando comparados aos indivíduos com malária complicada.

Nossos resultados corroboram os de outros autores que mostraram uma relação entre anticorpos citofílicos, IgG1 e IgG3, com formas não graves da doença. Vários estudos mostraram que anticorpos IgG1 e IgG3 específicos seriam protetores na malária, enquanto anticorpos IgG4 seriam não protetores (BOUHAROUN-TAYOUN & DRUILHE, 1992; DUBOIS *et al*, 1993;

RZEPCZYK *et al*, 1997; TAYLOR *et al*, 1998; TANGTEERAWATANA *et al*, 2001).

Em indivíduos naturalmente imunes, anticorpos IgG1 e IgG3 anti-MSPf₁₉ evoluíram com as estações do ano dependendo, da carga parasitária e a produção específica de IgG1 versus IgG3 foi regulada independentemente. Para explicar as diferenças na regulação dos diferentes isotipos de anticorpos, especula-se se a evolução dos anticorpos IgG1 e IgG3 seja decorrente do catabolismo e/ ou da utilização desses anticorpos (DIALLO *et al*, 2002).

Um estudo realizado com indivíduos com malária grave em Dakar, no oeste da África, não encontrou anticorpos IgG3 em indivíduos que evoluíram para a fatalidade; por outro lado, anticorpos IgG3, em baixos níveis foram encontrados nos indivíduos que evoluíram bem, mostrando que de alguma maneira estes anticorpos estariam contribuindo para a ausência de mortalidade (SARTHOU *et al*, 1997).

Apesar dos anticorpos IgG2 não participarem dos mecanismos efetores de opsonização, fagocitose e ADCC por não se ligarem aos receptores FcγR, principalmente ao FcγRIIA, um receptor encontrado em células e envolvido na ativação da produção de TNF-α e conseqüente morte do parasita, nossos resultados mostraram predominância de anticorpos IgG2 em indivíduos com formas não complicadas de malária. Deloron *et al*. (1997) já haviam mostrado uma associação entre altos níveis de IgG2 e baixo risco de se adquirir infecção por *P. falciparum*. Também Aucan *et al*. (2000)

encontraram associação entre altos níveis de anticorpos IgG2 para epitopos de RESA e MSP2 e baixo risco de infecção.

O papel protetor de anticorpos IgG2 na malária em determinadas populações tem sido explicado pela ocorrência de um polimorfismo no gene do receptor FcγRIIA (AUCAN *et al*, 2000). O polimorfismo H131 que é uma mudança de arginina (R) para histidina (H) na posição 131, permite a ligação da fração F_c de IgG2 ao receptor, conferindo assim capacidade citofílica aos anticorpos IgG2 (WARMERDAM *et al*, 1991).

Como nossos resultados também sugeriram uma ação citofílica dos anticorpos IgG2, investigamos a existência do polimorfismo H131 na parte da nossa população de que dispunhamos. Infelizmente não foi possível a investigação do polimorfismo na maioria da população com formas complicadas da malária, por não dispormos de sangue total para extração de DNA. Desta forma o polimorfismo H131 foi investigado em 53 amostras de DNA de indivíduos infectados sintomáticos e assintomáticos. A frequência do alelo H131 nesta população foi 67,9%, sendo 22,6% H/H e 45,3% H/R. O aminoácido arginina na posição (R/R) foi encontrado em 32,1% dos indivíduos. Encontramos que tanto a frequência de positivos como os níveis dos anticorpos IgG2 foram significativamente maiores nos indivíduos assintomáticos (76,9%) do que nos sintomáticos (39,1%). Entre os indivíduos que carregam o polimorfismo H131 os níveis de IgG2 foram muito maiores nos assintomáticos (78,7µg/mL) dos que nos sintomáticos (3,35 µg/mL).

Aucan *et al.* (2000) também encontraram uma frequência aproximada de 70% do polimorfismo H131 na população e os níveis de IgG2 se correlacionaram com baixo risco de infecção por *P. falciparum*. Os altos níveis de IgG2 que encontramos nos indivíduos assintomáticos portadores do polimorfismo sugerem a participação de IgG2 como anticorpo citofílico na nossa população, cuja frequência do polimorfismo H131 também foi alta.

Os resultados obtidos com os anticorpos IgG4 também estão de acordo com os da literatura. Os níveis de IgG4 apresentaram correlação negativa com o número de malárias anteriores, e a frequência de positividade e os níveis de IgG4 foram maiores nos grupos de indivíduos com poucos episódios anteriores de malária e nos indivíduos com malária complicada.

A associação de anticorpos IgG4 específicos na malária com ausência de proteção foi observada por outros autores (ARIBOT *et al.*, 1996; AUCAN *et al.*, 2000). IgG4 inibe *in vitro* a ação de anticorpos citofílicos, IgG1 e IgG3, responsáveis por mediar a opsonização de eritrócitos infectados (GROUX & GYSIN, 1990). Soe-Soe *et al.* (2004) observaram que os níveis dos anticorpos IgG4 contra diferentes regiões de GLURP (Proteína rica em glutamato), (R0 e R1) se associaram negativamente com proteção clínica. Na infecção por *S. mansoni*, IgG4 bloqueia mecanismos protetores mediados por anticorpos e também inibe a morte do parasita por eosinófilos (KHALIFE *et al.*, 1989; RIHET *et al.*, 1992).

Aucan *et al.* (2000) observaram que a correlação positiva de IgG4 com o risco de infecção foi mais forte quando os níveis de IgG2 eram baixos sugerindo que IgG4 estaria neutralizando a citotoxicidade celular mediada por

monócitos ou outras células efetoras dependentes de IgG2. Assim IgG4 teria um papel bloqueador da ação protetora de IgG2.

Outro aspecto essencial da resposta imune humoral é a afinidade dos anticorpos que pode refletir a qualidade dos anticorpos envolvidos em proteção ou em diferentes fases da doença.

A afinidade funcional ou avidéz é a medida da força entre o antígeno e o anticorpo. A avidéz de determinadas classes de anticorpos aumenta com o tempo, após estímulos antigênicos e em diferentes infecções, como consequência da maturação da resposta imune (ABBAS *et al*, 2000). Nos estágios iniciais de uma infecção, quando presumivelmente existem grandes quantidades de antígeno presente, células B com receptores de membrana de diferentes graus de avidéz são estimuladas e o resultado total é uma resposta humoral específica com anticorpos de grande variedade de avidéz. Com o tempo, o nível de antígenos cai e o remanescente estimula preferencialmente células B com receptores altamente específicos e de alta avidéz, levando à produção de clones de células produtoras de anticorpos de maior avidéz.

A avidéz de anticorpos produzidos em resposta a um estímulo antigênico parece ser dependente da natureza desse estímulo, de fatores genéticos, da eficiência dos macrófagos em processarem o antígeno para apresentarem às células imunocompetentes, da presença de antígenos circulantes e anticorpos circulantes e da presença de células T auxiliares.

A medida de avidéz tem sido amplamente utilizada no diagnóstico de infecções, como na rubéola, citomegalovírus, herpesvírus, varicela-zoster

(revisado em WOZICOVA, 2004). Na toxoplasmose, a determinação da avidéz de anticorpos IgG específicos tem permitido diferenciar fase aguda de fase pregressa (CAMARGO, 1991).

Na malária, Ferreira *et al.* (1996) estudaram a avidéz de anticorpos anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum*, naturalmente adquiridos, em população de área endêmica, com transmissão estável, na África, e transmissão instável, na Amazônia Brasileira. Eles observaram que anticorpos de alta avidéz, particularmente da subclasse IgG1, predominaram na resposta humoral anti-*P. falciparum* desenvolvida por africanos clinicamente imunes. Os pacientes da Amazônia, produziram anticorpos de baixa avidéz durante a fase aguda, que poderia ser explicado pela ativação policlonal de células B. Dois meses após a quimioterapia, a proporção de anticorpos IgG de alta avidéz anti-*P. falciparum* aumentou significativamente, mas a concentração de anticorpos citofílicos diminuiu. Eles postularam que anticorpos de alta qualidade anti-*P. falciparum* seriam produzidos inicialmente durante o crescimento intra-eritrocítico do parasita, e agiriam enquanto as parasitemias ainda eram baixas, sendo mais efetivos contra a severidade da doença.

