

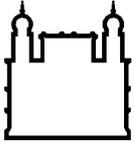
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E DA RESPOSTA  
IMUNE EM INDIVÍDUOS COINFECTADOS COM *Plasmodium* spp. E  
PARASITOS INTESTINAIS EM POPULAÇÕES NATURALMENTE  
EXPOSTAS À MALÁRIA

MARCELLE MARCOLINO DE FRANÇA

Rio de Janeiro  
2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*MARCELLE MARCOLINO DE FRANÇA*

Avaliação das alterações hematológicas e da resposta imune em indivíduos coinfectados com *Plasmodium* spp. e parasitos intestinais em populações naturalmente expostas à malária

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

**Orientador:** Profa. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira

**RIO DE JANEIRO**  
Março de 2013

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

F814 França, Marcelle Marcolino de

Avaliação das alterações hematológicas e da resposta imune em indivíduos coinfectados com *Plasmodium* spp. e parasitos intestinais em populações naturalmente expostas à malária / Marcelle Marcolino de França. – Rio de Janeiro, 2013.

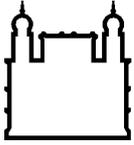
xv, 101 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2013.

Bibliografia: f. 79-95

1. Coinfecção. 2. Malária. 3. Parasitoses intestinais. 4. Resposta imune humoral. I. Título.

CDD 616.9362



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**MARCELLE MARCOLINO DE FRANÇA**

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E DA RESPOSTA IMUNE  
EM INDIVÍDUOS COINFECTADOS COM *Plasmodium* spp. E PARASITOS  
INTESTINAIS EM POPULAÇÕES NATURALMENTE EXPOSTAS À MALÁRIA**

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira**

**Aprovada em: 27 / 03 / 2013**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Dalma Maria Banic (Presidente)**

**Prof. Dra. Graziela Maria Zanini**

**Prof. Dra. Lilian Rose Pratt Riccio**

**SUPLENTES:**

**Prof. Dra. Paula Melo De Luca**

**Prof. Dra. Juliana Pessanha Rodrigues Motta**

Rio de Janeiro, 27 de Março de 2013

Ao meu pai, meus irmãos e amigos,  
pelo apoio incondicional em todos os  
momentos da minha vida

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a FIOCRUZ pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

À Comissão da Pós-graduação em Biologia Parasitária e às meninas da secretaria acadêmica, Julimar e Luciane pela boa vontade em resolver todos os problemas burocráticos que apareceram ao longo do caminho.

À minha orientadora, Dra Joseli de Oliveira Ferreira pela excelente orientação, suporte, aprendizado, pela super paciência e tempo dedicado a mim e a esta pesquisa.

Ao Dr. Josué da Costa Lima Júnior, pela co-orientação informal que me salvou a vida por diversas vezes; sua dedicação e competência ao trabalho são inspiradoras.

À Dra. Graziela Maria Zanini por aceitar participar da banca de defesa e revisar tão atenciosamente e com tanta boa vontade esta dissertação.

Às Doutoradas Dalma Maria Banic, Mércia Eliane de Arruda, Lilian Rose Pratt-Riccio e Juliana Pessanha Rodrigues Motta por aceitarem tão gentilmente participar da banca de avaliação da defesa desta dissertação de mestrado.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Imunoparasitologia (LIP), por permitirem que todo o trabalho experimental fosse realizado harmoniosamente neste laboratório.

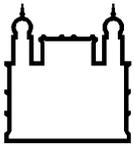
À Bruna Fonseca, do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica de Bio-Manguinhos-Fiocruz, pela dedicação e boa vontade, permitindo a realização dos experimentos de Luminex.

À minha família, meu pai Antônio, meus irmãos João, José, Joana, Antônio Filho e Márcio e meus sobrinhos Cláudio, Gabi, Grasi, André, Débora, Samuel e Júlia por todo amor, apoio nas horas mais difíceis, e incentivo na realização dos meus sonhos. Minhas conquistas pertencem também a vocês.

Aos meus amigos, poucos e bons, sem os quais a vida não teria a menor graça: Bárbara, Bruno, Mari, Nina, Nathália, Juliana, Thaísinha, Dani, Robson, Maurício, Priscilla. Obrigada por me entenderem, me aguentarem nos meus momentos de chatice, compreenderem as minhas ausências e me trazerem as melhores memórias da minha vida.

Aos companheiros de laboratório, Alana, Amanda, Dani, Jordi, Luciana, Rafaela e Rodrigo. Obrigada por me ajudarem sempre, resolverem meus problemas, por me ouvirem - cada momento com vocês foi impagável. E um agradecimento especial ao Juan e a Virginia pelo companheirismo e ajuda em tempo integral e por me acudirem sempre, qualquer que fosse meu problema. Estes dois anos me trouxeram mais do que um título acadêmico, me tornaram uma pessoa melhor graças a todos vocês do LIP.

E um agradecimento muito especial a todos aqueles que voluntariamente aceitaram participar deste estudo, na esperança de contribuir na resolução do grave problema, que ainda hoje é a malária.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

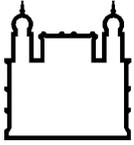
### AValiação DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E DA RESPOSTA IMUNE EM INDIVÍDUOS COINFECTADOS COM *Plasmodium* spp. E PARASITOS INTESTINAIS EM POPULAÇÕES NATURALMENTE EXPOSTAS À MALÁRIA

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Marcelle Marcolino de França

As áreas de distribuição geográfica do plasmódio e de parasitos intestinais se sobrepõem tornando a coinfeção malária-parasitoses intestinais comum nas regiões tropicais do planeta. A resposta imune contra o plasmódio é caracterizada por um perfil Th1 e por produção de anticorpos contra os estágios eritrocíticos, sendo os anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 relacionados com a imunidade protetora. As infecções por helmintos induzem forte resposta Th2 e imunorreguladora que podem inibir a resposta Th1 da malária, com possíveis consequências na clínica da doença. Dessa forma o objetivo do trabalho foi avaliar possíveis alterações nos parâmetros epidemiológicos e hematológicos, nos níveis de citocinas e na resposta imune humoral contra os antígenos candidatos vacinais de *Plasmodium vivax* AMA-1, MSP-1 e CVC nos indivíduos coinfectados com malária e parasitoses intestinais e nos indivíduos com apenas uma das infecções. O sangue dos 280 voluntários residentes na cidade de Porto Velho, Rondônia, foi coletado para a realização do exame parasitológico, do hemograma completo e para obtenção do plasma utilizado na quantificação de anticorpos IgG total, das subclasses de IgG e dos níveis de 6 citocinas e 3 quimiocinas. Também foi coletada uma amostra de fezes para a detecção de parasitos intestinais. Os quatro grupos formados **Malária (M)**, **Parasitoses Intestinais (PI)**, **Coinfectado (CI)** e **Exposto (E)** não apresentaram diferenças quanto aos parâmetros epidemiológicos. A concentração de hemoglobina assim como a frequência de indivíduos anêmicos também não foram diferentes entre os grupos **M** e **CI**. A população total apresentou prevalência de resposta de IgG de 62,9%, 65,7% e 68,6% contra respectivamente AMA-1, MSP-1 e CVC. A frequência de resposta de IgG total contra MSP-1 foi maior no grupo **M** que no grupo **CI** enquanto a frequência de resposta e o índice de reatividade (IR) de IgG total e o IR de IgG1 anti-MSP-1 foram menores no grupo **PI** quando comparados ao grupo **E**. Com relação aos anticorpos anti-AMA-1 observou-se que o IR de IgG1 foi menor e a frequência de resposta e os IRs de IgG2 e IgG4 foram maiores entre **PI** e **E**. O nível de IFN- $\gamma$  foi maior no grupo **CI** que em **M** enquanto IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  foram maiores no grupo **PI** quando comparado ao grupo **E**. IL-10 correlacionou-se significativamente com os IRs dos anticorpos contra as três proteínas estudadas. Dessa forma nossos dados sugerem que a coinfeção com parasitoses intestinais parece não estar interferindo na resposta imune humoral a antígenos candidatos a uma vacina antimalárica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EVALUATION OF THE HEMATOLOGICAL AND IMMUNE RESPONSE CHANGES IN COINFECTED SUBJECTS WITH *Plasmodium* spp. AND INTESTINAL PARASITES IN NATURALLY EXPOSED POPULATIONS TO MALARIA

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Marcelle Marcolino de França

The geographic distribution of the *Plasmodium* and intestinal parasites are overlapped over the world, therefore malaria co-infection with intestinal parasites are common in tropical regions of the planet. The immune response against *Plasmodium* is characterized by a Th1 profile and also antibodies production against erythrocytic stages, which IgG1 and IgG3 cytophilic antibodies are related to protective immunity. On the other hand, Helminth infections induce a strong immunoregulatory and Th2 response that can inhibit the inflammatory response against malaria, fetching possible consequences for clinical disease. Thus the aim of our study was to evaluate the occurrence of alterations in epidemiological and haematological parameters, level of cytokines and the humoral immune response against three *Plasmodium vivax* antigens (AMA-1, MSP-1 and CVC) in individuals co-infected with malaria and intestinal parasites and in individuals with single infections. The blood of 280 volunteers living in the city of Porto Velho, Rondônia, was collected for parasite examination, automated blood cell count and to obtain the plasma used in the quantification of antibodies and cytokine and chemokine levels. A stool sample was also collected for detection of intestinal parasites was also collected. The four groups formed **Malaria (M) Intestinal Parasites (PI), Coinfected (CI) and Exposed (E)** showed no differences in the epidemiological parameters. The hemoglobin concentrations, as well as the frequency of anemic patients, were not different between groups **M** e **CI**. The total population showed a prevalence of IgG response of 62.9%, 65.7% and 68.6% respectively against AMA-1, MSP-1 and CVC. The frequency response of total IgG against MSP-1 was higher in group **M** than in group **CI** while the frequency response and reactivity index (RI) of total IgG and IgG1 anti IR-MSP-1 were lower in **PI** when compared with group **E**. Regarding to anti-AMA-1, we observed that the IR IgG1 was lower and the frequency response and the IRs of IgG2 and IgG4 were higher between **PI** and **E**. The level of IFN- $\gamma$  was higher in that group **M** as **CI** IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  were higher in group **PI** compared to the group **E**. IL-10 was significantly correlated with the IRs of antibodies against three proteins studied. Thus our data suggest that co-infection with intestinal parasites presented low interference in the humoral immune response to malaria vaccine candidates.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
1.1 Características gerais da malária.....	1
1.2 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> spp.....	1
1.3 Distribuição da malária no mundo.....	4
1.4 Distribuição da malária no Brasil.....	6
1.5 Características gerais da coinfeção de malária com parasitoses intestinais.....	7
1.6 Alterações hematológicas na malária .....	8
1.7 Imunidade na malária.....	9
1.8 Resposta imune na fase eritrocítica da infecção.....	10
1.9 A coinfeção e a resposta imune.....	14
1.10 O desenvolvimento de vacina antimalárica .....	18
1.11 Candidatos vacinais utilizados no trabalho .....	21
1.11.1 AMA-1.....	21
1.11.2 MSP-1.....	23
1.11.3 CVC .....	25
1.12 Justificativa.....	26
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Metas .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1 Área de estudo.....	28
3.2 Voluntários.....	30
3.3 Coleta de sangue.....	31
3.4 Diagnóstico parasitológico de malária.....	32
3.5 Exame parasitológico de fezes .....	32
3.6 Cálculo amostral.....	32
3.7 Formação dos grupos de estudo em relação ao diagnóstico parasitológico.....	33
3.8 Exames hematológicos.....	33

<b>3.9</b>	<b>Proteínas Recombinantes .....</b>	<b>34</b>
3.9.1	PvMSP-1.....	34
3.9.2	PvAMA-1.....	34
3.9.3	PvCVC .....	35
<b>3.10</b>	<b>Análise da resposta imune humoral.....</b>	<b>35</b>
3.10.1	ELISA para a detecção de IgG total .....	35
3.10.2	ELISA para a detecção de subclasses de IgG.....	36
<b>3.11</b>	<b>Avaliação dos níveis séricos de citocinas .....</b>	<b>37</b>
3.11.1	Luminex: Dosagem simultânea de múltiplas citocinas (multiplex) presentes no plasma dos indivíduos estudados.....	37
<b>3.12</b>	<b>Armazenamento dos dados e análise estatística .....</b>	<b>38</b>
3.12.1	Teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) .....	38
3.12.2	Teste de Mann Whitney .....	39
3.12.3	Teste de Kruskal-Wallis .....	39
3.12.4	Teste de Spearman .....	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Características gerais da população estudada.....</b>	<b>40</b>
4.1.1	Distribuição de gênero e idade .....	40
4.1.2	Tempo de exposição à malária.....	41
4.1.3	História Progressiva de malária.....	41
<b>4.2</b>	<b>Diagnóstico Parasitológico .....</b>	<b>42</b>
4.2.1	Diagnóstico parasitológico de malária e parasitoses intestinais na população total do estudo.....	42
4.2.2	Diagnóstico parasitológico de malária e parasitoses intestinais nos grupos .....	44
<b>4.3</b>	<b>Avaliação dos dados hematológicos.....</b>	<b>48</b>
4.3.1	Comparação dos valores do eritrograma e plaquetas entre os grupos.....	48
4.3.2	Comparação dos valores do leucograma entre os grupos.....	48
<b>4.4</b>	<b>Resposta imune humoral aos antígenos de <i>P. vivax</i> .....</b>	<b>50</b>
4.4.1	Frequência e magnitude de anticorpos IgG contra as proteínas PvAMA-1, PvMSP-1 e PvCVC em toda população estudada .....	50

4.4.2	Perfil de reconhecimento dos antígenos na população .....	50
4.4.3	Frequência e magnitude de anticorpos IgG contra as proteínas AMA-1, MSP-1 e CVC por grupo .....	51
4.4.4	Perfil de reconhecimento dos antígenos nos grupos .....	54
4.4.5	Prevalência de resposta e IR de anticorpos IgG contra as proteínas estudadas nos indivíduos com e sem <i>Giardia</i> <i>lamblia</i> nos grupos Parasitoses Intestinais e Coinfectado .....	55
4.4.6	Correlações entre os índices de reatividade de anticorpos IgG contra os três antígenos estudados e dados epidemiológicos na população.....	56
4.4.7	Distribuição das subclasses de IgG específicas para as proteínas recombinantes PvAMA-1 e PvMSP-1 na população .....	57
4.4.8	Índice de reatividade das subclasses de IgG contra AMA- 1 e MSP-1 na população .....	58
4.4.9	Distribuição das subclasses de IgG específicas para a proteína recombinante PvAMA-1 nos grupos .....	59
4.4.10	Distribuição das subclasses de IgG específicas para a proteína recombinante PvMSP-1 nos grupos .....	61
4.4.11	Perfil de citocinas séricas circulantes no plasma da população .....	63
4.4.12	Correlações entre os níveis de citocinas e os IRs dos anticorpos .....	64
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>APÊNDICES</b>	<b>96</b>
9.1	Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	96
9.2	Apêndice B: Questionário epidemiológico .....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Esquema representativo do ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp. Adaptado de Centro para Controle de Doenças (CDC – Atlanta), 2005.....	4
Figura 2.2 Áreas de risco de transmissão de malária em 2010. Fonte: WHO, 2011 .....	6
Figura 2.3 Áreas de transmissão de malária no Brasil de acordo com o IPA em 2011. Fonte: Sivep – Malária.....	7
Figura 2.4 Proteínas descritas como candidatas potenciais a compor uma vacina contra a malária em relação a sua expressão durante o ciclo evolutivo. Realçadas nos quadros as proteínas de <i>P. vivax</i> .....	20
Figura 3.1 Localização de Rondônia apresentando os IPAs dos seus municípios em 2010 .....	28
Figura 3.2 Policlínica Ana Adelaide, local onde foi realizado o primeiro trabalho de campo em 2007 .....	29
Figura 3.3 Assentamento Joana D’Arc, local onde foram realizados o segundo e o terceiro trabalhos de campo, mostrando a estrutura das casas e as atividades realizadas durante as visitas aos domicílios .....	30
Figura 3.4 Esquema representativo da formação dos 4 grupos de estudo de acordo com o diagnóstico de malária e parasitoses intestinais.....	33
Figura 3.5 Representação esquemática da PvMSP-1 <sub>19</sub> utilizada neste estudo. Adaptado de Putaporntip et al., 2000 (179). .....	34
Figura 3.6 Representação esquemática da proteína recombinante PvAMA1 utilizada em nosso trabalho. ....	35
Figura 4.1 Frequência de infecções por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> no grupo Malária.....	44
Figura 4.2 Frequência das espécies de parasitos encontradas no grupo Parasitoses Intestinais .....	45
Figura 4.3 Distribuição dos casos de malária e parasitoses intestinais por espécie nos indivíduos do grupo CI.....	46
Figura 4.4 Prevalência de resposta (A) e índice de reatividade (B) de anticorpos IgG contra AMA-1, MSP-1 e CVC de <i>P. vivax</i> . As barras representam a mediana e os intervalos interquartis; *= P<0,05; **=P<0,001 .....	50

<b>Figura 4.5</b> Frequência de resposta de IgG para nenhum e para 1 ou mais antígenos na população total estudada .....	<b>51</b>
<b>Figura 4.6</b> Prevalência e índice de reatividade de anticorpos IgG contra AMA-1. As barras representam a mediana e os intervalos interquartis; *= P<0,05; **=P<0,001; ***=P<0,0001 .....	<b>52</b>
<b>Figura 4.7</b> Prevalência e índice de reatividade de anticorpos IgG contra MSP-1. As barras representam a mediana e os intervalos interquartis; *= P<0,05; **=P<0,001; ***=P<0,0001 .....	<b>53</b>
<b>Figura 4.8</b> Prevalência e índice de reatividade de anticorpos IgG contra CVC. As barras representam a mediana e os intervalos interquartis; *= P<0,05; **=P<0,001; ***=P<0,0001 .....	<b>53</b>
<b>Figura 4.9</b> Frequência de resposta de IgG contra nenhum e contra 1 ou mais antígenos nos quatro grupos.....	<b>55</b>
<b>Figura 4.10</b> IR de anticorpos IgG de acordo com o número de malárias no ano de coleta. As barras representam a mediana e os intervalos interquartis; ***=P<0,0001 .....	<b>57</b>
<b>Figura 4.11</b> Distribuição das subclasses de IgG específicas para as proteínas recombinantes PvAMA-1 e PvMSP-1 na população.....	<b>58</b>
<b>Figura 4.12</b> Prevalência de resposta e índice de reatividade das subclasses de anticorpos IgG anti-AMA-1 em cada grupo. As barras representam mediana e intervalo interquartil; *= P<0,05; **=P<0,001; ***=P<0,0001 .....	<b>60</b>
<b>Figura 4.13</b> Prevalência de resposta e índice de reatividade das subclasses de anticorpos IgG anti-MSP-1 em cada grupo. As barras representam mediana e intervalo interquartil; *= P<0,05; **=P<0,001; ***=P<0,0001 .....	<b>62</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Distribuição da população com relação ao gênero e média de idade .....	40
Tabela 4.2 Tempo de exposição à malária, avaliado através dos anos em área endêmica.....	41
Tabela 4.3 História progressa de malária.....	42
Tabela 4.4 Diagnóstico de malária e parasitoses intestinais na população total de estudo .....	42
Tabela 4.5 Espécies de protozoários e helmintos intestinais encontrados na população estudada.....	43
Tabela 4.6 Descrição das infecções por múltiplas espécies de parasitos intestinais na população total e nos grupos Parasitoses Intestinais e Coinfectado.....	47
Tabela 4.7 Dados do eritrograma dos grupos estudados.....	48
Tabela 4.8 Dados do leucograma de acordo com os grupos.....	49
Tabela 4.9 Prevalência e IR de anticorpos IgG nos indivíduos com e sem <i>G. lamblia</i> nos grupos Parasitoses Intestinais e Coinfectado .....	55
Tabela 4.10 Correlações entre o IR de anticorpos IgG e três parâmetros epidemiológicos .....	56
Tabela 4.11 IR (mediana e intervalo entre o 1º e 3º quartis) de anticorpos IgG de acordo com o número de malárias no ano de coleta.....	57
Tabela 4.12 Índice de reatividade (mediana e intervalo entre o 1º e 3º quartis) das subclasses de IgG contra AMA-1 e MSP-1 na população total do estudo ..	58
Tabela 4.13 Concentração de citocinas e quimiocinas nos grupos estudados.	64
Tabela 4.14 Correlações entre o IR de anticorpos IgG e os níveis séricos das citocinas.....	65

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

ADCC – Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo

ADCI – Inibição Celular Dependente de Anticorpo

AMA – Antígeno de Membrana Apical

CD – Grupo de Diferenciação

CVC – Complexo Caveóla- Vesícula

EGF – Fator de Crescimento da Epiderme

HCV – Vírus da Hepatite C

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IPA – Índice Parasitário Anual

IR – Índice de Reatividade

MCP – Proteína Quimiotática de Monócitos

MIP – Proteína Inflamatória de Macrófagos

MSP – Proteína de Superfície do Merozoíta

NMA – Número de Malárias Anteriores

NMAC – Número de Malárias no Ano de Coleta

RESA – Antígeno de Superfície de Eritrócito Infectado com Trofozoítas em Forma de Anel

TDUM – Tempo Desde a Última Malária

TGF – Fator de Crescimento Tumoral

Th – T auxiliares

TNF – Fator de Necrose Tumoral

WHO – Organização Mundial de Saúde

# INTRODUÇÃO

## 1.1 Características gerais da malária

A malária é uma doença parasitária e vetorial causada por protozoários do gênero *Plasmodium* sp. Das mais de 100 espécies existentes de plasmódio (1), apenas 5 são descritas como capazes de infectar o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, restrita ao oeste da África e *Plasmodium knowlesi*, um plasmódio de símio e presente na Ásia, recentemente descrito como capaz de infectar o ser humano (2). *P. falciparum* e *P. vivax* causam 95% das infecções, onde a primeira espécie está associada a uma forma mais grave da doença enquanto a segunda geralmente causa uma infecção considerada mais branda. Os vetores da malária são fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Aproximadamente 60 espécies de *Anopheles* são transmissoras de malária na natureza (1), sendo *Anopheles gambiae* e *An. darlingi* as principais espécies vetores de malária humana, na África e no Brasil, respectivamente (3,4). Tendo sua ocorrência localizada nas regiões tropicais e subtropicais do planeta a malária permanece como uma doença estritamente ligada à pobreza, uma vez que países que apresentam menor renda *per capita* apresentam também uma maior taxa de mortalidade por malária.

