

**KELLY DIAS COURA**

**Estudo das subclasses de IgG anti-*P. falciparum* durante a  
evolução de malária não complicada**

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.

Orientadora: Dra. Sandra do Lago Moraes

**SÃO PAULO  
2004**

*“Porque as Suas coisas invisíveis, desde a criação do mundo, tanto o Seu eterno poder como a Sua divindade se estendem e claramente se vêem pelas coisas que estão criadas.”*

*Paulo - (ROMANOS, 1:20)*

*“Mas a sabedoria que vem do alto é primeiramente pura, depois pacífica, moderada, tratável, cheia de misericórdia e de bons frutos, sem parcialidade e sem hipocrisia.”*

*(TIAGO, 3:17)*

*À Deus...*

*Por sua infinita misericórdia, benevolência e sabedoria, me ensinando que sempre há um caminho a ser seguido mesmo quando tudo parece trevas e escuridão. Que o futuro será melhor que o presente e para que isso aconteça, só depende de nós e que começar de novo faz parte do ciclo da vida e do aprendizado de cada ser humano.*

*Aos meus pais que aprenderam e me ensinaram na prática, cada um a seu modo, o significado da Parábola do Filho Pródigo.*

*À minha filha Leticia, Luz Divina em minha vida, que com seu jeito alegre e sincero de criança, seu sorriso meigo e seu rosto angelical faz com que os problemas pareçam grãos de areia diante de uma montanha.*

*Ao Fernando, que me ensinou a voltar os meus olhos para dentro do meu ser, e me ver de um jeito que eu nunca havia visto e que eu nem sabia que existia. Enfim, fez com que eu me conhecesse melhor.*

*Aos meus grandes e verdadeiros amigos Giovanna Grazzioli Lozzano, Ângela Grazzioli, Edna Souza, Débora Cristina Ramos De Marco, José Ângelo Lauletta Lindoso e Elena Hurtado Somoza que sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis e mais alegres do meu caminhar.*

*Aos meus avôs Anselmo e Diogo (in memorian) e às minhas avós Francisca (in memorian) e “Nena” pelas lembranças felizes que tenho da minha infância e a quem devo boa parte de quem hoje sou.*

*À minha querida tia “Quinha” (in memorian), a mãe que toda criança gostaria de ter, pela agradável e importante convivência ao longo da minha vida e pelo seu exemplo de vida e amor ao próximo.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Sandra do Lago Moraes, pela oportunidade em realizar este estudo, pelo seu espírito científico e pela paciência e ensinamentos que muitas vezes extrapolou os limites da “simples” orientação.

Aos membros da Banca de Qualificação Dr. Antônio Walter Ferreira, Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez e Dr. José Ângelo Lauletta Lindoso pelas críticas construtivas e sugestões dadas durante o Exame de Qualificação.

Às companheiras de equipe do Laboratório de Malária, Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez e Dra. Guita Rubinski Elefant pela amizade, companheirismo, esclarecimentos e sugestões durante convívio diário no laboratório.

À Dra. Sandra Trevisan Beck pela amizade e alegria durante todos esses anos de convívio.

À mestre Edna Souza, pela criteriosa leitura do boneco da minha dissertação.

Ao Fernando Henrique M. Ribeiro pela ajuda na confecção e correções de português desta dissertação.

Às meninas do Laboratório de Malária: Kelly Aparecida Kanunfre, Janaína Bezerra Miranda, Mônica Kudó, Amanda Farage Frade, Patrícia Araújo, Melissa Bastos, Elaine Antunes Lemos, Fabiana Maria de Souza Leoratti, Erika Hellen Esther Hoffmann pela troca de experiências e aprendizado ao longo dessa jornada.

Ao Dr. Francisco Fanucchi pelos momentos de descontração e pela paciência em me “socorrer” enquanto estava aprendendo a executar a técnica de *Immunoblotting*.

A todo o pessoal do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia do IMT-SP, pelo companheirismo e ajuda em tudo que precisei: Paulo Oliveira, Ione Sales, Arthur de Jesus, Renato Raickas, Eunice Bonfim, Vera Lúcia Vieira, Edite H. Y. Kanashiro, Adriano C. Coelho, Rogério Milton De Marco, Beatriz Julieta Celeste, Regiane Mathias, Fabrício Petito, Maria das Graças Prianti, Mariko Yoko, Márcia Dias, Célia Vendrame, Elisabete O. Mello da Silva, Sueli F. de Bastos, Dr. Paulo Cotrim, Dra. Hiro Goto, Dr. Magnus Åke Gidlund e Dr. Paulo Boschcov.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, mas que por um lapso de memória esqueci de mencionar os nomes.

“A CIÊNCIA PODE SOMENTE SER CRIADA POR AQUELES QUE ESTÃO ABSOLUTAMENTE IMBUÍDOS COM A ASPIRAÇÃO DA VERDADE E DA COMPREENSÃO. ESTA FONTE DE SENTIMENTO, ENTRETANTO, SURGE DA ESFERA DA RELIGIÃO.... A SITUAÇÃO PODE SER EXPRESSA POR UMA IMAGEM: CIÊNCIA SEM RELIGIÃO É IMPERFEITA, RELIGIÃO SEM CIÊNCIA É CEGA”. - CIÊNCIA, FILOSOFIA, E RELIGIÃO: UM SIMPÓSIO. 1941

**ALBERT EINSTEIN**

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

## SUMÁRIO

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>XIII</b>
<b>UNIDADES DE MEDIDA</b>	<b>XV</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XIX</b>
<b>RESUMO</b>	<b>XX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XXII</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
1. Histórico .....	24
2. Situação atual da malária no Brasil e no mundo .....	25
3. Etiologia da malária .....	30
4. A doença malária .....	32
5. Malária e imunidade .....	33
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
1. Casuística .....	46
2. Antígeno de <i>P. falciparum</i> .....	48
2.1. Manutenção de <i>P.falciparum</i> .....	48
2.2. Cultivo de <i>P. falciparum</i> .....	49
2.3. Preparo do extrato antigênico somático de <i>P.falciparum</i> (PfZw) .....	49
3. Obtenção de anticorpos .....	50
4. Obtenção de conjugados .....	51

5. ELISA para pesquisa de anticorpos anti-formas eritrocitárias de <i>P.falciparum</i> .....	51
5.1. Subclasses de IgG .....	51
5.1.1 Estudo da afinidade funcional ou avidéz das subclasses de IgG anti- <i>P. falciparum</i> .....	53
6. Padronização do "Immunoblotting" para pesquisa de subclasses anti- <i>P. Falciparum</i> .....	53
6.1. SDS-PAGE .....	53
6.2. "Immunoblotting" .....	54
6.2.1 Estudo da afinidade funcional ou avidéz dos anticorpos anti- <i>P.falciparum</i> .....	54
7. Análise estatística .....	55
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
1. Padronização da técnica de "Immunoblotting" para a pesquisa de diferentes subclasses de imunoglobulinas anti- <i>P.falciparum</i> .	56
2. ELISA para detecção de diferentes subclasses de igg anti-formas eritrocitárias de <i>P.falciparum</i> .....	61
2.1. Subclasses de IgG .....	61
2.2. Associações entre os níveis de anticorpos e a exposição prévia à malária .....	65
2.3. Associações entre os níveis de anticorpos e a resposta ao tratamento .....	66
3. "Immunoblotting" para detecção de diferentes subclasses de anticorpos anti- formas eritrocitárias de <i>P.falciparum</i> .....	71

<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>113</b>

**ABREVIATURAS**

ACCD	Citotoxicidade dependente de anticorpos
ADC1	Antibody-dependent cellular inhibition
CMSPH	Células mononucleares do sangue periférico humano
ELISA	“Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay” - ensaio imunoenzimático
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GLURP	Proteína rica-glutamato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Próxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
IA	Índice de Aidez
IL	Interleucina
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IR	Índice de Reatividade
kDa	Kilodaltons
LTC	Linfócito T-citotóxico
MSP	Proteína de superfície de merozoito
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PBS	“Phosphate Buffer Saline” – Solução salina tamponada com fosfato
PBS-TW20	PBS contendo Tween 20 a 0,05%
PBS-TW20-L	PBS contendo Tween 20 a 0,05% e leite a 0,5%
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
Pm	<i>Plasmodium malariae</i>
PMSF	Fluoreto de metilsufonila

Pv	<i>Plasmodium vivax</i>
RESA	Antígeno de superfície do eritrócito Infectado por trofozoítos jovens
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCP	Tempo de clareamento parasitário
TGF- $\alpha$	Fator de Crescimento Transformador alfa
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformador beta
Th	T-helper
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Zw	Detergente anfótero Zwittergent

**UNIDADES DE MEDIDA**

g	Aceleração da gravidade ( $\cong 9,8 \text{ m/s}^2$ )
M	Molaridade
mg	Miligramas
mL	Mililitro
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
N	Normalidade

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1** Áreas Endêmicas de Malária no mundo. 26
- Figura 2** Áreas Endêmicas de malária no Brasil de acordo com o risco de transmissão. 28
- Figura 3** Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* infectantes ao homem. 32
- Figura 4** Possíveis mecanismos de clareamento de eritrócitos infectados por *P.falciparum* mediados por anticorpos citofílicos. 39
- Figura 5** Reatividade de anticorpos IgG1 contra antígenos de formas eritrocitárias de *P.falciparum*. 57
- Figura 6** Reatividade de anticorpos IgG2 contra antígenos de formas eritrocitárias de *P.falciparum*. 58
- Figura 7** Reatividade de anticorpos IgG3 contra antígenos de formas eritrocitárias de *P.falciparum*. 59
- Figura 8** Reatividade de anticorpos IgG4 contra antígenos de formas eritrocitárias de *P.falciparum*. 60
- Figura 9** Curva das medianas das concentrações e dos Índices de Avidéz (IA) das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum* durante o acompanhamento por 42 dias de 48 pacientes com malária *falciparum* internados em hospital e sob tratamento com mefloquina. 64

- Figura 10** Correlação entre a concentração inicial de anticorpos IgG3 anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* e o tempo de clareamento da parasitemia. 68
- Figura 11** Concordância entre anticorpos IgG1 e IgG3 anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum* determinados em amostras de soro de pacientes com malária *falciparum* que tiveram tempo de clareamento da parasitemia menor que 48h (A) e maior que 48h (B). 69
- Figura 12** Concordância entre anticorpos IgG2 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum* determinados em amostras de soro de pacientes com malária *falciparum* que tiveram tempo de clareamento da parasitemia menor que 48h (A) e maior que 48h (B). 70
- Figura 13** Freqüência média de pacientes com resultados positivos de subclasses de IgG contra diferentes frações protéicas de formas eritrocitárias de *P.falciparum* divididas em grupos (I, II, III, IV e V) de acordo com o padrão de reconhecimento em cada tempo do acompanhamento. 73
- Figura 14** Reatividade das subclasses IgG1 (1), IgG2 (2), IgG3 (3) e IgG4 (4) contra bandas protéicas divididas de acordo com o padrão de freqüência de reconhecimento nos dias de acompanhamento 0, 48h, 7,21 e 42 dias (Grupos I, II, III, IV e V). 75
- Figura 15** Bandas protéicas com freqüência de reconhecimento 76

acima de 10% pelas subclasses de IgG contra formas eritrocitárias de *P.falciparum* de pacientes com malária falciparum internados sob tratamento com mefloquina acompanhados por até 42 dias. Reconhecimento por todas subclasses de IgG (A) ou predominante por IgG1, IgG2 e IgG3 (B).

**Figura 16** Bandas protéicas com freqüência de reconhecimento 77

acima de 10% pelas subclasses de IgG contra formas eritrocitárias de *P.falciparum* de pacientes com malária falciparum internados sob tratamento com mefloquina acompanhados por até 42 dias. Reconhecimento predominante por IgG4 e IgG1 (A) ou predominante por IgG1 e IgG2 (B).

**Figura 17** Bandas protéicas com freqüência de reconhecimento 78

acima de 10% pelas subclasses de IgG contra formas eritrocitárias de *P.falciparum* de pacientes com malária falciparum internados sob tratamento com mefloquina acompanhados por até 42 dias. Reconhecimento predominante por IgG1 e IgG3 (A) ou apenas por IgG1 (B).

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1** Características dos 48 pacientes com malária *falciparum* 48  
tratados com mefloquina apresentadas em médias.
- Tabela 2** Resultados do ELISA para detecção das subclasses IgG1, 63  
IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de  
*P.falciparum* durante o acompanhamento dos 48 pacientes  
tratados com mefloquina.
- Tabela 3** Medianas das concentrações máximas das subclasses e 65  
dos índices de avidéz máximos de IgG1, IgG2, IgG3 e  
IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum* e dos  
respectivos dias em que foram alcançados durante o  
acompanhamento por 42 dias de 48 pacientes com malária  
*falciparum* internados em hospital e sob tratamento com  
mefloquina.

## RESUMO

COURA, K. D. **Estudo da reatividade das subclasses de IgG anti-*P. falciparum* durante a evolução de malária não complicada.** São Paulo, 2004 p.131 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

O desenvolvimento de imunidade naturalmente adquirida na malária é lento e depende de fatores como o número de malárias prévias, intervalo entre cada malária, exposição a variantes antigênicas múltiplas e idade do indivíduo. Mecanismos imunes efetores dependentes de anticorpos são importantes no desenvolvimento dessa imunidade. Vários estudos têm mostrado que as subclasses IgG1 e IgG3 anti-*P. falciparum*, conhecidas por sua ação citofílica, são anticorpos protetores, enquanto anticorpos não citofílicos como IgG4 reconhecendo os mesmos epítomos seriam bloqueadores dos mecanismos protetores. Dados recentes sugerem que sob determinadas condições, IgG2 também pode ter ação citofílica e participar da proteção na malária.

Neste trabalho, nós estudamos pela primeira vez, a evolução das subclasses de IgG contra formas eritrocitárias de *P. falciparum* de pacientes com malária falciparum não complicada internados em hospital por até 42 dias, sob tratamento com mefloquina. As subclasses de IgG foram avaliadas por ELISA em 48 pacientes (7 amostras de soro de cada um colhidas nos tempos 0h, 48h, 7, 14, 28, 35 e 42 dias), quanto à quantidade (concentração, µg/ml; índices de reatividade, IR; ou em frequência, %) e quanto à avidez

dos anticorpos (índice de avidéz, IA). Amostras de soro de 14 pacientes (tempos: 0, 48h, 7, 21 e 28 dias) também foram avaliadas quanto à especificidade e a avidéz de reconhecimento das diferentes bandas protéicas do antígeno de *P. falciparum* por *Immunoblotting*.

As subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-*P. falciparum*, na maioria de alta avidéz, estavam presentes no início do tratamento, respectivamente, em 100%, 39,5%, 80,6% e 28,4% dos pacientes e com concentrações médias de 20, 2; 3,8; 1,5 e 0,05 µg/mL. As concentrações máximas das subclasses de IgG foram alcançadas no 7<sup>o</sup> dia, e os IAs máximos de IgG1 e IgG3 foram alcançados no 7<sup>o</sup> dia, e os de IgG2 no 14<sup>o</sup> dia e os de IgG4 no 2<sup>o</sup> dia. A concentração inicial dos anticorpos IgG3 anti-*P. falciparum* apresentou correlação negativa com o tempo de clareamento parasitário (TCP) e a relação das somas dos anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 pelos níveis de IgG4 se correlacionaram negativamente com a parasitemia inicial. No *Immunoblotting*, foram identificadas frações protéicas que podem estar relacionadas com o reconhecimento imune protetor, por serem reconhecidas pelas subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 e não reconhecidas ou reconhecidas tardiamente por IgG4: 125, 96, 86, 75, 55 e 47 kDa.

A resposta predominante das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 observada nestes pacientes, todos com malária não complicada, pode indicar que esses anticorpos estão cooperando para o controle de formas graves da doença e refletirem um certo grau de desenvolvimento de imunidade adquirida.

## ABSTRACT

COURA, K. D. **Study of the reactivity of anti-*P. falciparum* IgG subclasses following up uncomplicated malaria falciparum.** São Paulo, 2004. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

The development of naturally acquired immunity to malaria is slow and depends of several factors as number of previous malaria, interval between each malaria attack, exposure to parasite multiple antigen variant and age-associated maturation of the immune system. Antibody-dependent effector immune mechanisms are believed to be important to the protective immunity. A number of studies have showed that anti-*P. falciparum* IgG1 and IG3, named cytophilic antibodies, are protective, whereas the noncytophilic, IgG4, that recognize the same epitopes may block the protective mechanisms. Recent data have suggested that in certain situations, IgG2 can also act as cytophilic and to cooperate in protection.

In this work, we have studied, for the first time, the evolution of the IgG subclasses against *P. falciparum* blood stages in uncomplicated falciparum malaria patients taken into hospital upon mefloquine treatment and followed up 42 days. These antibodies were determined by ELISA in 48 patients (7 serum samples from each patient collected in different times: 0h, 48h, 7, 14, 28, 35 and 42 days). The results were expressed in concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ), index of reactivity (IR) or frequency (%) and the avidity were expressed as

index of avidity (IA). Serum samples 14 patients (time of collection: 0, 48h, 7, 21 and 42 days) were also evaluated by Immunoblotting as their specificity and avidity against different proteins of the *P. falciparum* blood stages

The subclasses Anti-*P. falciparum* IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4, high avidity predominantly, were present since the beginning of the treatment, respectively, in 100%, 39,5%, 80,6% and 28,4% of the patients with the following concentrations: 20, 2; 3,8; 1,5 and 0,05 µg/mL. The highest concentrations were reached at day 7, and IgG1 and the highest IgG3 IAs were reached at day 7, and the highest IgG2 IAs at day 14 and the highest IgG4 IAs at day 2. The initial concentration of anti-*P. falciparum* IgG3 showed a negative correlation with the parasitemia clearance time (PCT) and the ratio between the sum of IgG1, IgG2 and IgG3 levels to IgG4 levels was negatively correlated with the initial parasitemia. Six protein fractions were identified by the Immunoblotting that can be related to protective immune recognition, because they were recognized by IgG1, IgG2 and IgG3 antibodies and not or only later recognized by IgG4 antibodies: 125, 96, 86, 75, 55 and 47 kDa.

The predominant IgG1, IgG2 and IgG3 responses observed in these uncomplicated malaria patients may suggest that these antibodies are cooperating to the control of severe disease and reflecting a certain development of protective immunity.

# INTRODUÇÃO

---

---

## 1. Histórico

A história da malária se prolonga desde a antiguidade, havendo relatos de que o homem pré-histórico foi suscetível a esta doença. É provável que a doença tenha surgido no continente africano, considerado o berço da humanidade. A malária seguiu o homem em sua migração para a costa do Mediterrâneo, para a Mesopotâmia, para a península da Índia e para o Sudeste Asiático. Todavia, o estabelecimento da malária no Novo Mundo tem gerado apenas especulações, pois não há nenhum histórico ou dado confiável relacionado a esse assunto. É possível que *Plasmodium vivax* e *P. malariae* tenham sido trazidos do Sudeste Asiático por viajantes, enquanto que *P. falciparum* tenha sua origem na era pós-colombiana, quando escravos africanos foram trazidos por colonizadores espanhóis da América Central (BRUCE-CHWATT, 1985; COX, 2002).

Existem referências de febres intermitentes e sazonais na Assíria antiga e em escritos religiosos chineses e indianos. Hipócrates, que viveu na Grécia no século VI antes de Cristo (AC), foi o primeiro médico a descartar a superstição pela observação lógica da relação entre o aparecimento da doença e as estações do ano ou o lugar onde seus pacientes viviam. Ele também foi o primeiro a descrever detalhes clínicos da doença e algumas de suas complicações. A malária foi comum nas proximidades de Roma e, por isso, há relatos de que tenha sido denominada “Febre Romana”, porém

epidemias de malária continuaram em muitas partes da Europa e em outros continentes por muitos séculos (BRUCE-CHWATT, 1985; COX, 2002).

No século XVIII, essa febre específica recebeu o nome italiano de 'mal'aria' (maus ares), pois se acreditava que a malária fosse transmitida pelo ar. Já o termo "paludismo" que indica uma relação direta com pântanos, foi introduzido muito mais tarde (BRUCE-CHWATT, 1985).

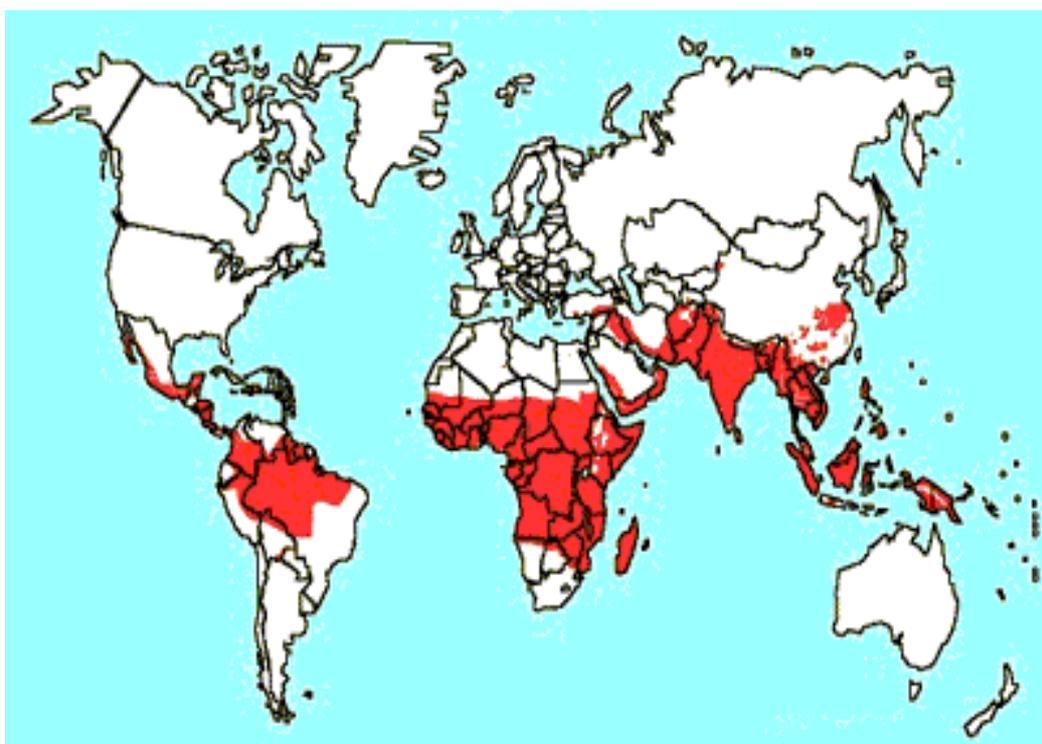
Em 1880, Laveran, um médico do exército francês na Argélia, foi o primeiro a observar o parasito causador da malária no interior das hemácias e a descrever o seu ciclo evolutivo. Já no final do século XIX, Ronald Ross detectou formas evolutivas do parasito da malária no intestino de mosquitos. Porém, somente entre 1898 e 1899 foi que os italianos Amico Bigmani, Giuseppe Bastianelli e principalmente Battista Grassi identificaram o *Anopheles sp* como o vetor e transmissor da doença (BRUCE-CHWATT, 1985).