Nossos resultados mostraram predomínio de anticorpos IgG, IgG1, IgG2 e IgG3 de alta avidéz e anticorpos IgG4 de baixa avidéz entre os indivíduos não infectados e o inverso foi observado entre os indivíduos infectados. Nos indivíduos não infectados os anticorpos de alta avidéz provavelmente estão controlando a reinfecção rapidamente e desempenhando um papel protetor eficaz contra o parasita. Enquanto nos indivíduos infectados a produção de

anticorpos de baixa avidéz seja é devida à ativação policlonal de células B, como verificado por Ferreira *et al.* (1996).

Anticorpos de baixa avidéz de todas os isótipos predominaram nos indivíduos com malária complicada, o que pode ser um reflexo do predomínio, neste grupo, de indivíduos com poucos episódios anteriores de malária. Mas, também predomínio de anticorpos de baixa avidéz poderia estar associado ao não controle da infecção com uma expressão de imunodeficiência (FERREIRA *et al.*, 1996).

Anticorpos IgG3 em geral foram de baixa avidéz, independentemente da forma clínica da malária, o que pode sugerir que estes anticorpos sejam, preferencialmente induzidos contra novas variantes dos antígenos polimórficos do estágio eritrocítico de *P. falciparum*. Também a baixa avidéz predominante nos anticorpos IgG3 poderia ser explicada pela curta meia-vida que apresentam (~ 7-8 dias), comparada à meia-vida das outras subclasses IgG1 IgG2 e IgG4 (~23 dias) (CALICH & VAZ, 2001; WINKLER *et al.*, 1998).

As freqüências de positividade e os níveis dos anticorpos IgE não diferiram entre indivíduos infectados e não infectados. A positividade para anticorpos IgE foi mais freqüente nos indivíduos com mais de cinco malárias anteriores, apesar dos níveis de anticorpos IgE terem sido maiores no grupo de primo-infectados. Os níveis de IgE foram maiores nos indivíduos com malária complicada.

Infecção experimental em camundongos com *P. chabaudi chabaudi* induz elevação dos níveis de IgE somente após repetidas infecções

indicando que a reexposição e/ ou infecção crônica é de grande importância (HELMBY *et al*, 1996); este fato pode justificar o fato da maior frequência de a positividade ter sido observada nos indivíduos que relatavam mais de cinco episódios anteriores de malária.

Anticorpos IgE anti-plasmodiais podem ser protetores, mas também devem contribuir para a gravidade da doença. Correlações observadas entre os níveis de IgE com a idade suportam a hipótese de que teriam um papel protetor contra malária (DESOWITZ *et al*, 1993; MAENO *et al*, 1993). Mais recentemente foram observadas altas concentrações de IgE em indivíduos com malária grave não comatosos quando comparados com indivíduos comatosos, sugerindo um papel protetor destes anticorpos (CALISSANO *et al*, 2003). O papel protetor de IgE é bem estabelecido na esquistossomose (JARRET & MILLER, 1982; ALLEN, 1993; CAPRON & CAPRON 1994; MILLER, 1996).

Outros trabalhos sugerem que os anticorpos IgE poderiam estar envolvidos na imunopatogênese da malária. Perlmann *et al*. (1994) observaram um aumento nos níveis de IgE em indivíduos com malária cerebral quando comparados com malária não complicada.

Um fator essencial da patogênese da malária *falciparum* é a citoaderência de eritrócitos infectados ao endotélio das vênulas pós-capilares, levando à obstrução do fluxo sanguíneo e várias respostas inflamatórias. Isso envolve o recrutamento de monócitos, ativação endotelial e a liberação de citocinas, tal como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (BERENDT *et al*, 1989). Embora TNF- α possa proteger contra os parasitas

(CLARK *et al*, 1991; MILLER *et al*, 1994), sua superprodução local causa dano tecidual e também a sua concentração elevada no sangue está correlacionada à morbidade e mortalidade na malária grave (GRAU *et al*, 1989; KWIATKOWSKI *et al*, 1990).

A principal fonte de TNF- α são monócitos ativados pelas “toxinas” derivadas do parasita contendo moléculas de glicosilfosfatidil inositol (GPI) (JAKOBSEN *et al*, 1995; KWIATKOWSKI, 1995). No entanto, imunocomplexos de IgE com antígeno ou com IgG anti-IgE podem induzir a expressão de receptores Fc ϵ em monócitos e a interação com estes receptores leva à ativação celular e à liberação de TNF- α . Isto foi observado *in vitro* quando células induziram a liberação de TNF- α , mas dependentemente de IgE (ELGHAZALI *et al*, 1997). *In vivo* a superprodução local de TNF- α em indivíduos com malária cerebral, pode ser induzida em monócitos pela reação com depósitos de imunocomplexos contendo antígeno e anticorpos IgE (MAENO *et al*, 2000). Imunocomplexos de IgE ligados a receptores CD23 (receptor de baixa afinidade de IgE -Fc ϵ II) podem levar à ativação da óxido nítrico sintase (NOS) e resultar na produção de óxido nítrico (NO) (DUGAS *et al*, 1995). No entanto, TNF- α e outras citocinas podem também induzir diretamente a liberação de NO (DING *et al*, 1988; CLARK *et al*, 1991). Ghigo *et al*. (1995) demonstraram que eritrócitos infectados podem gerar por si só grandes quantidades de NO, provavelmente produzindo um fator solúvel que induza NOS nas células endoteliais. Estes resultados sugerem que mecanismos dependentes e

independentes de IgE podem estar envolvidos na indução de TNF- α e NO nos microvasos, na malária cerebral.

Os maiores níveis de IgE específicos encontrados no grupo de indivíduos com malária complicada, observados no nosso trabalho, sugerem e favorecem mais a participação desses na patogênese da doença do que em proteção. Os níveis de IgE total também estavam bem aumentados na nossa população, como tem sido observado em populações de áreas endêmicas (PERLMANN *et al*, 1994).

As freqüências de positividade e os níveis dos anticorpos IgM não diferiram entre indivíduos infectados e não infectados, mas foram mais freqüentes nos indivíduos primo-infectados dos que nos que relataram de 1 a 5 malárias ou mais de 5 malárias. Os níveis de IgM diminuíram com número de malárias anteriores. Maior freqüência de anticorpos IgM em indivíduos primo-infectados era esperado, pois IgM é a primeira classe de anticorpos produzida numa resposta humoral primária. Este fato também deve ter contribuído para o predomínio de IgM em indivíduos com formas complicadas de malária, pois entre estes estavam a maioria dos primo-infectados.

As freqüências de positividade e os níveis dos anticorpos IgA também não diferiram entre indivíduos infectados e não infectados. A freqüência de anticorpos IgA não diferiu com o número de malárias anteriores, mas os níveis de IgA diminuíram com o número de malárias anteriores. Estes resultados estão de acordo com resultados anteriores do nosso grupo quando foi observado predomínio de anticorpos IgA em primo-infectados.

(ÁVILA *et al*, 1993; ÁVILA *et al*, 1999). Nenhuma outra relação dos anticorpos IgA com variáveis preditoras de exposição ou proteção foi observada.

A visualização do perfil da resposta humoral de cada indivíduo estudado (figura 15) reforça as observações da predominância de resposta de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 nos indivíduos assintomáticos e com malária não complicada e de IgG4, IgE e IgM nos indivíduos com malária complicada.