A sintomatologia da malária é caracterizada frequentemente por febres e calafrios, que podem ser acompanhados por dores de cabeça, mialgia, fraqueza, náuseas e vômitos. Também podem estar presentes outros sintomas clínicos tais como esplenomegalia, anemia, trombocitopenia, hipoglicemia, disfunção renal ou pulmonar e alterações neurológicas. O quadro clínico está associado com alguns fatores como a espécie de plasmódio infectante, o nível de parasitemia e resposta imune do paciente.

## 1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium* spp.

O ciclo biológico do plasmódio é complexo e apresenta uma etapa assexuada no hospedeiro vertebrado e outra sexuada no hospedeiro invertebrado. No hospedeiro vertebrado desenvolve uma fase pré-eritrocítica e uma fase eritrocítica.

Durante o repasto sanguíneo, fêmeas de anofelinos infectadas inoculam os esporozoítas na pele. Acreditava-se que esses esporozoítas deixavam rapidamente o local da inoculação, porém estudos com plasmódio de roedor demonstraram que a maioria dos esporozoítas permanece na derme no local da inoculação por horas, ocorrendo uma lenta liberação de parte desses esporozoítas para a circulação sanguínea (5), enquanto outra parte permanece na pele, provavelmente sendo eliminado por fagócitos (6) ou cai na circulação linfática chegando até os linfonodos, onde são degradados (5).

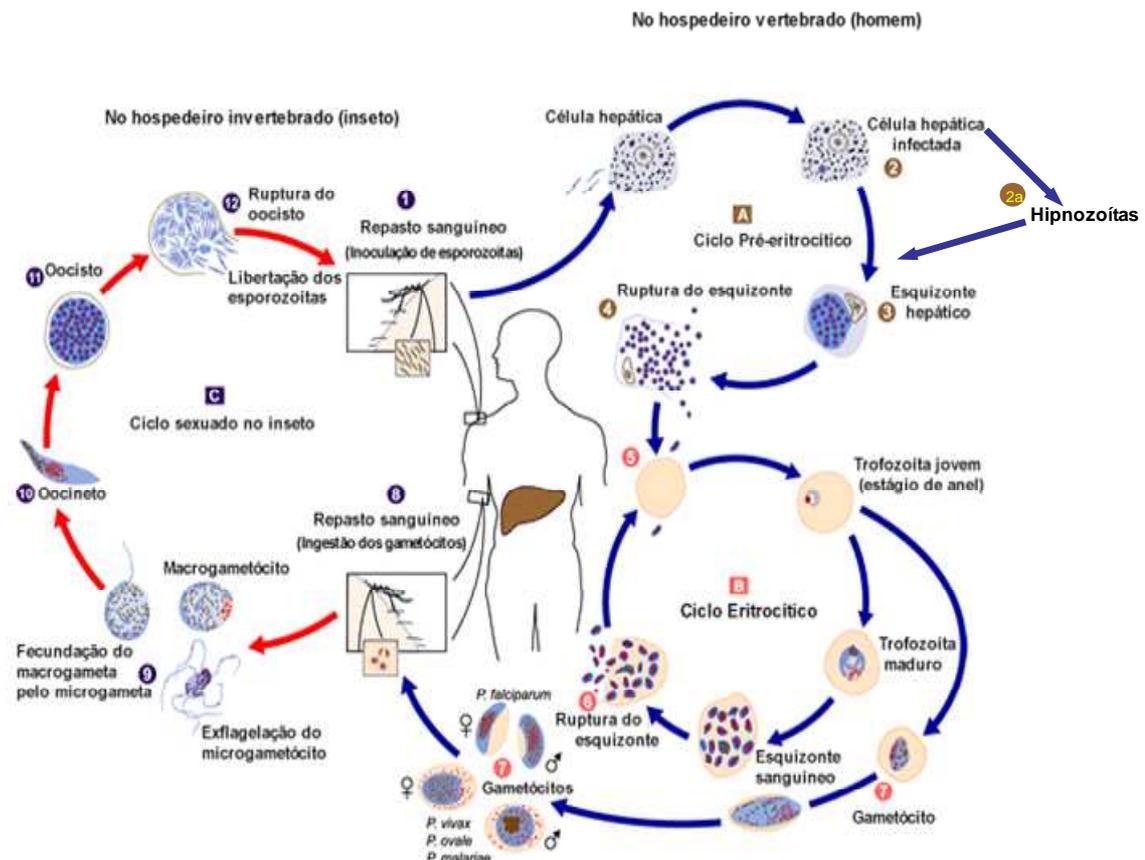
Uma vez na corrente sanguínea os esporozoítas alcançam rapidamente o fígado, primeiramente aderindo ao endotélio dos sinusóides hepáticos e posteriormente cruzando a barreira sinusoidal, provavelmente através das células de Kupffer. No parênquima hepático, esses esporozoítas atravessam ativamente numerosos hepatócitos, até encontrarem um determinado hepatócito final no qual ocorre a formação do vacúolo parasitóforo. Dentro do vacúolo parasitóforo os esporozoítas sofrem diversas transformações até formarem esquizontes hepáticos repletos de merozoítas, em um processo chamado esquizogonia exo-eritrocítica. Nessa fase pré-eritrocítica a infecção é assintomática. Em um dado momento os merozoítas são liberados do esquizonte hepático chegando até a corrente sanguínea, onde encontram e infectam os eritrócitos, iniciando a fase eritrocítica da infecção (7,8). Para *P. vivax* e *P. ovale* alguns esporozoítas podem não se desenvolver e formam um estágio dormente, conhecido como hipnozoíta (9), que pode permanecer no fígado por semanas até anos, e quando reativado provocar recidivas de malária.

A invasão dos merozoítas nos eritrócitos é um processo ativo e complexo que envolve interações moleculares altamente específicas de proteínas ligantes no complexo apical e na superfície do merozoíta com receptores nas membranas das hemácias. Ocorre um reconhecimento inicial e uma ligação reversível do merozoíta com a membrana dos eritrócitos, mediado por uma classe de proteínas de superfície de merozoíta (MSP), principalmente por MSP-1, que interage com a proteína banda 3 na superfície do eritrócito (10); em seguida acontece uma reorientação do merozoíta com uma ligação irreversível, promovida por uma proteína transmembrana, o antígeno 1 de membrana apical (AMA-1) (11). Estas proteínas (MSP e AMA-1) são provavelmente muito importantes na invasão, já que anticorpos direcionados contra elas podem bloquear este processo (11,12). Posteriormente

ocorre a invaginação do merozoíta pela membrana do eritrócito e formação de um novo vacúolo parasitóforo, culminando na invasão propriamente dita. Após a invasão, eritrócitos infectados por *P. vivax*, sofrem alterações em suas membranas plasmáticas apresentando estruturas conhecidas como complexos cavéola-vesícula (CVC) (13). Esses complexos são caracterizados por invaginações (cavéolas) da membrana do eritrócito associadas a diversas vesículas que parecem estar conectadas com a base das depressões caveolares. O principal componente dos complexos cavéola-vesícula é uma proteína de 95kDa predominantemente expressa nestas estruturas pertencente à superfamília PHIST (“*Plasmodium* helical interspersed subtelomeric”) (14).

Dentro da hemácia o parasito se diferencia em trofozoíta jovem, com forma de anel, para em seguida tornar-se um trofozoíta maduro, que passará por um processo de reprodução assexuada formando os esquizontes sanguíneos, que contém aproximadamente 20 merozoítas por esquizonte. Esses esquizontes hemáticos são rompidos e os merozoítas são liberados na corrente sanguínea, infectando novos eritrócitos, repetindo assim o ciclo eritrocítico (7,8). O rompimento das hemácias com a liberação dos merozoítas acontece de maneira sincronizada em intervalos regulares de 48 a 72 horas, dependendo da espécie plasmodial, coincidindo com o aumento da temperatura corporal, febre e aparecimento outras manifestações clínicas características da malária, ao fim de cada ciclo eritrocítico (1).

Em um dado momento, uma pequena proporção dos merozoítas se diferencia em gametócitos femininos (macrogametócitos) e masculinos (microgametócitos) que poderão ser ingeridos durante o repasto sanguíneo de fêmeas de anofelinos, onde ocorre a fase sexuada do ciclo do plasmódio. No intestino do mosquito suscetível os microgametócitos sofrem um processo de exflagelação e tornam-se os microgametas que se fundem aos macrogametas, culminando na fertilização e formação do zigoto. O zigoto transforma-se em oocineto, uma forma móvel, que penetra as células da parede do intestino do mosquito e se desenvolve até oocisto, onde ocorre a esporogonia, com formação de diversos esporozoítas. Quando ocorre a ruptura dos oocistos, os esporozoítas são liberados na hemocele e alcançam as glândulas salivares, tornando estes anofelinos capazes de infectar novos hospedeiros vertebrados e recomeçar o ciclo.



**Figura 2.1** Esquema representativo do ciclo biológico de *Plasmodium* spp. Adaptado de Centro para Controle de Doenças (CDC – Atlanta), 2005

### 1.3 Distribuição da malária no mundo

Mesmo sendo uma doença muito antiga, existindo relatos de episódios febris em manuscritos de antigas civilizações, e apesar dos esforços para o seu controle, a malária permanece como um dos mais graves problemas globais de saúde pública. Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS, ou em inglês WHO) indicam que 3,3 bilhões de pessoas, quase metade da população mundial, estão sob risco de contrair malária, sendo a doença prevalente em torno de 100 países, ocorrendo cerca de 250 milhões de casos, resultando em aproximadamente 1 milhão de mortes. Em 2010, em todo o planeta foram estimados 219 milhões de casos de malária, causando 660 mil mortes (15).

A maior parte dos casos de malária (80%) e 90% das mortes causadas por esta doença acontecem no continente africano, principalmente na região subsaariana, sendo grávidas e crianças menores de 5 anos os principais grupos de risco. Estatísticas alarmantes indicam que a cada minuto uma criança africana morre

em virtude de malária. Apenas 14 países são responsáveis por 80% das mortes estimadas por malária, sendo República Democrática do Congo e Nigéria os países com o maior número de casos fatais dessa doença.

Fora da África as regiões do sudeste da Ásia e do leste do Mediterrâneo detém a maioria dos episódios de malária, correspondendo respectivamente a 13% e 5% dos casos totais do planeta. Nas Américas, em 2010, foram registrados aproximadamente 1,1 milhões de casos estimados de malária, ocorrendo em 21 países, onde Brasil e Colômbia foram juntos responsáveis por 68% dos casos. A maioria dos países americanos apresentou uma tendência de diminuição no número de casos de malária (15).

*P. falciparum* e *P. vivax* são as principais espécies plasmodiais causadoras de malária no mundo. *P. falciparum* é a espécie mais prevalente na África e no mundo, sendo responsável pelas formas mais graves de malária, como a malária cerebral. Já *P. vivax* apresenta maior dispersão, sendo a espécie mais prevalente na Ásia e na América e geralmente associada com formas benignas da infecção (15); entretanto diversos estudos recentes têm relatado quadros graves de malária causada por *P. vivax* com alterações clínicas como insuficiência renal (16), anemia profunda (17), complicações respiratórias e pulmonares (18,19), coma e outras complicações neurológicas (20,21).



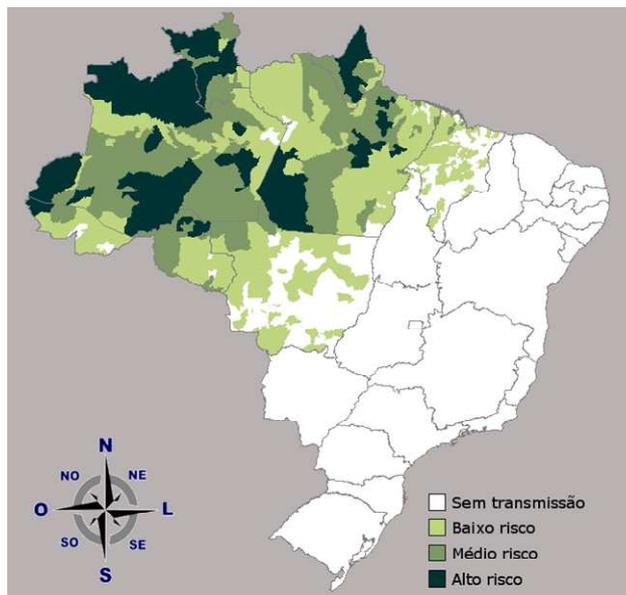
**Figura 2.2 Áreas de risco de transmissão de malária em 2010. Fonte: WHO, 2011**

#### **1.4 Distribuição da malária no Brasil**

O histórico de malária no Brasil mostra que no século passado houve uma grande variação no número de casos de malária por ano, principalmente em virtude das alterações nos programas de controle e erradicação da malária, mas também por conta de outros fatores como movimentos migratórios e ocupação desordenada da região Amazônica. Nesse período houve também mudanças nas frequências das duas principais espécies plasmodiais presentes no país: até o final da década de 1980 as prevalências de *P. vivax* e *P. falciparum* eram semelhantes, em torno de 50% dos casos para cada um dos plasmódios e a partir da década de 1990 *P. vivax* passou a ser a espécie mais prevalente, mantendo-se nessa posição até os dias atuais, sendo responsável por cerca de 84% dos casos registrados de malária em todo o país, enquanto os casos por *P. falciparum* correspondem aos outros 16%. Os casos por *P. malariae* são raramente observados (22).

Atualmente o Brasil é responsável por mais da metade dos casos de malária nas Américas e em 2011 registrou 267.054 casos da doença (23). Mais de 99% dos casos de malária no nosso país ocorrem na Amazônia Legal, região formada pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia,

Roraima e Tocantins, mas mesmo dentro desta região ocorre uma grande variação do Índice Parasitário Anual (número de casos de malária a cada mil habitantes - IPA) entre os municípios (22).



**Figura 2.3** Áreas de transmissão de malária no Brasil de acordo com o IPA em 2011. Fonte: Sivep – Malária

### **1.5 Características gerais da coinfeção de malária com parasitoses intestinais**

Infecções por múltiplos parasitos são comuns na natureza. As taxas de coinfeção dependem da distribuição espacial das condições ambientais que permitem a transmissão dos parasitos, mas também dependem das interações imunológicas e de outros fatores, gerados a partir da infecção pelos parasitos, que possam alterar a susceptibilidade genética ou o comportamento do hospedeiro.

Os parasitos intestinais estão entre os patógenos mais frequentemente encontrados em seres humanos, constituindo agravo importante à saúde. Dentre os helmintos, os mais prevalentes são os nematelmintos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*. Dentre os protozoários destacam-se *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. A Organização Mundial de Saúde estima que existam, em todo o mundo, cerca de 1 milhão de indivíduos infectados por *A. lumbricoides*, sendo apenas pouco menor o contingente infestado por *T. trichiura* e pelos ancilostomídeos. Estima-se, também, que 200 e 500 milhões

de indivíduos, respectivamente, alberguem *G. lamblia* e *E. histolytica*. As parasitoses intestinais, helmintoses e protozooses, caracterizam-se por serem doenças muito comuns em todo o planeta, sendo endêmicas nas regiões tropicais e países em desenvolvimento, constituindo um grande problema de saúde pública (24). Estas áreas endêmicas apresentam características geográficas, climáticas e socioeconômicas que favorecem a existência e manutenção de diversas espécies de parasitos intestinais.

Dessa forma, protozoários do gênero *Plasmodium* sp., agentes etiológicos da malária, e muitas espécies de parasitos intestinais (protozoários e helmintos) compartilham da mesma área de distribuição geográfica, podendo assim ambos os tipos de parasitos coinfectar uma mesma população de hospedeiros. Parasitos que coinfectam um mesmo hospedeiro podem interagir uns com os outros positivamente (facilitação) ou negativamente (competição) através de diferentes mecanismos como competição por fonte de recursos, interações mediadas por via imune e interferência direta (25). Os dados de coinfeção existentes na literatura são focados na coinfeção malária-helminto, não se tendo amplo conhecimento a respeito das coinfeções de plasmódio com protozoários intestinais.

## **1.6 Alterações hematológicas na malária**

Em virtude do plasmódio, na maior parte do seu complexo ciclo de vida, ser um parasito sanguíneo, é compreensível que as infecções maláricas induzam alterações hematológicas. As principais anormalidades hematológicas associadas à malária são anemia e plaquetopenia (ou trombocitopenia) (26). Também existem relatos de outras reações hematológicas em virtude da malária como leucocitose, linfocitose, neutropenia, monocitose (27), leucopenia, neutrofilia (28), eosinofilia (29), eosinopenia (30) e aumento no número de bastões (31). Alguns estudos têm demonstrado resultados contrastantes no que diz respeito às modificações nos parâmetros hematológicos indicando que nem sempre uma mesma alteração hematológica está presente em todos os indivíduos com malária.

A anemia é uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade nas infecções maláricas principalmente nas mulheres grávidas e crianças. A anemia na malária parece ser resultado de um processo multifatorial envolvendo o aumento na remoção dos eritrócitos infectados e não infectados e da diminuição da produção de

eritrócitos na medula óssea (32). *P. falciparum* apresenta maior capacidade de induzir quadros graves de anemia que *P. vivax*, entretanto *P. vivax* também é capaz de causar anemia grave (33).

A plaquetopenia, caracterizada por diminuição no número de plaquetas abaixo de 150.000 células/mm<sup>3</sup>, é uma alteração hematológica bastante comum nos indivíduos com malária, principalmente no início da infecção. A patogênese da plaquetopenia por malária é complexa e deve estar associada a eventos como distúrbios de coagulação, esplenomegalia e destruição das plaquetas por macrófagos, alterações na medula óssea, destruição de plaquetas mediada por anticorpos, estresse oxidativo e agregação plaquetária (34). Apesar de a plaquetopenia ser bastante comum na malária, episódios hemorrágicos são raramente observados e estão associados com trombocitopenia grave ou coagulação intravascular disseminada (35–37).

## **1.7 Imunidade na malária**

A resposta imune desencadeada na malária é complexa e ainda não está completamente esclarecida, mas sabe-se que é espécie e estágio específica, e tendo em vista o complexo ciclo biológico do plasmódio no qual o parasito apresenta estágios de vida antígenicamente distintos, essa resposta envolve uma gama de mecanismos imunológicos que agem contra as diferentes formas do plasmódio (38).

É bem estabelecido na literatura que indivíduos que residem em regiões endêmicas adquirem imunidade para malária através da exposição natural ao plasmódio. Este fenômeno é conhecido como imunidade naturalmente adquirida, caracterizada por ser um estado não estéril de proteção imune contra os parasitos, mantendo baixos os níveis de parasitemia, e contra as manifestações clínicas, tornando-as praticamente ausente. Imunidade naturalmente adquirida é resultado de uma contínua exposição a sucessivas infecções (39).

O sistema imune humano pode atuar contra praticamente qualquer estágio do ciclo de vida do parasito, desde a entrada do esporozoíta até o processo de fertilização dos gametas no intestino do anofelino (40), porém o fenômeno de imunidade naturalmente adquirida parece ter como alvo primário o estágio sanguíneo da infecção (39).

## 1.8 Resposta imune na fase eritrocítica da infecção

A invasão das hemácias pelo plasmódio é um processo chave no estabelecimento da infecção malárica, no qual estão envolvidas diversas proteínas na superfície do merozoíta, como as MSP-1 a 9 e AMA-1 (41). Dessa forma tais proteínas devem ser um importante alvo da resposta imune protetora.

A resposta imune contra os estágios assexuados sanguíneos está associada com a resposta mediada por anticorpos. Estudos de transferência adotiva de soros de indivíduos que apresentavam imunidade naturalmente adquirida contra malária para indivíduos que nunca tiveram contato com o plasmódio demonstraram que aqueles que receberam o soro apresentaram proteção contra a malária clínica ou diminuição na gravidade e carga parasitária da doença (42,43). Estudos como esses demonstraram que os anticorpos desempenham um papel importante na aquisição de imunidade contra a malária clínica.

Além do esporozoíta, o merozoíta é o único estágio no hospedeiro humano no qual o parasito da malária é extracelular, sendo um alvo visível aos anticorpos que podem atuar matando o merozoíta ou inibindo sua adesão, entrada ou desenvolvimento no interior dos eritrócitos. Os anticorpos direcionados aos merozoítas podem atuar de diversas formas: (a) ligando-se as proteínas da superfície do merozoíta responsáveis pela interação entre o parasito e a superfície do eritrócito, assim bloqueando a invasão dos merozoítas nestas células sanguíneas (44); (b) ativando vias do sistema complemento que medeiam a lise da membrana do merozoíta (45); (c) opsonizando os merozoítas facilitando o seu reconhecimento e ingestão pelos macrófagos (46); (d) mediando o processo de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) que causa a morte e remoção do parasito (47). Anticorpos contra as formas eritrocitárias também podem mediar o processo de inibição celular dependente de anticorpo (ADCI), levando à inibição do crescimento do parasito (48). Alguns trabalhos têm sugerido que os níveis de anticorpos contra epitopos de proteínas de invasão como MSP-1, MSP-2 e AMA-1 poderiam ser marcadores de proteção contra malária clínica (49–52), entretanto outros trabalhos não corroboram essas evidências (53–55).