## **2. SITUAÇÃO ATUAL DA MALÁRIA NO BRASIL E NO MUNDO**

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2003, a malária é a doença tropical mais importante do mundo e provoca mais mortes que outras doenças infecciosas juntas, como tuberculose, sarampo, AIDS e Hanseníase. Atualmente a malária é endêmica e um problema de saúde pública em 101 países, cerca de 40% da população mundial, sendo 45 países da África, 21 países das Américas, 4 da Europa, 14 da região do Leste do Mediterrâneo, 8 do Sudeste Asiático e 9 da região do Pacífico

Oeste. A prevalência da doença no mundo é de 300 a 500 milhões de casos por ano, com cerca de 1 a 2 milhões de mortes por ano, principalmente em crianças com menos de cinco anos de idade, sendo que a África concentra 90% do total de casos (OMS, 1998). Na figura 1, mostramos o mapa das áreas afetadas pela malária no mundo, segundo dados da OMS.

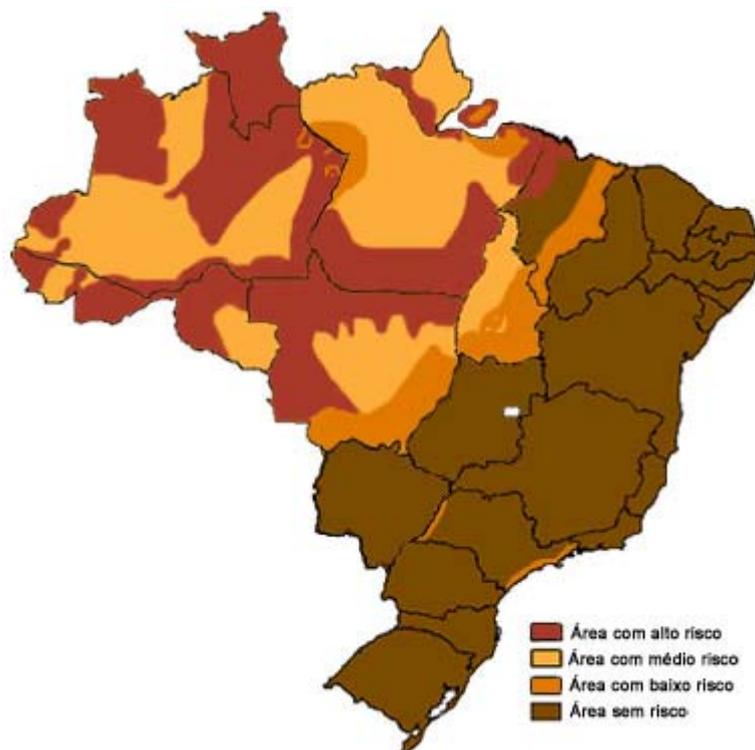
Nas Américas, o número de casos elevou-se de 344.170, em 1970 para 1.138.966 casos em 1996 (OPAS, 1996). No Brasil, nesse mesmo período observou-se uma elevação de cerca de 50.000 casos para 426.510 casos (CORDEIRO et al, 2002).



**Figura 1.** Áreas Endêmicas de Malária no mundo (Fonte:OMS,1997).

No Brasil, em 2001, foram registrados 388.807 casos, segundo dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), um número bem inferior em relação aos registros de anos anteriores, pois em 2000 e 1999 foram registrados 615.245 e 637.000, respectivamente. Essa redução ocorreu em decorrência dos esforços do Ministério da Saúde com a elaboração do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária em parceria com estados e municípios. As estratégias utilizadas para que ocorresse essa redução no número de casos registrados foram baseadas na descentralização do diagnóstico e tratamento para os estados e municípios, de maneira a ampliar e tornar mais rápido o acesso das populações da Amazônia, inclusive integrando na ação os Agentes Comunitários de Saúde e as Equipes de Saúde da Família; no reforço das ações de combate ao vetor; nas intervenções ambientais como a drenagem e limpeza de igarapés nas áreas urbanas onde há casos de malária, como Manaus e Porto Velho; e na regulamentação da avaliação prévia, por parte do Ministério da Saúde, quando da instalação de assentamentos ou de projetos de desenvolvimento. Atualmente, o desafio continua no sentido de reduzir a morbidade e a mortalidade causadas pela malária e eliminar sua transmissão urbana nas capitais. De todos os casos registrados no país cerca de 99% ocorrem na Amazônia Legal (CORDEIRO et al, 2002), sendo que o restante dos casos registrados nas demais regiões são na grande maioria das vezes importados da região amazônica ou de outros países onde ocorre transmissão. A Amazônia Legal é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia, Roraima e

Tocantins (FUNASA, 2001). Na figura 2 temos as áreas endêmicas de malária no Brasil de acordo com risco de transmissão.



**Figura 2.** Áreas Endêmicas de malária no Brasil de acordo com o risco de transmissão (Fonte: FUNASA – Fundação Nacional de Saúde / Superintendência de Controle de Endemias -SUCEN, 1994).

Com relação à intensidade de transmissão, a malária apresenta padrões epidemiológicos muito diversos de um lugar para o outro ou ainda de uma época para outra.

Em zonas com transmissão estável da malária, a incidência da doença é muito alta e quase todas as crianças na primeira infância têm parasitemia elevada após os primeiros meses quando os anticorpos maternos praticamente não estão mais presentes, exibindo em sua maioria

esplenomegalia. As crianças maiores também têm exame de sangue positivo, porém a parasitemia é mais baixa, devido ao desenvolvimento de imunidade. Nos adultos, a imunidade naturalmente adquirida assegura uma proteção considerável em comparação às crianças, com presença de imunidade anti-tóxica, ou seja, uma diminuição ou ausência dos sintomas clínicos nos indivíduos adultos, sendo que tanto a parasitemia como a esplenomegalia tendem a diminuir (BAIRD, 1995; BAIRD, 1991).

Em zonas com transmissão instável de malária, tanto adultos quanto crianças são suscetíveis à doença, e a proporção de indivíduos que apresentam esplenomegalia é praticamente a mesma em cada grupo (CARTER & MENDIS, 2002).

Além da estratificação das áreas malarígenas em regiões de transmissão estável e regiões de transmissão instável, também pode-se considerar as seguintes situações epidemiológicas para caracterizar uma área endêmica: quando o índice esplênico em crianças é constantemente alto, com mais de 75% das crianças apresentando esplenomegalia, e o índice em adultos é baixo, temos a presença de malária holoendêmica; quando o índice esplênico é maior que 50% nas crianças e alto nos adultos, temos a presença de malária hiperendêmica; na vigência de índice esplênico infantil entre 11% e 50%, temos a presença de malária mesoendêmica; quando o índice não ultrapassa 10%, temos a presença de malária hipoendêmica (KNELL, 1991).

### 3. ETIOLOGIA DA MALÁRIA

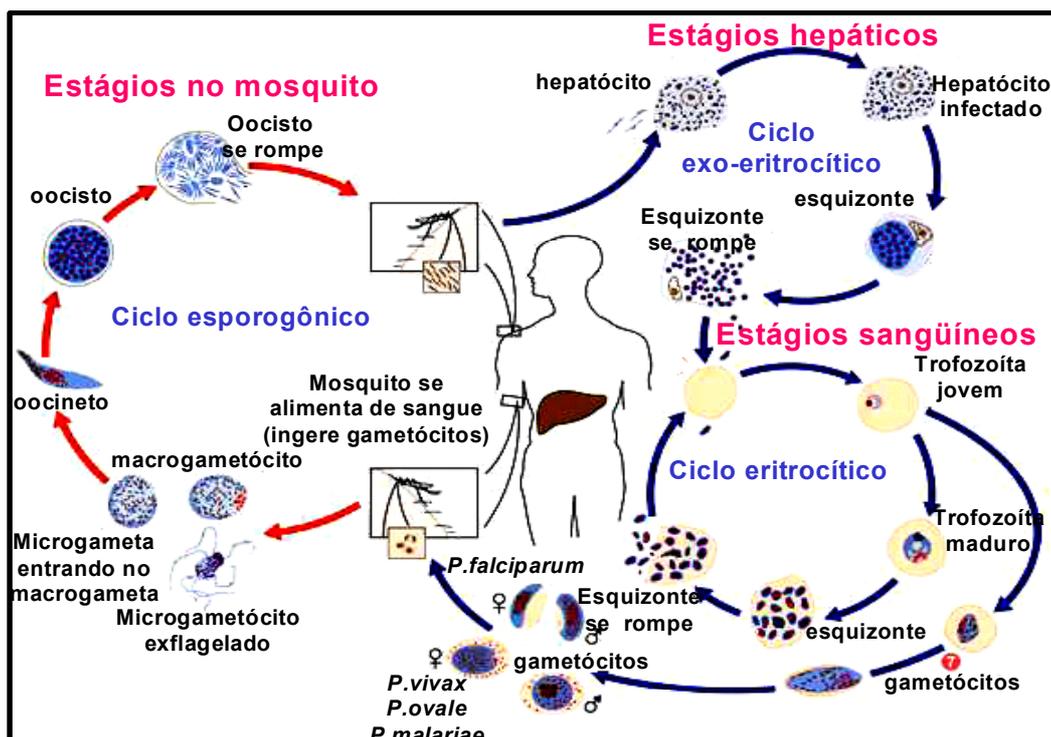
Os parasitos que causam a malária são os plasmódios e estão alocados no filo Apicomplexa, ordem Eucoccidii, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*, apresentando três sub-gêneros: *Plasmodium*, *Laverania* e *Vinckeia*.

São conhecidas atualmente cerca de 120 espécies de plasmódios, sendo que 22 espécies infectam primatas, 19 espécies acometem roedores, morcegos e outros mamíferos e em torno de 70 espécies infectam aves e répteis. Apenas 4 infectam naturalmente o homem: *Plasmodium (Laverania) falciparum*, (Welch, 1897); *Plasmodium (Plasmodium) malariae* (Laveran, 1881); *Plasmodium (Plasmodium) ovale* (Stephens, 1922); *Plasmodium (Plasmodium) vivax* (Grassi & Feletti, 1890) (BRUCE-CHWATT, 1985).

O ciclo evolutivo do *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado tem início quando a fêmea infectada do mosquito *Anopheles* realiza o repasto sangüíneo e inocula os esporozoítos, as formas infectantes de *Plasmodium*, que haviam se acumulado nas glândulas salivares do inseto (Figura 3).

Esses esporozoítos após cerca de uma hora da inoculação, migram da corrente sangüínea para o fígado onde infectam os hepatócitos e se diferenciam em criptozoítos. Os criptozoítos além de crescerem, iniciam um ciclo de reprodução assexuada, conhecido como ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia pré-eritrocítica. Quando começam as divisões nucleares, os parasitos passam a ser chamados de esquizontes e no fim da esquizogonia dão origem a milhares de merozoítos, que rompem os hepatócitos e, os que

não são fagocitados e destruídos pelas células de Kupffer, invadem as hemácias e dão início ao segundo ciclo de reprodução assexuada dos plasmódios, chamado de ciclo eritrocítico. A esquizogonia eritrocítica dos plasmódios que acometem humanos ocorre preferencialmente nos capilares profundos. Depois de várias repetições do ciclo eritrocítico, surgem as formas sexuadas no sangue periférico, chamadas de gametócitos, que são as formas infectantes para o mosquito. Quando a fêmea do *Anopheles* novamente realiza o repasto sanguíneo, ingere os gametócitos macho e fêmea que se encontram no interior das hemácias, estes quando se unem dão origem ao ovo ou zigoto, dando assim início ao ciclo evolutivo dos plasmódios no hospedeiro invertebrado. O ovo ou zigoto depois de algum tempo começa a deslocar-se com movimentos amebóides, sendo que nesta fase passa a ser chamado de oocineto. Este se dirige para o revestimento epitelial da parede do intestino do inseto. Neste local, segrega um envoltório protetor e passa a ser denominado de oocisto. A partir dessa fase inicia-se a esporogonia, na qual são formados milhares de elementos-filhos chamados de esporozoítos, ao mesmo tempo em que o oocisto cresce. O oocisto maduro então rompe-se e libera os esporozoítos que invadem a hemolinfa do inseto, sendo que muitos deles migram para as glândulas salivares, onde novamente a fêmea do *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo inocula as formas infectantes do parasito no hospedeiro vertebrado, fechando o ciclo evolutivo dos plasmódios (BRUCE-CHWATT, 1985).



**Figura. 3.** Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* infectantes ao homem (adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov>)

#### 4. A DOENÇA MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa febril e aguda, caracterizada por febre alta acompanhada de calafrios, suores e cefaléia que ocorrem em padrões cíclicos e que dependem da espécie do parasito infectante. Os ataques paroxísticos característicos da doença ocorrem em quatro estágios sucessivos: o primeiro é caracterizado por frio intenso, acompanhado de calafrios e tremores; o segundo por calor, febre alta, face hiperêmica, taquipnéia, seguida de suores e apirexia, com duração total de 6 a 12 horas. Outras manifestações que podem ocorrer são náuseas, vômitos, astenia, fadiga, diarréia, tosse, artralgia e dor abdominal, que podem ser

acompanhadas por palidez, icterícia e hepatoesplenomegalia. Na forma mais grave da doença que é causada por *P. falciparum*, o quadro clínico pode evoluir para distúrbios da coagulação sangüínea, choque, insuficiência renal ou hepática, encefalopatia aguda e edema pulmonar que levam a óbito em 10% dos casos (BRUCE-CHWATT, 1985).

## **5. MALÁRIA E IMUNIDADE**

A relação parasito-hospedeiro tem um enorme impacto na resposta imune do hospedeiro, levando à resposta mediada por células e à produção de anticorpos. Esta resposta imune tem sido intensamente estudada, no intuito de determinar tanto a natureza da imunidade protetora à malária como identificar resposta imune que possa ter valor diagnóstico ou epidemiológico.

Na malária, a imunidade protetora que é observada em indivíduos adultos que vivem em áreas endêmicas depois de repetidas infecções, pode ser classificada em imunidade clínica que é adquirida gradualmente, com redução do risco de letalidade e da intensidade dos sintomas clínicos e imunidade anti-parasitária, na qual ocorre redução do número de parasitos no indivíduo infectado seja pela inibição da replicação parasitária ou pela morte do parasito (CARTER & MENDIS, 2002; ARTAVANIS-TSAKONAS et al, 2003). O número de malárias adquiridas por um indivíduo e o intervalo entre cada malária é importante para definir o seu estado de imunidade. Nos casos de malária por *P. falciparum*, é possível que um certo grau de

imunidade, para alguns aspectos da doença severa e tratada, possa ser conseguido, após uma ou duas exposições ao parasito (GUPTA et al, 1999).

Devido ao tempo necessário para aquisição de imunidade efetiva para malária em regiões endêmicas, a imunidade antimalárica é dita como dependente da duração da exposição ou dependente da idade. Há, contudo, aspectos diretamente dependentes da idade para o surgimento de imunidade e para a resposta patogênica à malária. As crianças possuem uma capacidade bastante reduzida para adquirir imunidade antimalárica uma vez que ainda estão desenvolvendo mecanismos imunes protetores, e estão assim mais sujeitas aos riscos de malária clínica, doença severa e morte, enquanto os adultos podem adquirir essa imunidade mais rapidamente quando comparados às crianças, exceto as gestantes (BAIRD, 1995; BAIRD et al, 1991; ARTAVANIS-TSAKONAS et al, 2003). Porém, um intervalo de seis meses a um ano sem reinfecção parece ser suficiente para deixar um indivíduo adulto vulnerável mais uma vez ao impacto causado pelo plasmódio (CARTER & MENDIS, 2002). O desenvolvimento lento de imunidade protetora em áreas endêmicas de malária pode refletir a aquisição de imunidade específica para muitos antígenos variantes naturais que não reagem de forma cruzada (PLEBANSKI & HILL, 2000).

Na malária ocorre uma indução de resposta imune pelo parasito que estimula a liberação de citocinas por células mononucleares do sangue periférico humano (CMSPH), que podem ter importante função na ativação de monócitos (ESPARZA et al, 1987), células T (YOKOTA et al, 1988), células natural killer (NK) (OSTENSEN et al, 1987) e neutrófilos (DJEU et al

1990), do hospedeiro, que atuam nos subseqüentes estágios do parasito no fígado e no sangue.

O curso da infecção depende de um equilíbrio entre a indução apropriada ou inapropriada de citocinas secretadas por vários tipos de células ativadas (MALAGUARNERA & MUSUMECI, 2002). Portanto, respostas precoces de citocinas inflamatórias parecem mediar imunidade protetora, contudo respostas tardias contribuem para a patologia (McGUIRE et al, 1994; LUTY et al, 2000). Isso sugere que deve existir um equilíbrio durante a resposta inflamatória na malária, pois um desequilíbrio pode conduzir à forma severa da doença (MALAGUARNERA & MUSUMECI, 2002). No quadro 1 apresentamos de forma sumarizada as principais citocinas envolvidas na resposta imune na malária e suas principais funções.

A imunidade contra o plasmódio é complexa e estágio - específica (HOLDER, 1999). No estágio hepático, vários antígenos específicos têm sido identificados e estes juntamente com aqueles trazidos com a invasão por esporozóitos sejam rapidamente processados por células hospedeiras e apresentados na superfície de hepatócitos infectados em combinação com MHC de classe I (WEISS et al, 1990). Essa apresentação leva ao reconhecimento por linfócitos T citotóxicos (LTCs) e morte das células infectadas, ou estimulação de células NK e células T CD4+ para produzir interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), o qual pode desencadear uma cascata de reações imunes e pode levar, por último, à morte intracelular do parasito (WEISS et al, 1990; WANG et al, 1996). Os LTCs podem ser ainda diretamente citolíticos contra o hepatócito infectado por liberação de perforina e granzima

ou por ligação aos receptores indutores de apoptose nas células infectadas (KWIATKOWSKI, 1995).

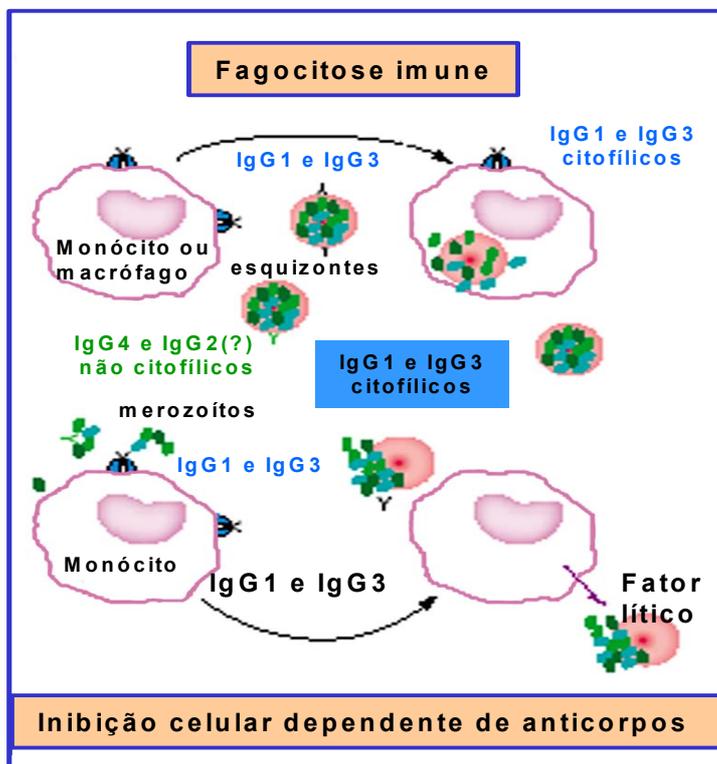
Quadro 1. Resumo das funções das principais citocinas relacionadas à resposta imune na malária (baseado em RICHARDS,1997; MALAGUARNERA et al, 2002).

<b>Citocinas</b>	<b>Células Produtoras</b>	<b>Ações</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Macrófagos e monócitos	Regula produção de IL-12 por macrófagos; aumenta a capacidade fagocitária de monócitos; suas concentrações no plasma mais o NO estão associados com a rápida resolução da febre e clareamento parasitário,ms o excesso conduz a patogênese.
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Linfócitos T CD4+ e CD8+ e células NK	Ativa macrófagos a liberarem TNF- $\alpha$ TNF- $\beta$ , IL-1 e IL-6, ROI, NOI que agem de forma individual ou conjunta na morte e inibição do crescimento parasitário; aumenta a expressão de MHC; pode induzir IgG citofílicos específicos para o estágio sanguíneo da malária; ajuda nos mecanismos inibitórios celulares dependentes de anticorpos.
<b>IL-12</b>	Macrófagos e linfócitos B	Ativam células NK; induz diferenciação de linfócitos T CD4 em Th1; aumenta a resposta imune mediada por células; afeta a resposta imune humoral por indução de troca de isotipo através de mecanismos dependentes e independentes de INF- $\gamma$ ; estimula produção de anticorpos em LB.
<b>IL-18</b>	Macrófagos e linfócitos B	Atua de forma sinérgica com IL-12 apresentandouma importante função na defesa contra o plasmódio; ativa macrófagos a produzirem TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 e induz a citotoxicidade de células NK e aumenta a diferenciação de células T para o tipo Th1.
<b>IL-4</b>	Linfócitos T (Th2), basófilos e mastócitos ativados	Ativação de LTC, células NK e macrófagos; estimula crescimento de Th2 e inibe resposta Th1 por depressão da produção de INF- $\gamma$ ; importante na resposta de anticorpos. A produção de IL-4 por células Th2 estimuladas com antígenos de plasmódios <i>in vitro</i> aumenta as concentrações de anticorpos.
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Linfócitos T e B, macrófagos, células NK	Inibe crescimento celular; tem função essencial no controle da transição entre resposta pró-inflamatória (Th1) e anti-inflamatória (Th2) durante a fase aguda e de resolução da infecção malárica; crucial no controle da densidade parasitária; em baixas concentrações estimula LB a secretarem subclasses de IgG.
<b>IL-10</b>	Linfócitos T (TH2) e B, monócitos	Supressor potente das funções do macrófago; induz proliferação de células B e produção de imunoglobulinas, que é essencial para o desenvolvimento e maturação de anticorpos antimaláricos; pode ter importante função na definição de resposta de linfócitos T helper na malária.

As células T CD4+ são cruciais para o desenvolvimento de respostas imunes mediadas por células T CD8+ contra hepatócitos infectados com parasitos da malária (CARVALHO et al, 2002). Portanto, o plasmódio que se desenvolve dentro do hepatócito do hospedeiro é o maior alvo de imunidade protetora no estágio hepático da doença (KWIATKOWSKI, 1995).

Os merozoítos que escapam da resposta imune no estágio hepático infectam as células sanguíneas, continuando o ciclo de infecção e de estimulação do sistema imune (RILEY et al, 1992). Os merozoítos são responsáveis pela modificação dos eritrócitos infectados com relação às proteínas do parasito expressas na superfície das células e à concomitante resposta imune, resultando nas manifestações clínicas da malária (RILEY et al, 1992; MILLER, et al 1998). A imunidade protetora adquirida induzida por plasmódios envolve tanto anticorpos quanto células (WIPASA et al, 2002). Em indivíduos que vivem em áreas endêmicas de malária tem sido demonstrado que a imunidade naturalmente adquirida depende amplamente da aquisição de um repertório de anticorpos protetores específicos direcionados contra antígenos alvo, em geral polimórficos (BULL et al, 1998). Anticorpos que se liguem à superfície do merozoíto e às proteínas que são externalizadas do complexo apical das organelas envolvidas no reconhecimento e invasão do eritrócito, parecem ter importante função na imunidade contra parasitos oriundos de reprodução assexuada, no estágio sangüíneo, sendo que esses anticorpos poderiam neutralizar parasitos ou levar a mecanismos celulares dependentes de anticorpos que levam à morte do parasito (SAUL, 1999).