Como as diferentes classes e subclasses de anticorpos reagem com os mesmos epitopos, mas aparentemente, podem afetar o curso da infecção de modo diferente, estabelecemos interações entre os anticorpos calculando razões entre os seus níveis. As interações podem ser um modo apropriado para estimar a atividade de anticorpos.

Observamos que nos indivíduos assintomáticos e com malária não complicada predominaram as interações dos anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3, enquanto nos indivíduos com malária complicada predominaram as interações entre IgG4 e IgE. Maiores razões dos níveis de IgG2 em relação a IgG4 predominam nos indivíduos assintomáticos e com malária não complicada, como observado por Aucan *et al*. (2000). A razão IgE/IgG foi significativamente maior nos indivíduos com malária complicada do que nos que não apresentavam complicações clínicas, o que pode sugerir que anticorpos IgG e IgE reativos contra os mesmos epitopos poderiam estar exercendo funções opostas durante a infecção. Assim as relações entre

anticorpos IgG/IgE, IgG1-IgG2-IgG3/IgG4, IgG2/IgG4, IgG4-IgE/IgG2 podem refletir o equilíbrio entre a patogenicidade e a proteção na malária.

Calissano *et al.* (2003) observaram baixos níveis de anticorpos IgG anti-*P. falciparum* em indivíduos em coma, isto poderia ser devido a uma fraca resposta humoral ou grande quantidade de anticorpos poderiam estar ligados aos parasitas seqüestrados. Uma explicação adicional, mas não exclusiva nas diferentes concentrações de anticorpos, reflete outros fatores genéticos que estão contribuindo para a proteção e/ ou patogenicidade da doença.

A medida de anticorpos em fluidos corpóreos reflete uma situação estática, ou seja, são medidos os anticorpos que estão presentes neste fluido no tempo da amostragem. Poucos ou ausentes anticorpos de uma ou mais subclasses sugerem ou que estas moléculas não estão sendo produzidas ou que estão sendo utilizadas. Os níveis de anticorpos detectáveis no plasma ou soro de indivíduos imunes a *P. falciparum* provavelmente resultem do equilíbrio entre a produção e o uso de anticorpos específicos contra o parasita (DIALLO *et al*, 2002).

Como na infecção por *P. falciparum* a imunidade nunca é completamente estéril, é plausível que haja uma produção contínua de anticorpos. Esses anticorpos são produzidos em quantidades excessivas ou decaem ou ocorre um clareamento a níveis indetectáveis. Isto tem pelo menos duas conseqüências: (a). anticorpos específicos são produzidos, provavelmente em excesso conjuntamente com anticorpos de especificidades irrelevantes que poderiam estar envolvidos na “decepção”

imune, um fenômeno geralmente observado em infecções parasitárias; (b). células B de memória específicas e diferenciadas são produzidas com especificidade para os antígenos mais abundantes do parasita com mudanças do isotipo *de novo* em resposta a novas variantes antigênicas (GARRAUD *et al*, 2003).

A seleção do isotipo e a maturação da afinidade de um anticorpo são conseqüências de um processo de diferenciação de células B que ocorrem nos centros germinativos dos linfonodos em um indivíduo imunizado. Embora, a afinidade funcional ou avidéz dependa do antígeno e da seleção de clones de células que produzam anticorpos com melhor cinética de ligação ao epitopo, a seleção de isotipos (classe/subclasse) é um fenômeno complexo que resulta de múltiplos mecanismos, muitos dos quais não são ainda bem compreendidos (MANIS *et al*, 2002).

Entre os mecanismos mais importantes que levam à mudança do isotipo da cadeia pesada estão a intensidade e a duração da ligação do receptor da célula B com o epitopo e a natureza dos sinais co-estimulatórios que acontecem simultaneamente à ligação. As citocinas predominantes no contexto da resposta a um determinado antígeno é que vão fornecer ou aumentar esses sinais co-estimulatórios para as células B, agindo no núcleo, ou diretamente na cadeia pesada da imunoglobulina ou ainda regulando a maturação da afinidade (GARRAUD & NUTMAN, 1996). Citocinas produzidas por células CD4⁺ Th1, como IFN- γ , IL-2, IL-12 induzem a produção dos anticorpos citofílicos que participam de mecanismos efetores celulares dependentes de anticorpos. Citocinas produzidas por células CD4⁺

Th2, como IL-4, IL-5, IL-10, induzem a produção de anticorpos neutralizantes e ainda bloqueadores dos mecanismos induzidos por Th1.

Winkler *et al.* (1998) mostraram mudança de resposta Th2 preferencial em malária aguda não tratada para uma resposta regulada por Th1, sendo que IFN- γ foi essencial para a resolução da parasitemia e IL-10 pareceu ser a molécula chave no controle de respostas inflamatórias, que quando exageradas, podem levar a dano tecidual mais do que ao clareamento da parasitemia.

Provavelmente, o desenvolvimento gradual de imunidade protetora na malária, de fato, corresponda a uma modificação progressiva na regulação da resposta imune e não, como se pensou por muito tempo, o lento desenvolvimento de uma resposta ou a moléculas pobremente imunogênicas ou altamente polimórficas. Dados de “Immunoblotting” e ADCI sugerem que o hospedeiro exposto uma vez, ou um número limitado de vezes, à malária pode desenvolver altos níveis de anticorpos a antígenos que levam a mecanismos protetores, embora estes mecanismos não sejam funcionais. Ao contrário, a aquisição de um estado de resistência parece correlacionar-se com a habilidade de desenvolver anticorpos de um isotipo próprio, na maioria IgG1 e IgG3, e reduzir a proporção de isotipos não citofílicos (IgG4 e IgM) da mesma especificidade que bloqueiem mecanismos efetores (BOUHAROUN-TAYOUN & DRUILHE, 1992).

Nossos resultados mostraram que, mesmo em populações de regiões com transmissão de malária instável, podemos observar o desenvolvimento de um certo grau de imunidade protetora, quando anticorpos apropriados

são produzidos, mesmo com análise sendo feita com antígenos totais de formas eritrocitárias. Estudos posteriores deverão ser feitos, nessa mesma população, com antígenos específicos e candidatos a compor uma vacina com múltiplos epitopos para malária, pois é muito importante avaliar a capacidade do sistema imune de selecionar os mecanismos apropriados, por ex. produção preferencial de IgG1 e/ou IgG3 a antígenos particulares que levem a uma resposta protetora.

VI. CONCLUSÕES

1. Foram padronizadas técnicas imunoenzimáticas para a pesquisa de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA e IgM contra formas eritrocitárias de *P.falciparum*.
2. Maiores níveis de anticorpos IgG, IgG1, IgG2 e IgG3 foram observados nos indivíduos naturalmente expostos à malária não infectados do que nos indivíduos infectados e o oposto foi observado para IgG4.
3. Os níveis de anticorpos IgG, IgG1, IgG2, IgG3 apresentaram correlação positiva com o número de episódios anteriores de malária relatados pelos indivíduos naturalmente expostos, enquanto os anticorpos IgG4 apresentaram correlação negativa.
4. Os níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 e os níveis de avididade de IgG e IgG1 apresentaram correlação positiva com a idade dos indivíduos naturalmente expostos à malária.

5. Indivíduos naturalmente expostos à malária com melhor resposta à infecção, ou seja, sem complicações clínicas de malária ou assintomáticos, apresentaram resposta imune humoral específica com predomínio dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2 de alta avidéz e IgG3 de baixa avidéz. Indivíduos naturalmente expostos à malária com complicações clínicas por malária apresentaram resposta imune humoral específica com predomínio dos anticorpos IgG4, IgE e IgM.
6. Altos níveis de anticorpos IgG2 foram encontrados nos indivíduos assintomáticos portadores do polimorfismo H131 do gene do receptor FcγRIIA, que confere ação citofílica aos anticorpos IgG2 e pode justificar a associação de IgG2 com proteção observada na população estudada.
7. Os resultados mostraram que mesmo em populações de regiões com transmissão de malária instável pode ser observado o desenvolvimento de um certo grau de imunidade protetora quando anticorpos apropriados são produzidos, ou seja, das classes IgG1, IgG2 e IgG3.