Estudos de ADCI *in vitro* demonstraram que embora os níveis de anticorpos imunoglobulina (Ig)G total anti-*P. falciparum* fossem semelhantes, apenas os anticorpos IgG dos indivíduos que apresentavam proteção clínica de malária

cooperaram eficientemente com os monócitos sanguíneos. Já os anticorpos dos indivíduos não protegidos não foram capazes de realizar essa função evidenciando que a eficiência da resposta não está relacionada somente com a quantidade de anticorpos IgG, mas sim com as subclasses destes anticorpos (56).

Diferentes subclasses de anticorpos IgG podem exercer papéis distintos na resposta imune contra o plasmódio. Trabalhos demonstram que anticorpos protetores parecem atuar em conjunto com alguns tipos celulares efetores, como monócitos, sugerindo sua característica citofílica (57). Dessa forma, os anticorpos citofílicos são os principais componentes de uma resposta imune humoral eficiente onde ocorre a eliminação do parasito. As subclasses citofílicas IgG1 e IgG3 contra antígenos de *P. falciparum* predominam nos indivíduos que apresentam imunidade clínica contra a malária enquanto nos indivíduos que desenvolveram episódios da doença ocorre uma alteração no perfil das subclasses, com predomínio da subclasse não citofílica IgG2 (56).

IgG1 e IgG3 podem se ligar aos antígenos de superfície do eritrócito e auxiliar na fagocitose por meio dos receptores FcγRI e FcγRII, podendo também auxiliar nos processos de ADCC e ADCC (56,58). Mediadores solúveis, provavelmente o fator de necrose tumoral (TNF)-α e óxido nítrico, liberados pelas células efetoras são possivelmente as substâncias que geram o efeito neutralizante na inibição do crescimento do parasito no ADCC e agem bloqueando a divisão celular do parasito no estágio intraeritrocítico (59). Em áreas endêmicas, o predomínio de anticorpos citofílicos está associado com baixa parasitemia e ao baixo risco de ataque clínico de malária (60).

Anticorpos não citofílicos IgG2 e IgG4 podem competir pelos mesmos domínios ou domínios próximos com anticorpos citofílicos, prejudicando as respostas efetoras eficientes de IgG1 e IgG3, causando um certo grau de desequilíbrio, sendo responsáveis pela geração de um estado de resistência ou susceptibilidade a malária (56,61).

Estudos em modelos animais também mostraram que a predominância de anticorpos citofílicos está relacionada com proteção. Em camundongos, anticorpos citofílicos IgG2a estão associados com a proteção contra infecções causadas por *Plasmodium* sp. (62–64). Já em camundongos imunizados com MSP-1<sub>19</sub> observou-se que IgG1 e IgG2 poderiam conferir proteção contra a infecção letal com *Plasmodium yoelii* YM (65).

Entretanto nem todos os estudos associam a presença de anticorpos citofílicos com proteção, pois isto pode ser influenciado por fatores como a cepa e /ou antígenos do parasito utilizados e características genéticas da população estudada. Anticorpos IgG3 direcionados contra os antígenos RESA (antígeno de superfície de eritrócito infectado pelo trofozoíta jovem) e MSP-1 de *P. falciparum* não estavam correlacionados com proteção em Madagascar e Papua Nova Guiné (66), da mesma forma que foram encontrados níveis mais altos de IgG1 contra esses mesmos antígenos em indivíduos não protegidos quando comparados a indivíduos protegidos em Madagascar (67). Com relação a IgG2, um estudo demonstrou associação entre altos níveis dessa subclasse com baixo risco de infecção por *P. falciparum* em crianças com menos de 6 meses de idade (68).

Mesmo com o papel primordial dos anticorpos na imunidade antiparasitária contra as formas eritrocíticas, não se pode desprezar a resposta imune mediada por células nem os mediadores secretados por elas já que esses também participam do processo imune. Estudos realizados em humanos demonstraram que voluntários não imunes e sem história prévia de malária quando inoculados repetidamente com doses ultrabaixas de eritrócitos infectados por *P. falciparum* desenvolveram imunidade protetora frente o desafio com doses infectantes do parasito, e nestes indivíduos não foram observados a presença de parasitos no sangue e tão pouco sintomatologia da doença. Estes indivíduos sadios apresentaram resposta proliferativa de célula T, tanto *cluster of differentiation* CD8+ quanto CD4+ e resposta de citocinas com liberação de interferon (IFN- $\gamma$ ), mas não de interleucina IL-4 e IL-10, além da indução de altas concentrações da atividade da enzima óxido nítrico sintase nas células mononucleares do sangue periférico. Esse mesmo padrão não foi observado em indivíduos naturalmente infectados com *P. falciparum* (69).

Entre os linfócitos T, as células T CD4+ parecem ser as mais importantes no desenvolvimento de imunidade contra o estágio sanguíneo da infecção. Essas células podem se diferenciar em células T helper 1 (Th1) ou Th2 de acordo com o tipo de citocinas secretadas por elas, sendo a manutenção do equilíbrio entre estas duas populações fundamental para a resolução da infecção.

Na fase inicial dos estágios eritrocíticos a resposta do hospedeiro é geralmente acompanhada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , juntamente com uma resposta destacada de IFN- $\gamma$  (70–74), caracterizando um perfil de resposta Th1. Estas citocinas pró-inflamatórias, com exceção do TNF- $\alpha$

(75), parecem atuar juntamente com reativos de nitrogênio e metabólitos de oxigênio na eliminação do parasito e controle da parasitemia (8). Modelos animais de malária em roedor demonstraram que IFN- $\gamma$ , células T CD4+ e células B são necessárias no desenvolvimento de imunidade protetora (76,77). Em um estágio mais tardio da infecção as células T CD4+ mudam seu perfil de resposta Th1 para um perfil com secreção de citocinas do tipo Th2, que providenciam auxílio para as células B na produção de anticorpos (76).

Um estudo de infecção natural em humanos indicou que a fase eritrocítica da malária induziu uma população de células com características de células T regulatórias (78). A indução destas células T regulatórias foi precedida por um aumento nos níveis de fator de crescimento tumoral (TGF)- $\beta$  e correlacionada com a diminuição da produção de citocinas inflamatórias e com aumento na taxa de crescimento do parasito. Assim foi sugerido que tal fenômeno seja utilizado como estratégia de sobrevivência do parasito. Da mesma forma, a infecção de camundongos BALB/C deletados de células T CD4+CD25+ (perfil regulatório) com uma amostra letal de *P. yoelii* protegeu estes camundongos da morte pela infecção, através do controle da parasitemia. Esse estudo indica que a indução de células T regulatórias contribui para a supressão imune e permite o crescimento do parasito (79).

Uma resposta imune inadequada pode resultar em altos níveis de parasitemia e malária grave com complicações como anemia, acidose metabólica e malária cerebral (80). O desenvolvimento da patologia na malária está associado com um desequilíbrio nos níveis das citocinas envolvidas na regulação da resposta inflamatória (81) com conseqüente desequilíbrio nos níveis das citocinas efetoras. Mesmo que as respostas pró-inflamatórias estejam associadas com imunidade protetora contra malária na fase eritrocítica da infecção, superprodução de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  predispõe o indivíduo a desenvolver quadros de exacerbação da doença e patologia grave de malária (80,81). TNF- $\alpha$  e IL-1 são pirógenos endógenos, produzidos por macrófagos ao entrarem em contato com metabólitos do plasmódio, que atuam no centro de regulação do hipotálamo, provocando aumento da temperatura corporal, caracterizando a febre observada na ruptura das hemácias infectadas (82). Assim, a resposta regulatória que parece suprimir a resposta imune e permitir o crescimento do parasito pode também contribuir para o controle da resposta inflamatória e prevenir a malária grave. Além disso, citocinas anti-

inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  e a proporção de IL-10/TNF- $\alpha$  podem ter um efeito protetor contra a patologia da malária, como sugerido por diversos estudos (83,84).

## 1.9 A coinfeção e a resposta imune

Estudos de coinfeção malária-helminto estão direcionados para os mecanismos de interação entre os parasitos por via imunomediada, isto em virtude dos conhecidos efeitos imunomoduladores causados pelos helmintos (85,86). As infecções helmínticas polarizam a resposta do hospedeiro para um perfil imune Th2 caracterizado por altos níveis de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, eosinofilia, altas concentrações no soro de IgE (87,88) e de anticorpos não-citofílicos IgG2, IgG4 e IgM (89). Apesar desta forte resposta Th2, helmintos adultos frequentemente sobrevivem por anos em hospedeiros imunocompetentes, possivelmente através da indução de mecanismos imunorregulatórios. Estes mecanismos incluem a indução de células T regulatórias e modulação de células do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas, o que resulta em ambiente anti-inflamatório caracterizado por níveis aumentados de IL-10 e TGF- $\beta$  (90). Esta rede regulatória no hospedeiro pode ser caracterizada como hiporresponsividade imunológica, a qual protege a eliminação dos helmintos, mas ao mesmo tempo protege o hospedeiro contra a patologia em virtude de uma possível inflamação excessiva (88,91). Esta hiporresponsividade não é direcionada somente contra antígenos dos helmintos, mas parece se estender para antígenos de terceiros. Diversos estudos demonstraram associação negativa entre infecções helmínticas crônicas e reatividade alérgica a alérgenos comuns (92,93). Tratamento com anti-helmíntico em crianças na Venezuela e no Gabão resultou no aumento da atividade atópica a ácaros de poeira doméstica (94,95). Estudos examinando os efeitos das infecções helmínticas na vacinação demonstraram que a resposta imune a vacina pode ser modificada. Por exemplo, infecção crônica com esquistossomo ou com *Onchocerca volvulus* modulou a reatividade imune na vacinação com tétano ou com BCG, resultando em menor resposta anti-vacina (96,97). Infecções com helmintos também alteram a resposta aos vírus: pacientes coinfectados com *Schistosoma mansoni* e vírus da hepatite C (HCV) apresentaram redução na resposta de células T específicas contra HCV comparados aos pacientes infectados somente com o vírus (98). Em modelo animal, camundongos coinfectados com o nematódeo murino

*Litomosoides sigmodontis* e *Leishmania major* possuíam a maior parte da resposta imune contra *Leishmania* inalteradas, mas o aparecimento de lesões foi mais tardio, indicando que a progressão da doença foi influenciada pela presença da infecção helmíntica concomitante (99).

Dessa forma, a resposta imune fortemente regulatória desencadeada pela infecção helmíntica poderia prejudicar a resposta imune Th1 eficaz contra a infecção por plasmódio, o que tornaria o hospedeiro mais suscetível a desenvolver altos níveis de parasitemia e sintomas de malária. Por outro lado, esta resposta regulatória também poderia ter um efeito benéfico ao hospedeiro por diminuir os efeitos nocivos de uma possível reação inflamatória exagerada causada por citocinas do perfil Th1, assim ajudando a controlar a imunopatologia resultante da infecção por plasmódio; neste caso poderia diminuir a probabilidade de desenvolver quadros de malária grave. Além da influência do perfil regulatório das infecções helmínticas na malária, o forte perfil Th2 pode se contrapor ao Th1, pela clássica dicotomia Th1xTh2, podendo também induzir maior produção de anticorpos não citofílicos como IgG4 no lugar dos anticorpos citofílicos, prejudicando a resposta eficiente na diminuição da carga parasitária. Entretanto o real papel desempenhado por helmintos no curso da malária ainda não está esclarecido.

Estudos têm investigado as interações existentes entre o plasmódio e helmintos durante uma coinfeção e demonstrado resultados conflitantes. É sugerido que ocorra tanto a presença de sinergismo quanto de antagonismo nas infecções simultâneas por nematódeos e protozoários (100). Assim, algumas pesquisas realizadas com modelos animais indicaram a existência de efeito facilitador de *Schistosoma* sobre a infecção por *Plasmodium* sp. (101), enquanto outras sugeriram um efeito supressor (102). Alguns estudos epidemiológicos reportaram um efeito protetor da infecção helmíntica sobre a densidade parasitária na infecção por *P. falciparum* ou sobre as manifestações clínicas da doença (103), enquanto outros demonstraram um risco aumentado de infecção por *Plasmodium* sp. ou malária naqueles indivíduos coinfectados com helmintos (104). Estes resultados contraditórios podem ser atribuídos as diferentes espécies de helmintos e fenótipos estudados (clínico ou parasitológico) e as diferentes populações expostas a níveis distintos de transmissão das infecções.

Analisando especificamente a interação de *Ascaris* com *Plasmodium* sp. observaram-se resultados inconclusivos. Um dos primeiros estudos de coinfeção

realizado em populações extremamente malnutridas mostrou que a infecção por *A. lumbricoides* leva à supressão da malária (105). Outro trabalho no Zaire demonstrou uma associação positiva entre a infecção com *A. lumbricoides* e *P. falciparum* (106).

Infecções parasitárias concomitantes podem induzir modificações na resposta imune específica a antígenos de cada patógeno, produzindo assim modificações nas manifestações clínicas das doenças causadas por eles. *Schistosoma* e *Plasmodium* sp. induzem em alguma fase da infecção uma resposta Th2-like e recentemente foi descrito em indivíduos do Quênia, Uganda e Sudão a presença de anticorpos IgG3 que reagem cruzadamente para antígenos de plasmódio e esquistossomo, demonstrando uma forte correlação na resposta desta subclasse de anticorpo para as duas infecções, sugerindo que uma reatividade cruzada de anticorpos contra esquistossomo e plasmódio pode conferir uma proteção a malária nos indivíduos infectados com este helminto (107). Um fenômeno similar pode estar envolvido na coinfeção de *A. lumbricoides* e *P. falciparum*, como sugerido pela demonstração da reatividade de anticorpos aos antígenos de esquistossomo em pacientes com *A. lumbricoides* (108).

Outros trabalhos mostram mudanças na resposta de anticorpos aos antígenos plasmodiais em indivíduos coinfectados com helmintos. Os níveis de anticorpos citofílicos antimaláricos direcionados contra extrato total de *P. falciparum* diminuía proporcionalmente com aumento da infecção por esquistossomo (109). No Senegal, os níveis de anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 específicos para MSP-3 de *P. falciparum*, candidato a uma vacina antimalárica, estavam diminuídos, enquanto os de IgG4 não-citofílico específico para MSP-3 encontravam-se aumentados em portadores de helmintos e *Plasmodium* sp. (110). Indivíduos com malária e portadores de *Schistosoma haematobium* apresentaram menor nível de anticorpos IgG1 específicos aos antígenos MSP-1 e GLURP de *P. falciparum* quando comparados aos indivíduos não infectados por este helminto (111).

A resposta imune contra protozoários intestinais não é tão destacadamente imunorregulatória como a resposta induzida por helmintos, entretanto infecções crônicas por protozoários foram sugeridas como possivelmente associadas ao perfil de resposta imune reguladora do tipo 1 (112). Por exemplo, a resposta imune contra *G. lamblia*, um dos protozoários intestinais mais prevalentes, envolve tanto a resposta celular quanto a humoral. Estudos relatam que os anticorpos contra giárdia atuam ativando a via clássica do sistema complemento que leva à lise do parasito

(113), limitando a invasão dos tecidos pelos trofozoítas de giárdia. Entretanto a defesa mais substancial está na imunidade de mucosa e ação de anticorpos IgA (114). A produção de IL-6 por linfócitos T estava aumentada nos indivíduos com *G. lamblia* comparado aos que não abrigavam esse protozoário. Também ocorreu aumento nos níveis de IL-10 produzido por células da imunidade inata nos indivíduos infectados com altas cargas de *G. lamblia*, tornando possível a ideia de que altas cargas de *G. lamblia* induzam resposta reguladora inata; ambas as estimulações para secreção das duas citocinas foram realizadas com antígenos não pertencentes à giárdia (115). Dessa forma é razoável pensar que as infecções por parasitos intestinais também possa influenciar em outras infecções no mesmo hospedeiro.

Os enteroparasitos podem causar aos seus portadores danos como obstrução intestinal (*A. lumbricoides*), desnutrição (*A. lumbricoides* e *T. trichiura*), quadros de diarreia (*G. lamblia* e *E. histolytica*) e anemia (ancilostomídeos) (24). Os ancilostomídeos causam anemia, entretanto esta alteração hematológica também foi associada com infecção de moderada a alta intensidade de *T. trichiura* (116). O impacto das infecções por *A. lumbricoides* sobre a anemia ainda não está esclarecido. Como a anemia é uma característica hematológica também fortemente associada à malária, diversos trabalhos avaliaram o impacto da coinfeção malária-helminto sobre a anemia nos indivíduos portadores dos dois tipos de parasitos, e alguns destes trabalhos encontraram resultados contrastantes. Em um trabalho realizado em crianças nigerianas, a frequência de anemia nas crianças coinfectadas com *P. falciparum* e *A. lumbricoides* não foi diferente da frequência de indivíduos anêmicos portadores somente de *P. falciparum*, indicando que neste caso a malária é a principal causa de anemia (117). No Zimbábue, a prevalência de anemia no grupo de crianças coinfectadas com *P. falciparum* e helmintos foi maior que no grupo de crianças com somente uma infecção (118). Estudo realizado no estado do Amazonas demonstrou que a concentração de hemoglobina durante o ataque de malária encontrava-se aumentada nas crianças que além da malária por *P. vivax* também estavam infectadas com helmintos intestinais quando comparado as crianças que estavam somente com *P. vivax*, sugerindo que a infecção helmíntica concomitante estava protegendo as crianças de desenvolver anemia (119). As respostas imunorreguladora e Th2 induzidas pelas infecções helmínticas podem

atenuar o perfil Th1 da malária, levando a diminuição da gravidade da anemia malárica, através da secreção de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$ .

A eosinofilia, número de eosinófilos maior que 450 células/mm<sup>3</sup>, é uma alteração hematológica bastante comum nas infecções helmínticas. Geralmente as infecções por protozoários como *Plasmodium* spp., *G. lamblia* e *E. histolytica* não causam eosinofilia (120). Os eosinófilos são estimulados por citocinas específicas como GM-CSF, IL-3 e IL-5. Linfócitos T ativados por infecções parasitárias produzem IL-5, estímulo predominante para eosinofilia que assim como IL-4 levam ao aumento de produção de IgE (121) para a resolução da infecção helmíntica. Mesmo que a eosinofilia não seja uma característica marcante na malária, um estudo demonstrou que indivíduos com infecções assintomáticas por *P. falciparum* apresentavam aumento na frequência de eosinófilos e que durante a fase aguda da malária o número de eosinófilos diminuía, mas ocorria elevação nos níveis plasmáticos de proteína eosinofílica catiônica e proteína X eosinofílica, marcadores de função de eosinófilos. Dessa forma, o menor número de eosinófilos durante a fase aguda da malária seria devido ao sequestro destas células nos tecidos e não em virtude de menor produção de eosinófilos na medula óssea. Assim é possível que os eosinófilos ou seus grânulos protéicos possam participar na resposta contra a malária (122). Assim, nas coinfeções de malária com parasitoses intestinais as alterações nos números de eosinófilos poderiam ter alguma implicação na resposta imune direcionada contra ambos os parasitos.

### **1.10 O desenvolvimento de vacina antimalárica**

Tradicionalmente, as vacinas são derivadas de organismos atenuados ou de preparações antigênicas. Essas vacinas previnem um grande número de infecções por microrganismos que são facilmente cultivados *in vitro*. As características básicas de determinados vírus e bactérias como forma única, número de genes relativamente pequeno e limitadas alterações morfológicas e bioquímicas, facilitam o desenvolvimento de uma resposta imune protetora. Esses fatos fazem com que conceitos gerados pela imunização contra infecções virais e bacterianas não possam ser aplicados a muitas doenças parasitárias (123).

A dificuldade prática de uma vacinação contra a malária com parasitos atenuados ou com preparações antigênicas é, principalmente, devido à necessidade

de cultura dos parasitos, em larga escala e livres de contaminação com componentes celulares do hospedeiro. Além de apresentar um custo relativamente alto, as preparações antigênicas são de difícil reprodutibilidade. Conseqüentemente, o desenvolvimento de uma vacina antimalárica necessita de modernas técnicas como a síntese química ou a tecnologia de DNA recombinante para a produção de antígenos (123).

A estratégia para o desenvolvimento de uma vacina vem focalizando, principalmente, a determinação de antígenos-alvo, essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência do parasito. Sendo assim, os três principais tipos de vacinas que podem ser desenvolvidos são contra os estágios pré-eritrocítico, eritrocítico assexuado e eritrocítico sexuado.

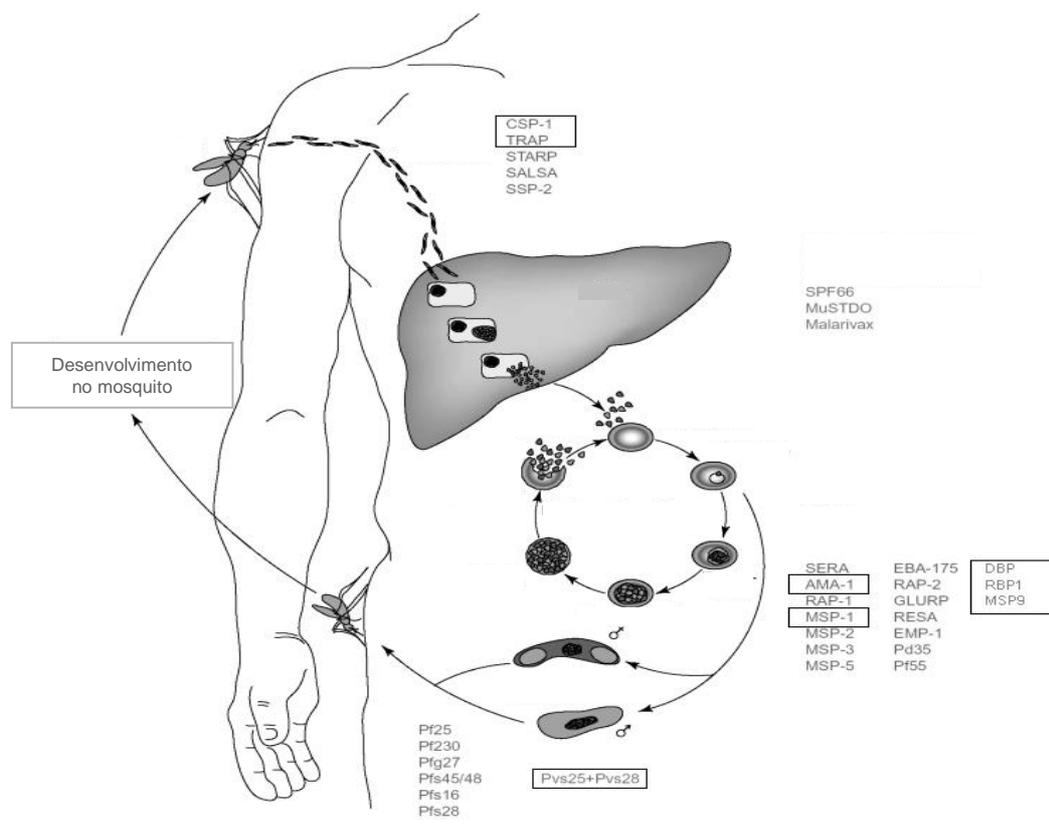
As vacinas contra o estágio pré-eritrocítico, poderiam impedir a penetração do esporozoíta no hepatócito e/ou agir sobre as células hepáticas infectadas, impedindo o desenvolvimento do parasito e, conseqüentemente, a liberação dos merozoítas. Tais vacinas poderiam prevenir tanto o desenvolvimento da doença, visto que os sintomas clínicos só se manifestam durante a fase eritrocítica, quanto a transmissão da malária, já que não haveria a formação de gametócitos.