Na malária há uma relação entre as propriedades das subclasses de anticorpos IgG e mecanismos de anticorpos mediando proteção. A resposta de isotipos de anticorpos parece ser mais importante do que inicialmente se reconheceu. Tem sido mostrado que o grau de imunidade protetora em humanos se correlaciona com o nível de anticorpos contra antígenos do estágio assexuado sangüíneo e é dependente do isotipo de anticorpos (PIPER et al, 1999; ASTAGNEAU et al, 1995; CHIZZOLINI et al, 1988). Os anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 contra *P. falciparum* em humanos são considerados os mais importantes para proteção (AUCAN et al, 2001). Esses mesmos anticorpos, chamados citofílicos, atuam em colaboração com células efetoras como monócitos e macrófagos, sendo que estes mediam opsonização e inibição celular dependente de anticorpos (ADCI). Estudos em indivíduos de áreas endêmicas mostraram que níveis aumentados de IgG1 e IgG3 específicos para *P. falciparum* estavam associados com baixa parasitemia (ARIBOT et al, 1996; BOUHAROUN-TAYOUN & DRUILHE, 1992). Na figura 4, 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 ADCI.



**Figura 4.** Possíveis mecanismos de clareamento de eritrócitos infectados por *P.falciparum* mediados por anticorpos citofílicos (Adaptado de Garraud, 2003).

A resposta de isotipo de anticorpos mais associada à proteção à malária em humanos é IgG3, que é uma subclasse de vida curta quando comparada com outras subclasses de IgG (GARRAUD, 2003). Anticorpos encontrados no soro para o antígeno da superfície de merozoítos 2 e 3 (MSP- merozoite surface antigen) que têm sido associados à proteção são quase exclusivamente da subclasse IgG3 (RZEPCZYK et al, 1997; TAYLOR et al, 1998; OEUVRAY et al, 1994). Os anticorpos protetores contra a maioria de antígenos identificados parecem ser da subclasse IgG3 em indivíduos vivendo em áreas hiperendêmicas de *P.falciparum* (ARIBOT et al, 1996).

Num estudo de caso-controle realizado em Bangkok na Tailândia foi verificada a contribuição da resposta imune humoral IgG e IgM durante a resposta terapêutica na malária *falciparum* aguda. Os resultados sugeriram que anticorpos antimaláricos podem ter uma importante função apoiada na resposta terapêutica para drogas antimaláricas uma vez que os títulos de anticorpos anti-RESA (anti-ring-infected erythrocyte surface antigen) na admissão dos pacientes foram significativamente altos em pacientes em que houve cura da doença quando comparado com pacientes em que o regime de tratamento antimalárico similar falhou (MAYXAY et al, 2001).

PINTO et al, 2001, avaliaram a resposta de anticorpos IgG total e as subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 contra *P. vivax* em crianças de 0 a 15 anos de idade antes e depois do tratamento específico utilizando a técnica de imunofluorescência indireta (IFI), e observaram um aumento dos níveis de IgG no primeiro e no último dia do tratamento específico e um predomínio de anticorpos citofílicos sobre o anticorpo não citofílico IgG2.

BECK et al, 1995, realizaram um estudo em uma região altamente endêmica para malária em Papua Nova Guiné onde observaram que a resposta imune humoral ao antígeno RESA (ring-infected erythrocyte surface antigen) foi freqüente em todas as subclasses de IgG e somente a resposta de IgG3 foi dependente da idade, além do mais, os anticorpos IgG1 e IgG3 foram associados com prevalência reduzida de *P. falciparum*.

Assim, a proteção contra a infecção por *P. falciparum* no estágio sangüíneo parece depender da proporção específica de anticorpos IgG1 e IgG3 relativa à proporção de anticorpos IgG2 e/ou IgG4 (BOUHAROUN-

TAYOUN & DRUILHE, 1992). Porém, alguns dados sugerem que sob certas circunstâncias, os anticorpos IgG2 podem participar de proteção. Isto poderia acontecer em populações que carreguem uma mutação no alelo que codifica um Fc $\gamma$ RIIA (polimorfismo H131) que capacita esse receptor a se ligar na fração Fc de IgG2, além de ligar a IgG3 e IgG1 (AUCAN et al, 2000).

AUCAN et al, 2000, analisaram a distribuição de subclasses IgG em resposta a epítomos conservados do extrato de *P. falciparum* do estágio eritrocítico e observaram que altos níveis de IgG2 para os epítomos RESA e MSP2 estavam associados a baixo risco de infecção, porém observaram que 70% dos indivíduos estudados apresentavam o alelo H131, ou seja, nestes indivíduos a IgG2 é capaz de se ligar a Fc $\gamma$ RIIA, assim como IgG1 e IgG3. Observaram também que os altos níveis de IgG4 específicas foram relacionadas com um acentuado risco de infecção e um acentuado risco de ataque de malária. Também observaram que os níveis de IgG2 e IgG3, bem como as proporções de IgG2/IgG4 e IgG3/IgG4 aumentaram com a idade do indivíduo, em paralelo com a proteção contra infecção e doença. Portanto, neste estudo foi observada uma função protetora para IgG3 e IgG2, que pode ativar células efectoras através de Fc $\gamma$ RIIA, e mostram evidências de uma função bloqueadora de IgG4 na doença e infecção malárica.

Vários estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar a eficácia da avidéz ou maturação da afinidade de anticorpos em resposta a antígenos produzidos em várias infecções, sendo que resultados muito bons já foram obtidos, por exemplo, na rubéola, citomegalovírus, herpesvírus, varice-

zoster, onde a medida da avidéz é utilizada para fins diagnósticos (revisado em WOZNICOVA, 2004) e na toxoplasmose, onde a avidéz de anticorpos IgG é utilizada para diferenciar a fase aguda de infecção pregressa (CAMARGO et al, 1991). Na malária, poucos estudos investigaram a avidéz dos anticorpos. FERREIRA et al, 1996, avaliaram a composição de isotipos IgG e a avidéz desses mesmos anticorpos naturalmente adquiridos por ELISA em adultos senegaleses clinicamente imunes e adultos amazonenses semi-imunes durante a presença de sintomas clínicos agudos e 2 meses após terapêutica específica e na ausência de re-infecção. Eles observaram a presença de anticorpos citofílicos de alta avidéz nos adultos senegaleses clinicamente imunes. Nos pacientes amazonenses foram observados altos níveis de anticorpos citofílicos de baixa avidéz. Dois meses depois a concentração de anticorpos citofílicos foi significativamente baixa, porém, observou-se a maturação da afinidade desses anticorpos durante o mesmo período.

No estudo do perfil sorológico de populações expostas a diferentes situações epidemiológicas de malária no Brasil realizado por TOZETTO-MENDOZA em 1997, a presença e a intensidade de anticorpos IgG, IgM, IgG1, IgG2 e IgG3 anti-*P.falciparum*, mostraram correlação com o nível de endemicidade, infecção patente, episódios de malária há menos de um ano e com a idade dos indivíduos estudados, além do predomínio de anticorpos IgG anti-*P.falciparum* de alta avidéz em indivíduos com múltiplos episódios de malária e de baixa avidéz nos indivíduos primo-infectados, sendo que os

anticorpos IgG3 anti-*P.falciparum* foram predominantemente de baixa avidéz (TOZETTO-MENDOZA, 1997).

Como a técnica de *Immunoblotting* tem demonstrado ser útil em estudos soroepidemiológicos na detecção precisa do perfil de anticorpos em resposta a diferentes frações protéicas, esta técnica tem sido utilizada também na avaliação da resposta imune humoral na malária. Num estudo longitudinal conduzido em Burkina Faso por THELU et al, 1991, foi investigado o desenvolvimento de resposta imune natural ao *P.falciparum* por *Immunoblotting* utilizando antígenos somáticos e exoantígenos. Os resultados mostraram fortes variações nas respostas individuais, e altos níveis de anticorpos e alta prevalência de anticorpos contra as frações protéicas de 115 e 103 kDa, mas que provavelmente não estavam envolvidos em proteção. A prevalência de anticorpos IgG diferiu entre as diferentes subclasses, sendo que as subclasses IgG1 e IgG3 foram predominantes e a subclasse IgG4 foi a menos prevalente. Portanto fica evidente a importância do estudo da resposta imune humoral, e principalmente das subclasses de IgG utilizando técnicas com alta sensibilidade e especificidade como ELISA e *Immunoblotting* na avaliação da imunidade naturalmente adquirida de indivíduos que vivem em regiões onde a malária é endêmica. Porém, muitos estudos têm sido realizados em regiões com alta endemicidade de malária, onde já está bem caracterizado o desenvolvimento de imunidade naturalmente adquirida. Contudo estudos semelhantes em região de transmissão instável de malária, como no Brasil,

ainda são raros. Mais raros ainda são os estudos avaliando a reatividade de anticorpos em indivíduos acompanhados durante o tratamento nessas mesmas regiões.

No presente trabalho, estudamos o perfil da resposta humoral das subclasses de IgG anti-*P. falciparum* em indivíduos moradores em área com transmissão instável de malária na Amazônia Brasileira. Foram avaliadas a quantidade, a qualidade e a reatividade específica desses anticorpos contra formas eritrocitárias de *P.falciparum* por dois métodos imunoenzimáticos ELISA e *Immunoblotting*. Para tanto, foram estudadas amostras de soro colhidas em diferentes tempos desde o início do tratamento de pacientes com malária *falciparum* internados em hospital até 42 dias e tratados com mefloquina. Os resultados foram analisados em relação à variáveis preditoras de exposição à malária e variáveis de resposta ao tratamento e à infecção malárica.

Os resultados fornecem informações importantes para um melhor entendimento do papel desses anticorpos contra formas eritrocitárias no desenvolvimento de imunidade naturalmente adquirida mesmo em áreas de transmissão instável. A determinação da reatividade específica das subclasses de anticorpos IgG fornece ainda informações sobre bandas protéicas que deverão ser melhor estudadas e caracterizadas como candidatas a alvos de vacinas.

## OBJETIVOS

---

---

### Geral

Determinar a evolução dos níveis e da avidéz das subclasses IgG1, IgG2, IgG3, Ig4 contra formas eritrocitárias de *P.falciparum* de pacientes com malária *falciparum* não complicada internados em hospital sob tratamento com mefloquina.

### Específicos

1. Padronizar a técnica de *Immunoblotting* para a pesquisa das subclasses IgG1, IgG2, IgG3, Ig4 anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum*;
2. Determinar por ELISA os níveis e os índices de avidéz dos anticorpos IgG1, IgG2, IgG3, Ig4 e contra antígenos de formas eritrocitárias de *P.falciparum* em amostras de soros de pacientes com malária *falciparum* internados em hospital sob terapêutica com mefloquina colhidas nos tempos 0, 48h, 7, 14, 28, 35 e 42 dias;
3. Avaliar por *Immunoblotting* a reatividade das subclasses IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 contra antígenos de formas eritrocitárias de *P.falciparum* em amostras de soro de pacientes com malária *falciparum* internados em hospital sob terapêutica com mefloquina nos tempos 0, 48h, 7, 21 e 42 dias;
4. Analisar os resultados obtidos em relação à variáveis preditoras de exposição à malária, variáveis de resposta ao tratamento e à doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

---

### 1. CASUÍSTICA

1.1. Amostras de soros-padrão positivos (n=12) e negativos (n=12) para anticorpos anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* para padronização do “immunoblotting” para pesquisa das subclasses de IgG.

1.2. Amostras de soro (n=290) de 48 pacientes internados em hospital sob tratamento anti-malárico com mefloquina 1.000mg em dose única (n=48) colhidas nos tempos 0, 48h e 7(n=48), 14 (n=46), 28 (n=47), 35 (n=30) e 42 (n=23) dias.

Essas amostras de soro fazem parte da soroteca do IMT/SP e foram colhidas no Hospital Municipal de Peixoto de Azevedo, MT, durante o período de março de 1996 a agosto de 1997, para a realização de dois projetos de tese de Mestrado de Rui Rafael Durlacher (“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”), (DURLACHER, 1998) e de Crispim Cerutti Junior [“Avaliação *in vivo* e *in vitro* da sensibilidade do *P. falciparum* a quinino e mefloquina em área endêmica de malária na Amazônia Brasileira (Peixoto de Azevedo, Estado do Mato Grosso)”], (CERUTTI–JUNIOR, 1998).

Durlacher em 1998 realizou um estudo observacional prospectivo, onde pacientes com malária *falciparum* apresentando diferentes características individuais e de exposição passada a malária foram

acompanhados durante terapêutica específica, com mefloquina (n=143) ou quinino (n=35) para avaliação da resposta imune humoral.

Todos os pacientes preencheram os seguintes critérios para inclusão nos estudos:

- indivíduos com infecção por *P. falciparum* diagnosticada por gota espessa, com menos que 100.000 parasitas /mm<sup>3</sup>;
- sexo masculino;
- idade entre 18 e 60 anos;
- não uso de drogas antimaláricas nos 7 dias precedentes à internação;
- não evidência de complicações clínicas, tais como envolvimento renal ou cerebral;
- consentimento pós-informado

Na tabela 1 apresentamos os dados dos 48 pacientes incluídos no nosso estudo.

**Tabela 1.** Características dos 48 pacientes com malária *falciparum* tratados com mefloquina apresentadas em médias.

<b>Características</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
Idade (anos)	28,15	±7,78
Tempo de permanência em área endêmica (anos)	9,30	±7,12
Nº de episódios de malária por <i>P.falciparum</i> nos últimos 2 anos	5,48	±6,22
Tamanho do baço (cm do RCE LHC)	4,91	±2,43
Tempo com sintomas (dias)	4,04	±3,51
Parasitemia inicial (/mm <sup>3</sup> )	10826,00	±6224,56

1.4. Amostras de soros de doadores de sangue foram obtidas junto à Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo (n=50)

## **2. ANTÍGENO DE *P. falciparum***

### **2.1. Manutenção de *P.falciparum***

O isolado ADA de *P.falciparum* é mantido no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT, por cultivo *in vitro* e por congelamento em nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido.

#### **(a). Congelamento**

Hemácias de cultivo foram centrifugadas e para cada 1ml de sedimento foi adicionado 0,34ml de "glycerolyte" na velocidade de 1 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 aliquotado em 1 ml em ampola de congelamento, mantido a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 18 horas e posteriormente, armazenado em "container" contendo  $\text{N}_2$  líquido.

(b). Descongelamento

As hemácias foram descongeladas por 2 minutos, em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , 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  $1500 \times g$  por 10 minutos e o sedimento ressuspenso com 10 ml de NaCl 0,9% e dextrose 0,2%. Após nova centrifugação, o sedimento de hemácias foi adicionado ao meio de cultura, para recuperação dos parasitos.

## 2.2. Cultivo de *P. falciparum*

Cultivo de *P.falciparum* foi feito como descrito por Trager e Jensen, 1976. Cepas foram cultivadas assincronicamente em hemácias humanas tipo "O", Rh positivo na concentração final de 4%, em placas de Petri contendo 8 ml de meio RPMI 1640 completo em ambiente a 5% de  $\text{CO}_2$ . A troca do meio de cultura foi feita diariamente, e quando a parasitemia alcançava um mínimo de 4% ou a cada 4 dias, era feito o repique para duas placas de Petri, contendo meio de cultura.

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

Quando a parasitemia atingiu cerca de 10%, com formas predominantes de esquizontes, as hemácias foram retiradas das placas e centrifugadas 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 hemácias 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 (Zw) a 10% em PBS contendo os seguintes inibidores de proteases: aprotinina (50µg/ml), leupeptina (1µg/ml) e antipaína (1µg/ml) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (phenylmethyl sulfonyl fluoride-PMSF) 1mM. Para aproximadamente 100 mg (peso úmido) de sedimento de parasitas foram adicionados 200 µl de Zw e 1,0 ml de PBS (Miettinen-Baumann et al. 1988). O conteúdo protéico do extrato antigênico de *P. falciparum* foi dosado pelo método de LOWRY et al. 1981.

### **3. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS**

3.1. 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.

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

#### **4. OBTENÇÃO DE CONJUGADOS**

4.1. conjugado enzimático proteína-peroxidase.

Os conjugados estreptavidina-Peroxidase foram obtidos comercialmente da Sigma Chemical Co.

#### **5. ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-FORMAS ERITROCITÁRIAS DE *P.falciparum***

5.1. Subclasses de IgG (segundo LEORATTI, 2004)

Placas NUNC (polysorb) foram sensibilizadas com antígeno de *P. falciparum* a 5µg/ mL (50 µL/ cavidade) em PBS por 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 soros diluídos em leite desnatado a 2% em PBS-Tw a 1/50 (IgG1, IgG2 e

IgG3) e 1/5 (IgG4), 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 dos conjugados específicos anti-IgG1 (1/1000), anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 marcados com biotina (1/500) 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 (1/1000) (50µL/cavidade), as 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 TMB (Sigma Chemical Co) e as placas foram incubadas por 30 minutos a 37° C. A reação foi interrompida com 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A densidade óptica (D.O.) do produto colorido obtida em leitor de microplacas Titertek Multiskan MCC340 a 450 nm.

Foram testadas as amostras de soro de pacientes internados e tratados com mefloquina em dose única 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” de cada placa foi calculado a partir da média mais duas vezes o desvio padrão das D.O.s de seis soros controles negativos.

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 utilizadas no programa STATELISA para o cálculo da concentração de subclasses de IgG anti-*P. falciparum*.

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

A técnica ELISA foi realizada conforme descrito anteriormente, sendo que após a incubação das amostras de soros em duplicata, a primeira lavagem de uma duplicata foi realizada 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 e multiplicada por 100.

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

## 6. Padronização do “Immunoblotting” para pesquisa de subclasses anti-*P. falciparum*

### 6.1. SDS-PAGE

Frações protéicas do extrato antigênico de *P.falciparum* foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), como descrito por LAEMMLI et al, 1970 em aparelho Mini-Protean II® (BIO RAD).

Em cada gel foi incluído um padrão de massa molecular pré-corado contendo proteínas recombinantes de 250, 160, 105, 75, 50, 35 e 30 kDa (Sigma Chemical Co.).

## 6.2. “Immunoblotting”

As frações antigênicas separadas por SDS-PAGE foram transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose (BioRad) por 18 horas, em aparelho Mini-Protean II® - BioRad, segundo técnica descrita por TOWBIN et al, 1979. As membranas foram cortadas em tiras de cerca de 4mm e bloqueadas com leite desnatado a 5% em PBS por 15 minutos. Após bloqueio, as tiras de nitrocelulose contendo as frações protéicas foram incubadas com os soros diluídos a 1/10, 1/20 e 1/50 para anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 e a 1/2 e 1/5 para anticorpos IgG4, em leite desnatado a 0,5% em PBS-Tw-L (PBS-Tween-Leite 0,5%) por 18 horas a 4°C, em seguida lavadas por 6 vezes de 5 minutos com PBS-Tw. As fitas foram então incubadas por duas hora com os conjugados anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 marcados com biotina e diluídos a 1/250 e 1/500 em PBS-Tw-L. Em seguida foi realizada nova incubação após lavagens das fitas com conjugado estreptavidina-peroxidase diluído a 1/250 e 1/500 também por duas horas. Após novo ciclo de lavagens, a reação foi revelada com solução cromógena de peróxido de hidrogênio e 4-cloro- $\alpha$ -naftol por 15 minutos ao abrigo da luz e interrompida pela lavagem das fitas com água destilada. As fitas foram secas na ausência de luminosidade sobre papel de filtro e analisadas conforme o perfil imunológico de reatividade das bandas.

### 6.2.1 Estudo da afinidade funcional ou avidéz dos anticorpos anti-*P. falciparum*

Para o estudo da avidéz de anticorpos no “immunoblotting”, as fitas foram incubadas em duplicata com as amostras de soro e após essa incubação, uma das tiras foi tratada com uréia 8M em PBS por 15 min e a outra apenas com PBS. O perfil de anticorpos contra as diferentes frações protéicas foi considerado de alta avidéz quando a reatividade permaneceu após o tratamento com uréia, de média avidéz quando a reatividade diminuiu após o tratamento com uréia e de baixa avidéz quando perdeu completamente a reatividade após o tratamento com uréia.

## **7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todas as análises estatísticas e dos dados descritivos foram realizadas com o Programa Sigma Stat (Jandel Scientific Co) e Prysma. Os resultados dos índices de reatividade e da concentração de anticorpos foram apresentados em medianas. A comparação entre os resultados obtidos em diferentes tempos foi feita pelo método de Friedman para análise de variância de dados pareados não paramétricos. As correlações foram feitas pelo método não paramétrico de Spearman. As comparações entre as frequências e proporções foram feitas pelo teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e teste de Fischer (para pequenas casuísticas). Todas as probabilidades dos testes foram feitas para um nível de significância de 95%.