VII. ANEXOS

Anexo I - Padronização do ELISA - subclasses de IgG

Densidades ópticas obtidas no ELISA com diferentes diluições dos conjugados anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 humano marcado com biotina e diferentes concentrações de mieloma purificado das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. [] concentração em ng/mL.

Conjugado Anti-humano Marcado com biotina	diluições	Mieloma IgG1 [] ng/mL			
		5000	1000	200	40
IgG1	1/1000	1,079	1,132	0,899	0,257
	1/2000	1,176	1,069	0,738	0,216
IgG2	1/500	0,029	0,063	0,041	0,033
	1/1000	0,013	0,081	0,073	0,075
IgG3	1/500	0,025	0,087	0,087	0,039
	1/1000	-0,034	-0,009	-0,030	-0,022
IgG4	1/500	-0,016	-0,004	-0,016	-0,022
	1/1000	-0,057	0,000	0,025	0,005

Conjugado Anti-humano Marcado com biotina	diluições	Mieloma IgG2 [] ng/mL			
		5000	1000	200	40
IgG1	1/1000	0,344	0,106	0,011	0,001
	1/2000	0,268	0,066	0,013	0,001
IgG2	1/500	1,010	0,704	0,221	0,026
	1/1000	1,035	0,585	0,131	0,018
IgG3	1/500	0,138	0,056	0,007	0,009
	1/1000	0,055	0,037	-0,005	-0,012
IgG4	1/500	0,033	0,013	-0,003	-0,004
	1/1000	0,019	0,005	-0,006	-0,010

Anexo I - Padronização do ELISA-subclasses de IgG (cont.)

Conjugado Anti-humano Marcado com biotina IgG1	diluições	Mieloma IgG3 [] ng/mL			
		5000	1000	200	40
IgG1	1/1000	0,123	0,048	0,015	0,006
	1/2000	0,062	0,032	0,022	0,017
IgG2	1/500	0,034	0,051	-0,010	-0,005
	1/1000	-0,005	0,030	-0,028	-0,033
IgG3	1/500	1,240	0,966	0,044	0,215
	1/1000	1,084	0,0857	0,371	0,097
IgG4	1/500	0,043	0,007	0,003	0,006
	1/1000	-0,003	0,004	0,004	0,025

Conjugado Anti-humano Marcado com biotina IgG1	diluições	Mieloma IgG4 [] ng/mL			
		5000	1000	200	40
IgG1	1/1000	0,123	0,022	0,004	0,037
	1/2000	0,062	0,022	0,004	0,018
IgG2	1/500	0,023	0,007	0,003	0,006
	1/1000	0,011	0,002	0,003	0,003
IgG3	1/500	0,059	0,029	0,007	0,002
	1/1000	0,038	0,018	0,003	0,003
IgG4	1/500	0,994	0,948	0,403	0,069
	1/1000	0,992	0,899	0,393	0,046

Anexo II - Padronização do ELISA-IgE

Titulação dos soros anti-IgE humana em ELISA com placas sensibilizadas com mieloma de IgE humana.

Soros anti-IgE humana	Diluições do mieloma de IgE				
	1/100	1/500	1/1000	1/5000	branco
soro de carneiro (6/7/82) (A)	1,111	1,628	1,209	1,152	0,169
soro de carneiro (Cappel) (B)	2,145	2,009	2,241	1,309	0,748
soro de cabra marcado com peroxidase (Sigma Chem. Co. 11/11/96) (C)	2,744	1,983	2,372	1,678	0,073
soro de cabra (específico para cadeia ε) marcado com peroxidase (Sigma Chem. Co, lote 029H4887) (D)	2,284	2,164	2,165	2,243	0,087
	1/100	1/200	1/400	1/800	branco
soro de cabra (Sigma Chem Co., 55,3mg/mL) marcada com biotina (E)	2,119	2,332	2,201	1,928	0,162

Anexo III - Padronização do ELISA-IgM

Média das densidades ópticas obtidas no ELISA com diferentes diluições dos soros controles positivos e soros negativos para anticorpos IgM anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* e diferentes diluições dos conjugados e nas variáveis de bloqueio e armazenamento estudadas: A. leite desnatado a 5% em PBS (PBS-L) por 2 horas a 37°C e tratamento com solução estabilizante; B. PBS-L por 2 horas a 37°C e secagem direta das placas; C. PBS-L por 18 horas a 4°C e tratamento com solução estabilizante; D. PBS-L por 18 horas a 4°C e secagem direta das placas.

ELISA – resultados						
Variável	Soros	Diluição do conjugado anti-IgM humana				
		diluição	1/5.000	1/10.000	1/20.000	1/30.000
A	positivos	1/25	1,831	1,158	0,571	0,429
		1/50	1,719	0,954	0,462	0,374
		1/100	1,477	0,800	0,359	0,281
		1/200	1,204	0,659	0,290	0,249
	negativos	1/25	0,505	0,249	0,111	0,089
		1/50	0,362	0,166	0,078	0,065
		1/100	0,244	0,101	0,046	0,046
B	positivos	1/25	2,225	1,397	0,884	
		1/50	1,991	1,221	0,730	
		1/100	1,790	1,041	0,616	
		1/200	1,467	0,811	0,540	
	negativos	1/25	0,857	0,446	0,225	
		1/50	0,549	0,295	0,154	
		1/100	0,404	0,202	0,097	
C	positivos	1/25	1,808	1,038	0,498	0,347
		1/50	1,502	0,882	0,428	0,319
		1/100	1,229	0,747	0,360	0,264
		1/200	1,017	0,593	0,287	0,225
	negativos	1/25	0,567	0,292	0,154	0,104
		1/50	0,387	0,200	0,114	0,076
		1/100	0,269	0,140	0,060	0,057
D	positivos	1/25	1,805	1,104	0,632	0,510
		1/50	1,607	0,920	0,541	0,411
		1/100	1,379	0,791	0,438	0,355
		1/200	1,176	0,667	0,377	0,294
	negativos	1/25	0,623	0,339	0,184	0,145
		1/50	0,429	0,227	0,131	0,101
		1/100	0,305	0,160	0,090	0,067

Anexo III - Padronização do ELISA-IgM (cont.)

Densidades ópticas do soro limiar de reatividade artificialmente preparado pela diluição de “pool” de soros positivos para anticorpos IgM anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* em “pool” de soros negativos.

ELISA-indireto								
SLR	Diluições do “pool” de soros positivos em “pool” de soros negativos para anticorpos IgM anti-formas eritrocitárias de <i>P. falciparum</i>							
	1/2	1/3	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
D.O.	0,417	0,347	0,251	0,247	0,173	0,147	0,132	0,124

Anexo IV - Padronização do ELISA-IgA

Média das densidades ópticas obtidas no ELISA com diferentes diluições dos soros controles positivos e soros negativos para anticorpos IgA anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* e diferentes diluições dos conjugados.

ELISA - resultados							
Soros		Diluição do conjugado anti-IgA humana					
	diluição	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1000	1/2000
positivos	1/25	2,135	2,049	1,611	1,028	0,539	0,381
	1/50	1,912	1,549	1,001	0,678	0,367	0,266
	1/100	1,418	1,007	0,678	0,445	0,212	0,140
	1/200	0,959	0,609	0,443	0,260	0,121	0,085
negativos	1/25	1,341	0,947	0,663	0,457	0,208	0,134
	1/50	0,923	0,608	0,456	0,326	0,129	0,087
	1/100	0,677	0,382	0,298	0,204	0,077	0,055

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, AB, Lichtman, AH, Pober, JSP. In: Cellular and Molecular Immunology, 2000; 4^a ed., WB Saunders Company.