As vacinas contra o estágio eritrocítico assexuado, não preveniriam a infecção, mas interfeririam no desenvolvimento da doença através da diminuição da carga parasitária impedindo a penetração de merozoítas nas hemácias, a adesão de esquizontes ao endotélio vascular, implicada no desenvolvimento da malária cerebral. Além disso, impediriam a formação de gametócitos e conseqüentemente a transmissão.

Em contraste, as vacinas contra o estágio eritrocítico sexuado, também chamadas de vacinas altruístas, não preveniriam a infecção nem a doença. Entretanto, impediriam o desenvolvimento do parasito no mosquito, bloqueando a transmissão.

Nos últimos 20 anos um progresso significativo tem sido obtido na identificação e caracterização molecular e imunológica de proteínas de vários estágios do *P. falciparum* candidatas a uma vacina. No caso do *P. vivax*, apesar de sua alta prevalência em várias partes do mundo, inclusive no Brasil, a busca de vacinas contra o *P. vivax* é pouco explorada e o número de genes clonados que codificam para proteínas antigenicamente relevantes ainda é pequeno (124) quando comparado ao *P. falciparum*. Uma das razões principais é a falta de um sistema *in*

*vitro* para o cultivo contínuo do *P. vivax*, como já estabelecido para o *P. falciparum*. As dificuldades de manutenção do parasito em cultura se devem ao fato de que o *P. vivax* invade preferencialmente ou quase que exclusivamente reticulócitos os quais normalmente correspondem a apenas 1% da população total de eritrócitos no homem (125,126). Conseqüentemente, a obtenção de reticulócitos em quantidades suficientes para manter um cultivo contínuo no laboratório não é uma tarefa fácil. Por essa razão, os grupos que estudam o *P. vivax* são obrigados a obter parasitos de macacos *Saimiri* sp. infectados com cepas adaptadas para esse animal ou a estudar plasmódios simianos (*P. cynomolgi* e *P. knowlesi*) filogeneticamente mais próximos e com características similares ao *P. vivax* (127).



**Figura 2.4** Proteínas descritas como candidatas potenciais a compor uma vacina contra a malária em relação a sua expressão durante o ciclo evolutivo. Realçadas nos quadros as proteínas de *P. vivax*

## 1.11 Candidatos vacinais utilizados no trabalho

### 1.11.1 AMA-1

O antígeno 1 de membrana apical (AMA-1) é uma proteína de 83 kDa sintetizada por estágios sanguíneos maduros do parasito e também por esporozoítas (128), sendo localizado inicialmente nos micronemas (129,130). A estrutura primária deduzida da sua sequência gênica sugere que AMA-1 apresenta características estruturais de uma proteína integral de membrana tipo 1, com um curto domínio transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática na região C-terminal (131,132). Em todos os genes caracterizados de AMA-1 de *Plasmodium* spp., 16 resíduos invariantes de cisteína estão codificados na região ectoplasmática, e a análise do padrão de pontes dissulfeto sugere uma divisão em três domínios distintos, I, II e III, que são estabilizados, respectivamente, com três, duas e três pontes dissulfeto (133,134). Antes da invasão dos merozoítas nos eritrócitos a proteína AMA-1 é processada em um produto de 66 kDa e então liberada na superfície do merozoíta momentos antes ou durante o processo de invasão (131,133). O grau de conservação constatado entre as sequências dessa proteína implica que sua função biológica seja conservada entre as diferentes espécies de *Plasmodium* spp. (135) e talvez entre outros apicomplexa (136). Acredita-se que uma das suas funções seja facilitar a reorientação do merozoíta após adesão inicial, de modo que as roptrias e os complexos de micronemas sejam expostos na superfície dos eritrócitos durante a invasão do parasito (11,137), ou ainda, iniciar o contato entre o parasito e o eritrócito, ação dependente da ligação de proteínas Duffy (11). Treeck e colaboradores (2009) demonstraram que essa proteína tem um papel essencial no movimento de junção e que a fosforilação do domínio citoplasmático é um pré-requisito para a invasão do parasito no eritrócito (138). Além disso, a análise cristalográfica da AMA-1 de *P. vivax* revelou que os seus domínios I e II são estruturalmente similares entre si e pertencem à superfamília PAN de proteínas. Esses domínios PAN fazem parte de proteínas micronemais de Apicomplexa, que desempenham importante papel na invasão do hospedeiro (131). O potencial antigênico da proteína AMA-1 foi observado, inicialmente, após a imunização de macacos *Rhesus* sp. com a proteína nativa purificada de *P. knowlesi* (PK66), a qual foi capaz de induzir proteção parcial contra infecção (139). Além disso, imunizações experimentais em roedores e primatas, utilizando a proteína

recombinante AMA-1, evidenciaram proteção contra malária (130,140). Ensaios clínicos de Fase 1, realizados em humanos, demonstraram que AMA-1 de *P. falciparum*, expressa tanto em *Pichia pastoris* quanto em *Escherichia coli*, associada a adjuvantes do tipo Alhydrogel ou AS02A, é segura e imunogênica, desencadeando potente resposta humoral, celular e de citocinas do tipo IFN- $\gamma$  e IL-5 quando administrada em indivíduos adultos saudáveis nunca expostos à infecção (141–143). Verificou-se também nesses estudos o desencadeamento de atividade biológica contra malária em ensaio de inibição de invasão *in vitro* (143).

Na África, em estudo soroepidemiológico observou-se que crianças maiores de dois anos e adultos apresentavam anticorpos que reconhecem uma proteína recombinante correspondente a AMA-1 de *P. falciparum*, a PF83 (144). No Quênia, estudo longitudinal realizado em população residente em área endêmica para *P. falciparum* observou uma considerável proporção de indivíduos portadores de anticorpos naturalmente adquiridos e reatividade celular frente à AMA-1 (145).

Dos poucos estudos soroepidemiológicos descritos na literatura, a maioria tem sido realizada em áreas hiperendêmicas e utilizam como alvo a AMA-1 de *P. falciparum*. No Brasil, a resposta contra AMA-1 de *P. vivax* (PvAMA-1) foi avaliada em indivíduos expostos à transmissão em regiões do Estado do Pará; a proteína foi reconhecida por grande parte de indivíduos naturalmente expostos (85%), apresentando predomínio da resposta do tipo IgG1 (146). Outro estudo realizado no Brasil (147) demonstrou que a proteína AMA-1 de *P. vivax* é naturalmente imunogênica em indivíduos que apresentam diferentes graus de exposição à infecção por malária. Neste estudo, observou-se que a prevalência e os níveis de IgG, IgG1 e IgG3 anti-Pv-AMA-1 aumentam com o tempo de exposição à infecção. Além disso, a frequência de resposta positiva e os níveis de IgG foram maiores em áreas onde a prevalência de malária apresentou maior intensidade (147). Com fulcro nessas evidências de alto reconhecimento da proteína PvAMA-1 em indivíduos com diferentes graus de exposição ao *P. vivax*, Múfalo e colaboradores realizaram estudo em que se verificou que a região do domínio II (DII) apresentou semelhança no grau de reconhecimento de anticorpos IgG em indivíduos infectados em comparação aos níveis detectados contra o ectodomínio (AMA-1) (148). Esse mesmo grupo demonstrou a imunogenicidade do DII de PvAMA-1, em conjugação com diferentes formulações de adjuvantes, o que pode indicar que o DII deve continuar sendo avaliado como parte de uma vacina de subunidade (149).

O polimorfismo dessa proteína ocorre de forma não aleatória na região codificadora dentro do ectodomínio, especialmente no domínio I (domínio mais polimórfico), sugerindo que essa região seja o principal alvo da resposta imune (150). Esse polimorfismo pode ser determinante para a morbidade da doença, uma vez que já foi demonstrada forte associação entre a forma clínica e os resíduos Glu187 e Glu243 no gene AMA-1 de *P. falciparum* (151), e entre trombocitopenia e a presença dos resíduos Y193 e S210 (152). Grosso modo, apesar de AMA-1 constituir um alvo potencial para uma vacina protetora contra malária, existem poucos relatos sobre a caracterização da resposta imune de humanos contra esta proteína. A maioria dos estudos até então realizados têm como foco a resposta imune humoral, o que nos leva a acreditar que estudos direcionados para o entendimento da interação entre antígenos vacinais e a resposta imune humoral e também celular do hospedeiro seriam necessários para determinar o papel dessas proteínas na geração de uma resposta imune protetora.

### 1.11.2 MSP-1

A proteína 1 de superfície de merozoítas (MSP-1) tem sido intensivamente estudada como alvo potencial para proteção imune (153). Essa proteína é sintetizada como um precursor de alto peso molecular (180 a 230 kDa) durante a esquizogonia, e é depois processada em quatro principais fragmentos de proteínas de superfície de merozoítas, de aproximadamente 83, 30, 3 e 42 kDa (134). Em um segundo processamento, ocorre a clivagem do fragmento C-terminal do fragmento de 42 kDa em um peptídeo de 33 kDa, que é liberado na circulação, e em outra porção de 19 kDa, que permanece ancorada, via âncora de glicofosfatidilinositol (GPI), sobre a superfície do merozoíta (154). Esses eventos de clivagem parecem ser essenciais para a invasão do parasito (155). Essa proteína de 19 kDa da região C-terminal da MSP-1 (MSP-1<sub>19</sub>) é considerada uma das principais candidatas à vacina contra *Plasmodium* spp. (70).

Embora a função precisa da MSP-1<sub>19</sub> ainda não seja conhecida, a análise estrutural de cristais de MSP-1<sub>19</sub> indica a presença de dois domínios similares ao fator de crescimento epidermal (EGF) (156), sendo que a comparação de sequências sugere que a mesma conformação esteja presente em todas as espécies de *Plasmodium* spp. (157). De fato, a homologia entre MSP-1<sub>19</sub> de *P. vivax*

e *P. falciparum* é estimada em torno de 35%, mas sua função parece ser conservada entre as espécies (158).

Em certas condições a MSP-1<sub>19</sub> pode induzir imunidade em macacos (159) e em camundongos (65,160,161). A vacinação com MSP-1<sub>19</sub> de *P. cynomolgi* foi altamente efetiva, induzindo altos títulos de anticorpos contra merozoítas e reduzindo significativamente a parasitemia após o desafio de macacos com as formas sanguíneas desse parasito (162). Proteção parcial contra a infecção com formas sanguíneas de *P. vivax* também foi obtida em macacos imunizados com a proteína recombinante MSP-1<sub>19</sub> (163). Em humanos, ensaios de fase 1 evidenciaram a segurança e imunogenicidade da MSP-1<sub>19</sub>, na qual a imunização de voluntários não expostos à infecção com diferentes formas alélicas da proteína recombinante induziu altos níveis de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4 e IL-10) antígeno específicos (164). Além disso, altos títulos de anticorpos específicos acompanhados de altos índices de proliferação celular e pronunciada resposta de memória detectada por ELISPOT foram demonstrados para essa proteína (165). De forma geral, altos títulos de anticorpos anti-MSP-1<sub>19</sub> parecem ser essenciais para proteção contra altas parasitemias (70).

A MSP-1<sub>19</sub> apresenta polimorfismos (166–168), apesar do efeito desses na imunidade induzida por vacinas em humanos não ser conhecida (70). A análise da sequência de nucleotídeos da MSP-1<sub>19</sub> de 28 isolados de *P. vivax* no Brasil revelou que as sequências de DNA codificadoras desta proteína são conservadas, não apresentando polimorfismo genético, e que os anticorpos produzidos por indivíduos naturalmente expostos reconhecem predominantemente epitopos conservados presentes em ambas as formas alélicas da proteína (169).

Em contraste com os intensos estudos realizados com MSP-1<sub>19</sub> de *P. falciparum*, poucos estudos são conduzidos utilizando a proteína correspondente de *P. vivax* (170). No Brasil, poucos estudos imunoepidemiológicos têm sido realizados e normalmente são limitados a uma área de transmissão focal (169,171,172). Da mesma forma que para AMA-1, ainda são necessários estudos que demonstrem a interação entre antígenos vacinas com células do hospedeiro e a geração de resposta imune protetora.

### 1.11.3 CVC

Na fase eritrocítica do *P. vivax* as hemácias parasitadas sofrem alterações visíveis por microscopia ótica. Estas alterações morfológicas denominadas de granulação de Shüffner têm sido pouco estudadas e estão associadas a um complexo caveolar formado por vesículas denominado de CVC (Complexo Cavéola-Vesícula). CVC foi primeiramente observada em microscopia eletrônica em 1975 (13) e descrita como vesículas que se estendem pela base da cavéola formada em eritrócitos infectados por *P. vivax* (173). As estruturas caveolares estão abertas para o exterior da célula hospedeira e fisicamente acumula o corante Giemsa formando os grânulos de Schüffner na superfície da membrana do eritrócito infectado (14). Como esse complexo é formado e qual a sua função ainda não é conhecido, porém tem sido sugerida a função de transporte de nutrientes ou liberação de metabólitos do parasito presente na hemácia infectada (13,174,175).

## 1.12 Justificativa

A coinfeção humana por múltiplas espécies de parasitos na natureza é comumente observada e recentes estudos epidemiológicos indicam que essa interação representa um desafio na ecologia de parasitos e na saúde humana.

No homem, têm sido descritas associações da infecção por malária com salmonela, helmintos, HIV e tuberculose (176,177), a maioria em populações africanas. Entretanto, os dados são controversos, alguns mostrando uma maior susceptibilidade, outros menor susceptibilidade ou nenhuma influência na evolução da malária clínica grave ou com acometimento cerebral (178).

Considerando que nas áreas endêmicas de malária no Brasil, a população também esteja exposta a outros patógenos, a nossa hipótese é que a coinfeção de malária com parasitos intestinais (helmintos e protozoários) exista e que essa interação possa causar alterações no balanço entre a resposta imune e a evolução clínica do hospedeiro infectado. Além disso, as pesquisas em vacinas contra a malária precisam levar em consideração a influência do poliparasitismo na imunogenicidade de antígenos candidatos.

Tendo em vista que os trabalhos que abordam as coinfeções entre plasmódio e parasitoses intestinais são raros, e que estes são principalmente voltados para *P. falciparum*, é importante o desenvolvimento de estudos direcionados para *P. vivax*, já que esta espécie é a principal responsável pelos casos de malária no Brasil. É possível que indivíduos coinfectados apresentem alterações na resposta imune específica a um dos patógenos devido à presença do outro. Dessa forma é possível que a coinfeção de *Plasmodium* sp. e parasitos intestinais modifique o perfil de resposta imunológica a determinados antígenos específicos do plasmódio. Esta modificação pode ser relevante em termos de prevenção, vacinação e tratamento já que a resposta imune antimalárica diferenciada em indivíduos coinfectados exigiria a adoção de medidas visando à diminuição dessas modificações. Isto torna os estudos de coinfeção entre os dois parasitos de grande importância no planejamento de ações antimaláricas em áreas endêmicas de *P. vivax*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de alterações no perfil de aspectos hematológicos e da resposta imune humoral à antígenos candidatos a compor uma vacina antimalárica em indivíduos coinfectados com *Plasmodium* spp. e parasitos intestinais (helmintos e protozoários) em populações naturalmente expostas à infecção em uma área rural no município de Porto Velho, Rondônia.

### 2.2 Metas

- Verificar a presença e prevalência da coinfecção de *Plasmodium* spp. e parasitos intestinais frequentes no estado de Rondônia;
- Investigar os aspectos epidemiológicos mais importantes na malária e na associação com parasitoses intestinais;
- Determinar as alterações hematológicas nos elementos figurados do sangue periférico (anemia, leucopenia, plaquetopenia, entre outras) associadas à coinfecção;
- Avaliar a resposta imune humoral contra antígenos de *P. vivax* candidatos a compor uma vacina antimalárica (AMA-1 e MSP-1<sub>19</sub>) e contra a proteína CVC e a influência da coinfecção com parasitos intestinais nessa resposta.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo

O presente estudo foi realizado no município de Porto Velho, capital do estado de Rondônia. Rondônia possui 52 municípios e extensão geográfica de 237.590 km<sup>2</sup>, com população de aproximadamente 1.562.409 habitantes, segundo dados do IBGE de 2010, pertencendo à região Norte do Brasil e fazendo parte da Amazônia Legal (Figura 3.1).

A malária permanece como uma doença endêmica na região Amazônica, considerando-se que 99% dos casos de malária no país ocorrem nessa região. Rondônia registrou 30.371 casos de malária em 2011, sendo o terceiro estado com maior número de casos no Brasil e apresentando IPA igual a 48,41, 27,53 e 22,5 nos anos de 2007, 2010 e 2011, anos em que foram realizadas as coletas do material analisado.



**Figura 3.1 Localização de Rondônia apresentando os IPAs dos seus municípios em 2010**

O assentamento Joana D'arc está localizado na área rural do município de Porto Velho (aproximadamente a 100 km do centro), e apesar de existir a pelo menos 10 anos e possuir cerca de 1400 famílias assentadas apresenta infraestrutura precária e serviço de saúde limitado, com apenas um posto de

atenção básica e um laboratório para atendimento dos casos de malária, mas não possui nenhuma medida para conter os problemas de saúde local. A fonte de renda dos moradores provém da agricultura e pequena pecuária voltada para fabricação de queijos. A presença de todos os fatores determinantes como clima e a presença de criadouros de mosquitos do gênero *Anopheles* condicionam a presença da malária na área. Como agravante, as casas ficam muito próximas da floresta e de coleções de água e muitas delas apresentam estrutura aberta proporcionando um contato intenso dos moradores com os anofelinos presentes no local. Não há saneamento básico no assentamento e as casas não possuem nem mesmo banheiro, o que aumenta a possibilidade dos habitantes contraírem parasitoses intestinais.

Foram realizados três trabalhos de campo em diferentes épocas: o primeiro entre julho e setembro de 2007, constituindo uma coleta passiva, onde os indivíduos buscavam atendimento no posto de diagnóstico de malária da Policlínica Ana Adelaide, unidade da secretaria estadual de saúde de Rondônia (Figura 3.2); e os outros dois trabalhos de campo realizados entre junho e julho de 2010 e maio e junho de 2011, caracterizados por uma busca ativa de casos nas residências do assentamento Joana D'arc (Figura 3.3).



**Figura 3.2 Policlínica Ana Adelaide, local onde foi realizado o primeiro trabalho de campo em 2007**



**Figura 3.3 Assentamento Joana D'Arc, local onde foram realizados o segundo e o terceiro trabalhos de campo, mostrando a estrutura das casas e as atividades realizadas durante as visitas aos domicílios**

### **3.2 Voluntários**

Foram considerados elegíveis para o nosso estudo pessoas com mais de 10 anos de idade, moradores da região de Porto Velho com exceção de indivíduos pertencentes a populações indígenas, deficientes intelectuais, grávidas e

parturientes. Foram coletadas amostras de 280 indivíduos. Na primeira coleta, realizada na Policlínica Ana Adelaide, participaram do estudo 46 indivíduos com diagnóstico positivo de malária. Nas outras duas coletas foram coletadas amostras de 234 indivíduos presentes nas residências e que aceitaram participar de nosso estudo. Para todos os 280 indivíduos participantes do presente estudo no momento da coleta de sangue foram realizados gota espessa e distensão sanguínea para diagnóstico de malária e exame parasitológico de fezes para a detecção de parasitoses intestinais. Os indivíduos que apresentaram diagnóstico parasitológico positivo para malária ou para parasitoses intestinais receberam tratamento terapêutico específico para a eliminação da infecção.

Os voluntários do estudo foram informados sobre como ocorre à transmissão de malária, os seus métodos profiláticos e o projeto de pesquisa em desenvolvimento, leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido que formaliza a participação do indivíduo na presente pesquisa em realização (Apêndice A). Após a confirmação da participação no estudo, os indivíduos eram submetidos a uma entrevista onde respondiam a um questionário para obtenção de dados gerais como nome e idade e dados de caráter epidemiológico, como tempo de residência em área endêmica de malária, tempo desde a última malária, número de malárias anteriores, dentre outros (Apêndice B).

Este estudo obteve duas aprovações no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FIOCRUZ) sob os números 354/06 e 492/08.

### **3.3 Coleta de sangue**

Após a assinatura do termo de consentimento de participação no projeto de pesquisa, foram coletadas amostras de sangue por punção endovenosa com o sistema a vácuo de coleta, utilizando tubos do tipo *vacutainer* (Becton Dickison and Company, Franklin Lakes, USA) com heparina (20 mL de sangue) para a obtenção do plasma e tubos *vacutainer* com EDTA (10 mL de sangue) para obtenção de sangue total para realização do hemograma e futuros estudos, em cada paciente. No campo, em Porto Velho, as amostras de sangue foram processadas e os plasmas separados, congelados a -20°C e transportados em gelo seco para o Laboratório de Imunoparasitologia, IOC, FIOCRUZ, no Rio de Janeiro.