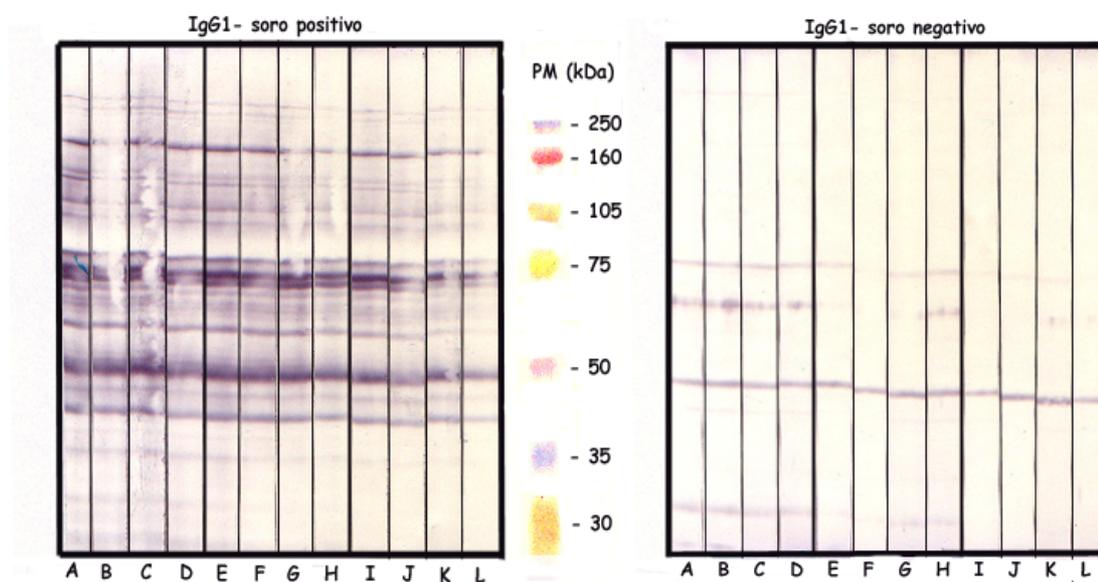
## RESULTADOS

---

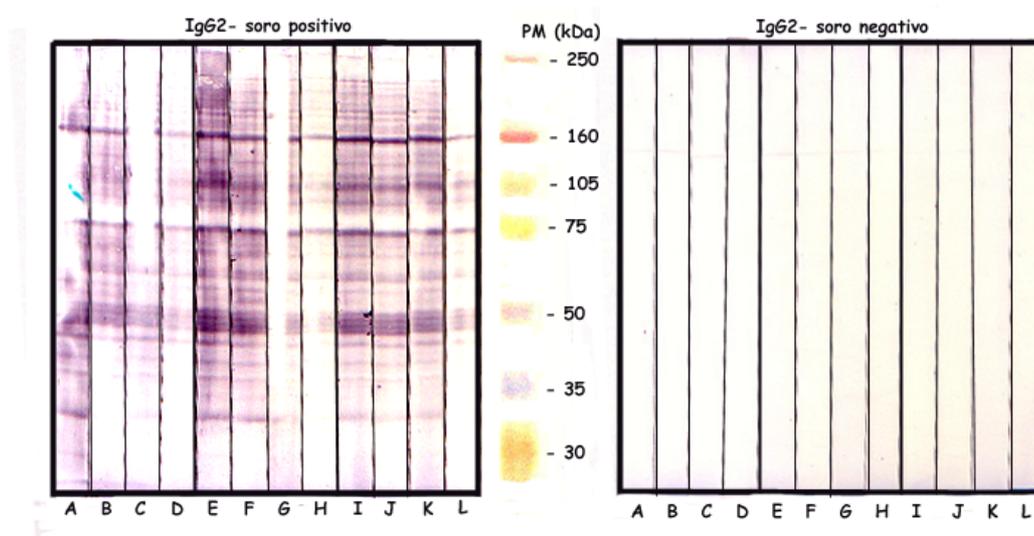
---

### **1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE “IMMUNOBLOTTING” PARA A PESQUISA DE DIFERENTES SUBCLASSES DE IMUNOGLOBULINAS ANTI-*P.falciparum***

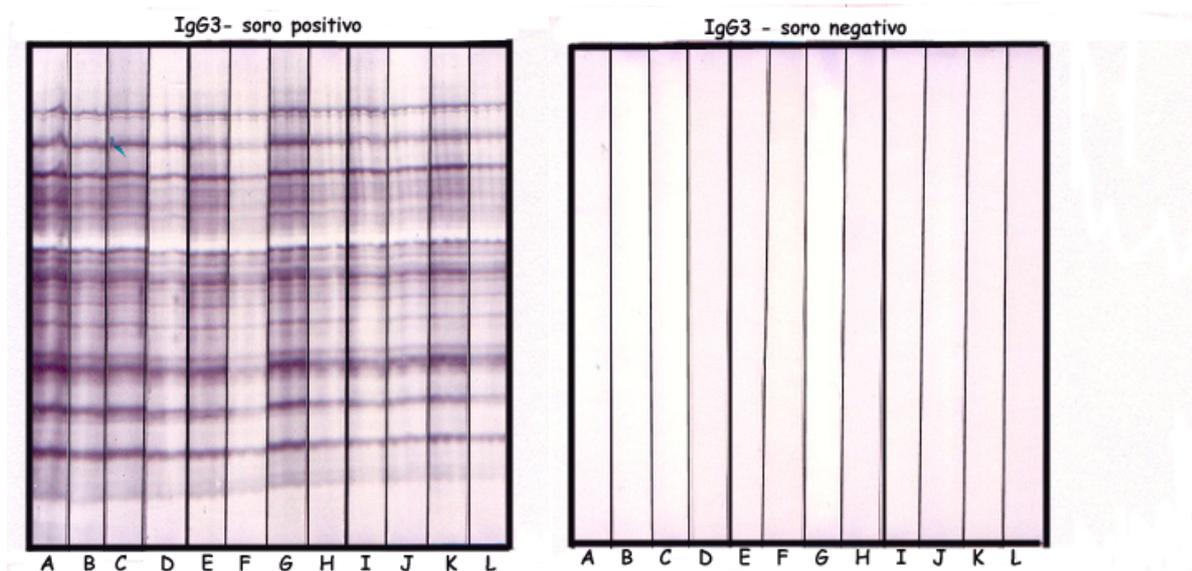
Foi padronizada a técnica de “Immunoblotting” para pesquisa de subclasses de IgG anti-*P.falciparum*. Pelos resultados apresentados nas figuras 5 a 8, escolhemos as diluições de 1/50 para anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 e de 1/2 para anticorpos IgG4; diluição de 1/500 para os conjugados anti-IgG1-Biotina, -IgG2-Biotina, -IgG3-Biotina, -IgG4-Biotina e de 1/300 para o conjugado estreptavidina-peroxidase.



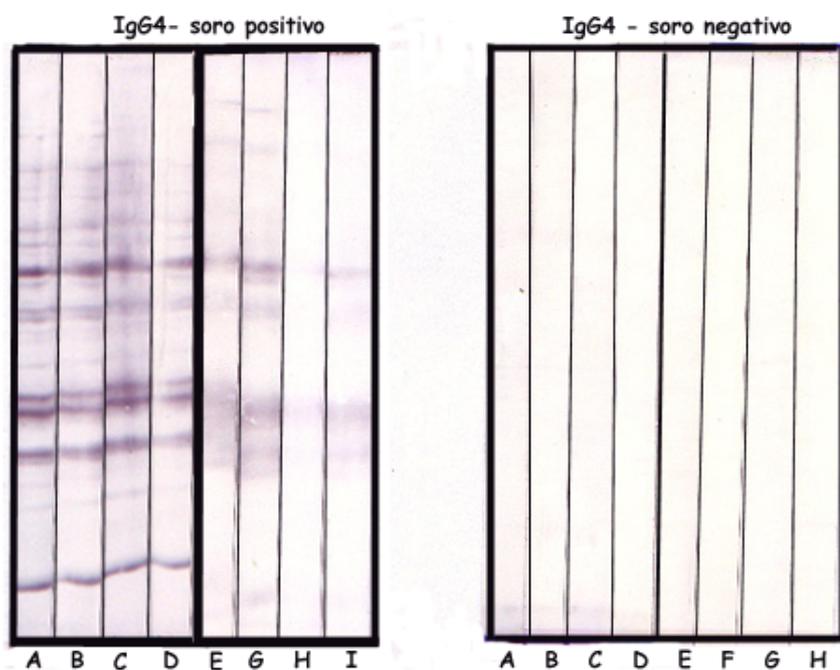
**Figura 5.** Reatividade de anticorpos IgG1 contra antígenos de formas eritrocitárias de *P.falciparum*. Diluições dos soros a 1/10 (A-D), 1/25 (E-H) e 1/50 (I-L); Diluições de conjugado marcado com biotina 1/250 (A-B, E-F, I-J) e 1/500 (C-D, G-H, K-L); Diluições do conjugado estreptavidina-peroxidase a 1/250 (A,C,E,G,I,K) e 1/500 (B,D,F,H,J,L).



**Figura 6.** Reatividade de anticorpos IgG2 contra antígenos de formas eritrocitárias de *P.falciparum*. Diluições dos soros a 1/10 (A-D), 1/25 (E-H) e 1/50 (I-L); Diluições de conjugado marcado com biotina 1/250 (A-B, E-F, I-J) e 1/500 (C-D, G-H, K-L); Diluições do conjugado estreptavidina-peroxidase a 1/250 (A,C,E,G,I,K) e 1/500 (B,D,F,H,J,L).



**Figura 7.** Reatividade de anticorpos IgG3 contra antígenos de formas eritrocitárias de *P.falciparum*. Diluições dos soros a 1/10 (A-D), 1/25 (E-H) e 1/50 (I-L); Diluições de conjugado marcado com biotina 1/250 (A-B, E-F, I-J) e 1/500 (C-D, G-H, K-L); Diluições do conjugado estreptavidina-peroxidase a 1/250 (A,C,E,G,I,K) e 1/500 (B,D,F,H,J,L).



**Figura 8.** Reatividade de anticorpos IgG4 contra antígenos de formas eritrocitárias de *P.falciparum*. Diluições dos soros a 1/2 (A-D), 1/5 (E-H); Diluições de conjugado marcado com biotina a 1/250 (A-B, E-F) e 1/500 (C-D, G-H); Diluições do conjugado estreptavidina-peroxidase a 1/250 (A,C,E,G) e 1/500 (B,D,F,H).

## 2. ELISA PARA DETECÇÃO DE DIFERENTES SUBCLASSES DE IgG ANTI-FORMAS ERITROCITÁRIAS DE *P.falciparum*

### 2.1. Subclasses de IgG

Foi investigada a evolução dos níveis e da avidéz das subclasses de IgG anti-*P.falciparum* por ELISA de 48 pacientes com malária *falciparum*, internados em hospital e sob tratamento com mefloquina em dose única. Foram testadas sete amostras de soro de cada paciente colhidas nos tempos 0, 48h, 7, 14, 28, 35 e 42 dias.

Na tabela 2 são apresentados os resultados do ELISA para a detecção de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-*P.falciparum* expressos em medianas dos IRs (índices de reatividade), IAs (índices de avidéz) e concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) e em freqüência de amostras reagentes para cada subclasse de IgG em cada tempo do acompanhamento. No gráfico da figura 9 apresentamos as curvas das medianas das concentrações de cada subclasse e dos respectivos IAs.

No tempo inicial (antes do tratamento), todos pacientes eram reagentes para IgG1 ( $Md=20,17\mu\text{g/ml}$ ) e continuaram reagentes durante o acompanhamento, com exceção de um paciente que se tornou não reagente no 28<sup>o</sup> dia. Os níveis iniciais de IgG1 aumentaram, alcançando um pico de resposta no 7<sup>o</sup> dia ( $Md= 35,57\mu\text{g/ml}$ ). Com relação ao Índice de Avidéz (IA), foi constatado que os IA-IgG1 nos tempos 0, 48 horas, 7, 28, 35 e 42 dias mantiveram-se praticamente nos mesmos patamares, somente aos 14 dias ocorreu uma diminuição nos IAs. Mas, nenhuma das diferenças observadas

entre concentrações, IRs e IAs nos diferentes tempos foi significativa ( $P>0,05$ ).

Para anticorpos IgG2, 39,45 % das amostras de soro foram reagentes no tempo inicial ( $Md= 3,80\mu\text{g/ml}$ ). O pico de resposta foi alcançado em 48h ( $Md= 6,99\mu\text{g/ml}$ ), sendo que os níveis permaneceram estáveis até o 28<sup>o</sup> dia, caindo a partir do 35<sup>o</sup> dia, apesar de não haver diferença significativa entre os níveis de anticorpos ( $P>0,05$ ). Os IAs-IgG2 estiveram entre 55% e 66% nos diferentes tempos ( $P>0,05$ ).

Para anticorpos IgG3, 80,59% das amostras de soro foram reagentes no tempo inicial ( $Md= 1,47\mu\text{g/ml}$ ). Maior produção ocorreu 48 horas após o início do tratamento ( $Md= 2,28\mu\text{g/ml}$ ), diminuindo a partir deste tempo. Os IAs-IgG3 não variaram muito, mas diminuíram a parti do 7<sup>o</sup> dia. Nenhuma das diferenças observadas entre concentrações e IAs nos diferentes tempos foram significantes ( $P>0,05$ ).

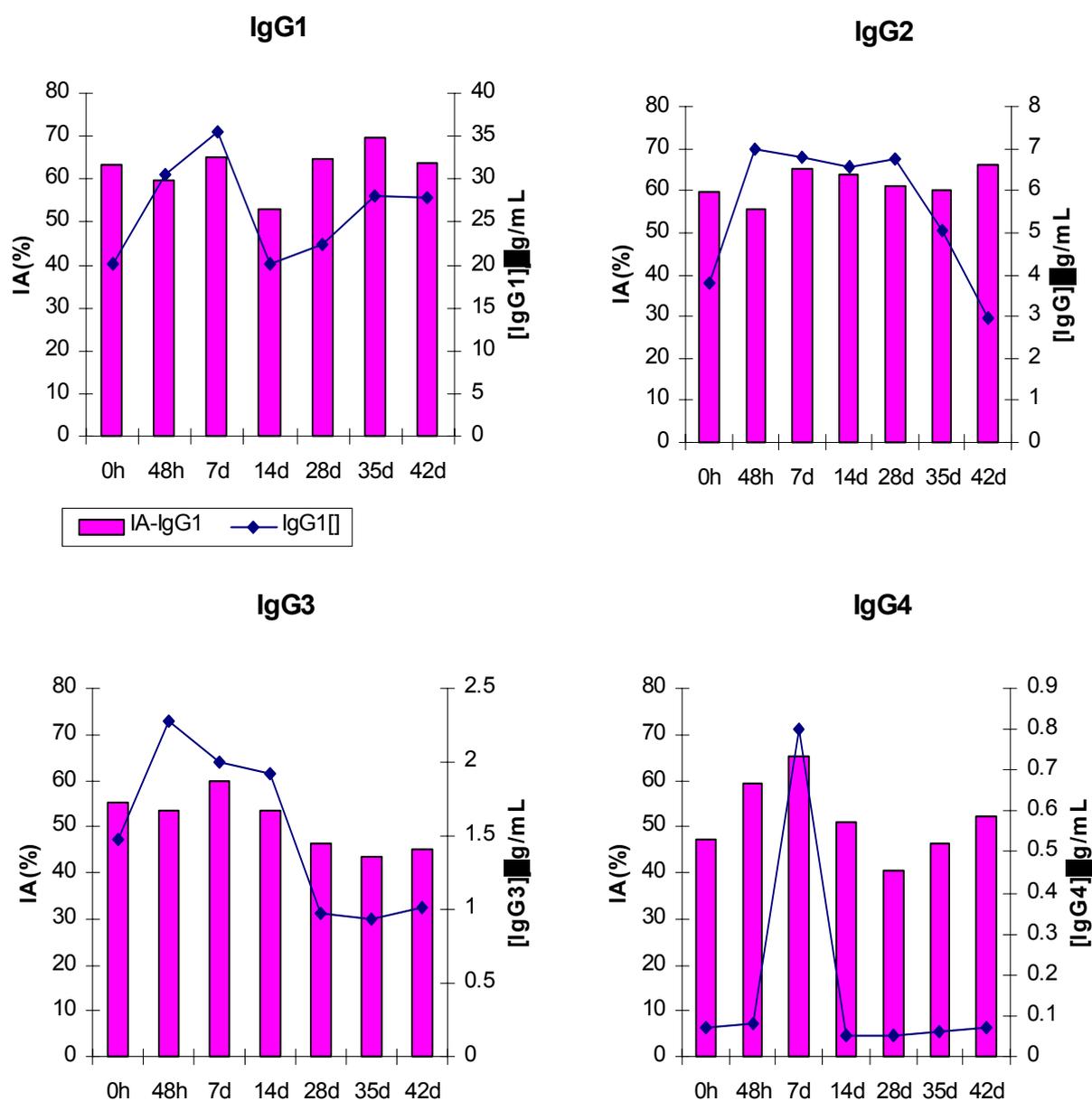
Em relação aos anticorpos IgG4, apenas 28,37% das amostras de soro foram reagentes no tempo inicial ( $m= 0,07\mu\text{g/ml}$ ). Muitas amostras não apresentaram concentrações detectáveis de IgG4, assim os resultados foram analisados em média e não em medianas como para as outras subclasses. O pico de resposta aconteceu no 7<sup>o</sup> dia com queda a partir do 14<sup>o</sup> dia do acompanhamento. Os IAs-IgG4 aumentaram gradativamente até o 7<sup>o</sup> dia e também diminuíram no a partir do 14<sup>o</sup> dia. Nenhuma das diferenças observadas foram significantes ( $P>0,05$ ).

**Tabela 2.** Resultados do ELISA para detecção das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum* durante o acompanhamento dos 48 pacientes tratados com mefloquina. IR\*= mediana dos índices de reatividade; IA= índice de avidéz.

Subclasse de IgG	Tempos de colheita da amostra de soro						
	0h	48h	7d	14d	28d	35d	42d
IR*	8,43	11,08	13,08	9,53	8,58	11,23	13,38
% pos	100,00	100,00	100,00	100,00	97,22	100,00	100,00
IgG1 [ ] µg/ml	20,17	30,52	35,57	20,14	22,44	27,99	27,72
IA	63,37	59,73	65,1	52,86	64,67	69,72	63,69
IR*	0,57	1,54	1,45	1,32	1,14	0,95	0,43
% pos	39,45	57,78	55	52,33	53,64	49,04	43,65
IgG2 [ ] µg/ml	3,80	6,99	6,80	6,56	6,75	5,04	2,97
IA	59,86	55,29	65,09	63,64	61,02	60,15	66,08
IR*	2,19	2,70	3,39	2,29	1,52	1,83	1,04
% pos	80,59	80,56	81,11	78,4	64,39	58,85	50,79
IgG3 [ ] µg/ml	1,47	2,28	2,00	1,92	0,97	0,93	1,01
IA	55,36	53,38	59,9	53,55	46,42	43,24	45,19
IR	0,305	0,44	0,59	0,39	0,28	0,33	0,14
IgG4 % pos	28,37	22,23	23,89	14,00	19,73	17,71	11,83
[ ] µg/ml	0,07	0,08	0,8	0,05	0,05	0,06	0,07
IA	47,11	59,46	65,3	51,15	40,26	46,34	52,12

IR= densidade óptica (DO) da amostra/ DO do "cut-off"

IA= (DO da amostra lavada com uréia/ DO da amostra lavada sem uréia) x 100



**Figura 9.** Curva das medianas das concentrações e dos Índices de Avidéz (IA) das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum* durante o acompanhamento por 42 dias de 48 pacientes com malária *falciparum* internados em hospital e sob tratamento com mefloquina. IA= (densidade óptica da amostra lavada com uréia/ DO da amostra lavada sem uréia)x100.

Na tabela 3 apresentamos as medianas dos níveis de anticorpos máximos e o dia em que estes foram alcançados para cada subclasse.

**Tabela 3.** Medianas das concentrações máximas das subclasses e dos índices de avidéz máximos de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum* e dos respectivos dias em que foram alcançados durante o acompanhamento por 42 dias de 48 pacientes com malária *falciparum* internados em hospital e sob tratamento com mefloquina. IA= (densidade óptica da amostra lavada com PBS/ DO da amostra lavada sem uréia)x100.

	Subclasse de anticorpos IgG			
	[ ] máxima		IA máxima	
	(µg/ml)	dia	%	dia
IgG1	42,24	7	85,49	7
IgG2	9,42	7	71,96	14
IgG3	2,94	7	78,24	7
IgG4	0,195	7	64,29	2

## 2.2. Associações entre os níveis de anticorpos e a exposição prévia à malária

Avaliamos as possíveis correlações entre os resultados das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e as variáveis preditoras de exposição à malária: tempo de permanência em área endêmica de malária (em anos); a idade (em anos); o número de episódios de malária por *P.falciparum* nos dois anos anteriores à admissão ao estudo, e o tamanho do baço medido no exame

físico de admissão (em cm) (resultados das correlações apresentados no Anexo I).

Os resultados das subclasses usados para estabelecer as correlações foram: a concentração inicial de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2, IgG3, IgG4; o maior nível de anticorpos atingidos durante o período de acompanhamento (IgG1max, IgG2max, IgG3max e IgG4max) e o dia em que este nível foi alcançado (DiaG1max, DiaG2max, DiaG3max, DiaG4max).

Para IgG1, IgG2 e IgG4 não houve correlação significativa ( $p > 0,05$ ) para nenhuma das variáveis estudadas em relação a concentração inicial dos anticorpos IgG1, o maior nível dos anticorpos atingidos durante o período de acompanhamento e o dia em que este nível foi alcançado.

Para IgG3 houve uma tendência de correlação positiva entre o tempo de permanência na área endêmica e os níveis iniciais de IgG3 ( $P = 0,067$ ), sendo que as outras variáveis não apresentaram significância estatística ( $p > 0,05$ ).

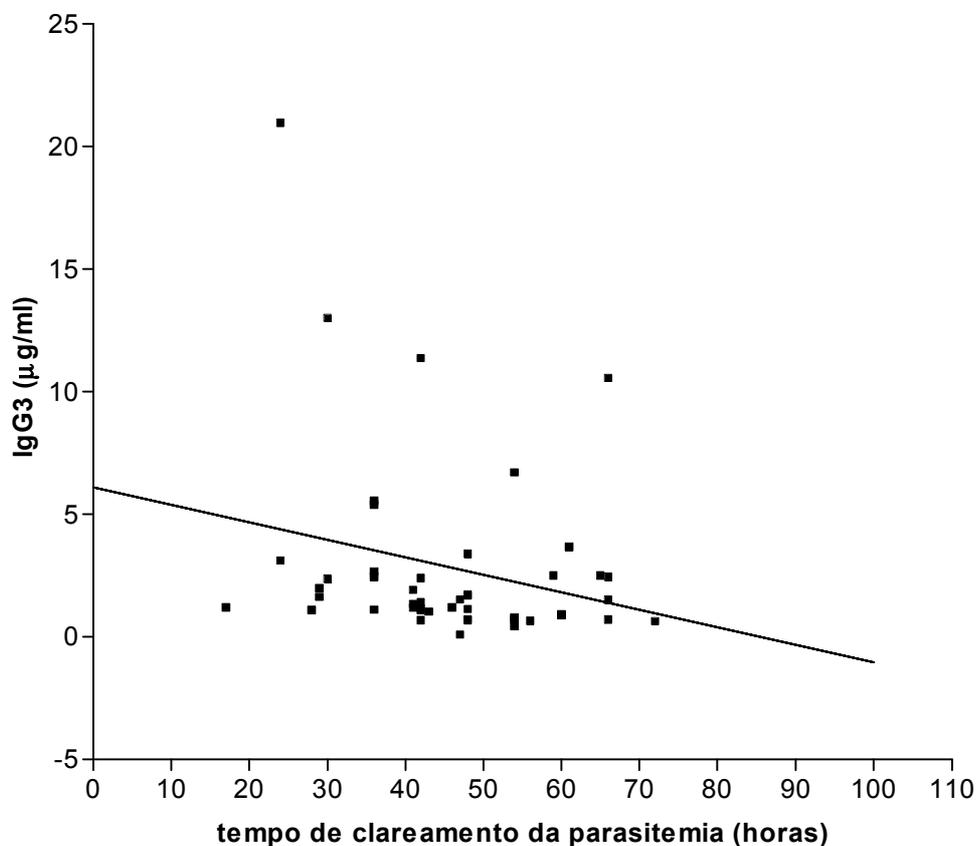
### **2.3. Associações entre os níveis de anticorpos e a resposta ao tratamento**

Avaliamos também as correlações entre os resultados das subclasses e as variáveis de resposta individual à malária, como: tempo com sintomas no momento da admissão (em dias) e a parasitemia inicial (número de formas assexuadas por  $\text{mm}^3$  de sangue) e as variáveis de resposta ao tratamento: tempo de clareamento parasitário (em horas) e o tempo de

clareamento de febre (em horas) (resultados das correlações apresentados no Anexo II).