Allen, J. Immunology of Human Helminth Infection *Int. Arch. Allergy Clin. Immunol.* 1993; 109: 3-10.

Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, Trape JF, Balde, AT, Druilhe P, Roussilhon C. Pattern of Immunoglobulin Isotype Response to *Plasmodium falciparum* Blood-Stage Antigens in Individuals Living in a Holoendemic Area of Senegal (Dielmo, West Africa) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 54(5):449-457.

Aucan C, Traoré Y, Tall F, Nacro B, Traoré-Leroux T, Fumoux F, Rihet P. High Immunoglobulin G2 (IgG2) and Low G4 (IgG4) Levels are Associated with Human Resistance to *Plasmodium falciparum* Malaria *Infect. Immun.* 2000; 68(3): 1252-1258.

Avila SLM, Oliveira MS, Leandro, MC, Arruk, VG, Carvalho Filho NR, Boulous M, Ferreira AW. Malária Humana: Definição de Perfis Sorológicos por *Western Blotting* e ELISA. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 1993; 35 (S10): S 32.

Ávila SLM, Ogando SLA, Nunes Mal, Durlacher, RR, Pang L, Ferreira AW. Análise do Comportamento de Anticorpos IgA Anti – *Plasmodium falciparum*, por ELISA, em Pacientes Submetidos a Terapêutica Antimalárica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1999; 32(I): 277.

Baird JK. Age-dependent Characteristics of Protection v. Susceptibility to *Plasmodium falciparum* *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1998; 92(4):367-90.

Baird JK. Host Age as a Determinant of Naturally Acquired to *Plasmodium falciparum* *Parasitol. Today* 1995; 11(3):105-111.

Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K. Intercellular Adhesion Molecule-1 as an Endothelial Cell Adhesion Receptor for *Plasmodium falciparum* *Nature* 1989; 341: 57-59.

Boudin C, Chumpitazi B, Dziegel M, Peyron F, Picot S, Hogg B, Ambroise-Thomas P. Possible Role of Specific Immunoglobulin M Antibodies to *Plasmodium falciparum* Antigens in Immunoprotection of Human Living in a Hyperendemic Area, Burkina Faso *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(3): 636-641.

Bouharoun-Tayoun H & Druilhe P. *Plasmodium falciparum* Malaria: Evidence for an Isotype Imbalance which May Be Responsible for Delayed Acquisition of Protective Immunity *Infect. Immun.* 1992; 60(4): 1473-1481.

Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms Underlying the Monocyte-mediated Antibody-dependent Killing of *Plasmodium falciparum* Asexual Blood Stages *J. Exp. Med.* 1995; 182: 409-418.

Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that Protect Humans against *Plasmodium falciparum* Blood Stages Do Not on their Own Inhibit Parasite Growth and Invasion *in vitro*, but Act in Cooperation with Monocytes *J. Exp. Med.* 1990; 172:1633-1641.

Brown GV, Anders RS, Knowles G. Differential Effect of Immunoglobulin on the *in vitro* Growth of Several Isolates of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.*, 1983; 39: 1228-1235.

Brown. IN. Immunological Aspects of Malaria Infection *Adv. Immunol.* 1969; 2: 267-349.

Bruce-Chwatt LJ. In: *Essential Malariology*, 1985; 2^a ed., William Heisemann Medical Books, London.

Calich V, Vaz C. In: *Imunologia* 2001; p. 72, Revinter.

Calissano C, Modiano D, Sirina BS, Konate A, Sanou I, Sawadogo A, Perlmann H, Troye-Blomberg M, Perlmann P. IgE Antibodies to *Plasmodium*

falciparum and Severity of Malaria in Children of one Ethnic Group Living in Burkina Faso *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003, 69(1):31-35.

Camargo ME, Silva, SM, Leser PG, Granato CH. Avidéz de Anticorpos IgG Específicos como Marcadores de Infecção Primária Recente pelo *Toxoplasma gondii* *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 1991; 33: 213-218.

Capron M, Capron A: Immunoglobulin E and Effector Cells in Schistosomiasis *Science*, 1994; 24: 1876-1877.

Carter R, Chen DH. Malaria Transmission Blocked by Immunization with Gametes of the Malaria Parasite *Nature* 1976; 203: 57.

Carter R, Mendis KN. Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(4): 564-594.

Carter R, Graves PM, Quakyi IA, Good MF. Restricted or Absent Immune Responses in Human Populations to Gamete Antigens that are Targets of Malaria Transmission-blocking Antibodies *J. Exp. Med.* 1989; 169: 135-147.

Celada A, Cruchaud A, Perrin LH. Phagocytosis of *Plasmodium falciparum* Parasitized Erythrocytes by Human Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Parasito.* 1983; 69: 49-53.

Chen Q, Schichtherle M, Wahlgren M. Molecular Aspects of Severe Malaria *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13: 439-450.

Chumpitazi BFF, Lepers J-P, Simon J, Deloron P. IgG1 and IgG2 Antibody Responses to *Plasmodium falciparum* Exoantigens Correlate inversely and Positively, Respectively, to the Number of Malaria Attacks *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996; 14:151-158.

Clark IA, Rockett KA, Cowden WB. Proposed Link between Cytokines, Nitric Oxide and Human Cerebral Malaria *Parasitol. Today* 1991; 7: 205-207.

Cooke GS, Aucan C, Walley AJ, Segal S, Greenwood BM, Kwiatkowski DP, Hill AVS. Association of Fc γ Receptor IIA (CD32) Polymorphism with Severe Malaria in West Africa *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 69(6): 565–568.

Cox FEG. History of human Parasitology *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(4):595-612.

Day KP, Marsh K. Naturally Acquired Immunity to *Plasmodium falciparum* *Parasitol. Today* 1991; 7: A68-A70.

Deane LM. Malaria Studies and Control in Brazil *Am. J. Trop Med. Hyg.* 1988; 38(2): 223-230.

Deloron P, Dubois B, Le Hesran JY, Riche D, Fievet N, Cornet M, Ringwald P, Cot M. Isotypic Analysis of Maternally Transmitted *Plasmodium falciparum*-specific Antibodies in Cameroon and Relationship with Risk of *Plasmodium falciparum* Infection *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 110: 212-218.

Desowitz RS. *Plasmodium falciparum* Immunoglobulin E in Sera from an area of Holoendemic Malaria *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1989; 83:479-479.

Desowitz RS, Elm J, Alpers MP. *Plasmodium falciparum* – Specific Immunoglobulin G (IgG), IgM and IgE Antibodies in Paired Maternal-Cord Sera from East Sepik Province, Papua New Guinea *Infect. Immun.* 1993; 61(3):988-993.

Diallo TO, Spiegel A, Diouf A, Lochouarn L, Kaslow DC, Tall A, Perraut R, Garraud O. Short Report: Differential Evolution of Immunoglobulin G1/G3 Antibody Responses to *Plasmodium falciparum* MSP₁₉ over Time in Malaria-immune Adult Senegalese Patients *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 66(2): 137-139.

Diamandis EP, Christopoulos TK. The Biotin-(Strept) Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology *Clin. Chem.* 1991; 37(5):625-636.

Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of Reactive Nitrogen Intermediates and Reactive Oxygen Intermediates from Mouse Peritoneal Macrophages: Comparison of Activating Cytokines and Evidence for Independent Production *J. Immunol.* 1988. 141: 2407-2412.

Dobson MJ. The Malariology Centenary *Parassitologia* 1999; 41:21-32.