### **3.4 Diagnóstico parasitológico de malária**

O diagnóstico parasitológico de malária foi realizado através de lâminas de distensão sanguínea e gota espessa coradas pelo *Giemsa* (Sigma Chemical CO, St Louis, USA) e analisadas por microscopistas experientes. Este diagnóstico foi feito em todos os indivíduos que queriam realizar o exame, mesmo naqueles que não participaram do estudo. A parasitemia foi calculada através do método da gota espessa a partir da contagem do número de parasitos (considerando todas as espécies e estágios presentes) em 500 leucócitos, posteriormente ajustando para um valor final de parasitemia que leva em conta que o número médio de leucócitos é igual a 6000.

### **3.5 Exame parasitológico de fezes**

Uma amostra de fezes de cada um dos voluntários do estudo foi encaminhada para o Laboratório de Análises Clínicas São Lucas, localizado em Porto Velho, para a realização do exame parasitológico de fezes. Foi utilizado o método de sedimentação espontânea que consistiu na mistura das fezes com água, filtração em gaze cirúrgica e repouso do material por ao menos 2 horas para a sedimentação dos restos fecais; após esse período uma porção do sedimento foi colocada em lâmina de vidro, adicionado lugol e coberto com lamínula e observado em microscópio. Outra técnica utilizada foi sedimentação por centrifugação em éter onde a amostra fecal foi homogeneizada com formol 10%, filtrada e éter-sulfúrico foi adicionado a mistura, que posteriormente foi centrifugada por 1 minuto a 1500 RPM e o sedimentado resultante misturado a solução salina e/ou lugol, que então foi colocado em lâmina e coberto por lamínula para visualização no microscópio ótico. Ambas as abordagens foram utilizadas para a identificação de ovos e larvas de helmintos e cistos e oocistos de protozoários intestinais.

### **3.6 Cálculo amostral**

Como não se tem dados de coinfeção na área estudada, o calculo amostral foi baseado nas infecções a serem estudadas. Utilizamos o calculo amostral para

proporção para uma prevalência de 0,5, significância de 5%, erro absoluto de 0,1 e 20% de perdas. O total de amostras necessária para o estudo foram 274.

### 3.7 Formação dos grupos de estudo em relação ao diagnóstico parasitológico

A partir dos diagnósticos de malária e parasitoses intestinais foram formados os quatro grupos de estudo: **grupo Malária (M)**, formado por indivíduos com diagnóstico positivo de malária somente; **grupo Parasitoses Intestinais (PI)**, composto por indivíduos com diagnóstico positivo de parasitoses intestinais somente; **grupo Coinfectado (CI)**, formado por indivíduos com diagnóstico positivo tanto de malária quanto de parasitoses intestinais e **grupo Exposto (E)**, composto por pessoas com diagnóstico negativo de malária e de parasitoses intestinais. As análises foram realizadas comparando-se as diferenças em cada um dos parâmetros a frente estudados (Figura 3.4).

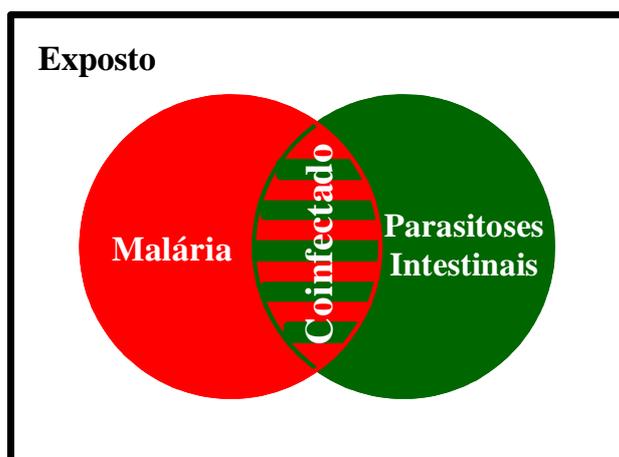


Figura 3.4 Esquema representativo da formação dos 4 grupos de estudo de acordo com o diagnóstico de malária e parasitoses intestinais

### 3.8 Exames hematológicos

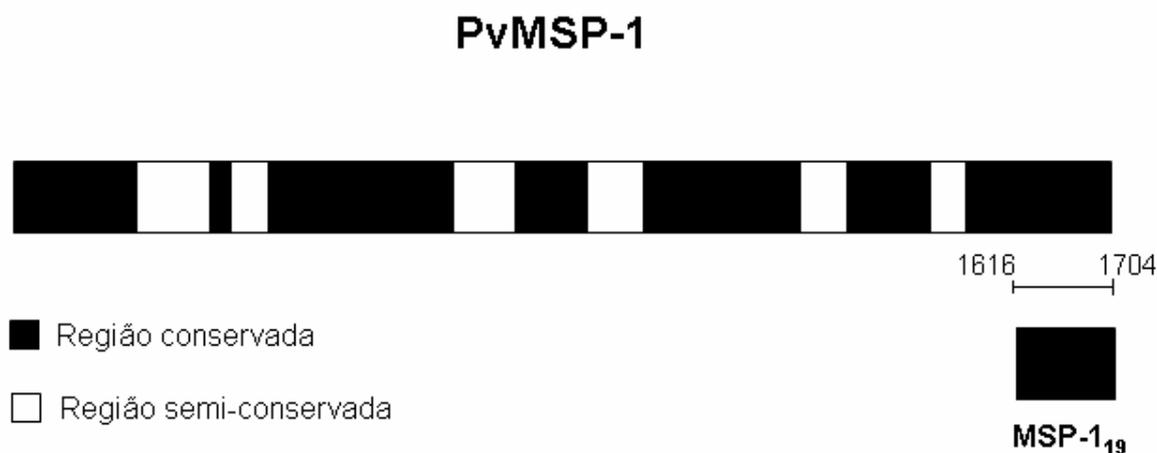
Uma amostra de sangue de cada participante do estudo foi enviada para o Laboratório de Análises Clínicas São Lucas, localizado em Porto Velho, para a realização do hemograma completo, onde foram quantificados os seguintes parâmetros: concentração de hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume globular

médio (VGM – dg/dL), hemoglobina globular média (HGM – pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM - %), índice de anisocitose (%), número de hemácias (milhões/mm<sup>3</sup>), plaquetas (mil/mm<sup>3</sup>), leucócitos, neutrófilos, metamielócitos, bastões, segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos típicos e atípicos, monócitos e reticulócitos (células/mm<sup>3</sup>).

### 3.9 Proteínas Recombinantes

#### 3.9.1 PvMSP-1

As proteínas recombinantes representando o fragmento de 19 kDa da região C-terminal da Proteína 1 de Superfície de Merozoíta (aa 1616 – 1704) foram produzidas e expressas em *Escherichia coli* e gentilmente cedidas pelo Dr. Maurício Rodrigues (Figura 3.5).



**Figura 3.5 Representação esquemática da PvMSP-1<sub>19</sub> utilizada neste estudo. Adaptado de Putaporntip et al., 2000 (179).**

#### 3.9.2 PvAMA-1

As proteínas recombinantes, representando regiões codificadoras dos domínios I, II e III do Antígeno Apical de Membrana Pv-AMA-1 (aa 43–487), como representado na Figura 3.6, foram produzidas em *E. coli* a partir do vetor de expressão pET-22b no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo e gentilmente cedidas pela Dra. Irene Soares.



**Figura 3.6** Representação esquemática da proteína recombinante PvAMA1 utilizada em nosso trabalho.

### 3.9.3 PvCVC

A proteína recombinante PvHIST/85-CVC representando a proteína do complexo caveolar formado por vesículas denominado de CVC foi produzida na Emory University e gentilmente cedidas pela Dra. Mary Galinski.

## 3.10 Análise da resposta imune humoral

A resposta imune humoral dos participantes do estudo foi avaliada através da reatividade de anticorpos IgG e suas subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) presentes no plasma contra as proteínas antigênicas candidatas vacinais AMA-1, MSP-1 e CVC de *P. vivax*. Somente os indivíduos que apresentaram resposta positiva de IgG total tiveram seus plasmas testados para as subclasses de IgG.

### 3.10.1 ELISA para a detecção de IgG total

Placas de 96 poços (*Nunc/Maxicorp*) foram sensibilizadas por 12 a 16h a 4°C com 200 ng da proteína recombinante (AMA-1, MSP-1<sub>19</sub> ou CVC) diluídos em tampão fosfato-salino (PBS). Após esse período as placas foram lavadas 3x com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBS-tween) e bloqueadas com 200 µL por poço de PBS-tween com 5% de leite desnatado (PBS-molico) por 1h. Então, novamente as placas foram lavadas 3x com PBS-tween e incubadas com o soro diluído em PBS-molico na proporção de 1:100 por 1h a 37°C, onde cada soro foi testado em duplicata. Após outras 3 lavagens com PBS-tween, as placas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-IgG conjugado a peroxidase (Sigma) diluído em PBS-molico na proporção de 1:1000 por 1h a 37°C. Depois de mais um ciclo de lavagens foi feita a revelação das placas, a partir da incubação com solução reveladora contendo OPD (O-fenilenediamina 1-2 Benediamina – Sigma), tampão

citrato-fosfato ( $C_6H_8O_7$  e  $Na_2HPO_4$ , pH=5,0) e  $H_2O_2$  por 3 a 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida a reação de revelação foi paralisada com  $H_2SO_4$  2N. As leituras das densidades ópticas (DOs) foram realizadas a 492 nm no leitor de ELISA (Modelo Biotek ELx800) do Laboratório de Imunoparasitologia.

Em cada placa foram colocados soros-padrão reativos (controle positivo do experimento) e soros-padrão não reativos de indivíduos moradores de áreas não endêmicas de malária que nunca contraíram a doença (controle negativo do experimento). Em cada experimento foi calculada a média das DOs dos controles negativos e três desvios-padrão foram somados a esta média, obtendo-se assim o valor do *cut-off*. As médias das DOs das duplicatas de cada soro foram divididas pelo *cut-off* do experimento e o valor desta razão foi chamado de **Índice de Reatividade** (IR). Soros com índice de reatividade maior que 1 foram considerados positivos, ou seja, apresentavam resposta positiva de anticorpos IgG contra o antígeno testado.

### 3.10.2 ELISA para a detecção de subclasses de IgG

Placas de 96 poços foram sensibilizadas por 12 a 16h a 4°C com 200 ng da proteína recombinante (AMA-1 ou MSP-1<sub>19</sub>) diluídos em tampão fosfato-salino (PBS). Neste mesmo período parte da placa foi sensibilizada com uma das subclasses de IgG purificada (IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 - Sigma) para a realização da curva-padrão, iniciada na concentração de 16 µg/mL da subclasse, diluída seriadamente em PBS e finalizada na concentração de 0,0075 µg/mL. Após a sensibilização, as placas foram lavadas 3x com PBS-tween e bloqueadas com 200 µL por poço de PBS-molico por 1h. Após o bloqueio as placas foram lavadas mais 3x com PBS-tween e incubadas com soro diluído em PBS-molico na proporção de 1:100 por 1h a 37°C, onde o soro de cada voluntário foi testado em duplicata. Para a detecção das subclasses de IgG, após outras 3 lavagens com PBS-tween, as placas foram incubadas com cada um dos anticorpos monoclonais conjugados a peroxidase (Sigma) anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti IgG4 diluídos em PBS-molico na proporção de 1:1000 por 1h a 37°C. Depois de mais um ciclo de lavagens foi feita a revelação das placas, a partir da incubação por 3 a 5 minutos à temperatura ambiente com solução reveladora contendo o substrato OPD (O-fenilenediamina 1-2 Benediamina – Sigma), tampão citrato-fosfato ( $C_6H_8O_7$  e  $Na_2HPO_4$ , pH=5,0) e  $H_2O_2$ ; a reação de revelação foi paralisada com  $H_2SO_4$  2N. As leituras das densidades

ópticas (DOs) foram realizadas a 492 nm no leitor de ELISA (Biotek Modelo ELx800) do Laboratório de Imunoparasitologia.

Em cada placa foram colocados soros-padrão reativos (controle positivo do experimento) e soros-padrão não reativos de indivíduos moradores de áreas não endêmicas de malária que nunca contraíram a doença (controle negativo do experimento). Para cada uma das subclasses, em cada experimento foi calculada a média das DOs dos controles negativos e três desvios-padrão foram somados a esta média, obtendo-se assim o valor do *cut-off* da subclasse. As médias das DOs das duplicatas de cada soro foram divididas pelo *cut-off* encontrando-se o valor do índice de reatividade. Soros com índice de reatividade maior que 1 foram considerados positivos para a subclasse de IgG, ou seja, apresentavam resposta positiva da determinada subclasse de IgG estudada contra o antígeno testado.

Os testes para detecção das subclasses de IgG para as proteínas PvAMA-1 e PvMSP-1 foram realizados nos indivíduos que apresentaram resposta IgG positiva para os antígenos. Não foram realizados testes de detecção de subclasses de IgG anti-CVC, mas serão realizados futuramente.

### **3.11 Avaliação dos níveis séricos de citocinas**

#### **3.11.1 Luminex: Dosagem simultânea de múltiplas citocinas (multiplex) presentes no plasma dos indivíduos estudados**

Os níveis séricos de seis citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) e 3 quimiocinas (IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) foram avaliados utilizando o Kit comercial (17-plex human cytokine panel, Bio-Rad, EUA).

Placas de 96-poços com fundo chato foram pré-umedecidas com 100  $\mu$ L do “tampão de ensaio”, sendo a solução aspirada em seguida, utilizando uma sucção a vácuo (Millipore Corporation, Billerica, EUA). Após essa etapa, 50  $\mu$ L das microesferas revestidas com anticorpos monoclonais para a detecção das citocinas e quimiocinas mencionadas acima foram adicionadas aos poços, sendo a placa aspirada a vácuo logo após com ajuda de lavador de placas com base magnética.

Em seguida, de acordo com instruções do kit, a placa foi lavada com o tampão de lavagem fornecido pelo kit, aspirada a vácuo, e então, 50  $\mu$ L das amostras das curvas-padrão de cada citocina avaliada, em concentrações variando de 32.000 a

1,95 pg/mL para elaboração das respectivas curvas, e 50 µL de plasma não diluído de cada indivíduo, foram adicionados aos seus poços correspondentes na placa, que foi então incubada no escuro, sob leve agitação por 30 minutos, e em seguida novamente submetida à sucção a vácuo.

Após nova lavagem, 25 µL de anticorpos de detecção, diluídos conforme orientação do fabricante, foram adicionados em cada poço e incubados por 30 minutos no escuro e sob leve agitação. Então a placa foi novamente lavada com o tampão de lavagem fornecido pelo kit. Por fim, a placa foi incubada com 50 µL por poço de estreptavidina conjugada a ficoeritrina (PE), por 10 minutos no escuro sob leve agitação, quando, após nova lavagem e aspiração, foram adicionados 125 µL de “tampão de ensaio” a cada poço, para análise no leitor de Luminex (Luminex 200™, Luminex®, Austin, TX, EUA). As concentrações de cada parâmetro analisado nas amostras de plasma foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando o software Milliplex Analyst, (Millipore Corporation, Billerica, EUA). Os níveis séricos das citocinas foram expressos como picogramas por mililitro (pg/mL).

### **3.12 Armazenamento dos dados e análise estatística**

Os dados epidemiológicos obtidos a partir do questionário, os resultados dos exames hematológicos e dos experimentos de resposta imune humoral, assim como os níveis séricos das citocinas e quimiocinas de cada voluntário foram armazenados no banco de dados do programa Epi-info versão 3.2. A análise estatística dos dados foi realizada através do programa *GraphPad Prism* versão 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e foram consideradas como estatisticamente significativas alterações com  $P < 0,05$ . Os testes estatísticos utilizados foram escolhidos considerando-se o tipo e tamanho de cada variável e o número de grupos avaliados.

#### **3.12.1 Teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ )**

O teste do qui-quadrado é um método estatístico para  $n$  amostras independentes, cujas proporções observadas nas diversas modalidades estão dispostas em tabelas de contingência, sendo os valores esperados deduzidos matematicamente, e onde se procura determinar se as proporções observadas nas diferentes categorias são independentes ou estão associadas. Esse teste foi

utilizado na avaliação de proporções e de frequências das variáveis entre os grupos estudados.

### **3.12.2 Teste de Mann Whitney**

O teste estatístico não paramétrico de Mann Whitney foi utilizado na comparação das medianas entre duas variáveis não pareadas, ou seja, variáveis independentes, com os mesmos tamanhos ou desiguais, utilizados aqui na avaliação dos IRs de IgG entre os indivíduos que não tiveram malária e aqueles que tiveram uma ou mais malária no ano de coleta.

### **3.12.3 Teste de Kruskal-Wallis**

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado na avaliação estatística das diferenças existentes entre as variâncias de três ou mais grupos não homogêneos. Este teste foi utilizado, por exemplo, na comparação dos IRs de IgG entre os 4 grupos formados.

### **3.12.4 Teste de Spearman**

O teste não paramétrico de Spearman foi utilizado na avaliação de associações entre duas variáveis mensuradas ordinais e do mesmo tamanho, sendo a correlação calculada pelo coeficiente de Spearman ( $r^2$ ). Neste estudo utilizamos este teste para correlacionar os valores de IR de IgG com os parâmetros epidemiológicos e com os níveis de citocinas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características gerais da população estudada

Neste trabalho, foram estudados 280 indivíduos de área rural do município de Porto Velho, Estado de Rondônia. O grupo **Malária** foi composto por 24 indivíduos (8,6% da população estudada); o grupo **Parasitoses Intestinais** foi formado por 101 pessoas (36,1%); o grupo **Coinfectado** foi composto por 45 voluntários (16,1%) e o grupo **Exposto** por 110 voluntários (39,2%).

#### 4.1.1 Distribuição de gênero e idade

Os indivíduos estudados foram avaliados quanto à distribuição do gênero e idade nos grupos, conforme descrito na Tabela 4.1. Embora tenhamos observado uma clara prevalência de indivíduos do sexo masculino nos grupos Malária e Coinfectado, sendo a proporção de masculino/feminino maior no grupo Coinfectado, não foram observadas diferenças significativas na distribuição dos indivíduos quanto ao gênero, entre os grupos Parasitoses Intestinais e Expostos. Em relação à idade, a população de estudo encontra-se distribuída entre 10 a 71 anos, não existindo diferença significativa entre os grupos ( $P=0,5553$ ), com medianas entre 27 e 32 anos.

**Tabela 4.1 Distribuição da população com relação ao gênero e média de idade**

	<b>Malária</b> N=24	<b>Parasitoses</b> <b>Intestinais</b> N=101	<b>Coinfectado</b> N=45	<b>Exposto</b> N=110
<b>Gênero</b>				
<b>Feminino</b>	9	51	12	58
[n (%)]	(37,5%)	(49,5%)	(26,7%)	(52,7%)
<b>Masculino</b>	15	50	33	52
[n (%)]	(62,5%)	(50,5%)	(73,3%)	(47,3%)
<b>Idade</b>	27	30	32	29,5
[X (Iq1-Iq3)]	(22,75-40,5)	(14-43)	(22-42)	(14-38,75)

N= Número total de indivíduos em cada grupo; [n/(%)] = número (porcentagem) de indivíduos de cada gênero; [X (Iq1-Iq3)] = Mediana e (Intervalo entre o 1º e 3º quartis)

#### 4.1.2 Tempo de exposição à malária

Para avaliação do tempo de exposição à malária foram utilizadas informações obtidas no questionário epidemiológico: tempo de residência em áreas endêmicas de malária e no estado de Rondônia. Conforme demonstrado na Tabela 4.2, o tempo de residência em área endêmica de malária e em Rondônia, parâmetros associados ao tempo de exposição à malária, não diferiram entre os grupos ( $P=0,5$ ), sendo o tempo médio de residência em área endêmica de pelo menos 23 anos.

**Tabela 4.2 Tempo de exposição à malária, avaliado através dos anos em área endêmica**

Tempo de residência	Malária N=24	Parasitoses Intestinais N=101	Coinfectado N=45	Exposto N=110
<b>Em áreas endêmicas</b> [X (Iq1-Iq3)]	23 (18-28)	24 (14-35)	24 (19-33)	25 (13-32)
<b>Em Rondônia</b> [X (Iq1-Iq3)]	22,5 (13,25-28)	19 (12-30)	23 (16-28)	24 (13-31)

N= Número total de indivíduos em cada grupo; [X (Iq1-Iq3)]= Mediana e (Intervalo entre o 1º e 3º quartis)

#### 4.1.3 História Progressiva de malária

A história progressiva de malária na população de área endêmica foi avaliada com base em dados relatados pelos indivíduos, referentes aos resultados positivos ao exame parasitológico direto (gota espessa), realizado nos postos de atendimento da Secretaria de Saúde ou nos laboratórios locais. Deste modo, analisamos o número de malárias anteriores (NMA), o tempo desde a última malária (TDUM) e o número de malárias no ano de coleta (NMAC). Conforme demonstrado na Tabela 4.3, a mediana do NMA mostrou-se semelhante entre os quatro grupos, já que não houve diferença estatística entre eles ( $P=0,093$ ). TDUM foi maior nos grupos Parasitoses Intestinais e Exposto ( $P<0,0001$ ) visto que os grupos Malária e Coinfectado se encontravam com malária no momento da coleta. Os grupos Malária e Coinfectado também apresentaram maior número de malárias no ano de coleta de nosso estudo.