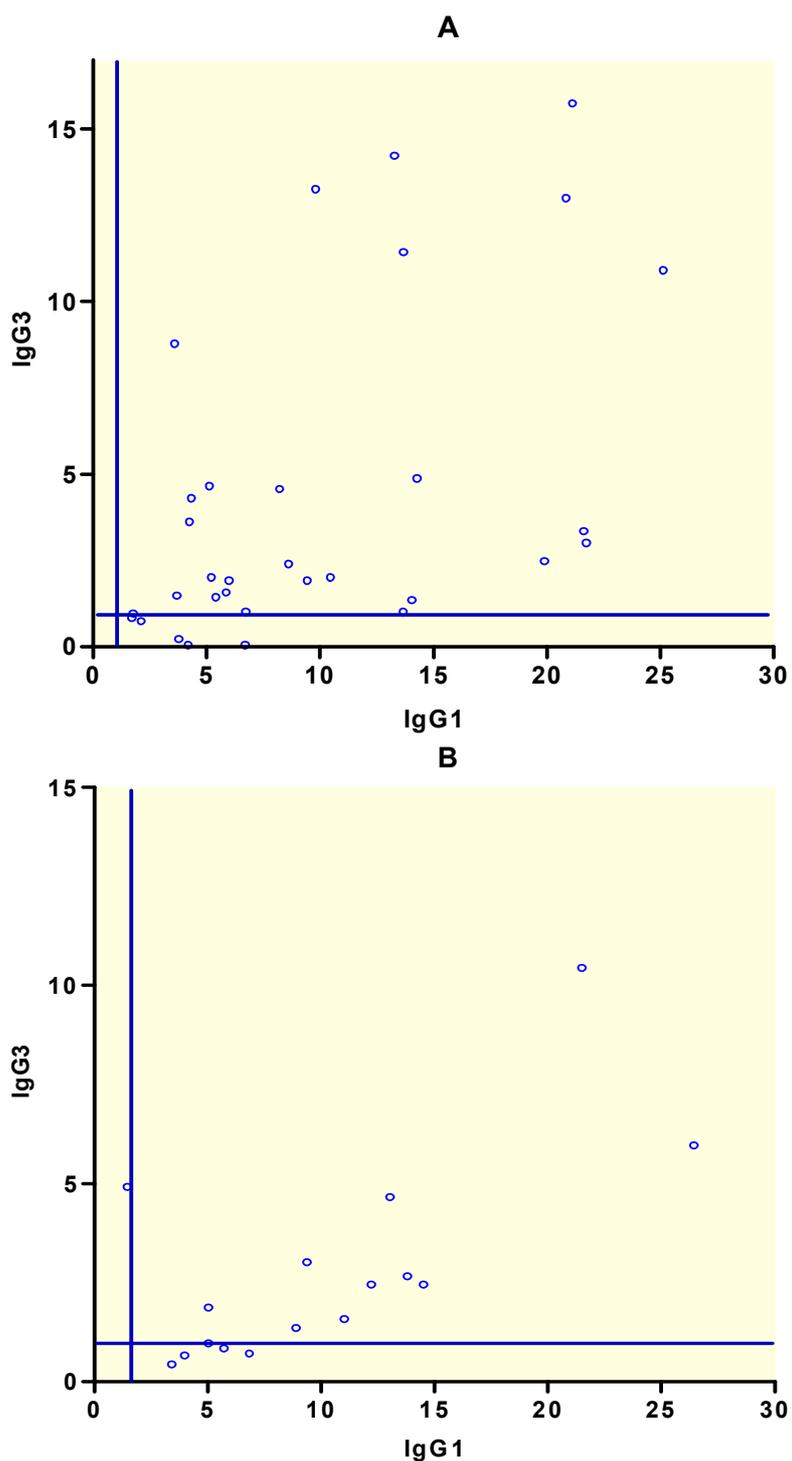
Não houve nenhuma correlação entre as variáveis de resposta à infecção malárica e ao tratamento com mefloquina e os níveis de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG4, os maiores níveis desses anticorpos atingidos durante o período de acompanhamento (IgG-max) e os dias em que estes níveis foram alcançados (DiaG-max) ( $P > 0,05$ ). Apenas observamos uma tendência de correlação negativa entre a parasitemia inicial das formas assexuadas de *P. falciparum* e os níveis iniciais de IgG1 ( $P = 0,079$ ).

Analisando os níveis iniciais de IgG3 e o tempo de clareamento parasitário, observamos uma correlação negativa significativa ( $P = 0,045$ ) (figura 10), sendo que com as outras variáveis não houve correlação entre a concentração inicial de anticorpos IgG3, o maior nível de anticorpos IgG3 atingido durante o período de acompanhamento e o dia em que este nível foi alcançado ( $P > 0,05$ ) (Tabela 10).

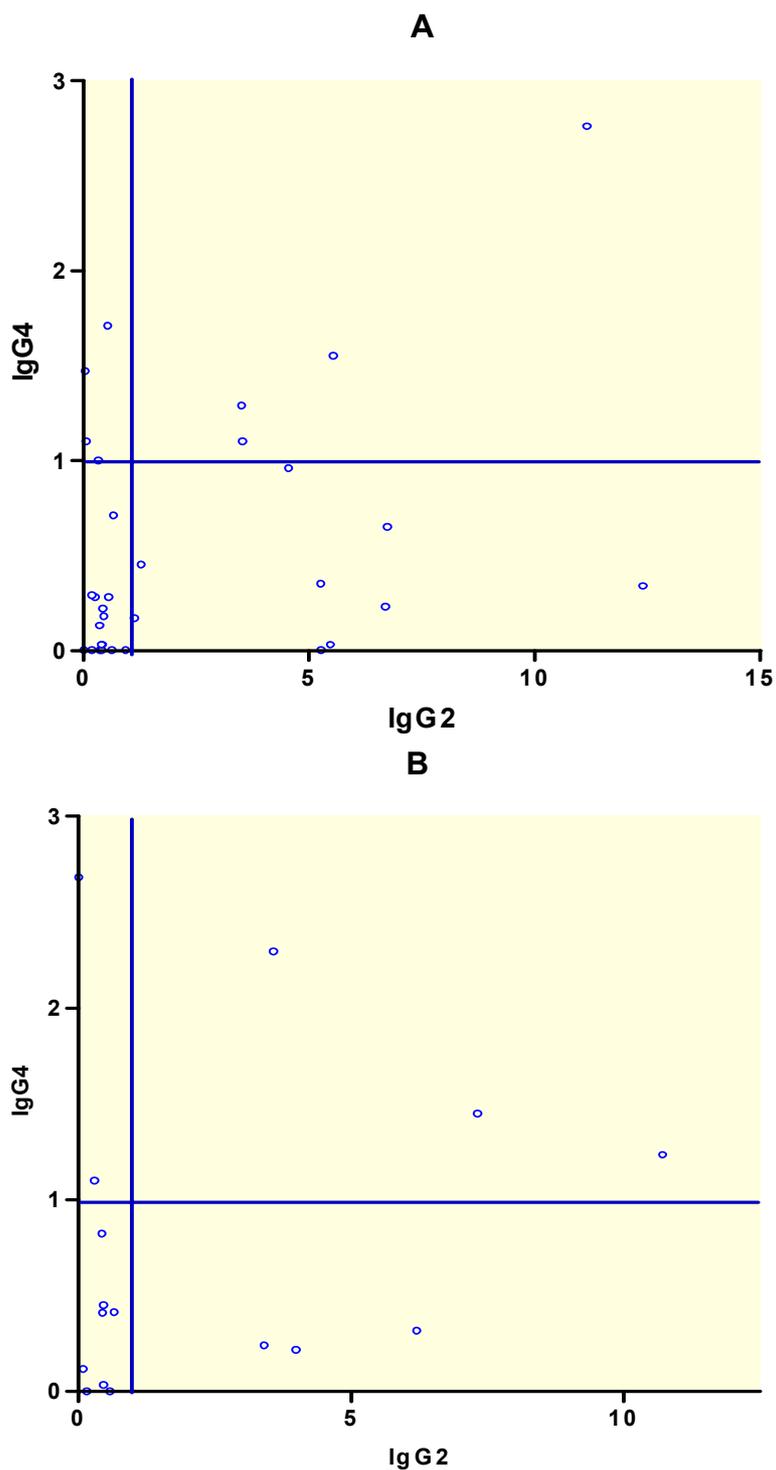


**Figura. 10.** Correlação entre a concentração inicial de anticorpos IgG3 anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum* e o tempo de clareamento da parasitemia (em horas) ( $r = -0,29$ ;  $P = 0,04$ ).

Analizamos a concordância entre os resultados dos anticorpos IgG1 e IgG3 e IgG2 e IgG4 em dois grupos de pacientes: aqueles que apresentaram um tempo de clareamento parasitário (TCP) menor ou igual a 48h e os que apresentaram TCP maior que 48h (figuras 11 e 12).



**Figura. 11.** Concordância entre anticorpos IgG1 e IgG3 anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum* determinados em amostras de soro de pacientes com malária *falciparum* que tiveram tempo de clareamento da parasitemia menor que 48h (A) e maior que 48h (B). Os resultados são expressos como índices de reatividade, que é a taxa da D.O. amostra/ D.O. cut-off. As linhas azuis representam, os valores dos limiar de reatividade considerados.



**Figura 12.** Concordância entre anticorpos IgG2 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P.falciparum* determinados em amostras de soro de pacientes com malária *falciparum* que tiveram tempo de clareamento da parasitemia menor que 48h (A) e maior que 48h (B) Os resultados são expressos como índices de reatividade, que é a taxa da D.O. amostra/ D.O. cut-off. As linhas azuis representam, os valores dos limiar de reatividade considerados.

Nos gráficos das figuras 11 e 12, podemos observar que os resultados IgG1+/IgG3+ e IgG2+/IgG4- foram mais freqüentes nos pacientes com TCP $\leq$ 48h (81,3% e 28,8%, respectivamente) do que nos pacientes com TCP $>$ 48h (68,8% e 18,8%, respectivamente). Enquanto os resultados IgG2+/IgG4+ e IgG4+ foram mais freqüentes nos pacientes com TCP $>$ 48h (18,8% e 31,3%, respectivamente) do que nos pacientes com TCP $\leq$ 48h (12,5% e 25,0%, respectivamente).

A relação entre a soma dos níveis das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 pelos níveis de IgG4 apresentou uma correlação negativa próxima a significativa com os níveis de parasitemia inicial ( $r = -0,27$ ;  $P = 0,05$ ).

### **3. IMMUNOBLOTTING PARA DETECÇÃO DE DIFERENTES SUBCLASSES DE ANTICORPOS ANTI- FORMAS ERITROCITÁRIAS DE *P.falciparum***

Foi também investigada a evolução dos níveis e da avidéz das subclasses de IgG anti-*P.falciparum* por *Immunoblotting* de 14 pacientes com malária *falciparum*, internados em hospital e sob tratamento com mefloquina em dose única. Foram testadas cinco amostras de soro de cada paciente colhidas nos tempos 0, 48h, 7, 21 e 42 dias.

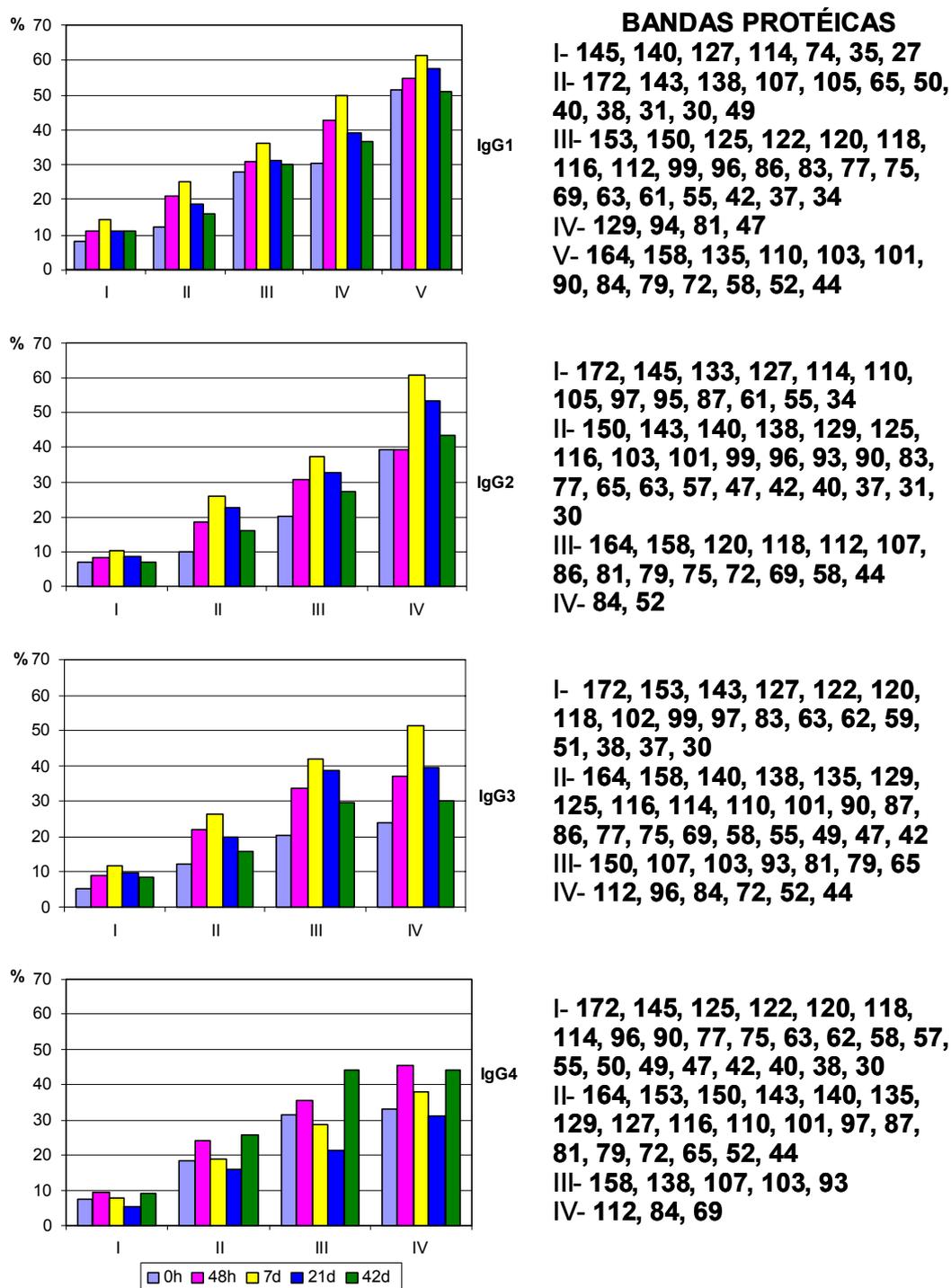
Foram reconhecidas 70 bandas protéicas por todas as subclasses de IgG. O número de bandas protéicas reconhecidas pelas subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 dos pacientes estudados foi de 67, 61, 60 e 53 respectivamente. Como o número de bandas foi muito grande, excluimos

das análises as bandas protéicas reconhecidas por 10% ou menos dos pacientes em todos os dias do acompanhamento. Os resultados de cada paciente contra cada banda protéica nos cinco tempos estudados, considerando o grau de reatividade (alto ou baixo) e o grau de avidéz (alta, média ou baixa) das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 são apresentados nos anexos III, IV, V e VI, respectivamente.

Observamos que em geral, as freqüências de reconhecimento das bandas protéicas pelas diferentes subclasses de IgG dos 14 pacientes nos dias do acompanhamento poderiam ser agrupadas em cinco padrões:

- I. freqüência de reconhecimento abaixo de 15% em todos dias do acompanhamento
- II. freqüência de reconhecimento abaixo de 15% no tempo 0, aumentando em 48h e chegando a cerca de 35% no 7º dia, depois voltando a diminuir
- III. freqüência de reconhecimento entre 25 e 40% em todos dias do acompanhamento
- IV. freqüência de reconhecimento acima de 30% em todos tempos, com um pico de cerca de 50% no 7º dia
- V. freqüência de reconhecimento acima de 50% em todos tempos, com um pico de cerca de 60%no 7º dia

Nos gráficos da figura 13, apresentamos as freqüências médias de reconhecimento das bandas protéicas em cada grupo pelas diferentes subclasses de IgG anti-*P.falciparum*.



**Figura 13.** Frequência média de pacientes com resultados positivos de subclasses de IgG contra diferentes frações protéicas de formas eritrocitárias de *P. falciparum* divididas em grupos (I,II,III,IV e V) de acordo com o padrão de reconhecimento em cada tempo do acompanhamento.

Analisando os gráficos da figura 13, observamos que as freqüências de reconhecimento das bandas protéicas são bastante semelhantes entre IgG1, IgG2 e IgG3 para os grupos I, II, III e IV. No primeiro dia de tratamento as freqüências de reconhecimento são mais baixas em relação aos dias subsequentes (exceto para IgG2 no grupo IV em que no tempo inicial e no 2º dia de acompanhamento as freqüências de reconhecimento foram praticamente iguais), com as maiores freqüências de reconhecimento ocorrendo sempre no 7º dia do acompanhamento, e posterior declínio, e em geral no 42º dia ficando muito próximas do tempo inicial do acompanhamento. A única diferença observada foi a presença de bandas protéicas altamente reconhecidas por IgG1 (Grupo V) com freqüência de reconhecimento inicial maior que 50%, em todos dias do acompanhamento. Para IgG4 podemos observar que as maiores freqüências de reconhecimento ocorreram em dois tempos, 48h e 42º dia.

Na figura 14, apresentamos os mesmos resultados da figura 13, mas colocando por banda protéica e por subclasse de IgG nos diferentes padrões de freqüências de reconhecimento.

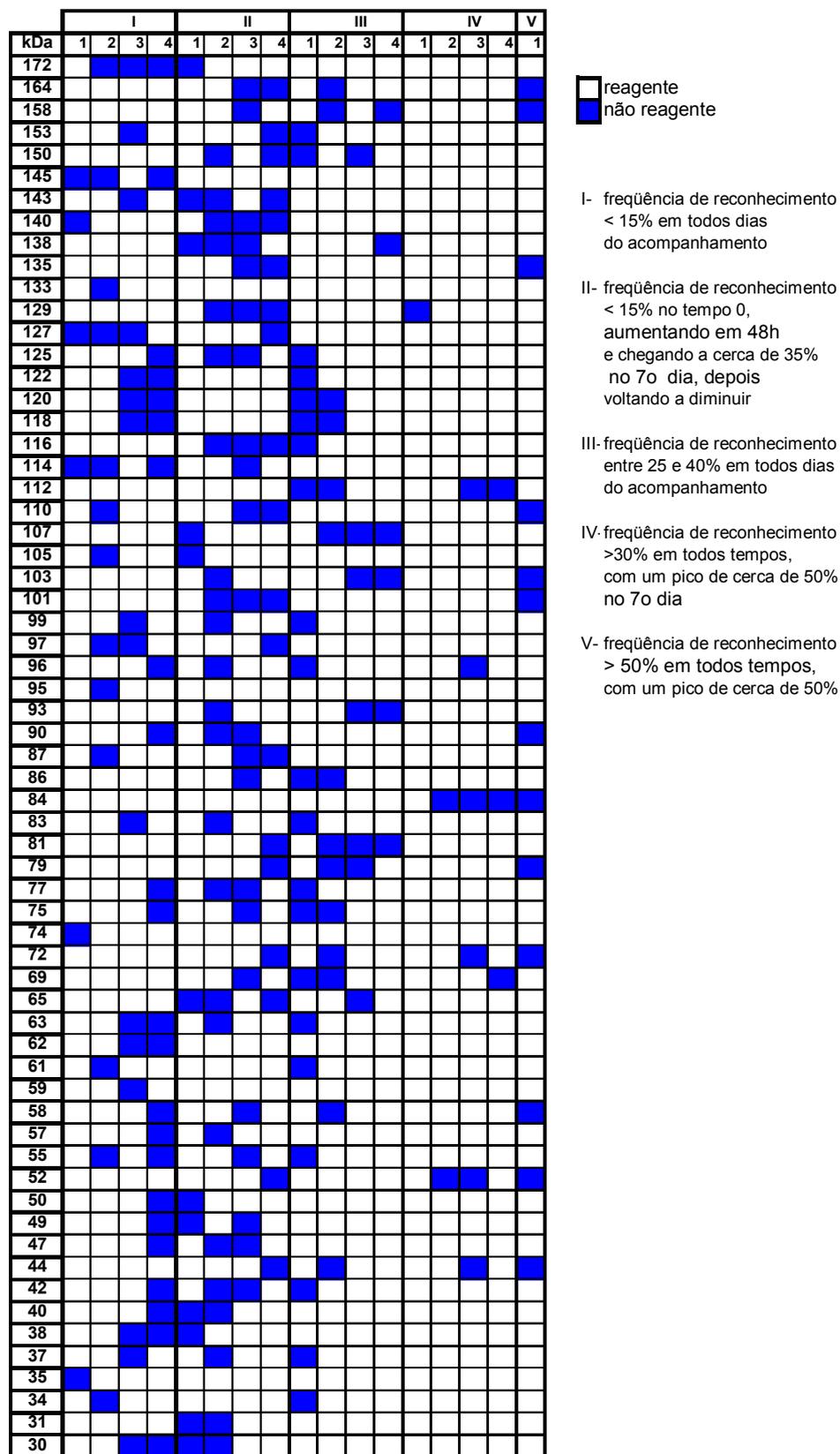
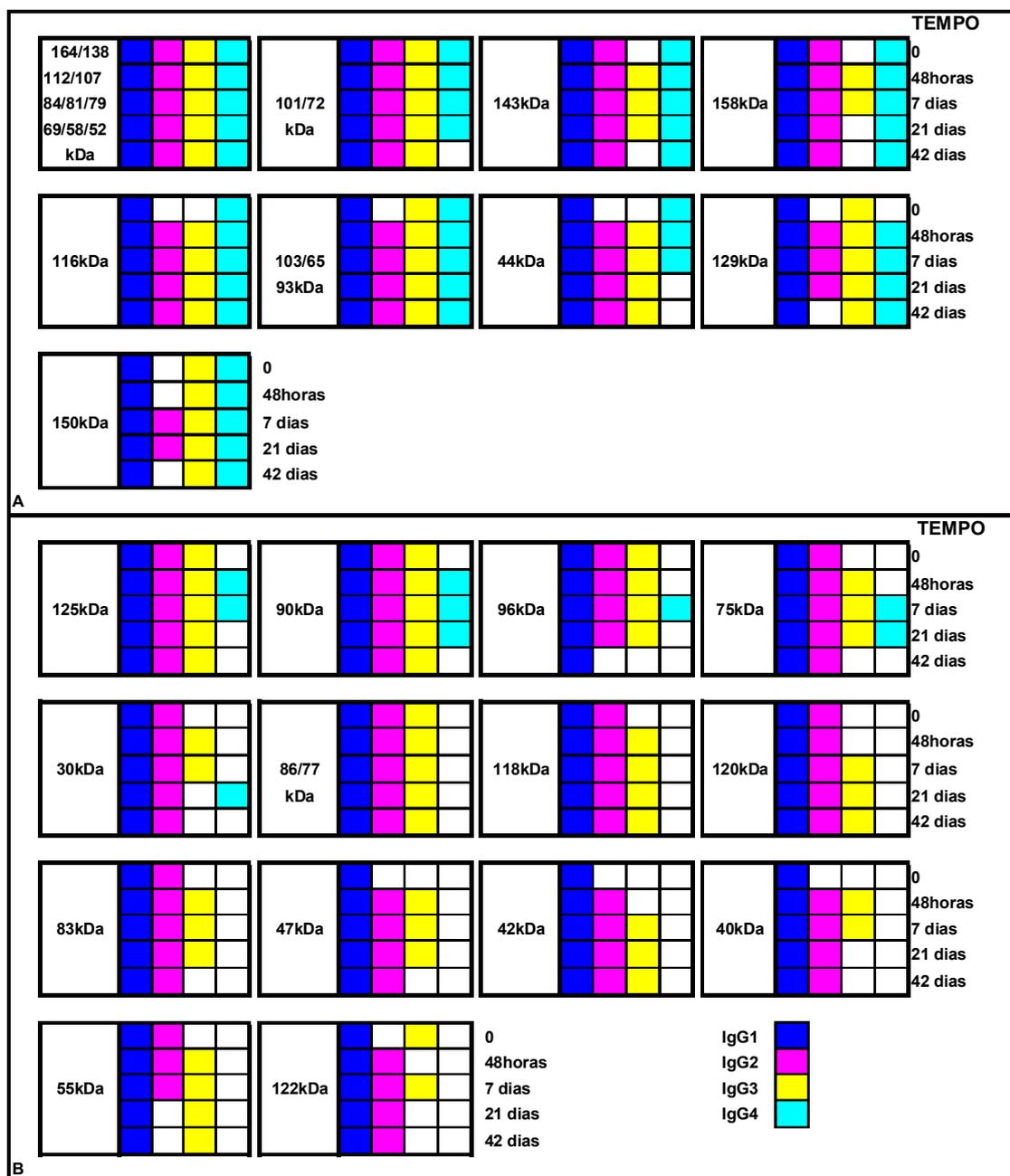
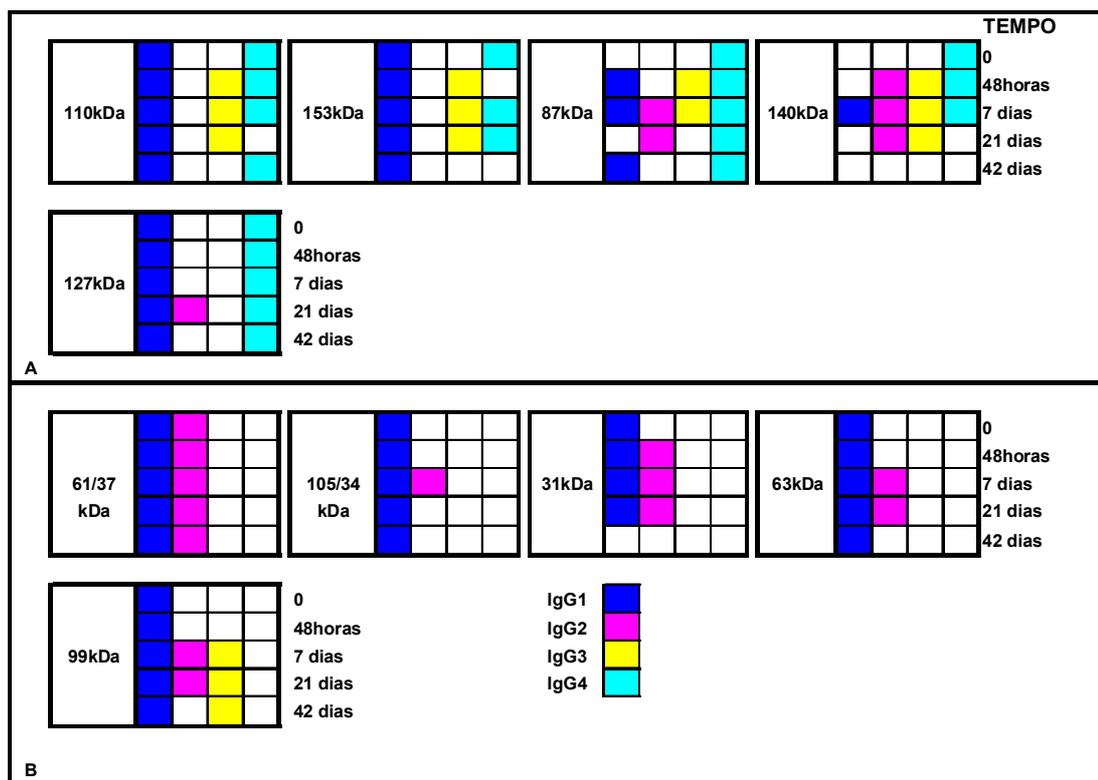