Dubois B, Deleron P, Astagneau P, Chougnet C, Lepers JP. Isotypic Analysis of *Plasmodium falciparum*- specific Antibodies and their Relation to Protection in Madagascar *Infect. Immun.* 1993; 61(10): 4498-4500.

Dugas B, Mossalayi D, Damais C, Kolb JP. Nitric Oxide Production by Human Monocytes: Evidence for a Role of CD23 *Immunol. Today* 1995; 16: 574- 580.

Durlacher RR. *Avaliação da Resposta Imune Humoral em Pacientes com Infecção por Plasmodium falciparum Submetidos à Terapêutica Específica em Região de Transmissão Instável de Malária no Brasil.* São Paulo, 1998. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Edozien JC, Gilles HM, Udeozo IOK. Adult and Cord Blood Gammaglobulin and Immunity to Malaria in Nigerians *Lancet ii* 1962; 951-955.

Elghazali G, Perlmann H, Rutta AS, Perlmann P, Troye-Blomberg M. Elevated Plasma Levels of IgE in *Plasmodium falciparum*-primed Individuals Reflect an Increased Ratio of IL-4 to Interferon-gamma (IFN-gamma)-producing Cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 109:84-89.

Ferreira AW. Imunodiagnostico de la Malaria. In: Antunãno FJ & Schmuñis G Diagnostico de la Malaria. *Organizacion Panamericana de la Salud* 1988 (Publicação Científica nº 512): 65-75.

Ferreira MU, Liu Q, Zhou M, Kimura M, Kaneko O, Thien HV, Isomura S, Tanabe K., Kawamoto, F. Stable Patterns of Allelic Diversity at the *Merozoite Surface Protein-1* Locus of *Plasmodium falciparum* in Clinical Isolates from Southern Vietnam *J. Eukaryot. Microbiol.* 1998; 45: 131-136.

Ferreira MU, Kimura EAS, Souza JM, Katzin AM. The Isotype Composition and Avidity of Naturally Acquired anti-*Plasmodium falciparum* Antibodies: Differential Patterns in Clinically Immune Africans and Amazonians Patients *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 55(3):315-323.

Fossati G, Bucknall RC, Edwards SW. Fc γ Receptors in Autoimmune Diseases *Eur. J. Clin. Invest.* 2001; 31: 821-831.

Fujioka H, Aikawa M. Structure and Life Cycle *Chem. Immunol.* 2002; 80:1-26.

Fundação Nacional de Saúde *Boletim Eletrônico Epidemiológico On Line* 2003; <http://www.funasa.gov.br>.

Fundação Nacional de Saúde Investe mais de R\$ 140 milhões no Combate à Malária *Guia de Vigilância Epidemiológica* 1999; Dezembro.

Garraud O, Nutman TB. The Role of Cytokines in Human B-cell Differentiation into Immunoglobulin-secreting Cells *Bull. Inst. Pasteur*, 1996; 94: 285-309.

Garraud O, Mahanty S, Perraut R. Malaria-specific Antibody Subclasses in Immune Individuals: a Key Source of Information for Vaccine Design *Trends Immunol.* 2003; 24(1):30-35.

Ghigo D, Todde R, Ginsburg H, Costamagna C, Gautret P, Bussolino F, Ulliers D, Giribaldi G, Deharo E, Gabrielli G, Pescarmona G, Bosia A. Erythrocyte Stages of *Plasmodium falciparum* Exhibit a High Nitric Oxide Synthase (NOS) Activity and Release an NOS-inducing Soluble Factor *J. Exp. Med.* 1995; 182: 677-688.

Good MF, Doolan D. Immune effector mechanisms in malaria *Curr. Opin. Immunol.* 1999; 11:412-419.

Gravely SM, Kreirer, JP. Adoptive transfer of Immunity to *Plasmodium bergeri* with Immune T and B Lymphocytes *Infect. Immun.* 1976; 14: 184-190.

Greenberg AE, Ntumbanzondo M, Ntula N, Mawa L, Howell J, Davachi F. Hospital Surveillance of Malaria-related Paediatric Morbidity and Mortality in Kinhasa, Zaire *Bull. WHO*, 1989; 67: 189-196.

Greenberg S, Silverstein SC. Phagocytosis. In: *Fundamental Immunology*, Paul WE (ed) New York, 1993; Raven Press p.941-964.

Greenwood BM. Asymptomatic Malaria Infections – Do They Matter? *Parasitol. Today* 1987; 3(7): 206-214.

Greenwood B. What Can the Residents of Malaria Endemic Countries Do To Protect Themselves Against Malaria? *Parassitologia*, 1999; 41: 295-299.

Groux H, Gysin J. Opsonization as an Effector Mechanism in Human Protection against Asexual Blood Stages of *Plasmodium falciparum*: Functional Role of IgG Subclasses *Res. Immunol.* 1990; 141: 529-542.

Harte PG, Cooke A, Playfair JH. Specific Monoclonal IgM is a Potent Adjuvant in Murine Malaria Vaccination *Nature* 1983; 302: 256-258.

Heddi A. Malaria Pathogenesis a Jigsaw with an Increasing Number of Pieces *Int. J. Parasitology* 2002; 32: 1587-1598.

Helmby H, Troye-Blomberg M. Differential Immunoglobulin E and Cytokine Responses in BALB/c and C57Bl/6 Mice During Repeated Infections with Blood-stage *Plasmodium chabaudi* Malaria *Parasite Immunol.* 2002; 22:185-190.

Helmby H, Perlmann H, Troye-Blomberg M, Perlmann P. Immunoglobulin E Elevation in *Plasmodium chabaudi* Malaria *Infect. Immun.* 1996; 64(4):1432-1433.

Hirunpetcharat C, Tian JH, Kaslow DC, Van Rooijen N, Kumar S, Berzofsky J, A, Miller LH, Good MF. Complete Protective Immunity Induce in Mice by immunization with the 19-kilodalton Carboxyl-terminal Fragment of Merozoite Surface Protein-1 (MSP₁₉) of *Plasmodium yoelii* Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: Correlation of Protection with Antigen-specific Antibody Titer, but not with Effector CD4⁺ Cells *J. Immunol.* 1997; 159: 3400-3411.

Hoffman SL, Franke ED. Inducing Protective Immune Responses against the Sporozoite and Liver Stages of *Plasmodium falciparum*. *Immunol. Letters* 1994; 41: 89-94.

Jakobsen PH, Bate CAW, Taverne J, Playfair JHL. Malaria: Toxins, Cytokines and Disease *Parasite Immunol.* 1995; 17: 223-231.

Jarrett, EEE, Miller HRP. Production and Activities of IgE in Helminth Infection *Progress Allergy* 1982; 31:178-233.

Jayawardena AN, Janeway CA, Kemp JD. Experimental Malaria in the CBA/N Mouse *J. Immunol.* 1979; 123: 2532-2539.

Jelinek T, Schulte C, Behrens R, Grobusch MP, Coulaud JP, Bisoffi Z, Matteelli A, Clerinx J, Corachán M, Puente S, Gjopup I, Harms G, Kollaritsch H, Kotlowski A, Björkmann A, Delmont JP, Knobloch J, Nielsen LN, Cuadros J, Hatz C, Beran J, Schmid ML, Schulze M, Lopez-Velez R, Fleischer K, Kapäum A, Mcwhinney P, Kern P, Atougia J, Fry G, Cunha S, Boecken G.

Imported Falciparum Malaria in Europe: Sentinel Surveillance Data from the European Network on Surveillance of Imported Infectious Diseases *Clin. Infect. Dis.* 2002; 34:572-576.

Jensen JB, Boland MT, Akood M. Induction of Crisis Forms in Cultured *Plasmodium falciparum* with Human Immune Serum from Sudan. *Science*, 1982; 216: 2130-2133.