**Tabela 4.3 História progressa de malária**

	<b>Malária N=24</b>	<b>Parasitoses Intestinais N=101</b>	<b>Coinfectado N=45</b>	<b>Exposto N=110</b>
<b>Tempo desde a última malária (meses) [X (Iq1-Iq3)]</b>	0 (0-0)	24 (12-60)	0 (0-0)	13 (3,5-48)
<b>Número de malárias anteriores [X (Iq1-Iq3)]</b>	5 (2-10)	5 (2-15)	4 (1-10)	5 (2-15)
<b>Número de malárias no ano de coleta [X (Iq1-Iq3)]</b>	1 (1-4)	0 (0-0)	1 (1-2,75)	0 (0-1)

N= Número total de indivíduos em cada grupo; [X (Iq1-Iq3)]= Mediana e (Intervalo entre o 1º e 3º quartis)

## 4.2 Diagnóstico Parasitológico

### 4.2.1 Diagnóstico parasitológico de malária e parasitoses intestinais na população total do estudo

Avaliando a prevalência de malária na população como um todo (n=280), constatamos que 24,6% dos indivíduos estavam com malária no momento da coleta, sendo 79,7% destes infectados com *P. vivax* e 20,3% com *P. falciparum*. A prevalência de parasitoses intestinais foi de 52,1%, sendo que 74% dos indivíduos parasitados estavam infectados com protozoários, 13,7% com helmintos e 12,3% com protozoários e helmintos simultaneamente (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4 Diagnóstico de malária e parasitoses intestinais na população total de estudo**

<b>Diagnóstico Parasitológico</b>	<b>NP (%)</b>
<b>Malária</b>	
<i>P. falciparum</i>	14 (20,3)
<i>P. vivax</i>	55 (79,7)
<b>Total</b>	<b>69 (24,6)</b>
<b>Parasitos intestinais</b>	
Protozoários	108 (74,0)
Helmintos	20 (13,7)
Protozoários + Helmintos	18 (12,3)
<b>Total</b>	<b>146 (52,1)</b>

NP: Número de Positivos; (%): Percentual de Positivos

Na população total do estudo foram identificadas quatro espécies de protozoários e seis espécies de helmintos. Observamos que 71 indivíduos estavam infectados com *Giardia lamblia*, sendo esta a espécie de protozoário mais prevalente correspondendo a 48,6% das parasitoses intestinais. A espécie de helminto mais prevalente foi *Ancylostoma duodenale* (4,8%), com 7 indivíduos portando esta espécie de helminto. 14,4% (21 indivíduos) da população com alguma parasitose intestinal possuíam infecções por múltiplas espécies de protozoários intestinais, enquanto 12,3% (18 indivíduos) estavam infectados simultaneamente por protozoários intestinais e helmintos. Apenas uma pessoa (0,7%) possuía infecção por múltiplos helmintos. Na Tabela 4.5 estão representadas as espécies de protozoários e helmintos e suas prevalências encontradas na população estudada.

**Tabela 4.5 Espécies de protozoários e helmintos intestinais encontrados na população estudada**

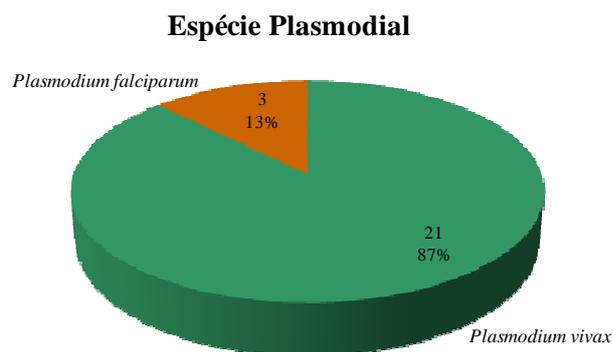
Grupo de Parasito	NP	%
<b>Protozoários</b>		
<i>Entamoeba coli</i>	10	6,9
<i>Entamoeba histolytica</i>	4	2,7
<i>Giardia lamblia</i>	71	48,6
<i>Iodamoeba butschlii</i>	2	1,4
<b>Infecções por múltiplos protozoários</b>	21	14,4
<b>Helmintos</b>		
<i>Ancylostoma duodenale</i>	7	4,8
<i>Ascaris lumbricoides</i>	4	2,7
<i>Strongyloides stercoralis</i>	6	4,1
<i>Trichuris trichiura</i>	2	1,4
<b>Infecções por múltiplos helmintos</b>	1	0,7
<b>Infecções por protozoários e helmintos</b>	18	12,3
<b>TOTAL</b>	146	100

NP: Número de Positivos; (%): Percentual de Positivos

## 4.2.2 Diagnóstico parasitológico de malária e parasitoses intestinais nos grupos

### 4.2.2.1 Grupo Malária (M)

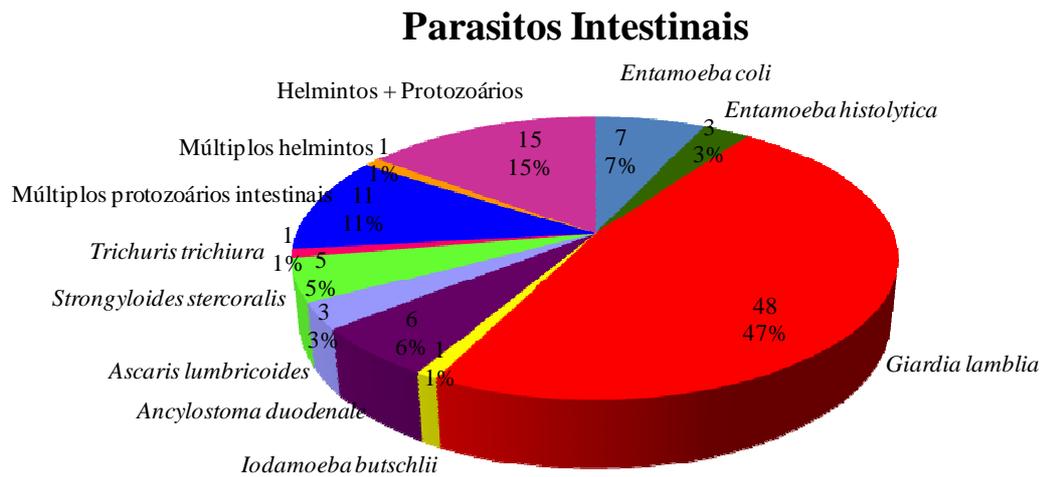
O grupo **Malária** (n=24) era composto de indivíduos infectados com *Plasmodium* spp. que apresentavam malária não complicada e eram negativos para parasitoses intestinais. A espécie plasmodial mais frequente foi o *P. vivax*, responsável por aproximadamente 87% dos casos enquanto os outros 13% foram causados por *P. falciparum* (Figura 4.1).



**Figura 4.1** Frequência de infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* no grupo Malária

### 4.2.2.2 Grupo Parasitoses Intestinais (PI)

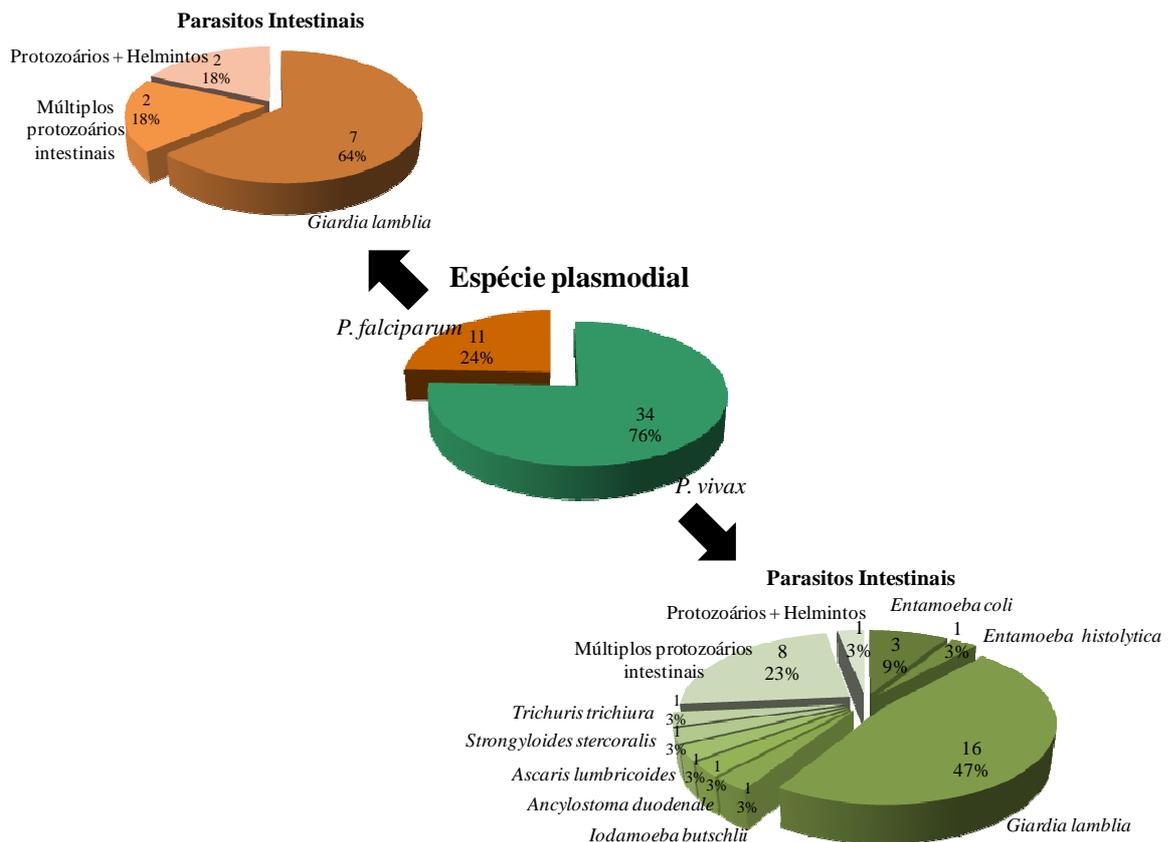
No grupo Parasitoses Intestinais (compostos de indivíduos negativos para malária e positivos para parasitoses intestinais) foram encontradas 8 espécies diferentes de parasitos intestinais, sendo *G. lamblia* o parasito e o protozoário de maior prevalência, com 47% dos indivíduos deste grupo infectados somente por esta espécie. O helminto mais frequente neste grupo foi *A. duodenale*, responsável por 6% dos casos enquanto 11% dos indivíduos estavam infectados por múltiplas espécies de protozoários intestinais e 15% concomitantemente infectados por helmintos e protozoários intestinais. Infecção por múltiplos helmintos representou 1% das infecções neste grupo. As frequências de cada espécie de parasito intestinal estão representadas na Figura 4.2.



**Figura 4.2** Frequência das espécies de parasitos encontradas no grupo Parasitoses Intestinais

#### 4.2.2.3 Grupo Coinfectado (CI)

No grupo Coinfectado, onde os indivíduos encontravam-se simultaneamente com malária e parasitoses intestinais, as frequências das espécies de plasmódio e de parasitos intestinais foram semelhantes aos grupos M e PI. A espécie plasmodial mais comum foi *P. vivax*, com 76% dos casos enquanto *P. falciparum* representou 24% das infecções maláricas, sendo ligeiramente mais alto que no grupo Malária (Figura 4.3). Foram encontradas 10 espécies de parasitos intestinais, 2 espécies de helmintos do género *Hymenolepis* que não estavam presentes no Grupo PI. Analisamos as parasitoses intestinais de acordo com a espécie de plasmódio infectante e observamos que nos indivíduos infectados com *P. falciparum* houve uma menor variedade de espécies de parasitos intestinais quando comparado aos indivíduos infectados com *P. vivax*. *G. lamblia* foi o parasito intestinal mais prevalente em ambas as espécies plasmodiais. As espécies de parasitos intestinais no grupo Coinfectado, de acordo com a espécie plasmodial, estão apresentadas na Figura 4.3.



**Figura 4.3 Distribuição dos casos de malária e parasitoses intestinais por espécie nos indivíduos do grupo CI**

Na Tabela 4.6 estão discriminadas todas as infecções por múltiplos protozoários intestinais, por múltiplos helmintos e infecções simultâneas por protozoários e helmintos intestinais na população total e nos grupos Parasitoses intestinais e Coinfectado, este ultimo grupo dividido em indivíduos infectados por *P. falciparum* e por *P. vivax*.

#### 4.2.2.4 Grupo Exposto (EX)

Neste grupo todos os indivíduos apresentaram diagnóstico negativo para malária e também para parasitoses intestinais no momento da coleta. Estes indivíduos, embora negativos, vivem na mesma área que os outros grupos. Portanto, estão expostos a malária e a parasitos intestinais.

**Tabela 4.6 Descrição das infecções por múltiplas espécies de parasitos intestinais na população total e nos grupos Parasitoses Intestinais e Coinfectado**

<b>Espécies de Parasitos Intestinais</b>	<b>Pop. Total (N=280)</b>	<b>Grupo PI (N=101)</b>	<b>Grupo CI Pf (N=11)</b>	<b>Grupo CI Pv (N=34)</b>
<b>Infecções por protozoários intestinais + helmintos</b>				
<i>G. lamblia</i> + <i>A. duodenale</i>	5	4	---	1
<i>G. lamblia</i> + <i>A. lumbricoides</i>	1	1	---	---
<i>G. lamblia</i> + <i>T. trichiura</i>	3	3	---	---
<i>G. lamblia</i> + <i>S. stercoralis</i>	2	2	---	---
<i>G. lamblia</i> + <i>Hymenolepis nana</i>	1	---	1	---
<i>G. lamblia</i> + <i>Hymenolepis diminuta</i>	1	---	1	---
<i>E. coli</i> + <i>A. lumbricoides</i>	2	2	---	---
<i>G. lamblia</i> + <i>I. butschlii</i> + <i>A. lumbricoides</i>	1	1	---	---
<i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i> + <i>A. duodenale</i>	1	1	---	---
<i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i> + <i>I. butschlii</i> + <i>S. stercoralis</i>	1	1	---	---
<b>Infecções por múltiplos helmintos</b>				
<i>S. stercoralis</i> + <i>T. trichiura</i>	1	1	---	---
<b>Infecções por múltiplos protozoários</b>				
<i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i>	3	2	1	---
<i>G. lamblia</i> + <i>I. butschlii</i>	1	1	---	---
<i>E. histolytica</i> + <i>G. lamblia</i>	1	1	---	---
<i>E. histolytica</i> + <i>I. butschlii</i>	1	1	---	---
<i>E. coli</i> + <i>G. lamblia</i>	9	1	1	7
<i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i> + <i>G. lamblia</i>	4	3	---	1
<i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i> + <i>I. butschlii</i>	1	1	---	---
<i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i> + <i>G. lamblia</i> + <i>I. butschlii</i>	1	1	---	---

### 4.3 Avaliação dos dados hematológicos

#### 4.3.1 Comparação dos valores do eritrograma e plaquetas entre os grupos

Avaliando os dados do eritrograma dos indivíduos em cada grupo as médias dos valores de hemoglobina, hematócrito e hemácias se apresentaram dentro dos parâmetros de normalidade. Entretanto, quando avaliamos os valores de hemoglobina considerando anêmicos homens com menos que 13g/dL e mulheres com menos que 12g/dL de hemoglobina, 25% dos indivíduos (n=6) do grupo Malária e 32.6% (n=14) do grupo Coinfectado apresentavam anemia enquanto que no grupo Exposto e PI apenas 9,2% (n=10) e 13,9% (n=14) se apresentaram anêmicos.

Em relação às plaquetas, embora a média tenha sido menor no grupo coinfectado, a frequência de pessoas com plaquetopenia (número de plaquetas menor que 150.000 por  $\text{mm}^3$ ) foi maior nos grupos Malária ( $\chi^2=7,637$ ,  $P=0,0057$ ), Parasitoses Intestinais ( $\chi^2=4,697$ ,  $P=0,0302$ ) e Coinfectado ( $\chi^2=33,47$ ,  $P<0,0001$ ) quando comparados ao grupo Exposto. A maior frequência de plaquetopenia, 37,2%, foi encontrada no grupo Coinfectado que também apresentou o menor número de plaquetas.

**Tabela 4.7 Dados do eritrograma dos grupos estudados**

<b>Eritrograma [X (Iq1-Iq3)]</b>	<b>Malária N=24</b>	<b>Parasitoses Intestinais N=101</b>	<b>Coinfectado N=45</b>	<b>Exposto N=110</b>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,75 (12,15-14,58)	13,8 (12,8-15,03)	13,2 (12,2-14,0)	13,8 (13,1-14,6)
<b>Hematócrito (%)</b>	41,60 (37,95-44,33)	41,05 (38,18-44,10)	42,0 (39,0-45,0)	40,9 (38,6-43,0)
<b>Hemácias (milhões/<math>\text{mm}^3</math>)</b>	4,60 (4,29-4,94)	4,58 (4,31-4,94)	4,76 (4,47-5,37)	4,62 (4,37-4,98)
<b>Plaquetas (mil/<math>\text{mm}^3</math>)</b>	185 (161,75-243,25)	212,5 (172,75-245,75)	156,0*** (110,5-197,0)	232,0*** (194,0-277,0)

N= número de indivíduos em cada grupo; [X (Iq1-Iq3)]= Mediana e (Intervalo entre o 1º e o 3º quartis);  
\*\*\*  $P<0,0001$  entre os grupos assinalados

#### 4.3.2 Comparação dos valores do leucograma entre os grupos

Avaliando os dados do leucograma dos indivíduos em cada grupo (Tabela 4.8), observamos que as medianas do número de leucócitos e linfócitos foram menores no grupo Coinfectado quando comparadas ao grupo Exposto ( $P=0,011$ ;  $P<0,0001$ , respectivamente). A leucopenia, caracterizada por menos que 5000 leucócitos por

mm<sup>3</sup>, também foi mais frequente no grupo Coinfectado que no grupo Exposto ( $\chi^2=12,52$ ,  $P=0,0004$ ).

O número de eosinófilos e monócitos foram menores no grupo Malária e Coinfectado que nos grupos Exposto e Parasitoses Intestinais. Entretanto, não houve diferença na frequência de eosinofilia (mais que 500 eosinófilos/mm<sup>3</sup>) entre os grupos, apesar de ter ocorrido diferenças na contagem de eosinófilos. Também observamos uma maior mediana nos números de bastões nos grupos Malária e Coinfectado quando comparados com os grupos Exposto e Parasitoses Intestinais ( $P<0,0001$  para todas as comparações). Entretanto, o número destas células não diferiu entre os grupos Malária e Coinfectado e tão pouco entre Parasitoses Intestinais e Exposto. Não observamos nenhuma diferença entre os grupos na mediana dos valores de neutrófilos, segmentados e basófilos.

**Tabela 4.8 Dados do leucograma de acordo com os grupos**

<b>Leucograma (/mm<sup>3</sup>) [X (Iq1-Iq3)]</b>	<b>Malária N=24</b>	<b>Parasitoses Intestinais N=101</b>	<b>Coinfectado N=45</b>	<b>Exposto N=110</b>
<b>Leucócitos</b>	6600,0 (5202,5-7385,0)	6765,0 (5630,0-8135,0)	5600,0* (4100,0-7015,0)	6470,0* (5430,0-7460,0)
<b>Linfócitos</b>	1712,0 (1212,0-2663,5)	2124,0 (1787,0-2682,5)	1161,0*** (789,0-1826,5)	2036,0*** (1699,0-2438,0)
<b>Eosinófilos</b>	102,5 <sup>a*</sup> c*** (55,0-228,0)	303,0 <sup>c***d***</sup> (181,0-694,0)	90,0 <sup>b*d***</sup> (42,5-339,0)	230,0 <sup>a*b*</sup> (149,0-460,0)
<b>Neutrófilos</b>	3530,0 (3081,0-4139,25)	3541,5 (2660,75-4875,75)	3500,0 (2155,0-4413,5)	3386,0 (2656,0-4243,0)
<b>Bastões</b>	0,0 <sup>e***</sup> (0,0-117,5)	0,0 (0,0-0,0)	47,0 <sup>f***</sup> (0,0-160,0)	0,0 <sup>e***f***</sup> (0,0-0,0)
<b>Segmentados</b>	3523,0 (2914,0-4044,0)	3494,0 (2550,0-4835,0)	3417,0 (1845,0-4832,0)	3386,0 (2656,0-4243,0)
<b>Basófilos</b>	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
<b>Monócitos</b>	418,5 <sup>g**</sup> (268,0-550,5)	492,5 (410,75-604,25)	426,0 <sup>h***</sup> (298,5-560,0)	564,0 <sup>g**h***</sup> (445,25-675,0)

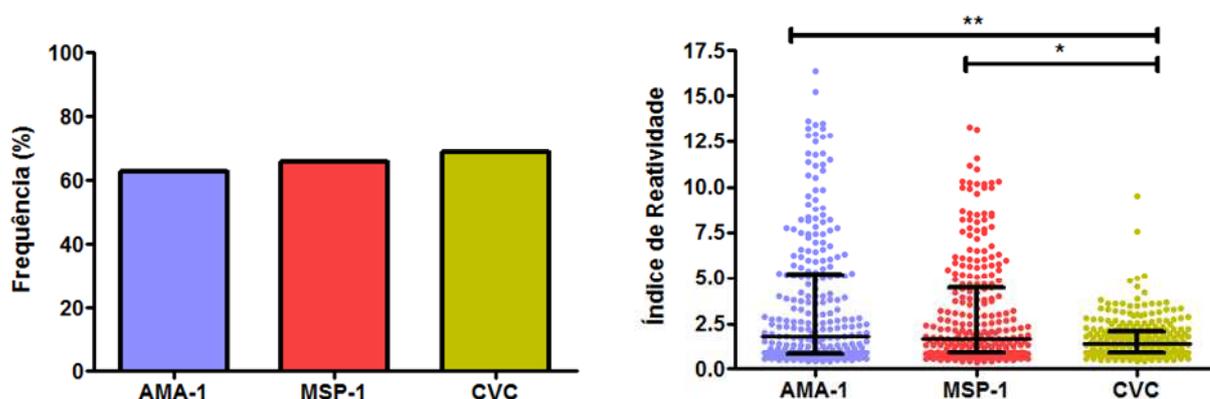
N= número de indivíduos em cada grupo; [ X (Iq1-Iq3)]= Mediana e (Intervalo entre o 1º e o 3º quartis); \* =  $P<0,05$ ; \*\*= $P<0,001$ ; \*\*\*= $P<0,0001$  na comparação entre os grupos assinalados com a mesma letra e símbolo

#### 4.4 Resposta imune humoral aos antígenos de *P. vivax*

A presença de anticorpos IgG específicos para proteínas de *P. vivax* na população estudada foi avaliada através do teste de ELISA utilizando como antígenos três proteínas recombinantes representando a PvAMA-1, MSP-1 e CVC.