Figura 14. (Legenda no final do documento)

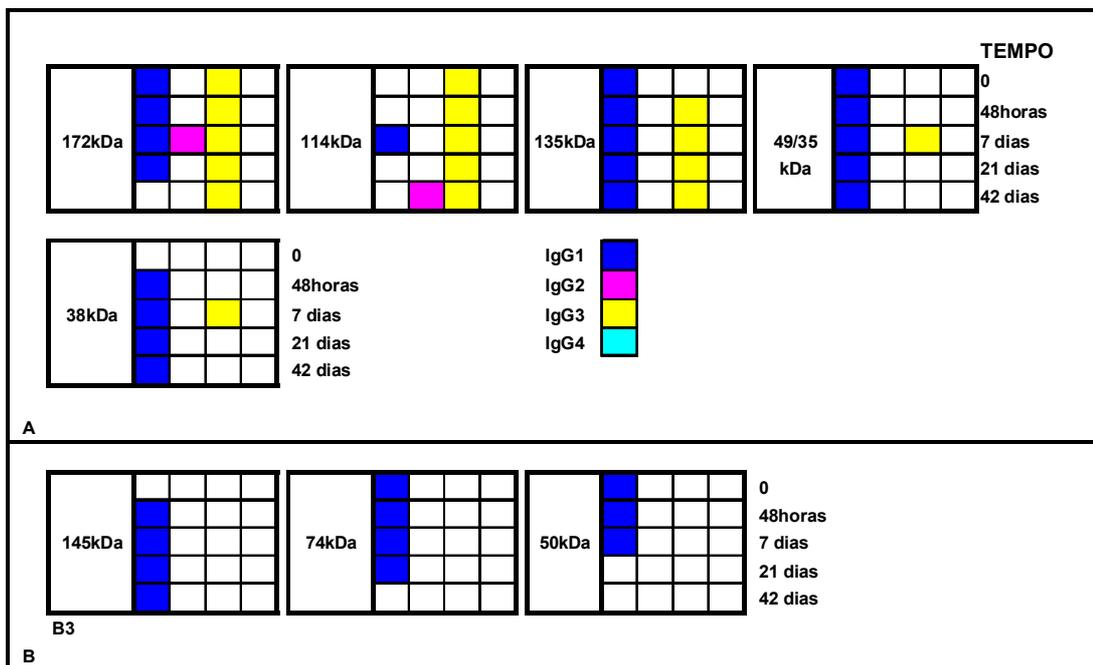
Nas figuras 15, 16 e 17 apresentamos os resultados das reatividades das subclasses contra as diferentes bandas protéicas em cada dia do acompanhamento.



**Figura 15.** Bandas protéicas com freqüência de reconhecimento acima de 10% pelas subclasses de IgG contra formas eritrocitárias de *P.falciparum* de pacientes com malária falciparum internados sob tratamento com mefloquina acompanhados por até 42 dias. Reconhecimento por todas subclasses de IgG (A) ou predominante por IgG1, IgG2 e IgG3 (B).



**Figura. 16.** Bandas protéicas com freqüência de reconhecimento acima de 10% pelas subclasses de IgG contra formas eritrocitárias de *P.falciparum* de pacientes com malária falciparum internados sob tratamento com mefloquina acompanhados por até 42 dias. Reconhecimento predominante por IgG4 e IgG1 (A) ou predominante por IgG1 e IgG2 (B).



**Figura 17.** Bandas protéicas com frequência de reconhecimento acima de 10% pelas subclasses de IgG contra formas eritrocitárias de *P.falciparum* de pacientes com malária falciparum internados sob tratamento com mefloquina acompanhados por até 42 dias. Reconhecimento predominante por IgG1 e IgG3 (A) ou apenas por IgG1 (B).

Nas figuras anteriores, observamos os seguintes padrões de reconhecimento:

- bandas protéicas reconhecidas por todas subclasses de IgG em pelo menos três dias do acompanhamento (fig.16-A): 164,138, 112, 107, 84, 81, 79, 69, 58, 52 kDa;
- bandas protéicas reconhecidas por IgG1, IgG2 e IgG3 em todos dias do acompanhamento e por IgG4 após 48h ou 7 dias do acompanhamento (fig. 16-B): 125,96,90,75, 30 kDa;

- bandas protéicas reconhecidas apenas por IgG1, IgG2 e IgG3 em pelo menos três dias do acompanhamento (fig. 16-B): 120, 83, 47, 42, 40, 55, 122 kDa;
- bandas protéicas reconhecidas predominantemente por IgG4 e IgG1 (fig. 17-A): 110, 153, 87, 140, 127 kDa;
- bandas protéicas reconhecidas predominantemente por IgG1 e IgG2 (fig. 17-B): 61,37,105, 34, 31, 63, 99kDa;
- bandas protéicas reconhecidas predominantemente por IgG1 e IgG3 (fig. 18-A): 172, 114, 135, 49, 35, 38 kDa;
- bandas protéicas reconhecidas apenas por IgG1 (fig. 18-B): 145, 74, 50 kDa.

Como as subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 têm sido relacionadas à proteção na malária e IgG4 relacionada com formas mais complicadas da doença, inclusive por resultados do nosso grupo (Leoratti, 2004) e também pelos nossos resultados da relação entre a soma dos níveis das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 pelos níveis de IgG4 terem apresentado uma tendência de correlação negativa com os níveis de parasitemia inicial, procuramos identificar as bandas imunodominantes que fossem reconhecidas por IgG1, IgG2 e IgG3 e não por IgG4 no tempo inicial (fig. 16-B), que foram: 125, 122, 120, 96, 90, 83, 77, 75, 55, 47, 42, 40 e 30 kDa.

Como os anticorpos IgG3 apresentaram correlação negativa com o tempo de clareamento da parasitemia (TCP), analisamos quais dessas bandas protéicas foram reconhecidas por IgG3 de pacientes com TCP menor ou igual a 48h, assim selecionamos as bandas 125, 96, 86, 75, 55 e 47 kDa.

Baseando-se nas figuras 13 a 17 e nos anexos III a V, as bandas selecionadas apresentam perfis de reconhecimento interessantes para serem estudadas como candidatas a alvos de vacinas, como:

- ▶ 125- banda protéica reconhecida por anticorpos IgG1 (grupo III, com baixa reatividade em geral de baixa e média avidéz), IgG2 (grupo II, com baixa reatividade de baixa avidéz) e IgG3 (grupo II, com baixa reatividade, baixa avidéz);
- ▶ 96- banda protéica reconhecida por anticorpos IgG1 (grupo III, com baixa reatividade, baixa avidéz), IgG2 (grupo II, com baixa reatividade, baixa avidéz), IgG3 (grupo IV, baixa reatividade e baixa avidéz);
- ▶ 86- banda reconhecida por anticorpos IgG1 (grupo III, baixa reatividade e baixa avidéz), IgG2 (grupo III, baixa reatividade e baixa avidéz) e IgG3 (grupo II, baixa reatividade e baixa avidéz) da maioria dos pacientes estudados independente do número de episódios anteriores de malária e não reconhecida por IgG4;
- ▶ 75- banda reconhecida por anticorpos IgG1 (grupo III, baixa reatividade, alta avidéz), IgG2 (grupo III, baixa reatividade, alta avidéz) e IgG3 (grupo II, baixa avidéz);
- ▶ 55 banda reconhecida por anticorpos IgG1 (grupo III, alta avidéz), IgG2 (grupo I, alta avidéz) e IgG3 (grupo II, média e alta avidéz);
- ▶ 47- banda reconhecida por anticorpos IgG1 (grupo IV, alta avidéz), IgG2 (grupo II, baixa avidéz) e IgG3 (grupo II, média e alta avidéz).

## DISCUSSÃO

---

A função de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra antígenos do estágio assexuado sangüíneo na malária falciparum tem despertado interesse nos pesquisadores há muitas décadas. Embora alguns estudos tenham mostrado que altos níveis desses anticorpos IgG sejam pobres preditores de proteção (BOUHAROUN-TAYON & DRUILHE, 1992), há um crescente interesse nas diferentes funções das subclasses de IgG na aquisição de imunidade na malária.

No estágio eritrocítico da infecção malárica a imunidade é mediada principalmente por anticorpos que cooperam com mecanismos de resposta celular, chamados de citofílicos, apesar de também participarem anticorpos neutralizantes ou não citofílicos. Alguns estudos demonstraram que o grau de imunidade em humanos se correlaciona com os níveis de anticorpos produzidos contra antígenos de parasitos do estágio eritrocítico e é dependente do isotipo do anticorpo (PIPER et al, 1999; ASTAGNEAU et al, 1995; CHIZZOLINI et al, 1988).

Nos últimos anos têm-se um número considerável de estudos das subclasses IgG específicas para antígenos de *P. falciparum* com o objetivo de determinar o papel protetor ou patogênico de cada subclasse em populações expostas. A grande maioria desses estudos foram feitos em áreas de transmissão estável da malária, onde é muito evidente o desenvolvimento de uma imunidade naturalmente adquirida. Já em regiões de transmissão instável da malária, como nas áreas endêmicas do Brasil,

esses estudos são mais raros, principalmente pela dificuldade de se definir populações imunes.

Um estudo recente do nosso grupo em áreas endêmicas do Brasil, Peixoto de Azevedo, MT e Manaus, AM, mostrou que anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 contra formas eritrocitárias de *P.falciparum* foram predominantes em indivíduos com malária não complicada e em indivíduos assintomáticos, enquanto anticorpos IgG4, IgE e IgM predominaram em indivíduos com complicações clínicas causadas pela malária. Estes resultados sugeriram que mesmo em regiões de transmissão instável pode-se observar um certo grau de imunidade naturalmente adquirida quando anticorpos apropriados são produzidos, mesmo com análise sendo feita com antígenos totais do parasito (LEORATTI, 2004).

Neste trabalho, nós estudamos pela primeira vez, a evolução das subclasses de IgG contra formas eritrocitárias de *P. falciparum* de pacientes com malária falciparum não complicada internados em hospital por até 42 dias, sob tratamento com mefloquina. As subclasses de IgG foram avaliadas pela técnica imunoenzimática ELISA quanto à quantidade, determinada em concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ), índices de reatividade (IR) ou em frequência (%) e quanto à avides dos anticorpos, determinada em índice de avides (IA). Também foram avaliadas quanto à especificidade e a avides de reconhecimento das diferentes bandas protéicas do antígeno de formas eritrocitárias de *P. falciparum* pela técnica de *Immunoblotting*.

A resposta humoral de anticorpos IgG, IgM e IgA contra antígenos de formas eritrocitárias de *P. falciparum* desses pacientes havia sido investigada em

estudo anterior do nosso grupo. Os resultados mostraram que os anticorpos IgG, IgM e IgA alcançam um pico de resposta no 7<sup>o</sup> dia do monitoramento. Também foi observado que os níveis iniciais de IgG e IgM se correlacionaram com algumas variáveis de exposição prévia a malária. As correlações positivas foram entre IgG e o tamanho do baço e entre IgM e idade, tempo de permanência na área endêmica e tamanho do baço dos pacientes. Os resultados sugeriram que o nível de anticorpos específicos apresentado no momento da admissão podia refletir a experiência prévia desta população em relação à malária podendo ser indicador de infecção. Também foi observado que níveis máximos de IgG e IgM foram atingidos durante a fase aguda da doença, em média depois de 10 dias do início do tratamento, além da tendência dos anticorpos retornarem a níveis pré tratamento no final do período estudado. Outras observações feitas foram que os níveis iniciais de anticorpos IgG e o nível máximo atingido por anticorpos IgM apresentaram correlação inversa significativa com o tempo de clareamento parasitário (TCP), e essa correlação foi independente da idade e da parasitemia inicial. Estes resultados sugeriram que os anticorpos IgG e IgM podem desempenhar algum grau de proteção à infecção malárica (DURLACHER, 1998).

Para a determinação da quantidade e da avidéz das subclasses de IgG no ELISA, sete amostras de soro de 48 pacientes (total= 290) colhidas nos tempos 0h, 48h, 7, 14, 28, 35 e 42 dias, foram analisadas utilizando-se metodologia padronizada por LEORATTI, 2004. Os pacientes selecionados

havam relatado em média cinco malárias prévias, residiam há nove anos na área endêmica e apresentaram um TCP em torno de 50,3 horas.

Todos os pacientes apresentavam altos níveis de anticorpos IgG já no início do tratamento, comprovando a alta exposição prévia relatada pelos mesmos (dados não mostrados). Os anticorpos IgG1 também estavam presentes em altas concentrações ( $Md= 20,17 \mu\text{g/mL}$ ) em todos os pacientes no início do tratamento, provavelmente por IgG1 ser a subclasse predominante no *pool* de anticorpos. Os níveis de IgG1 aumentaram gradativamente, alcançando um pico no 7º dia, mas sem diferenças significantes.

Quase 40% dos pacientes apresentavam anticorpos IgG2 no início do tratamento, com mediana de concentração de  $3,80\mu\text{g/ml}$ . O pico de resposta de IgG2 foi alcançado em 48h, tanto em concentração ( $Md= 6,99\mu\text{g/ml}$ ) como na frequência de positivos (57,8%).

Uma maior frequência de pacientes com anticorpos IgG3 (80,6%) foi observada no tempo inicial, com mediana de concentração de  $1,47\mu\text{g/ml}$ . A maior concentração de IgG3 foi observada 48 horas após o início do tratamento ( $Md= 2,28\mu\text{g/ml}$ ), mas também sem diferenças significantes entre os diferentes tempos.

Apenas 28,4% dos pacientes apresentavam anticorpos IgG4 no tempo inicial, sendo essa, a maior frequência observada durante o acompanhamento. As concentrações médias de IgG4 estiveram entre 0,05 e  $0,08\mu\text{g/mL}$ , com exceção do 7º dia que aumentou para  $0,8\mu\text{g/mL}$ . Esse aumento na média de concentração no 7º dia foi devido a um paciente com

resposta muito alta, cujo resultado desviou a média para cima, já que os resultados de IgG4 foram analisados pela média e não mediana, pelo grande número de amostras com resultados negativos.

Ao analisarmos as medianas dos dias em que ocorreram as concentrações máximas para cada subclasse de IgG, observamos que para todas subclasses foi o dia máximo foi o 7<sup>o</sup> dia e o dia máximo para os IA de IgG1 e IgG3 foi o 7<sup>o</sup> dia, para IA de IgG2 foi o 14<sup>o</sup> dia e para IA de IgG4 foi o 2<sup>o</sup> dia (Tabela 3).

As associações entre os níveis das subclasses de IgG com as diferentes variáveis preditoras de exposição prévia à malária ou de resposta ao tratamento, mostraram apenas correlação negativa significativa entre o clareamento parasitário e os níveis iniciais de IgG3 ( $P < 0,05$ ) e uma tendência de correlação positiva desses níveis e o tempo de permanência na área endêmica.

Uma vez que as diferentes classes e subclasses de anticorpos podem reagir com os mesmos epítomos e aparentemente afetam o curso da infecção de formas diferentes, estabelecemos interações entre os anticorpos calculando razões entre os seus níveis, como um modo apropriado para estimar a atividade de anticorpos. LEORATTI (2004) observou que as interações dos anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 predominaram nos indivíduos assintomáticos e com malária não complicada, enquanto que na malária complicada predominaram as interações entre IgG4 e IgE. Neste mesmo estudo foi sugerido que as relações entre os anticorpos IgG/IgE, IgG1-IgG2-IgG3/IgG4, IgG4-IgE/IgG2 poderiam refletir o equilíbrio entre a

patogenicidade e a proteção. Como no nosso estudo foram estudados apenas pacientes com malária não complicada, portanto com controle da doença, não conseguimos estabelecer correlações significantes quando essas interações foram associadas às variáveis preditoras de exposição prévia e as variáveis de resposta individual à malária. Apenas a relação entre a soma dos níveis das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 pelos níveis de IgG4 apresentou uma correlação negativa marginal com os níveis de parasitemia inicial ( $r = -0,27$ ;  $P = 0,05$ ).

Na análise das concordâncias, observamos que os resultados IgG1+/IgG3+ e IgG2+/IgG4- foram mais freqüentes em pacientes com  $TCP \leq 48h$  do que nos pacientes com  $TCP > 48h$ , enquanto os resultados IgG2+/IgG4+ e IgG4+ foram mais freqüentes nos pacientes com  $TCP > 48h$  do que nos pacientes com  $TCP \leq 48h$ . Estes resultados sugerem que mesmo em um grupo relativamente homogêneo quanto ao controle da doença, uma melhor resposta ao tratamento avaliada pelo menor tempo de clareamento parasitário foi associada à presença de anticorpos citofílicos, como IgG1, IgG2 e IgG3.

A resposta predominante das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 observada nestes pacientes, todos com malária não complicada, pode mais uma vez indicar que esses anticorpos estão cooperando para o controle de formas graves da doença e refletirem um certo grau de desenvolvimento de imunidade adquirida.

Além dos anticorpos IgG1 e IgG3, naturalmente considerados citofílicos por serem capazes de se ligar a receptores  $Fc\gamma$  e participarem de

mecanismos imunes efetores como opsonização, fagocitose e ADCC, também IgG2 em determinadas situações pode agir como citofílico. Isto se deve a existência em determinadas populações de um polimorfismo no gene que codifica para o receptor FcγRIIa (polimorfismo H131), um receptor envolvido na ativação da produção de TNF- $\alpha$  e conseqüente morte do parasito. O polimorfismo H131 que é uma mudança de arginina (R) para histidina (H) na posição 131, permite a ligação da fração F<sub>c</sub> de IgG2 ao receptor conferindo assim capacidade citofílica aos anticorpos IgG2 (WARMERDAM *et al*, 1991).

Essa possibilidade de IgG2 agir também como anticorpo citofílico justifica a associação entre altos níveis de IgG2 e baixo risco de se adquirir infecção por *P. falciparum* observada em alguns estudos em áreas endêmicas de malária (DELORON *et al*, 1995; AUCAN *et al*, 2000). Resultados anteriores do nosso grupo mostraram a ocorrência do polimorfismo H131 em 70% de indivíduos de Peixoto de Azevedo, MT, incluindo os pacientes do nosso estudo. E como já citado, nestes indivíduos os anticorpos IgG2 foram associados com formas não complicadas e assintomáticas da malária, sendo que tanto a freqüência de positivos como os níveis dos anticorpos IgG2 foram significativamente maiores nos indivíduos assintomáticos (76,9%) do que nos sintomáticos (39,1%) e entre os indivíduos que carregavam o polimorfismo H131 os níveis de IgG2 foram ainda mais altos nos assintomáticos (78,7 $\mu$ g/mL) dos que nos sintomáticos (3,35  $\mu$ g/mL) (LEORATTI, 2004). Assim, nossos resultados mostrando uma freqüência de positividade considerável para anticorpos IgG2 ao longo do

monitoramento de pacientes com malária não complicada corroboram com o papel protetor de IgG2.