Jiang, XM, Arepally G, Poncz M, McKenzie S. Rapid detection of the Fc γ RIIA-H/R¹³¹ ligand- binding Polymorphism using an Allele- specific Restriction Enzyme Digestion (ASRED) *J. Immunol. Methods* 1996; 199:55-59.

Khalife JD, Dunne DW, Richardson, BA, Mazza G, Thorne KJ, Capron A, Butterworth AE. Functional Role of Human IgG Subclasses in Eosinophil-mediated Killing of Schistosomula of *Schistosoma mansoni* *J. Immunol.* 1989; 142: 4422-4427.

Khusmith S, Druilhe P. Cooperation between Antibodies and Monocytes that Inhibit *in vitro* Proliferation of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 1983; 41: 219-221.

Knell AJ (ed.) *Malaria* 1991 Oxford university press, Oxford.

Kwiatkowski D. Malarial Toxins and Regulation of Parasite Density *Parasitol. Today* 1995; 11: 115-123.

Kwiatkowski D, Hill AVS, Sambou I, Twumasi P, Castracanee J, Manogue KR, Ceramo, Brewster DR, Greenwood BM. TNF Concentrations in Fatal Cerebral, Non-cerebral and Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria *Lancet*, 1990; 336:1201-1024.

Lacerda MVG, Santos PJT, Alecrim, WD, Alecrim MGC. Malária Grave e Terapia Intensiva na Fundação de Medicina Tropical-AM: Experiência de Dois Anos *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34(1): 73-74, 2001.

Luty AJF, Mayombo J, Lekoulou F, Mshana R. Immunologic Responses to Soluble Exoantigens of *Plasmodium falciparum* in Gabonese Children Exposed to Continuous Intense Infection *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 51(6): 720-729.

Luty AJ, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B Matousek, P, Herbich, K, Schmid, D. Weinberg, JB; Kremsner, PG. Low Interleukin-12 Activity in Severe *Plasmodium falciparum* Malaria *Infect. Immun.* 2000; 68(7): 3909-3015.

MacDonald G. In: *The Epidemiology and Control of Malaria* 1957; Oxford University Press London, United Kingdom.

Maeno Y, Perlmann P, Perlmann H, Kusuhara Y, Taniguchi K, Nakabayashi T, Win K, Looarreesuwan S, Aikawa M. IgE Deposition in Brain Microvessels and on Parasited Erythrocytes from Cerebral Malaria Patients *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 63 (3-4): 128-132.

Maeno Y, Steketee R, Nagatake T, Tegoshi T, Desowitz RS, Wirima JJ, Aikawa M. Immunoglobulin Complex Deposits in *Plasmodium falciparum* – infected Placentas from Malawi and Papua New Guinea *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993; 49(5): 574-580.

Majarian WR, Daly TM, Weidanz WP, Long CA. Passive immunization Against Murine Malaria with an IgG3 Monoclonal Antibody *J. Immunol.* 1984; 132:3131-3137.

Malaguarnera L & Musumeci S. The Immune Response to *Plasmodium falciparum* malaria *Lancet Infect. Dis.* 2002; 2: 472-478.

Manis, JP, Tian T, Alt FW. Mechanisms and Control of Class- switch Recombination *Trends Immunol.* 23(1):31-39, 2002.

Matsumoto S, Yukitake H, Kambara H, Yamada H, Kitamura A, Yamada T. *Mycobacterium bovis bacillus* Calmette-guerin Induces Protective Immunity

Against Infection by *Plasmodium yoelii* at Blood-stage Depending on Shifting Immunity Toward Th1 Type and Inducing Protective IgG2a After the Parasite Infection *Vaccine* 2000; 19:779-787.

Mcgregor IA. The Passive Transfer of human Malarial Immunity *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1964; 13:237-239.

Mcguire W, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF- α Promoter Region Associated with Susceptibility to Cerebral Malaria *Nature* 1994; 371: 508-511.

Miller H. Mucosal Mast Cells and the Allergic Response against Nematode Parasites *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996; 54:331-336.

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The Pathogenic Basis of Malaria *Insight Review articles Nature* 2002; 415(7):673-679.

Miller LH, Good, MF, Milon G. Malaria Pathogenesis *Science* 1994; 264(5167): 1878-83.

Mitchell GH, Butcher A, Voller A, Cohen S. The Effect of Human Immune IgG on the in vitro Development of *Plasmodium falciparum* *Parasitology*, 1976; 72: 149-162.

Mungai M, Tegtmeier G, Chamberland M; Parise M. Transfusion-transmitted Malaria in the United States from 1963 Trough 1999 *N. Engl. J. Med.* 2001; 344(26): 1973-1978.

Naotunne TS, Karunaweera ND, Del Giudice G, Kularatne MU, Grau GE, Carter R, Mendis KN. Cytokines Kill Malaria Parasites During Infection Crisis: Extracellular Complementary Factors Are Essential *J. Exp. Med.* 1991; 173(3):523-529.

Nardin EH, Nussenzweig RS, McGregor IA; Bryan JH. Antibodies to Sporozoites: Their Frequent Occurrence in Individuals Living in an Area of Hyperendemic Malaria. *Science*, 1979; 206:597-9.

Newbold C, Craig A, Kyes S, Rowe A, Fernandez-Reyes D, Fagan T. Cytoadherence, Pathogenesis and the infected Red Cell Surface in *Plasmodium falciparum* *Int. J. Parasitol.* 1999; 29: 927-937.

Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape J-F, Mercereau-Puijalon O. Age- dependent Carriage of Multiple *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Antigen-2 Alleles in Asymptomatic Malaria Infections *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; 52(1): 81-88.

Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJM. Effects of Foetal Haemoglobin on Susceptibility of Red Cells to *Plasmodium falciparum* *Nature* 1977; 270: 171-173.

Perlmann H, Helmby H, Hagstedt M, Carlson J, Larsson PH, Troye-Blomberg M, Perlmann P. IgE Elevation and IgE anti-malarial Antibodies in *Plasmodium falciparum* Malaria: Association of High IgE Levels with Cerebral Malaria *Clin. Exp. Immunol.* 1994; 97:284-292.

Pleass, RJ, Woof J. Fc Receptors and Immunity to Parasites *Trends Parasitol.* 17(11):S45-S51, 2001.

Potocnjak P, Yoshida N, Nussenzweig R, Nussenzweig V. Monovalent Fragments (Fab) of Monoclonal Antibodies to a Sporozoite Surface Antigen (Pb44) Protect Mice against malarial Infection *J. Exp .Med.* 1980; 151: 1504-1513.

Rank RG, Weidanz WP. Non-sterilizing Immunity in Avian Malaria: an Antibody-independent Phenomenon *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1976; 151: 257-259.

Ravetch JV, Kinet J. Fc receptors *Ann. Rev. Immunol.* 1991; 9: 457-492.

Read, D, Lensen, AH, Berganie S, Haley S, Raza A, Carter R. Transmission-blocking Antibodies against Multiple, Non-variant Target Epitopes of the *Plasmodium falciparum* Gamete Surface Antigen Pfs230 are All Complement-fixing *Parasite Immunol.* 1994; 16(10): 511-519.

Richards AL. Tumour Necrosis Factor and Associated Cytokines in the Host's Response to Malaria *Int. J. Parasitol.* 1997; 27(10): 1251-1263.

Rihet P, Demeure CE, Ouattara M, Bourgois A, Carvalho D, Dessein AJ. Immunological Mechanisms of Human Resistance to Schistosome Infection; the Protective Effect of Immunoglobulin E is Balanced by a Blocking Action of Immunoglobulin G4 In Proceedings of the 15th European Congress of Allergology and Clinical Immunology, 1992, Paris. Advances in Allergology and Clinical Immunology, EAACI, Stockholm, Sweden.