##### 4.4.1 Frequência e magnitude de anticorpos IgG contra as proteínas PvAMA-1, PvMSP-1 e PvCVC em toda população estudada

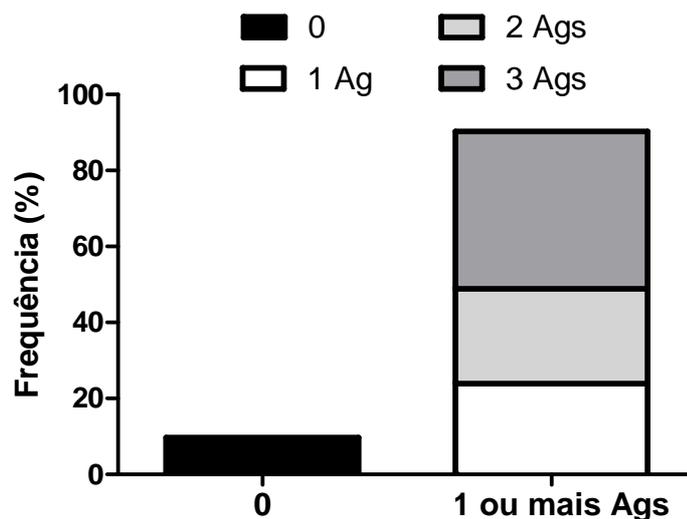
A presença de anticorpos IgG específicos na população foi semelhante para as proteínas AMA-1 (62,9%), MSP-1 (65,7%) e CVC (68,6%) (Figura 4.4). Entretanto, observamos diferenças significativas na magnitude de resposta para as 3 proteínas estudadas. A mediana do índice de reatividade (IR) de IgG anti-AMA-1 (1,80;  $P=0,0026$ ) e do IR de IgG anti-MSP-1 (1,87;  $P=0,015$ ) foram significativamente maiores que a mediana do IR de IgG anti-CVC (1,39). Entretanto não observamos diferença estatisticamente significativa quando comparamos os IRs de AMA-1 com o de MSP-1 (Figura 4.4).



**Figura 4.4** Prevalência de resposta (A) e índice de reatividade (B) de anticorpos IgG contra AMA-1, MSP-1 e CVC de *P. vivax*. As barras representam a mediana e os intervalos interquartis; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,001$

##### 4.4.2 Perfil de reconhecimento dos antígenos na população

Observamos que 90,3% da população estudada apresentaram resposta de anticorpos contra pelo menos uma das proteínas estudadas. 23,9%, 25% e 41,4% dos indivíduos responderam exatamente para 1, 2 ou 3 antígenos; 9,7% da população não apresentaram resposta positiva de anticorpos contra nenhuma das proteínas (Figura 4.5).

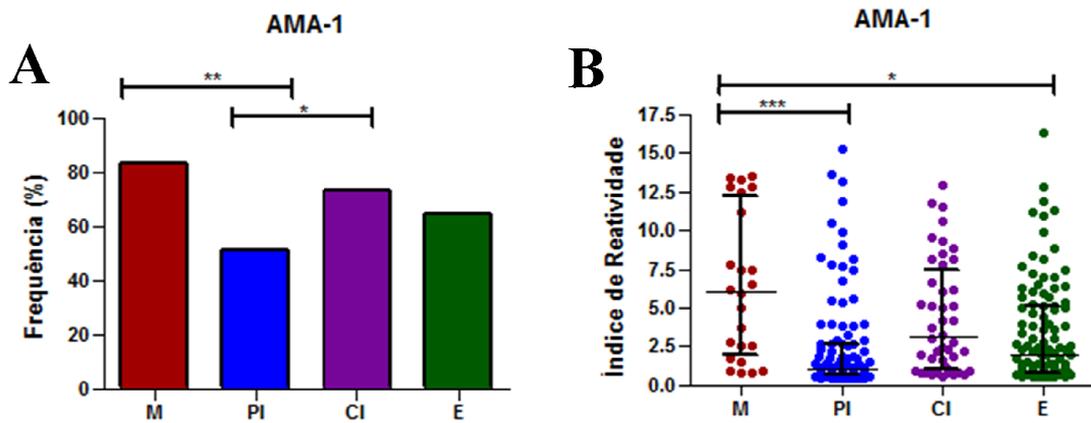


**Figura 4.5** Frequência de resposta de IgG para nenhum e para 1 ou mais antígenos na população total estudada

#### **4.4.3** Frequência e magnitude de anticorpos IgG contra as proteínas AMA-1, MSP-1 e CVC por grupo

##### **4.4.3.1** Prevalência e índice de reatividade de IgG específica para PvAMA-1

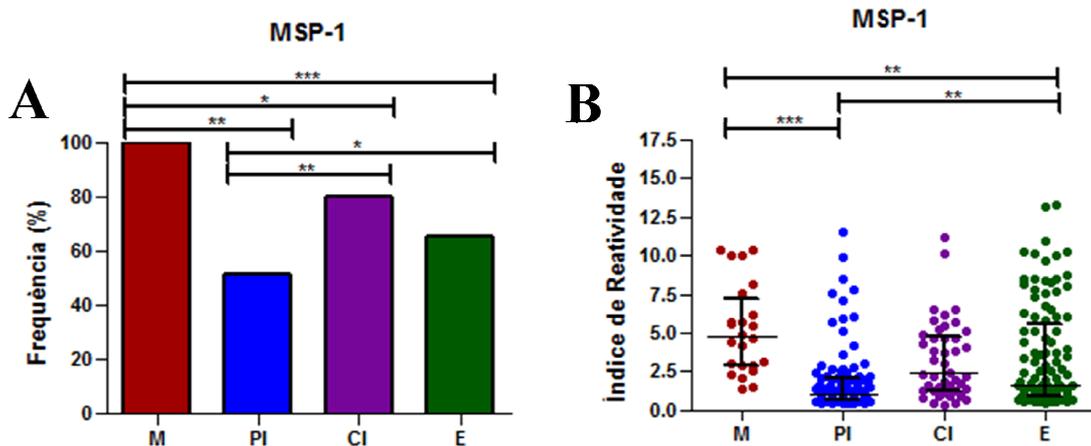
A prevalência de resposta para AMA-1 foi maior nos grupos com malária, grupo Malária ( $\chi^2=8,054$ ,  $P=0,0045$ ) e Coinfectado ( $\chi^2=6,109$ ,  $P=0,0134$ ), quando comparados com aos indivíduos do grupo PI. Entretanto, não observamos diferença quando comparamos com o grupo Exposto onde os indivíduos também não estão com malária (Figura 4.6). O índice de reatividade dos anticorpos anti-AMA-1 também foi maior no grupo Malária quando comparado aos grupos Parasitoses Intestinais e Exposto (Figura 4.6).



**Figura 4.6** Prevalência e índice de reatividade de anticorpos IgG contra AMA-1. As barras representam a mediana e os intervalos interquartis; \*= P<0,05; \*\*=P<0,001; \*\*\*=P<0,0001

#### 4.4.3.2 Prevalência e índice de reatividade de IgG específica para PvMSP-1

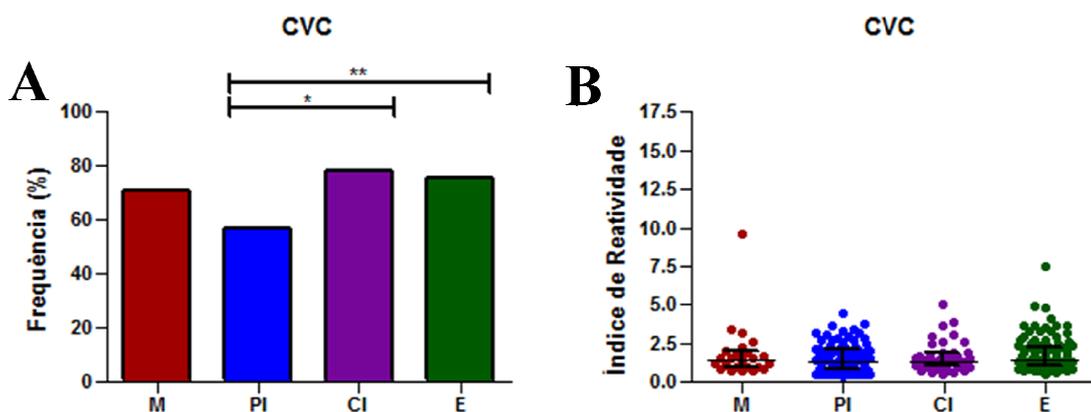
A frequência de resposta de IgG anti-MSP-1 foi maior no grupo Malária que em todos os outros grupos, (PI:  $\chi^2=19,15$ ,  $P<0,0001$ ; CI:  $\chi^2=55,20$ ,  $P=0,0188$ ; E:  $\chi^2=11,57$ ,  $P=0,0007$ ) e menor no grupo Parasitoses Intestinais do que em todos os outros grupos (M:  $\chi^2=19,15$ ,  $P<0,0001$ ; CI:  $\chi^2=10,57$ ,  $P=0,0011$ ; E:  $\chi^2=42,40$ ,  $P=0,0395$ ). O IR de anticorpos anti-MSP-1 estava aumentado no grupo Malária quando comparado aos grupos Parasitoses Intestinais ( $P=0,0062$ ) e Exposto ( $P<0,0001$ ), porém não houve diferença com o grupo Coinfectado. No grupo Parasitoses Intestinais o IR de IgG anti-MSP-1 foi menor que nos grupos Malária ( $P=0,0062$ ) e Exposto ( $P=0,002$ ). Estas alterações referentes à prevalência e IR de IgG anti-MSP-1 estão demonstradas na Figura 4.7 A e B.



**Figura 4.7** Prevalência e índice de reatividade de anticorpos IgG contra MSP-1. As barras representam a mediana e os intervalos interquartis; \*= P<0,05; \*\*=P<0,001; \*\*\*=P<0,0001

#### 4.4.3.3 Prevalência e índice de reatividade de IgG específica para PvCVC

A prevalência de anticorpos para CVC foi muito similar tanto nos grupos dos indivíduos com malária (Grupos M e CI) quanto no grupo de indivíduos sem malária (Grupo E). O grupo Parasitoses Intestinais apesar de apresentar a menor frequência só apresentou diferença significativa quando comparada aos grupos Coinfectado ( $\chi^2=60,84$ ,  $P=0,0136$ ) e Exposto ( $\chi^2=85,31$ ,  $P=0,0035$ ), resultados demonstrados na Figura 4.8 A. Não houve diferença significativa no IR de anticorpos IgG anti-CVC entre os quatro grupos (Figura 4.8 B).



**Figura 4.8** Prevalência e índice de reatividade de anticorpos IgG contra CVC. As barras representam a mediana e os intervalos interquartis; \*= P<0,05; \*\*=P<0,001; \*\*\*=P<0,0001

Em resumo todos os grupos apresentaram anticorpos para as 3 proteínas sendo AMA-1 e MSP-1 mais frequentes e com IR maiores nos grupos onde os indivíduos apresentavam infecção ativa de malária (Grupos M e CI). Portanto a presença de parasitoses intestinais no grupo CI não parece interferir substancialmente na resposta. Da mesma maneira, não observamos grandes diferenças de resposta entre os grupos PI e E. A presença de parasitose intestinal no Grupo PI não parece interferir na resposta a estes antígenos. Já para a prevalência e a magnitude de de resposta para a proteína CVC não observamos diferença entre os grupos nestes parâmetros.

#### **4.4.4 Perfil de reconhecimento dos antígenos nos grupos**

Ao analisarmos a frequência de resposta de IgG contra nenhum e contra um ou mais antígenos em cada um dos grupos (Figura 4.9) observamos que no grupo Malária todos os indivíduos responderam a um ou mais antígenos, sendo mais frequente a resposta para 3 (58,3%) e 2 (41,7%) antígenos. No grupo Parasitoses Intestinais 16,8% dos indivíduos não apresentaram resposta para nenhum dos antígenos testados, enquanto os outros 83,2% responderam a pelo menos um dos antígenos plasmodiais (31,7% - 1 antígeno; 24,8% - 2 antígenos; 26,7% - 3 antígenos). 93,3% dos indivíduos do grupo Coinfectado apresentaram resposta positiva de anticorpos a 1 ou mais antígenos plasmodiais, sendo mais prevalente a resposta a 3 (55,5%), seguido pela resposta a 2 (22,2%) e 1 (15,6%) antígenos. No grupo Exposto 93,6% dos participantes responderam ao menos a um dos antígenos testados, onde 44,4% dos indivíduos responderam para 3 antígenos, 24,5% para 2 e os demais 24,5% para 1 antígeno.

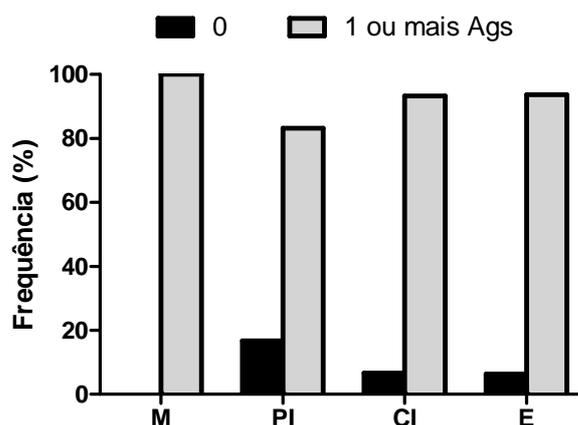


Figura 4.9 Frequência de resposta de IgG contra nenhum e contra 1 ou mais antígenos nos quatro grupos

#### 4.4.5 Prevalência de resposta e IR de anticorpos IgG contra as proteínas estudadas nos indivíduos com e sem *Giardia lamblia* nos grupos Parasitoses Intestinais e Coinfectado

Como *G. lamblia* foi o parasito intestinal mais prevalente decidimos comparar a resposta de anticorpos IgG total entre aqueles indivíduos infectados e os não infectados com *G. lamblia* nos grupos Parasitoses Intestinais e Coinfectado. Observamos que nos anticorpos IgG totais a única diferença significativa encontrada esteve no índice de reatividade de IgG anti-MSP-1 no grupo Coinfectado, sendo maior nos indivíduos sem *G. lamblia* do que naqueles com este protozoário intestinal (P=0,0452) (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 Prevalência e IR de anticorpos IgG nos indivíduos com e sem *G. lamblia* nos grupos Parasitoses Intestinais e Coinfectado

	Parasitoses Intestinais		Coinfectado	
	<i>Giardia lamblia</i> + (N=66)	<i>Giardia lamblia</i> – (N=35)	<i>Giardia lamblia</i> + (N=35)	<i>Giardia lamblia</i> – (N=10)
<b>AMA-1</b>				
Prevalência (%)	47%	60%	68,6%	90%
IR [X (Iq1-Iq3)]	0,9 (0,7-2,9)	1,2 (0,7-2,4)	3,1 (1,0-7,5)	3,3 (2,1-5,8)
<b>MSP-1</b>				
Prevalência (%)	45,5%	62,9%	77,10%	90%
IR [X (Iq1-Iq3)]	0,9 (0,7-2,1)	1,3 (0,8-2,1)	2,2 (1,3-4,6)*	4,9 (2,0-6,5)*
<b>CVC</b>				
Prevalência (%)	54,5%	60%	80%	70%
IR [X (Iq1-Iq3)]	1,4 (0,8-2,0)	1,5 (0,9-2,2)	1,4 (1,1-1,9)	1,4 (1,0-1,6)

N= número de indivíduos em cada grupo; %=porcentagem de indivíduos positivos para anticorpos IgG; [X (Iq1-Iq3)]= Mediana e (Intervalo entre o 1º e o 3º quartis); \* P<0,05

#### 4.4.6 Correlações entre os índices de reatividade de anticorpos IgG contra os três antígenos estudados e dados epidemiológicos na população

Analisamos as correlações existentes entre os IRs dos anticorpos IgG totais contra cada uma das três proteínas estudadas e alguns parâmetros epidemiológicos indicadores de tempo de exposição e história pregressa de malária (Tabela 4.10 e Tabela 4.11).

**Tabela 4.10 Correlações entre o IR de anticorpos IgG e três parâmetros epidemiológicos**

	AMA-1	MSP-1	CVC
<b>Tempo de residência em área endêmica</b>	r = 0,126 P = 0,048	r = 0,099 P = 0,117	r = 0,067 P = 0,287
<b>Tempo desde a última malária</b>	r = -0,271 P < 0,0001	r = -0,411 P < 0,0001	r = -0,118 P = 0,062
<b>Número de malárias anteriores</b>	r = 0,262 P < 0,0001	r = 0,128 P = 0,037	r = -0,023 P = 0,706

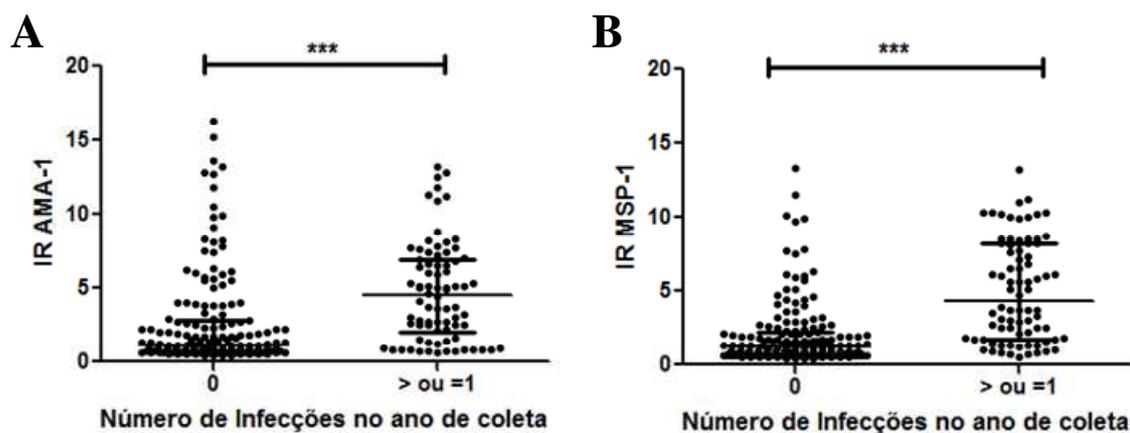
O tempo de residência em área endêmica correlacionou-se significativamente apenas com o IR de anticorpos IgG anti-AMA, apresentando coeficiente de correlação de *Spearman* (*r*) de 0,126 e *P*=0,048. Já o tempo desde a última malária teve correlação negativa e significativa tanto com o IR de IgG anti-AMA-1 quanto com o IR de IgG anti-MSP-1, o que significa que quanto menos tempo passado desde a última infecção malárica, maior o IR dos anticorpos IgG. O número de malárias anteriores também se correlacionou significativamente com os IRs de IgG anti-AMA-1 e IgG anti-MSP-1, entretanto esta correlação apresentou valor positivo.

Para observarmos a existência de relação entre o número de malárias no ano de coleta e o IR de anticorpos IgG, avaliamos estes IRs nos indivíduos que não tiveram nenhuma malária no ano e naquelas pessoas que tiveram uma ou mais infecções maláricas neste período. Os resultados estão demonstrados na Tabela 4.11 e na Figura 4.10. Podemos verificar que nos indivíduos que tiveram um caso de malária ou mais no ano de coleta, os IRs de IgG anti AMA-1 e de IgG anti-MSP-1 foram maiores do que nas pessoas que não tiveram nenhuma infecção no ano.

De todos estes resultados de correlação podemos destacar o fato de que o IR de anticorpos IgG contra a proteína CVC não foi correlacionado com nenhum dos parâmetros epidemiológicos avaliados neste estudo.

**Tabela 4.11 IR (mediana e intervalo entre o 1º e 3º quartis) de anticorpos IgG de acordo com o número de malárias no ano de coleta**

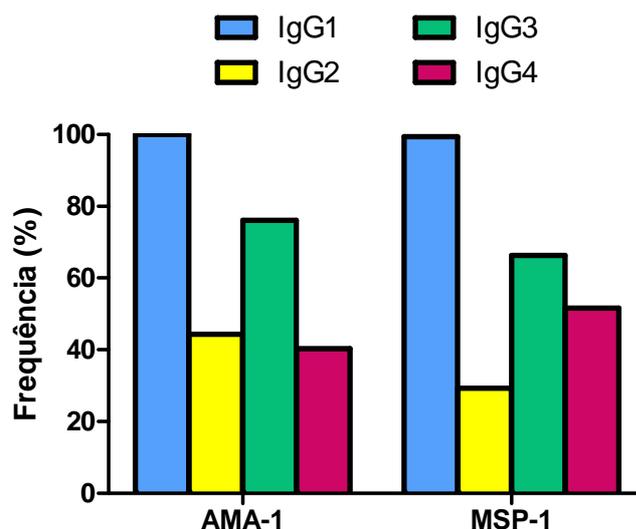
	0	≥1	P
AMA-1	1,14 (0,72-2,81)	4,51 (2,11-6,91)	< 0,0001
MSP-1	1,18 (0,73-2,17)	4,32 (1,79-8,16)	< 0,0001
CVC	1,38 (0,89-2,11)	1,43 (1,06-2,1)	0,372



**Figura 4.10 IR de anticorpos IgG de acordo com o número de malárias no ano de coleta. As barras representam a mediana e os intervalos interquartis; \*\*\*=P<0;0001**

#### 4.4.7 Distribuição das subclasses de IgG específicas para as proteínas recombinantes PvAMA-1 e PvMSP-1 na população

O perfil de resposta das quatro subclasses de IgG é semelhante para as duas proteínas, AMA-1 e MSP-1, na população estudada (Figura 4.11). Observamos uma predominância de anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 tanto para PvAMA-1 quanto para PvMSP-1. Já os anticorpos não citofílicos IgG2 e IgG4 apesar de serem menos prevalentes, apresentaram prevalências distintas e comparando a resposta para os dois antígenos, IgG2 foi maior para AMA-1 ( $\chi^2= 8,681$ ,  $P=0,0032$ ) e IgG4 para MSP-1 ( $\chi^2= 4,614$ ,  $P=0,0317$ ).