Estímulos antigênicos naturais induzem primeiro a produção de anticorpos IgG1 ou IgG3 pelas células B e estímulos subseqüentes induzem a produção de anticorpos IgG2 e por último anticorpos IgG4, sugerindo que a expressão de isotipo reflete a ativação seqüencial de células B específicas por meio de estimulações antigênicas repetidas (WAHLGREN et al, 1986). DUBOIS et al (1993) encontrou proporções bem semelhantes as nossas para as quatro subclasses de IgG e se baseou no que havia sido postulado por WAHLGREN (1986) para justificar seus resultados.

A baixa freqüência de positividade para IgG4 pode ser explicada pelo fato desse isotipo estar associado à ausência de proteção e às formas complicadas da doença, que não estiveram presentes em nenhum dos pacientes estudados (LEORATTI, 2004). A associação de anticorpos IgG4 específicos na malária com ausência ou baixa proteção também foi observada por outros autores (ARIBOT et al, 1996; AUCAN, 2000). GROUX e GYSIN (1990) observaram que IgG4 inibe *in vitro* a ação de anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3, responsáveis por mediar a opsonização de eritrócitos infectados. 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 mais baixos, sugerindo que IgG4 poderia estar neutralizando a citotoxicidade celular mediada por monócitos ou outras células efectoras dependentes de IgG2. Portanto, IgG4 teria um papel bloqueador da ação protetora de IgG2 nos indivíduos que apresentam o polimorfismo H131.

FERREIRA et al (1996), encontraram um predomínio de anticorpos IgG1 e IgG3 contra formas eritrocitárias de *P. falciparum* durante a fase aguda da infecção tanto de africanos clinicamente imunes quanto de brasileiros residentes na região amazônica considerados semi-imunes, mas durante a fase de convalescença, observaram uma diminuição dos níveis desses anticorpos nos brasileiros, principalmente para IgG3. Já os níveis das subclasses IgG2 e IgG4 foram baixos em geral.

Resultados semelhantes foram obtidos por TAYLOR et al (1998), uma vez que observaram um predomínio de anticorpos IgG3 contra MSP-2 em adolescentes e adultos protegidos do oeste da África (Gâmbia). Outros trabalhos em áreas de transmissão estável de malária também observaram um predomínio de anticorpos IgG1 e IgG3 nos indivíduos considerados protegidos, associando-os portanto com proteção na malária, enquanto anticorpos IgG4 predominaram em indivíduos não protegidos, sendo assim não protetores e/ou bloqueadores dos anticorpos protetores (BOUHAROUN-TAYOUN & DRUILHE, 1992; DUBOIS et al, 1993; RZEPCZYK et al, 1997; TANGTEERAWATANA et al, 2001).

Um outro aspecto da resposta imune humoral quase não explorado na malária é a medida da força da ligação entre o antígeno e os anticorpos, ou seja, a avidéz ou afinidade funcional dos anticorpos naturalmente adquiridos e que pode trazer informações quanto a qualidade desses anticorpos.

A força da interação primária entre um antígeno único e um anticorpo monovalente é resultado de forças atrativas e repulsivas existentes entre as moléculas, e é conhecida como afinidade de anticorpo ou afinidade

intrínseca. Esta é uma medida termodinâmica e é expressa pela constante de equilíbrio (K). Anticorpos de alta afinidade são aqueles que não dissociam do complexo antígeno-anticorpo facilmente, necessitando de uma quantidade relativamente alta de energia para se dissociarem. Interações secundárias e terciárias levam a maior coesão entre as moléculas e a força total das ligações é conhecida como avides ou afinidade funcional, o que também descreve a força de ligação de anticorpos policlonais contra estruturas antigênicas complexas avaliados por vários imunoensaios (JANEWAY – TRAVERS, 1994).

A avides pode ser um importante parâmetro qualitativo da resposta imune na malária, semelhante ao que já foi observado em outras patologias. Em algumas doenças infecciosas como na rubéola, citomegalovírus, herpesvírus, varice-zoster, a medida da avides é utilizada para fins diagnósticos (revisado em WOZNICOVA, 2004). Na toxoplasmose, a avides de anticorpos IgG permite diferenciar a fase aguda de infecção pregressa (CAMARGO, 1991).

Ao considerarmos que índices de avides acima de 30% no ELISA representam anticorpos de alta avides, podemos afirmar então que anticorpos de alta avides de todas subclasses de IgG predominaram em todos pacientes em todos tempos estudados, desde que as medianas dos IA foram sempre acima de 45%. Provavelmente o predomínio de anticorpos de alta avides mesmo na fase aguda da infecção seja resultante da ativação de células B de memória específicas para as diferentes proteínas presentes no antígeno somático de formas eritrocitárias de *P. falciparum*.

FERREIRA et al (1996) observaram anticorpos IgG anti-*P. falciparum* de alta avidéz, especialmente IgG1, em pacientes africanos clinicamente imunes. Já em pacientes da região amazônica observaram predomínio de anticorpos de baixa avidéz durante a fase aguda da infecção, o que poderia ser explicado pela ativação policlonal de células B, e um aumento significativo de anticorpos de alta avidéz dois meses após a quimioterapia. Os autores sugeriram que anticorpos de alta avidéz anti-*P. falciparum* seriam produzidos inicialmente durante o crescimento intra-eritrocítico do parasito, e que agiriam enquanto as parasitemias ainda fossem baixas, sendo portanto mais efetivos contra a severidade da doença. LEORATTI (2004) observou um predomínio de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 de alta avidéz e de baixa avidéz para anticorpos IgG4 entre indivíduos não infectados, porém o inverso foi observado entre os indivíduos infectados. LEORATTI (2004) postulou que nos indivíduos não infectados os anticorpos de alta avidéz poderia estar controlando a reinfecção e desempenhando um papel protetor eficaz contra o parasito. Enquanto que nos indivíduos infectados, a produção de anticorpos de baixa avidéz pudesse ser devida à ativação policlonal de células B, semelhante ao verificado por FERREIRA et al (1996). e LEORATTI (2004) ainda observou o predomínio de anticorpos de baixa avidéz nos indivíduos com malária complicada entre todos os isotipos de IgG, fato esse que poderia ser devido aos poucos episódios anteriores de malária relatados por esses indivíduos ou ainda estar associado ao não controle da infecção como uma expressão de imunodeficiência, como sugerido por FERREIRA et al (1996). Portanto, o predomínio de anticorpos

de alta avidéz em nossos pacientes com malária não complicada está de acordo com os poucos estudos sobre a avidéz de anticorpos na malária.

Vários estudos têm enfatizado a importância da análise do perfil de resposta de anticorpos contra antígenos específicos e que possam ser usados no desenvolvimento de vacinas ou com valor diagnóstico na malária. Com esse objetivo, analisamos também a reatividade das subclasses de IgG contra diferentes proteínas do antígeno somático de *P. falciparum*.

Para tanto, inicialmente padronizamos a técnica de *Immunoblotting* para a pesquisa das subclasses de IgG utilizando antígeno somático de formas eritrocitárias de *P. falciparum* e o sistema biotina-estreptavidina.

Apesar de não termos encontrado na literatura outros trabalhos utilizando o sistema biotina-estreptavidina em *Immunoblotting*, o escolhemos para padronização pela possibilidade que o mesmo oferece de amplificação do sinal, visto que concentrações muito baixas de anticorpos deveriam ser detectadas no caso de IgG2, IgG3 e IgG4.

As diluições de todos reagentes foram escolhidas por titulação em bloco, ou seja, diferentes diluições do soro contra diferentes diluições dos conjugados anti-Ig humana marcados com biotina e diferentes diluições do conjugado estreptavidina-peroxidase. Para a pesquisa de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 a diluição dos soros escolhida foi 1/50, por ser a maior diluição que não afetou o padrão de reconhecimento das diferentes frações protéicas pelos anticorpos. Para a detecção de anticorpos IgG4, que estão presentes em concentrações muito baixas no soro, foi escolhida a diluição 1/2. A diluição para os conjugados anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4-

Biotina escolhida foi de 1/500 e para o conjugado estreptavidina-peroxidase foi de 1/300.

Geralmente a técnica de *Immunoblotting* é considerada altamente específica, enquanto a técnica de ELISA é considerada altamente sensível por visualizarmos a reação contra todas proteínas presentes num antígeno complexo. Porém através desta padronização observamos a detecção de anticorpos IgG4 específicos à diferentes frações protéicas do antígeno somático de *P. falciparum*, mesmo em pacientes que haviam sido negativos no ELISA para IgG4 (dados não mostrados), o que nos permite sugerir que a técnica de *Immunoblotting* empregando o sistema biotina-estreptavidina apresenta alta sensibilidade para a detecção de anticorpos da subclasse IgG4 contra o antígeno empregado.

Na padronização do *Immunoblotting* para anticorpos IgG1, observamos a reatividade de soros de doadores de sangue (controle negativo) contra algumas frações protéicas do antígeno de *P. falciparum*, o que não foi observado para as outras subclasses de anticorpos. Esta reatividade foi observada por outros autores com antígenos de *P. falciparum* (AVILA et al, 1994; TOZETTO-MENDOZA, 1997) e de *P. vivax* (SANCHEZ et al, 1994); e provavelmente seja devida à presença de anticorpos contra componentes de hemácias (autoanticorpos) ou mesmo anticorpos de reatividade cruzada.

Para avaliação da avidéz dos anticorpos por *Immunoblotting* realizamos a lavagem de uma das duplicatas das fitas de nitrocelulose com uréia 8M por 15 minutos e a outra com PBS, segundo TOZETTO-MENDOZA

(1997). Essas condições são as mais utilizadas nos ensaios de avidéz de anticorpos com antígeno adsorvido em fase sólida.

Após a padronização do *Immunoblotting*, avaliamos a reatividade das subclasses de IgG anti-*P. falciparum* em cinco amostras de soro de 14 pacientes (total= 70) colhidas nos tempos 0, 48horas, 7, 28 e 42 dias.

Os resultados do *Immunoblotting* mostraram o reconhecimento de um grande número de bandas protéicas pelas subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, 67, 61, 60 e 53 bandas protéicas, respectivamente. O número de bandas protéicas reconhecidas pelas subclasses de IgG foi relacionado com o número de episódios anteriores de malárias relatados pelos pacientes (dados não mostrados).

Nossos resultados corroboram com os apresentados por THELU et al (1991), que também observaram um amplo número de bandas antigênicas de diferentes massas moleculares sendo reconhecido por subclasses de IgG de adultos imunes. TOZETTO-MENDOZA (1997) também observou um amplo espectro de bandas protéicas de *P. falciparum* sendo reconhecidas por anticorpos IgG de indivíduos com múltiplos episódios anteriores de malária e um menor número de bandas sendo reconhecidas por indivíduos com primo-infecção e portanto postulou que o repertório de bandas protéicas reconhecidas pelos anticorpos aumenta com o grau de exposição, semelhante ao observado por THELU et al (1991).

Apesar de muitas bandas protéicas terem sido reconhecidas pelas subclasses de IgG, esse reconhecimento foi sempre inferior a 50% dos pacientes em todos dias do acompanhamento e por todas subclasses, com

exceção das bandas 164, 158, 135, 110, 103, 101, 90, 84, 79, 72, 58, 52 e 44 kDa que foram reconhecidas por anticorpos IgG1 desde o início do tratamento por mais de 50% dos pacientes. THELU et al (1996) também observaram que poucos determinantes antigênicos somáticos foram fortemente ativos para a expressão de isotipo específico, e que os outros antígenos estimularam fracamente a expressão de isotipo.

As respostas específicas das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 contra as diferentes bandas protéicas também alcançaram o máximo de frequência de positividade no 7º dia do monitoramento, como observado no ELISA (fig. 14), ou seja, durante a fase aguda da infecção. As frequências de positividade dos anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 retornaram a patamares próximos aos iniciais ao final do monitoramento. Fato semelhante foi observado por THELU et al (1991) durante o acompanhamento de crianças com malária por cinco meses após o início da quimioterapia. Apenas os anticorpos IgG4 apresentaram dois picos de frequência de reconhecimento, no 2º e no 42º dias do monitoramento.

Em relação à avidéz das subclasses, observamos que ao invés de determinada banda protéica ser reconhecida preferencialmente por anticorpos de alta, média ou baixa avidéz, em geral os pacientes é que apresentavam um mesmo padrão de avidéz das subclasses, ou alta/média ou baixa contra as diferentes bandas protéicas (Anexos III a VI). Isto provavelmente ocorra porque a avidéz das subclasses contra diferentes bandas protéicas deve depender do nível de exposição prévia e da intensidade da resposta de memória de cada paciente. FERREIRA et al

(1996) observaram que houve uma mudança de anticorpos citofílicos de baixa avidéz na fase aguda da malária em pacientes da região amazônica para anticorpos de alta avidéz nos mesmos pacientes dois meses após o ataque malárico, mostrando que a maturação da afinidade pôde ser evidenciada pela medida sorológica da avidéz dos anticorpos.

Baseados nos resultados anteriores do nosso grupo e em dados da literatura, que mostram a associação das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 com proteção na malária e associação de IgG4 com formas complicadas da doença e com maior risco de infecção, selecionamos algumas bandas protéicas reconhecidas preferencialmente pelas subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 e não por IgG4 (pelo menos no início do monitoramento). Também consideramos na seleção dessas bandas as associações com o tempo de clareamento da parasitemia, com exposição prévia a malária e com os resultados das interações de anticorpos. Assim, selecionamos as seguintes bandas protéicas com perfil de reconhecimento associado à proteção e que deverão ser melhor investigadas como alvos de vacinas: 125, 96, 86, 75, 55 e 47 kDa.

Algumas dessas proteínas têm massas moleculares idênticas ou próximas à antígenos do parasito já descritos previamente. As bandas protéicas de 125 kDa e de 47 kDa podem se tratar da proteína de 126 kDa do vacúolo parasitóforo (p126) e seu segmento de 47 kDa, respectivamente, descritos na literatura como um dos candidatos a alvo de vacina na malária. A proteína é processada em fragmentos de 50 e 73 kDa , e mais tarde se divide em dois peptídeos, de 47 e um 18 kDa ligados por pontes dissulfeto.

Esse processamento é associado com a liberação de merozoítos de esquizontes maduros (DELPLACE, 1987). Num estudo conduzido em Porto Velho no Brasil por BANIC et al (1998), foi mostrado que 95% dos pacientes estudados apresentaram anticorpos anti-p126 detectáveis no soro independente do número de malárias prévias e que 77% desses pacientes apresentaram anticorpos anti-Nt47 (porção N-terminal da p126). A análise da resposta de subclasses de IgG para Nt47 mostrou que indivíduos com maiores níveis de anticorpos citofílicos tinham os menores níveis de parasitemia, sugerindo que estes anticorpos contribuam para a aquisição de imunidade na malária (BANIC et al, 1992). A banda protéica de 96kDa pode ser a mesma estudada por NKUO-AKENJI et al (1993), contra a qual foram observados anticorpos que aumentaram com a idade e foram relacionados com a exposição ao antígeno, sugerindo que estes anticorpos estariam relacionados com algum grau de proteção contra a infecção por *P. falciparum*. A banda protéica de 55 kDa pode ser tanto uma glicoproteína presente em trofozoítos jovens e maduros, como nos esquizontes e final da esquizogonia que se expressa na superfície dos merozoítos descrita como de 56 kDa (STANLEY et al, 1985) ou a de 55 kDa presente no vacúolo endocítico do parasito com atividade de protease semelhante a catepsina-D. A banda protéica de 75 kDa pode se tratar da proteína de choque térmico Pfhsp70, estudada atualmente como candidata à vacina na malária por elicitar anticorpos com função protetora contra *P. falciparum* (TSHEFU & JAMES, 1995)

As bandas de 86 e 75 kDa também foram relatadas por THELU et al (1991) e as de 46, 75, 125 e 96 por TOZETTO-MENDOZA (1997) por terem sido reconhecidos com alta frequência por anticorpos IgG contra antígeno somático de *P.falciparum*. TOZETTO-MENDOZA (1997) mostrou ainda que as bandas de 46, 125, 75, 96, e 56 eram reconhecidas por anticorpos de alta avides.

A seleção de subclasse e maturação da afinidade de uma resposta de anticorpo, são as conseqüências de um processo de diferenciação de células B específicas ocorrendo nos centros germinativos de linfonodos em um indivíduo imunizado (nessa situação – um indivíduo que tenha encontrado o epítipo do antígeno relevante). Embora a afinidade dependa do antígeno e da seleção clonal de células produzindo anticorpos com melhores cinéticas de ligação ao epítipo, a seleção de isotipos (classe e subclasse) é um fenômeno complexo que resulta de mecanismos múltiplos, muitos dos quais não estão ainda bem entendidos (MANIS, 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 epítipo 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<sup>+</sup> Th1, como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 induzem a

produção dos anticorpos citofílicos que participam de mecanismos efetores celulares dependentes de anticorpos. Citocinas produzidas por células CD4<sup>+</sup> 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- $\gamma$  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, corresponde 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 a um número limitado de vezes à malária pode desenvolver altos níveis de anticorpos a antígenos que levam à mecanismos protetores, embora estes mecanismos não sejam funcionais. Ao contrário, a aquisição de um estado de resistência parece correlacionar com a habilidade de desenvolver anticorpos a 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).

A existência de subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> respondedores a antígenos eritrocíticos do parasito em camundongos infectados por *P. chabaudi* mostrou heterogeneidade consistente com a idéia de dois subtipos de células CD4<sup>+</sup> diferentes funcionalmente. Células derivadas de infecção primária recente secretaram IL-2 e  $\gamma$ -IFN após o estímulo antigênico *in vitro*, portanto, apresentavam um repertório de citocinas típico de células CD4<sup>+</sup> 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 et al, 1993).

Com os resultados desse trabalho não conseguimos observar mudanças no perfil da resposta de subclasses de IgG específicas durante a infecção por *P. falciparum* que pudessem mostrar uma mudança do perfil Th1 na fase inicial da doença para Th2 numa fase mais tardia, provavelmente pela casuística estudada. Provavelmente se tivéssemos monitorado a cinética de produção das diferentes subclasses de IgG em pacientes primo-infectados, os resultados obtidos mostrassem uma mudança de perfil da resposta imune. No *Immunoblotting*, algumas bandas protéicas apresentaram mudança de reconhecimento inicial por IgG1, IgG2 e

IgG3 e reconhecimento mais tardio por IgG4: 125, 96, 90, 75, 30 kDa (fig. 16-B).

Nossos resultados mostram que a população estudada mesmo sendo oriunda de região de transmissão instável de malária no Brasil apresentou um certo grau de imunidade protetora, uma vez que anticorpos apropriados (IgG1, IgG3 e possivelmente IgG2) foram produzidos em resposta a infecção mesmo que a análise tenha sido realizada por meio de antígenos totais de formas eritrocitárias, o que pode não refletir a realidade em campo segundo THELU et al (1991).

Nossos estudos de monitoramento de pacientes por Immunoblotting nos permitiu identificar frações protéicas que deverão ser melhor avaliadas como alvo de vacinas. Outro ponto a ser destacado é a avaliação de pacientes com malária grave e pacientes assintomáticos por *Immunoblotting* para tentar observar possíveis diferenças de padrões de reconhecimento de frações protéicas para subclasses de IgG com avaliação da avidéz para ser realizada análise das três diferentes formas clínicas de malária como objetivo de encontrar diferenças que possam ser usadas no diagnóstico da malária, ou tentar definir perfis de acordo com a forma clínica como já ocorreu em outras doenças.

## CONCLUSÕES

---

---

1. Anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-*P. falciparum*, na maioria de alta avidéz, estavam presentes, respectivamente, em 100%, 39,5%, 80,6% e 28,4% dos pacientes com malária falciparum não complicada no início do tratamento;
2. As concentrações máximas das subclasses de IgG anti-*P. falciparum* foram alcançadas em média no 7<sup>o</sup> dia, e os índices de avidéz máximos de IgG1 e IgG3 foram alcançados em média no 7<sup>o</sup> dia, e os de IgG2 no 14<sup>o</sup> dia e os de IgG4 no 2<sup>o</sup> dia;
3. A concentração inicial dos anticorpos IgG3 anti-*P. falciparum* apresentou correlação negativa com o tempo de clareamento parasitário e a relação das somas dos anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 pelos níveis de IgG4 se correlacionaram negativamente com a parasitemia inicial;
4. Foram identificadas no *Immunoblotting* frações protéicas que podem estar relacionadas com o reconhecimento imune protetor, por serem reconhecidas pelas subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 e não reconhecidas ou reconhecidas tardiamente por IgG4: 125, 96, 86, 75, 55 e 47 kDa.
5. A resposta predominante das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 observada nestes pacientes, todos com malária não complicada, pode indicar que esses anticorpos estão cooperando para o controle de formas graves da doença e refletirem um certo grau de desenvolvimento de imunidade adquirida.

## ANEXO I

Correlações entre as concentrações iniciais de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum*, o maior nível da subclasse de IgG atingido durante o período de acompanhamento (IgG-max) e o dia em que este nível foi alcançado (DiaG-max) e as variáveis preditoras de exposição à malária.

<b>Variáveis</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Número de episódios de malária falciparum nos últimos 2 anos</b>	<b>permanência em área endêmica (anos)</b>	<b>tamanho do baço</b>	<b>(cm do RCE LHC)</b>	<b>[IgG] inicial (mg/ml)</b>
<b>IgG1</b>	<b>r (P)*</b>	0,0104 (0,943)	0,019 (0,897)	-0,018 (0,904)	0,079 (0,594)	20,17
<b>IgG1-max</b>	<b>r (P)*</b>	-0,0307 (0,835)	-0,034 (0,820)	0,039 (0,904)	0,140 (0,341)	
<b>DiaG1-max</b>	<b>r (P)*</b>	0,055 (0,709)	-0,209 (0,154)	0,207 (0,157)	0,062 (0,673)	
<b>IgG2</b>	<b>r (P)*</b>	0,141 (0,337)	0,061 (0,677)	0,026 (0,863)	0,052 (0,724)	3,8
<b>IgG2-max</b>	<b>r (P)*</b>	0,081 (0,584)	0,044 (0,766)	0,142 (0,334)	0,059 (0,688)	
<b>DiaG2-max</b>	<b>r (P)*</b>	0,222 (0,129)	-0,132 (0,371)	0,098 (0,506)	-0,009 (0,949)	
<b>IgG3</b>	<b>r (P)*</b>	0,200 (0,171)	-0,095 (0,519)	0,267 (0,067)	0,106 (0,470)	1,47
<b>IgG3-max</b>	<b>r (P)*</b>	0,025 (0,865)	0,046 (0,757)	0,227 (0,121)	0,038 (0,795)	
<b>DiaG3-max</b>	<b>r (P)*</b>	0,016 (0,914)	-0,013 (0,931)	-0,037 (0,800)	-0,082 (0,580)	
<b>IgG4</b>	<b>r (P)*</b>	-0,071 (0,629)	-0,0726 (0,622)	-0,215 (0,141)	-0,174 (0,234)	0,07
<b>IgG4-max</b>	<b>r (P)*</b>	-0,051 (0,762)	0,004 (0,983)	-0,061 (0,713)	0,188 (0,365)	
<b>DiaG4-max</b>	<b>r (P)*</b>	0,062 (0,713)	0,114 (0,498)	0,260 (0,120)	0,163 (0,434)	

## ANEXO II

Correlação entre a concentração inicial de anticorpos IgG4 anti-formas eritrocitárias de *P. falciparum*, o maior nível de anticorpos IgG4 atingido durante o período de acompanhamento (IgG4-max) e o dia em que este nível foi alcançado (DiaG4-max) e a resposta à infecção malárica e ao tratamento com mefloquina dos pacientes acompanhados.