Roberts DW, Weidanz WP. T-cell Immunity to Malaria in the B-cell Deficient Mouse *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1978; 28: 1-3.

Rzepczyk CM, Hale K, Woodroffe N, Bobogare A, Csurhers P, Ishii A, Ferrante A. Humoral Immune Responses of Solomon Islanders to the Merozoite Surface Antigen 2 of *Plasmodium falciparum* Show Pronounced Skewing Towards Antibodies of the Immunoglobulin G3 Subclass *Infect. Immun* 1997; 65(3): 1098-1100.

Sáez-Alquezar A, Val Ramos AMS, Di Santi SM, Branquinho S, Kirchgatter K, Corddeiro IAC, Murta M, Saraiva CPJ, Oliveira SG, Bochetti, MGG, Pirolla J A, Guerzoni D, Chamone DAF. Controle da Malária Transfusional em Região Endêmica e Não Endêmica do Brasil *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1998; 31(1): 27-34.

Sarthou J-L, Angel G, Aribot G, Rogier C, Dieye A, Balde AT, Diatta B, Seignot P; Roussilhon C. Prognostic Value of Anti - *Plasmodium falciparum* - Specific Immunoglobulin G3, Cytokines and their Soluble Receptors in West African Patients with Sever Malaria *Infect. Immun.* 1997; 65(8):3271-3276.

Shahabudin M, Toyoshima T, Aikawa M, Kaslow DC. Transmission-blocking activity of a Chitinase Inhibitor and Activation of Malarial Parasite Chitinase by Mosquito Protease *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 4266-4270.

Shi YP, Sayed U, Qari SH, Roberts, JM, Udhayakumar V, Oloo AJ, Hawley W A; Kaslow DC, Nahlen BL, Lal AA. Natural Immune Response to the C-terminal 19-kilodalton Domain of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 *Infect. Immun.* 1996; 64: 2716-2723.

Sinnis P, Nussenzweig V. Preventing Sporozoite Invasion of Hepatocytes In: *Malaria Vaccine Development*, 1996 Hoffmann SL (ed.) American Society for Microbiology Press, Washington, D. C, p.15-33.

Smith E, Taylor-Robinson AW. Parasite-specific Immunoglobulin Isotypes during Lethal and Non-lethal Murine Malaria Infections *Parasitol. Res.* 2003; 89:26-33.

Smith NC, Favila-Castillo L, Monroy-Ostria A, Hirunpetcharat C, Good MF. The Spleen, IgG Antibody Subsets and Immunity to *Plasmodium berghei* in Rats *Immunol. Cell Biol.* 1997; 75: 318-323.

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: 283-92.

Snow RW, Bastos De Azevedo I, Lowe BS, Kabiru EW, Nevill CG, Mwankusye S, Kassiga G, Marsh K, Teuscher T. Severe Childhood Malaria in Two Areas of Markedly Different *Falciparum* Transmission in East Africa *Acta Trop.* 1994; 57: 289-300.

Soe-Soe, Theisen M, Roussilhon C, Khin-Saw-Aye, Druilhe P. Association Between Protection Against Clinical and Antibodies to Merozoite Surface Antigen in an Area of Hyperendemicity in Myanmar: Complementary

Between Responses to Merozoite Surface Protein 3 and the 220-kilodalton Glutamate-rich Protein *Infect. Immun* 2004;72(1): 247-252.

Stewart MJ, Nawrot RJ, Schulman S, Vanderberg. *Plasmodium berghei* Sporozoite invasion is Blocked *in vitro* by Sporozoite-immobilizing Antibodies *Infect. Immun.* 1986; 51:859-864.

Su Z, Stevenson MM. Central Role of Endogenous Gamma Interferon in Protective Immunity against Blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS Infection. *Infect. Immun* 2000; 68: 4399-4406.

Tangteerawatana P, Krudsood S, Chalermrut K, Looareesuwan S, Khusmith S. Natural Human IgG Subclass Antibodies to *Plasmodium falciparum* Blood Stage Antigens and their Relation to Malaria Resistance in an Endemic Area of Thailand *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 2001; 32(2):247-254.

Taylor RR, Allen SJ, Greenwood, BM, Riley EM. IgG3 Antibodies to *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 2 (MSP2): Increasing Prevalence with age and Association with Clinical Immunity to Malaria *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 58(4):406-413.

Taylor-Robinson AW. A Model of Development of Acquired Immunity to Malaria in Humans Living Under Endemic Conditions *Med. Hypotheses* 2002; 58: 148-156.

Taylor-Robinson AW. Malaria-specific IgE as Risk factor for cancer and Atopy *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 59(2): 181.

Taylor-Robinson AW, Philips RS, Severo A, Moncada S, Liew FY. The role of Th1 and Th2 Cells in a Rodent Malaria Infection. *Science* 1993; 260:1913-1914.

Trager W, Jensen JB. Human Malaria Parasites in Continuous Culture *Science* 1976; 193:673-675.

Troye-Blomberg M, Perlmann P, Nilsson M, Perlmann H. Immune Regulation of Protection and Pathogenesis in *Plasmodium falciparum* Malaria *Parassitologia* 1999; 41:131-138.

Troye-Blomberg M, Riley EM, Kaliban M, Holmberg M, Perlmann H, Andersson U, Heusser CH, Perlmann P. Production by Activated Human T Cells of Interleukin 4 but not Interferon- γ is Associated with Elevated Levels of Serum Antibodies to Activating Malaria Antigens *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 5484-5488.

Van Sorge NM, Van der Pol W-L, Van de Winkel JGJ. Fc γ R Polymorphisms: Implications for Function, Disease Susceptibility and Immunotherapy *Tissue Antigens* 2003; 61: 189–202.

Vukovic P, Hogarth PM, Barnes N, Kaslow DC, Good MF. Immunoglobulin G3 Antibodies Specific for the 19-kilodalton Carboxyl-terminal Fragment of *Plasmodium yoelii* Merozoite Surface Protein 1 Transfer Protection to Mice Deficient in c-gammaR1 Receptors *Infect. Immun.* 2000; 68:3019-3022.

Warmerdam PA, Winkel V, Vlug JG, Westerdaal NA, Capel PJ. A Single Amino in the second Ig-like Domain of the Human Fc γ receptor II is Critical for Human IgG2 Binding *J. Immunol.* 1991; 147:1338-43.

Weatherall DJL, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, Roberts D J. Malaria and the Red Cell *Hematology* 2002; 35-57.

White KL, Snyder HL, Krzych U. MHC Class I-dependent Presentation of Exoerythrocytic Antigens to CD8⁺ T Lymphocytes is Required for Protective Immunity against *Plasmodium berghei* *J. Immunol.* 1996; 156:3374-338.

Wilson MB, Nakane PK. Recent Developments in the Periodate Method of Conjugating Horseradish Peroxidase (HRPO) to Antibodies. In: *Immunofluorescence and Related Staining Techniques* Knapp W, Holubar K, Wick G, 1978, Amsterdam, Elsevier, p.215-224.

Winkler S, Willheim M, Baier K, Schmid D, Aichelburg, A, Graninger, W, Kremsner PG. Reciprocal Regulation of Th1- and Th2-Cytokine-Producing T Cells during Clearance of Parasitemia in *Plasmodium falciparum* Malaria *Infect. Immun.* 1998; 66(12):6040-6044.

World Health Organization: Malaria. *WHO Fact Sheet*, 2003; n° 94.

World Health Organization: Ministerial Conference on Malaria *Weekly Epidemiol. Rec.* 1992; 67:349-350.

World Health Organization Roll Back Malaria: Resolution of the Executive Board on the *WHO* 1999; 52^a World Health Assembly.

Woznicova V. Immunoglobulin G Avidity in Infectious Diseases *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 2004 ;53(1):4-11.

www.ahcpub.com