Variáveis	Parasitemia inicial das formas assexuadas (/mm <sup>3</sup> )	Tempo de sintomas no momento da admissão (dias)	Tempo de clareamento parasitário (horas)	Tempo de clareamento de febre (horas)	[IgG1] inicial (mg/ml)
IgG1	r (P)* -0,255 (0,0797)	0,142 (0,333)	-0,150 (0,307)	-0,082 (0,578)	20,17
IgG1-max	r (P)* -0,119 (0,418)	0,109 (0,461)	-0,170 (0,248)	-0,110 (0,454)	
DiaG1-max	r (P)* 0,026 (0,858)	-0,089 (0,545)	-0,158 (0,282)	0,104 (0,480)	
IgG2	r (P)* -0,144 (0,329)	0,046 (0,757)	-0,099 (0,500)	0,072 (0,626)	3,8
IgG2-max	r (P)* -0,088 (0,858)	0,030 (0,837)	-0,095 (0,518)	0,062 (0,674)	
DiaG2-max	r (P)* 0,004 (0,977)	-0,131 (0,373)	-0,254 (0,081)	-0,114 (0,438)	
IgG3	r (P)* -0,184 (0,210)	0,083 (0,574)	-0,292 (0,045)	-0,185 (0,206)	1,47
IgG3-max	r (P)* 0,047 (0,752)	-0,066 (0,652)	-0,108 (0,463)	-0,078 (0,597)	
DiaG3-max	r (P)* 0,208 (0,156)	-0,253 (0,083)	0,110 (0,456)	0,123 (0,782)	
IgG4	r (P)* 0,046 (0,755)	0,159 (0,278)	0,186 (0,204)	0,136 (0,353)	0,07
IgG4-max	r (P)* 0,076 (0,654)	0,206 (0,220)	0,142 (0,399)	0,308 (0,063)	
DiaG4-max	r (P)* -0,038 (0,489)	-0,038 (0,822)	-0,162 (0,335)	0,022 (0,895)	

















## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

Abbas, A. K.; Murphy, K. M.; Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, v. 383 (6603), p. 787-793, 1996.

Akdis, C. A.; Blaser, K. IL-10 Induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two keys steps in specific immunotherapy. *FASEB J.*, v. 13(6), p. 603-609, 1999.

Aribot, G.; Rogier, C.; Sarthou, J. L.; Trape, J. F.; Balde, A. T.; 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.*, v. 54(5), p. 449-457, 1996.

Artavanis-Tsakonas, K.; Tongren, J. E.; Riley, E. M. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 133(2), p. 145-152, 2003.

Astagneau, P.; Roberts, J. M.; Steketee, R. W.; Wirima, J. J.; Lepers, J. P.; Deloron, P. Antibodies to a *Plasmodium falciparum* blood-stage antigen as a tool for predicting the protection levels of two malaria-exposed populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 53(1), p. 23-28, 1995.

Aucan C, Traore Y, Tall F, Nacro B, Traore-Leroux T, Fumoux F, Rihet P. High Immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect. Immun.*, v. 68(3), p. 1252-1258, 2000.

Aucan, C.; Traore, Y.; Fumoux, F.; Rihet, P. Familial correlation of immunoglobulin G subclass responses to *Plasmodium falciparum* antigens in Burkina Faso. *Infect. Immun.*, v. 69(2), p. 996-1001, 2001.

Ávila, S. L.; Leandro, M. C.; Carvalho, N. B.; Oliveira, M. S.; Arruk, V. G.; Sanchez, M. C.; Boulos, M.; Ferreira, A. W. Evaluation of different methods for Plasmodia detection, in well defined population groups in an endemic area of Brazil (1). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* v. 36(2), p. 157-162, 1994.

Baird, J. K. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today*, v. 11(3), p. 105-111, 1995.

Baird, J. K.; Jones, T. R.; Danudirgo, E. W.; Annis, B. A.; Bangs, M. J.; Basri, H.; Purnomo, Masbar, S. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 45(1), p. 65-76, 1991.

Banic, D. M.; de Oliveira-Ferreira, J.; Pratt-Riccio, L. R.; Conseil, V.; Goncalves, D.; Fialho, R. R.; Gras-Masse, H.; Daniel-Ribeiro, C. T.; Camus, D. Immune response and lack of immune response to Plasmodium falciparum P126 antigen and its amino-terminal repeat in malaria-infected humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 58(6), p. 768-774, 1998.

Bate, C. A.; Taverne, J.; Playfair, J. H. Malarial parasites induce TNF production by macrophages. *Immunology*, v. 64(2), p. 227-231, 1988.

Beck, H. P.; Felger, I.; Genton, B.; Alexander, N.; Al-Yaman, F.; Anders, R.F.; Alpers, M. Humoral and cell-mediated immunity to the Plasmodium falciparum ring-infected erythrocyte surface antigen in an adult population exposed to highly endemic malaria. *Infect Immun.*, v. 63(2), p. 596-600, 1995.

Biggs, B. A.; Gooze, L.; Wycherley, K.; Wollish, W.; Southwell, B.; Leech, J. H.; Brown, G. V. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl Acad.*, v. 88(20), p. 9171-9174, 1991.

Blackburn, N. K.; Besselaar, T. G.; Schoub, B. D.; O'connell, K. F. Differentiation of Primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. *J. Med. Virology*, v. 33(1), p. 6-9, 1991.

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.*, v. 60(4), p. 1473-1481, 1992.

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.*, v. 182(2), p. 409-418, 1995.

Bruce-Chwatt, L.J. *Essential Malariology*, 2ed. London, William Heinemann Medical Books, 1985.

Bull, P. C.; Lowe, B. S.; Kortok, M.; Molyneux, C. S.; Newbold, C. I.; Marsh, K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Natl Med.*, v. 4(3), p. 358-360, 1998.

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

Camargo, M. E.; Silva, S. M.; Leser, P. G.; Granato, C. H. Avidity of specific IgG antibodies as markers of recent primary infection caused by

*Toxoplasma gondii*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 33(3), p. 213-218, 1991.

Carter, R.; Mendis, K. N. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. Clin. Microbiol. Rev., v. 15(4), p. 564-594, 2002.

Carvalho, L.H.; Sano, G.; Hafalla, J.C.; Morrot, A.; Curotto de Lafaille, M. A.; Zavala, F. IL-4 secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T cells responses against malaria liver stages. Nat Med., v. 8(2), p. 166-170, 2002.

Carvalho, L. J.; Daniel-Ribeiro, C. T.; Goto, H. Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. Scand. J. Immunol., v. 56(4), p. 327-343, 2002.

Clark, I. A.; al Yaman, F. M.; Jacobson, L. S. The biological basis of malarial disease. Int J Parasitol., v. 27(10), p. 1237-1249, 1997.

Cerutti – Junior, C. Avaliação in vivo e in vitro da sensibilidade do *P.falciparum* a quinino e mefloquina em área endêmica de malária na Amazônia brasileira (Peixoto de Azevedo, Estado do Mato Grosso). São Paulo, 1998 (Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo).

Chizzolini, C.; Dupont, A.; Akue. J. P.; Kaufmann MH, Verdini AS, Pessi A, Del Giudice G. Natural antibodies against three distinct and defined

antigens of *Plasmodium falciparum* in residents of a mesoendemic area in Gabon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 39(2), p. 150-156, 1988.

Cohen, S.; McGregor, I. A.; Carrington, S. Gamma globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature.*, v. 192, p. 733-737, 1961.

Cordeiro, C. E. S.; Filomeno, C. R. M.; Costa, C.M.A.; Couto, A. A. R. A. Perfil epidemiológico de malária no estado do Pará em 1999 com base numa série histórica de dez anos (1989 – 1999). *Informe Epidemiológico do SUS*, v. 11(2), p. 69-77, 2002.

Cox, F. E. History of human parasitology. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 15(4), p. 595-612, 2002.

Crutcher, J. M.; Stevenson, M. M.; Sedegab, M.; Hoffman, S. L. Interleukin 12 and malaria. *Res. Immunol.*, v. 146(7-8), p. 552-559, 1995.

Delplace, P.; Fortier, B.; Tronchin, G.; Dubremetz, J. F.; Vernes, A. Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.*, v. 23(3), p. 193-201, 1987.

Diallo, T. O.; Spiegel, A.; Diouf, A.; Perraut, R.; Kaslow, D. C.; Garraud, O. Short report: IgG1/IgG3 antibody responses to analogs of recombinant

yPfMSP<sub>19</sub>: a study in immune adults living in areas of *Plasmodium falciparum* transmission. Am. J. Trop. Med. Hyg, v. 64(3-4), p. 204-206, 2001.

Diallo, T. O.; Spiegel, A.; Diouf, A.; Lochouarn, L.; Kaslow, D. C.; Tall, A.; Perraut, R.; Garraud, O. Short report: Differential evolution of IgG1/IgG3 antibody responses to *P. falciparum* MSP1<sub>19</sub> over time in immune adult Senegalese. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 66(2), p. 137-139, 2002.

Djeu, J. Y.; Serbousek, D.; Blanchard, D. K. Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear neutrophils. Blood, v. 76(7), p. 1405-1409, 1990.

Druilhe, P.; Sabchareon, A.; Bouharoun-Tayoun, H.; Oeuvray, C.; Perignon, J. L. *In vivo* veritas: lessons from immunoglobulin transfer experiments in malaria patients. Ann. Trop. Med. Parasitol.,v. 91, sp. 1, p. 37-54, 1997.

Dubois, B.; Deloron, P.; Astagneau, P.; Chougnet, C.; Lepers, J. P. Isotypic analysis of *Plasmodium falciparum* – specific antibodies and their relation to protection in Madagascar. Infect Immun., v. 61 (10), p. 4498-4500, 1993.

Durlcher, R.R. Avaliação da resposta imune humoral em pacientes com infecção por *Plasmodium falciparum* submetidos a terapêutica específica em região de transmissão instável de malária no Brasil. São Paulo, 1998 (Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo).

Egan, A. F.; Morris, J.; Barnish, G.; Allen, S.; Greenwood, B. M.; Kaslow, D. C.; Holder, A. A.; Riley, E. M. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP1. *J. Infect. Dis.*, v. 173(3), p. 765-769, 1996.

Esparza, I.; Mannel, D.; Ruppel, A.; Falk, W.; Krammer, P. H. Interferon  $\gamma$  and lymphotoxin or tumor necrosis factor act synergistically to induce macrophage killing of tumor cells and schistosomula or *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.*, v. 166(2), p. 589-594, 1987.

Essner, R.; Rhoades, K.; McBride, W. H.; Morton, D. L.; Economou, J. S. IL-4 down-regulates interleukin-1 and TNF gene expression in human monocytes. *J. Immunol.*, v. 142(11), p. 3857-3861, 1989.

Ferreira, M. U.; Kimura, E. A. S.; De Souza, J. M.; Katzin, A. M. The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: differential patterns in clinically immune Africans

and Amazonian patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 55(3), p. 315-323, 1996.

Fundação Nacional De Saúde (FUNASA). Dados epidemiológicos de malária no Brasil. Disponível em: [www.funasa.gov.br](http://www.funasa.gov.br), 2001.

Garraud, O.; Nutman, T. B. The role of cytokines in human B-cell differentiation into immunoglobulin-secreting cells. *Bull. Inst. Pasteur.*, v. 94, p. 285-309, 1996.

Garraud, O.; Mahanty, S.; Perraut, R. Malaria-specific antibody subclasses in immune individuals: a key source of information for vaccine design. *Trends. In Immunol.*, v. 24(1), p. 30-35, 2003.

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.*, v. 141(6), p. 529-542, 1990.

Gupta, S.; Snow, R. W.; Donnelly, C. A.; Marsh, K.; Newbold, C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat. Med.*, v. 5(3), p. 340-343, 1999.

Holder, A. A.; Riley, E. M. Human immune response to MSP-1. *Parasitol. Today.*, v. 12(5), p. 173-174, 1996.

Holder, A. A. Malaria vaccines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 96(4), p. 1167-1169, 1999.

Hviid, L.; Theander, T. G.; Abu-Zeid, Y. A.; Abdulhadi, N. H.; Jakobsen, P. H.; Saeed, B. O.; Jepsen, S.; Bayoumi, R. A.; Jensen, J. B. Loss of cellular immune reactivity during acute *Plasmodium falciparum* malaria. FEMS Microbiol. Immunol., v. 3(4), p. 219-227, 1991.

Janeway Jr., C. A.; Travers, P. Immunobiology The Immune System In Health And Disease, Cap2: The Induction, Measurement, And Manipulation of the Immune Respose. Item 2-12, 1994.

Knell, A. J. (ed) *Malaria*. Oxford, Oxford Univ. Press, 1991.

Klotz, F. W.; Scheller, L. F.; Seguin, M. C.; Kumar, N.; Marletta, M. A.; Green, S. J.; Azad, A. F. Co-localization of inducible-nitric-oxide synthase and *Plasmodium berghei* in hepatocytes from rats immunized sporozoites. J. Immunol., v. 154(7), p. 3391-3395, 1995.

Kumaratilake, L. M.; Ferrante, A.; Rzepczyk, C. The role of T lymphocytes in immunity to *Plasmodium falciparum*. Enhancement of neutrophil-mediated parasite killing by lymphotoxin and IFN-gamma comparisons

with tumor necrosis factor effects. *J. Immunol.*, v. 146(2), p. 762-767, 1991.

Kwiatkowski, D. Malarial toxins and the regulation of parasite density. *Parasitol. Today*, v. 11(6), p. 206-212, 1995.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, v. 227(5259), p. 680-685, 1970.

Leoratti, F. M. S. Resposta imune humoral na malária humana: quantidade e qualidade de anticorpos anti-*P. falciparum*. São Paulo, 2004. (Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo)

Lowry, O.H.; Rosebrough, D.; Farr, C.; Randal, R. J. Protein measure with the phenol reagent. *J. biochem.*, v. 193, p. 265-275, 1981

Luty, A. J.; Lell, B.; Schmidt-Ott, R.; Lehman, L.G.; Luckner, D.; Greve, B.; Matousek, P.; Herbich, K.; Schmid, D.; Migot-Nabias, F.; Deloron, P.; Nussenzweig, R. S.; Kremsner, P. G. Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children. *J. Infect. Dis.*, v. 179(4), p. 980-988, 1999.

Luty, A. J.; Perkins, D. J.; Lell, B.; Schmidt-Ott, R.; Lehman, L. G.; Luckner, D.; Greve, B.; Matousek, P.; Herbich, K.; Schmid, D.; Weinberg, J. B.;

Kremsner, P. G. Low interleukin -12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect. Immun.*, v. 68(7), p. 3909-3915, 2000.

Malaguarnera L, Musumeci S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 02(8), p. 472-478, 2002.

Manis, J. P.; Tian, M.; Alt, F. W. Mechanisms and control of class switch recombination. *Trends. Immunol.*, v.; 23(1), p. 31-39, 2002.

Mayxay, M.; Chotivanich, K.; Pukrittayakamee, S.; Newton, P.; Looareesuwan, S.; White, N. J. Contribution of humoral immunity to the therapeutic response in falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 65(6), p. 918-923, 2001.

Mcguire, W.; HILL, A. V.; ALLSOPP, C. E.; GREENWOOD, B. M.; KWIATKOWSKI, D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*, v. 371(6497), p. 508-150, 1994.

METZGER WG, MORDMULLER BG, KREMSNER PG. Malaria pigment in leucocytes. *TRANS R SOC TROP MED HYG.*; 89: 637-38, 1995.

Miettinen-Baumann, A.; Strych, W.; McBride, J.; Heidrich, H. G. A 46,000 dalton *Plasmodium falciparum* merozoite surface glycoprotein not related to the 185,000-195,000 dalton schizont precursor molecule: isolation and characterization. *Parasitol. Res.*, v. ;74(4), p.317-323, 1988.

Miller, L. H.; Good, M. F.; Kaslow, D. C. Vaccines against the blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 452, p. 193-205, 1998.

Nkuo-Akenji, T.; Deas, J. E.; Leke, R. G.; Ngu, J. L. Correlation between serum levels of antibodies to the 96-kD antigen of *Plasmodium falciparum* and protective immunity in Cameroon: a longitudinal study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 49(5), p. 566-573, 1993.

Oeuvray, C.; Bouharoun-Tayoun, H.; Gras-Masse, H.; Bottius, E.; Kaidoh, T.; Aikawa, M.; Filgueira, M. C.; Tartar, A.; Druilhe, P. Merozoite surface Protein-3: A malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood*, v. 84(5), p. 1594-1602, 1994.

Organização Pan-americana de Saúde (OPAS). Dados de malária nas Américas. Disponível em: [www.paho.org](http://www.paho.org), 1996.

- Ostensen, M. E.; Thiele, D. L.; Lipsky, P. E. Tumor necrosis factor -  $\alpha$  enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J. Immunol.*, v. 138(12), p. 4185-4191, 1987.
- Pinto, A. Y.; Ventura, A. M.; Souza, J. M. IgG antibody response against *Plasmodium vivax* in children exposed to malaria, before and after specific treatment. *J. Pediatr.*, v. 77(4), p. 299-306, 2001.
- Piper, K. P.; Hayward, R. E.; Cox, M. J.; Day, K. P. Malaria transmission and naturally acquired immunity to PfEMP-1. *Infect. Immune.*, v. 67(12), p. 6369-6374, 1999.
- Plebanski, M.; Hill, A. V. S. The immunology of malaria. *Curr Opin Immunol.*, v. 12(4), p. 437-441, 2000.
- Richards, A. L. Tumour necrosis factor and associated cytokines in the host's response to malaria. *Int. J. Parasitol.*, v. 27(10), p.1251-1263, 1997.
- Riley, E. M.; Allen, S. J.; Wheeler, J. G.; Blackman, M. J.; Bennett, S.; Tacaks, B. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.*, v. 14(3), p. 321-337, 1992.

Rzepczyk, C. M.; Hale, K.; Woodroffe, N.; Bobogare, A.; Csurhes, 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.*, v. 65(3), p. 1098-1100, 1997.

Sanchez, M. R.; Ramirez, J. A.; Rodriguez, M. H.; O'Reilly, F.; Larralde, C.; Ortiz-Ortiz, L. Antibody response to *Plasmodium vivax* antigens in human malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 50(3), p. 329-338, 1994.

Stanley, H. A.; Howard, R. F.; Reese, R. T. Recognition of a Mr 56K glycoprotein on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites by mouse monoclonal antibodies. *J Immunol.*, v. 134(5), p. 3439-3444, 1985.

Superintendência De Controle De Endemias (SUCEN). Dados sobre malária. Disponível em: [www.sucen.sp.gov.br](http://www.sucen.sp.gov.br)

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 Asinan. *J. Trop. Med. Public Health*, v. 32(2), p. 247-254, 2001.

Trager, W.; Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, v. 193(4254), p. 673-675, 1976.

Taylor, R. R.; Allen, S. J.; Greenwood, B. M.; Riley, E. M. 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.*, v. 58(4), p. 406-413, 1998.

Taylor-Robinson, A. W.; Phillips, R.S.; Severn, A.; Moncada, S.; Liew, F. Y. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. *Science.*, v. 260(5116),p. 1931-1934,1993.

Thelu, J.; Sheick-Zakiuddin, I.; Boudin, C.; Peyron, F.; Picot, S.; Ambroise-Thomas, P. Development of Natural Immunity in *plasmodium falciparum* Malaria: Study of Antibody Response by Western Immunoblotting. *J. Clinical Microbiology*, v. 29(3), p. 510-518, 1991.

Towbin, N.; Satehelin, T.; Bordon, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, v. 76, p. 43650-43654, 1979.

Tozetto – Mendoza, T.R. Estudo do perfil sorológico de populações expostas a diferentes situações epidemiológicas de malária no Brasil. São Paulo, 1997 (Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo).

Tshefu, K.; James, M. A. Relationship of antibodies to soluble *Plasmodium falciparum* antigen (Pf70) and protection against malaria in a human population living under intense transmission in Kinshasa, Zaire. *Trop. Med. Parasitol.*, v. 46(2),p. 72-6, 1995.

Wahlgren, M.; Bjorkman, A.; Perlmann, H.; Berzins, K.; Perlmann, P. Anti-*Plasmodium falciparum* antibodies acquired by residents in an holoendemic area of Liberia during development of clinical immunity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 35(1), p. 22-29, 1986.

Wang, R.; Charoenvit, Y.; Corradin, G.; De La Vega, P.; Franke, E. D.; Hoffman, S. L. Protection against malaria by *Plasmodium yoelii* sporozoite surface protein 2 linear peptide induction of CD4+ T cell and IFN-gamma-dependent elimination of infected hepatocytes. *J. Immunol.* v. 157, p. 4061-4067, 1996.

Warmerdam, P.A.; Winkel, V.; Vlug, J. G.; Westerdal, N. A.; Capel, P. J. A single amino in the second Ig-like domain of the human Fcγ receptor II is crucial for human IgG2 binding. *J. Immunol.*, v. 147(4), p.133813-43, 1991.

Weiss, W. R.; Mellouk, S.; Houghten, R. A.; Sedegah, M.; Kumar, S.; Good, M. F.; Berzofsky, J. A.; Miller, L. H.; Hoffman, S. L. Cytotoxic T cells

recognize a peptide from the circumsporozoite protein on malaria-infected hepatocytes. *J. Exp. Med.*, v. 171(3), p. 763-773, 1990.

Winkler, S.; Willheim, M.; Baier, K.; Graninger, W.; Kremsner, P. G. Frequency of cytokine-producing T cell in patients of different age groups with *Plasmodium falciparum* malaria. *Eur. Cytokine Netw.*, v. 10(2), p.155-160, 1999.

Wipasa, J.; Elliot, S.; Xu, H.; Good, M. F. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. *Immunology And Cell Biology*, v. 80(5), p. 401-414, 2002.

Woznicova, V. Immunoglobulin G avidity in infectious diseases. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, v. 53(1), p. 4-11, 2004 .

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO/OMS). Dados de malária no mundo. Disponível em: [www.who.int/health\\_topics/malaria/en](http://www.who.int/health_topics/malaria/en), 1998.

Yokota, S.; Geppert, T. D.; Lipisky, P. E. Enhancement of antigen-and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor alpha. *J. Immunol.*, v. 140, p. 531-536, 1988.

"JAMAIS CONSIDERE SEUS ESTUDOS COMO UMA OBRIGAÇÃO, MAS COMO UMA OPORTUNIDADE INVEJÁVEL (...) PARA APRENDER A CONHECER A INFLUÊNCIA LIBERTADORA DA BELEZA DO REINO DO ESPÍRITO, PARA SEU PRÓPRIO PRAZER PESSOAL E PARA PROVEITO DA COMUNIDADE À QUAL SEU FUTURO TRABALHO PERTENCER."

**ALBERT EINSTEIN**

Fig.14. Reatividade das subclasses IgG1 (1), IgG2 (2), IgG3 (3) e IgG4 (4) contra bandas protéicas divididas de acordo com o padrão de frequência de reconhecimento nos dias de acompanhamento 0, 48h, 7,21 e 42 dias (Grupos I, II, III, IV e V).