**Figura 4.11** Distribuição das subclasses de IgG específicas para as proteínas recombinantes PvAMA-1 e PvMSP-1 na população

#### 4.4.8 Índice de reatividade das subclasses de IgG contra AMA-1 e MSP-1 na população

Além da avaliação da frequência de indivíduos positivos para as subclasses de IgG específicas para as proteínas recombinantes, determinamos os níveis de reatividade desses anticorpos estimando a concentração a partir de uma curva padrão. Os nossos dados mostram que as medianas dos índices de reatividade das subclasses IgG1 e IgG3 foram significativamente superiores as medianas dos IR de IgG2 e IgG4 específicas para PvAMA-1 e PvMSP-1 nos indivíduos respondedores. Concordando com os dados de prevalência o IR foi também significativamente maior para IgG2 contra AMA-1 ( $P=0,0001$ ) e o IR de IgG4 foi maior para MSP-1 ( $P<0,0001$ ) (Tabela 4.12).

**Tabela 4.12** Índice de reatividade (mediana e intervalo entre o 1º e 3º quartis) das subclasses de IgG contra AMA-1 e MSP-1 na população total do estudo

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
AMA-1	9,71 (5,90-11,22)	0,84 (0,52-1,64)	1,66 (1,02-4,13)	0,91 (0,69-1,28)
MSP-1	9,42 (4,83-11,38)	0,62 (0,40-1,13)	1,42 (0,82-3,60)	1,03 (0,84-1,35)

#### **4.4.9 Distribuição das subclasses de IgG específicas para a proteína recombinante PvAMA-1 nos grupos**

O perfil de subclasses de IgG para PvAMA-1 mostrou que nos indivíduos respondedores para este antígeno, IgG1 e IgG3 específicas foram predominantes em todos os grupos (Figura 4.12). IgG1 além de apresentar índices de reatividade altos estava presente em todos os respondedores para esta proteína independente do grupo avaliado. Para IgG3, embora a prevalência também tenha sido alta em todos os grupos nem todos os indivíduos que eram IgG positivos apresentaram esta subclasse. Não houve diferença estatisticamente significativa na prevalência de resposta de IgG1 e IgG3 entre os grupos estudados, como mostrado na Figura 4.12, mas o IR de IgG1 foi menor no grupo PI que no grupo E. As subclasses IgG2 e IgG4 foram menos prevalentes; a frequência de resposta positiva de IgG2 foi maior no grupo Parasitoses Intestinais, que em todos os outros grupos (Grupo M:  $\chi^2=8,200$ ,  $P=0,0042$ ; Grupo CI:  $\chi^2=22,04$ ,  $P<0,0001$ ; Grupo E:  $\chi^2=5,268$ ,  $P=0,0217$ , respectivamente). O IR de IgG2 também foi maior no grupo Parasitoses Intestinais quando comparado ao grupo Exposto ( $P=0,02$ ) (Figura 4.11). Em relação a IgG4, tanto a frequência de indivíduos com resposta positiva quanto o IR de anticorpos IgG4 apresentaram perfil similares entre os grupos. Ambos foram maiores no grupo Parasitoses Intestinais que nos outros três grupos (Grupo M:  $\chi^2=4,098/P=0,0429$  e  $P=0,03$ ; Grupo CI:  $\chi^2=9,493/P=0,0021$  e  $P=0,0001$ ; Grupo E:  $\chi^2=9,311/P=0,0023$  e  $P=0,0001$ , respectivamente para prevalência e IR (Figura 4.12).

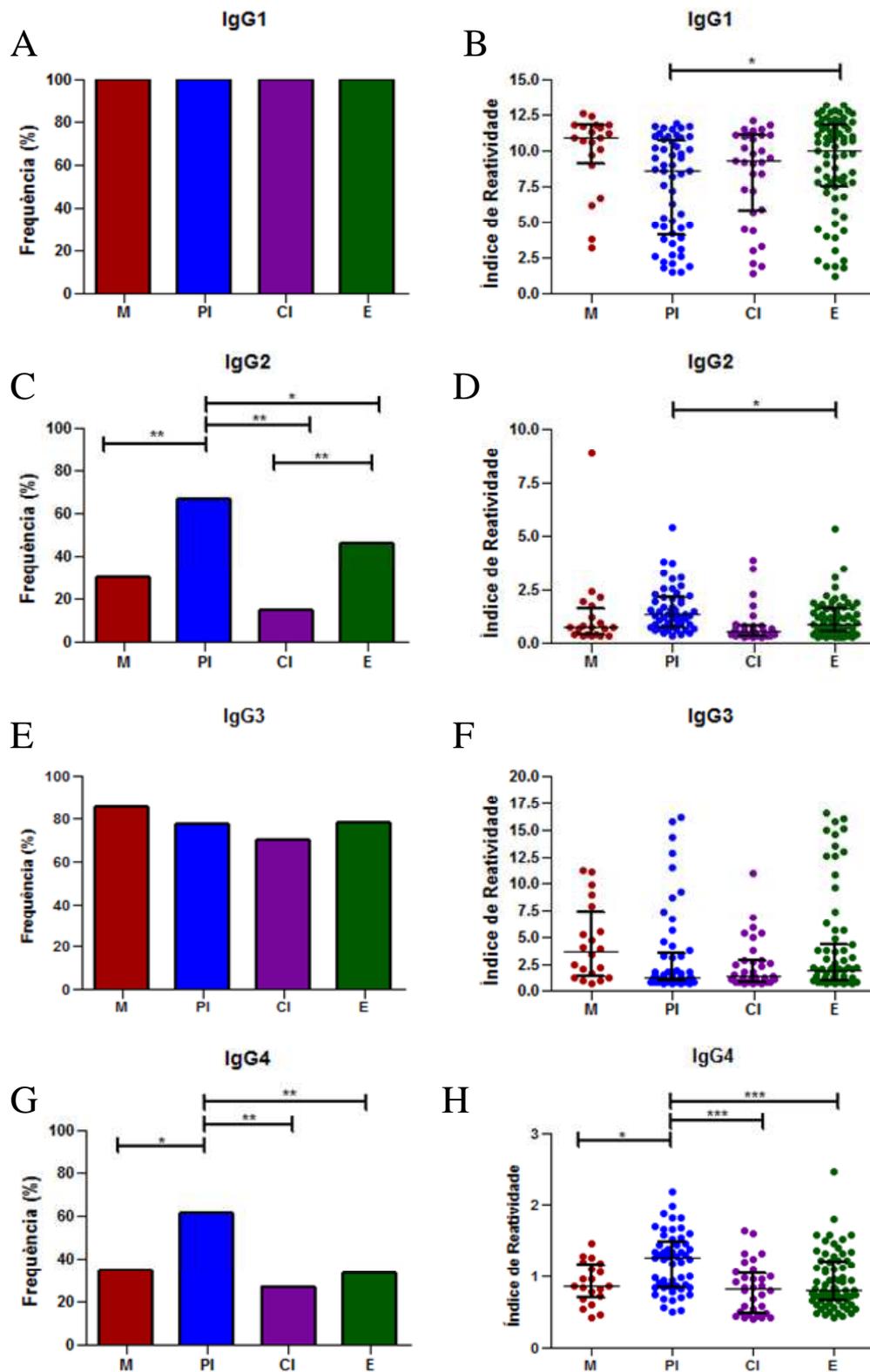


Figura 4.12 Prevalência de resposta e índice de reatividade das subclasses de anticorpos IgG anti-AMA-1 em cada grupo. As barras representam mediana e intervalo interquartil; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,0001$

#### **4.4.10 Distribuição das subclasses de IgG específicas para a proteína recombinante PvMSP-1 nos grupos**

O perfil de subclasses de IgG para PvMSP-1 foi similar a PvAMA-1, com IgG1 e IgG3 específicas para este antígeno predominantes em todos os grupos (Figura 4.13). IgG1 além de apresentar índices de reatividade altos estava presente em todos os respondedores para esta proteína, independente do grupo avaliado. Não houve diferença estatisticamente significativa na prevalência de resposta de IgG1 e IgG3 entre os grupos estudados, mas o IR de IgG1 foi menor em PI que em E, como mostrado na Figura 4.13. As prevalências de resposta e os IRs das subclasses de anticorpos IgG2 também não foram diferentes entre os grupos. Para IgG4, a frequência de indivíduos respondedores foi maior no grupo Malária do que nos grupos Parasitoses Intestinais ( $\chi^2=55,27$ ,  $P=0,0187$ ) e Exposto ( $\chi^2=7,350$ ,  $P=0,0067$ ), sendo maior também no grupo Coinfectado quando comparado ao grupo Exposto ( $\chi^2=5,354$ ,  $P=0,0207$ ). O IR destes anticorpos IgG4 foi maior no grupo Malária que nos grupos Parasitoses Intestinais ( $P=0,015$ ) e Exposto ( $P=0,028$ ) (Figura 4.13).

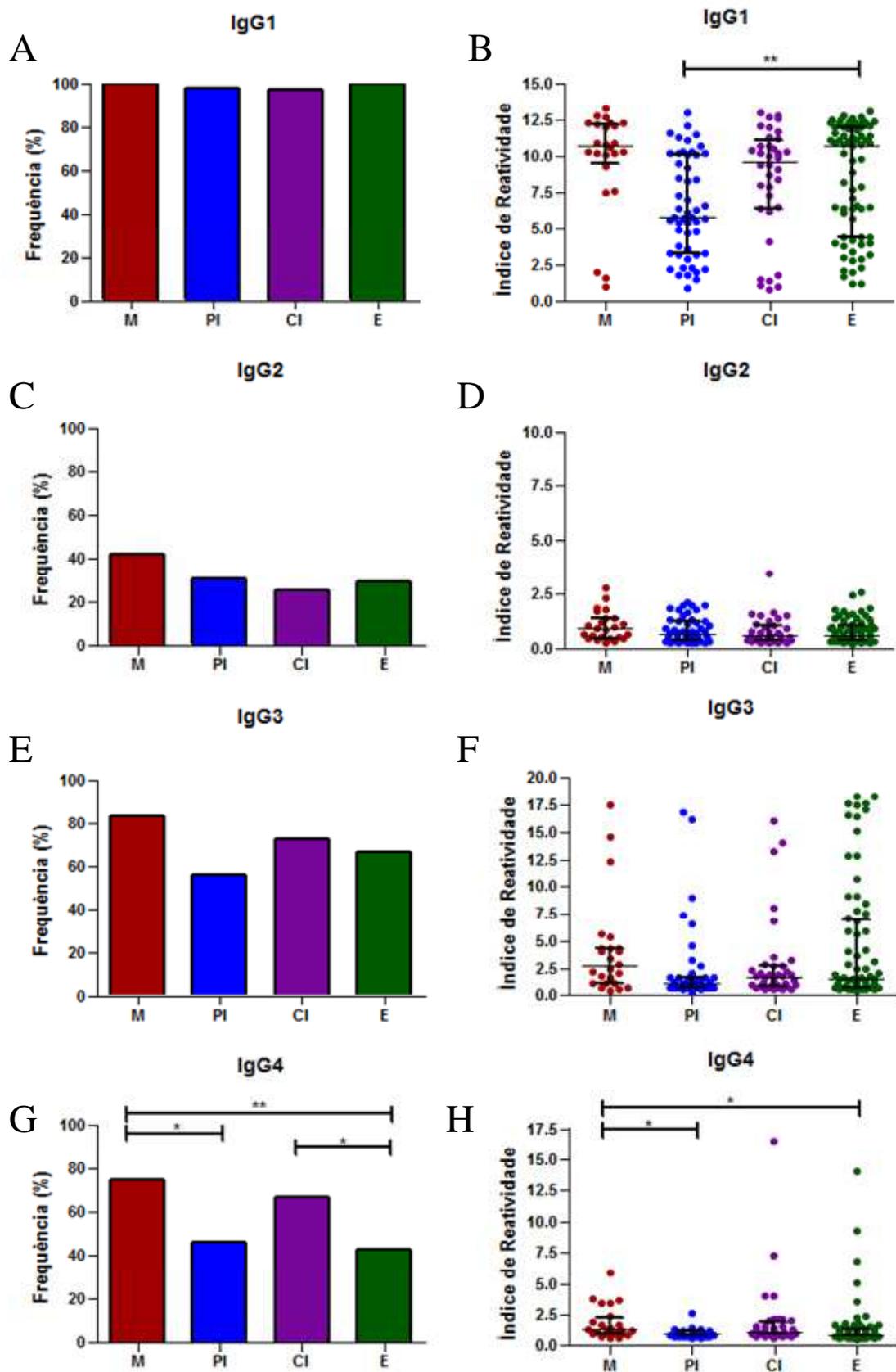


Figura 4.13 Prevalência de resposta e índice de reatividade das subclasses de anticorpos IgG anti-MSP-1 em cada grupo. As barras representam mediana e intervalo interquartil; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,001$ ; \*\*\* =  $P < 0,0001$

#### 4.4.11 Perfil de citocinas séricas circulantes no plasma da população

Ao avaliarmos os níveis séricos médios de citocinas e quimiocinas na população, encontramos alterações em todos os grupos estudados (Tabela 4.13). A concentração de IFN- $\gamma$  foi maior no grupo Coinfectado do que nos grupos Malária (P=0,021) e Exposto (P=0,0001). Adicionalmente, os níveis de IFN- $\gamma$  também estavam aumentados no grupo Parasitoses Intestinais quando comparados ao grupo Exposto (P=0,0003). Já as concentrações de TNF- $\alpha$  foram mais altas no grupo Malária e Coinfectado quando comparadas aos grupos Parasitoses Intestinais (P=0,029; P<0,0001) e Exposto (P=0,012; P<0,0001), porém as concentrações de TNF- $\alpha$  nos grupos Malária e Coinfectado não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, assim como as concentrações nos grupos Parasitoses Intestinais e Exposto. O mesmo perfil de TNF- $\alpha$  foi encontrado nas concentrações de IL-2: maiores níveis de IL-2 nos grupos Malária e Coinfectado que nos grupos Parasitoses Intestinais (P=0,002; P<0,0001) e Exposto (P=0,002; P<0,0001). Já com relação às citocinas anti-inflamatórias podemos observar que as concentrações de IL-4 foram maiores nos grupos Parasitoses Intestinais e Coinfectado que no grupo Exposto (P<0,0001 em ambas as comparações). Já o nível de IL-5 estava diminuído no grupo Coinfectado quando comparado aos grupos Parasitoses Intestinais (P<0,0001) e Exposto (P<0,0001). A concentração de IL-10 foi maior nos grupos Malária e Coinfectado que nos grupos Parasitoses Intestinais (P=0,006; P<0,0001) e Exposto (P=0,0001; P<0,0001). Os indivíduos do grupo Parasitoses Intestinais também apresentaram níveis de IL-10 maiores que o de Exposto.

As três quimiocinas estudadas foram IL-8, proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1 e proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1 $\beta$ . Ainda na Tabela 4.13 podemos observar que a concentração de IL-8 foi maior no grupo Parasitoses Intestinais do que no grupo Exposto (P=0,0001), não ocorrendo nenhuma outra diferença significativa entre os demais grupos. Com relação aos níveis de MCP-1, eles encontravam-se aumentados nos grupos Malária, Parasitoses Intestinais e Coinfectado quando comparados ao grupo Exposto (P=0,019; P<0,0001; P<0,0001). A concentração de MCP-1 foi também maior no grupo Coinfectado que no grupo Parasitoses Intestinais (P=0,003). Para MIP-1 $\beta$ , as concentrações dos grupos Parasitoses Intestinais e Coinfectado foram maiores que a do grupo Exposto

(P=0,023; P<0,0001), sendo também maior no grupo Coinfectado quando comparado ao Parasitoses Intestinais (P=0,011).

**Tabela 4.13 Concentração de citocinas e quimiocinas nos grupos estudados**

Citocinas e Quimiocinas [X (Iq1-Iq3)]	Malária N=24	Parasitoses Intestinais N=101	Coinfectado N=44	Exposto N=94
<b>Pró-inflamatórias</b>				
<b>IFN-<math>\gamma</math> (pg/mL)</b>	10,23 <sup>a*</sup> (4,84-159,98)	32,98 <sup>c**</sup> (14,88-85,91)	56,89 <sup>a*; b**</sup> (35,98-173,98)	10,75 <sup>b**; c**</sup> (4,84-34,15)
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	11,47 <sup>d*; e*</sup> (4,90-117,23)	6,22 <sup>d*; f***</sup> (3,86-13,75)	55,48 <sup>f***; g***</sup> (21,71-215,09)	4,58 <sup>e*; g***</sup> (4,58-10,27)
<b>IL-2 (pg/mL)</b>	2,0 <sup>h*; i*</sup> (0,71-170,96)	0,71 <sup>h*; j***</sup> (0,29-2,57)	2,0 <sup>j***; k***</sup> (2,0-56,49)	0,71 <sup>i*; k***</sup> (0,71-1,14)
<b>Anti-inflamatórias e Regulatórias</b>				
<b>IL-4 (pg/mL)</b>	0,51 (0,30-2,0)	2,52 <sup>l***</sup> (0,31-8,3)	2,0 <sup>m***</sup> (2,0-2,0)	0,35 <sup>l***; m***</sup> (0,25-1,29)
<b>IL-5 (pg/mL)</b>	2,7 (2,0-2,7)	2,7 <sup>n***</sup> (2,37-2,7)	2,0 <sup>n***; o***</sup> (2,0-2,0)	2,7 <sup>o***</sup> (2,7-2,7)
<b>IL-10 (pg/mL)</b>	29,26 <sup>p*; r**</sup> (1,26-2147,65)	1,97 <sup>p*; q***</sup> (0,96-4,42)	351,95 <sup>q***; s***</sup> (115,91-1264,50)	1,15 <sup>r**; s***</sup> (0,79-1,69)
<b>Quimiocinas</b>				
<b>IL-8 (pg/mL)</b>	401,13 (45,87-1949,24)	990,0 <sup>t**</sup> (289,0-5038,0)	1117,46 (151,66-3294,16)	207,0 <sup>t**</sup> (46,3-979,0)
<b>MCP-1 (pg/mL)</b>	76,55 <sup>u*</sup> (19,35-1009,80)	102,0 <sup>v***; x*</sup> (46,10-172,0)	198,0 <sup>w***; x*</sup> (84,11-825,48)	37,63 <sup>u*; v***; w***</sup> (16,44-77,02)
<b>MIP-1<math>\beta</math> (pg/mL)</b>	4119,58 (410,08-10665,24)	1776,0 <sup>y*; aa**</sup> (862,0-6589,0)	7038,19 <sup>z***; aa*</sup> (2565,50-12936,05)	807,0 <sup>y*; z***</sup> (124,0-3514,0)

N= número de indivíduos testados em cada grupo; [X (Iq1-Iq3)] = Mediana e (Intervalo entre o 1º e o 3º quartis); \* = P<0,05; \*\* = P<0,001; \*\*\* = P<0,0001 na comparação entre os grupos assinalados com a mesma letra e símbolo

#### 4.4.12 Correlações entre os níveis de citocinas e os IRs dos anticorpos

Correlacionamos os índices de reatividade dos anticorpos IgG total contra as três proteínas estudadas e os níveis de citocinas. Observamos que o IR de anticorpos anti-AMA-1 correlacionou-se positivamente com os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 e negativamente com IL-5. O IR de IgG anti-MSP-1 apresentou correlação positiva com IL-10 e correlação negativa com os níveis IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-8 e MIP-1 $\beta$ . O IR de anticorpos anti-CVC correlacionou-se unicamente com o nível de IL-10, sendo

esta uma correlação negativa. Os coeficientes de correlação de Spearman (r) e os P valores estão demonstrados na Tabela 4.14.

**Tabela 4.14 Correlações entre o IR de anticorpos IgG e os níveis séricos das citocinas**

	<b>AMA-1</b>	<b>MSP-1</b>	<b>CVC</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	r = -0,038 P = 0,536	r = -0,144 P = 0,019	r = -0,017 P = 0,773
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	r = 0,136 P = 0,027	r = 0,100 P = 0,105	r = 0,015 P = 0,798
<b>IL-2</b>	r = 0,096 P = 0,119	r = 0,073 P = 0,232	r = -0,061 P = 0,319
<b>IL-4</b>	r = 0,043 P = 0,485	r = -0,137 P = 0,026	r = -0,112 P = 0,068
<b>IL-5</b>	r = -0,133 P = 0,030	r = -0,019 P = 0,754	r = 0,031 P = 0,607
<b>IL-10</b>	r = 0,230 P = 0,0002	r = 0,142 P = 0,020	r = -0,125 P = 0,042
<b>IL-8</b>	r = 0,005 P = 0,932	r = -0,156 P = 0,011	r = -0,065 P = 0,292
<b>MCP-1</b>	r = 0,045 P = 0,464	r = -0,070 P = 0,252	r = -0,108 P = 0,078
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	r = -0,037 P = 0,548	r = -0,142 P = 0,021	r = 0,001 p = 0,982

## 5 DISCUSSÃO

O interesse por coinfeccção tem aumentado muito recentemente com publicações sobre coinfeccção humana envolvendo centenas de patógenos. No homem, têm sido descritas associações da infecção por malária com salmonela, helmintos, HIV e tuberculose (176,177), a maioria em populações africanas. Entretanto, os dados são controversos, alguns mostrando uma maior susceptibilidade, outros menor e alguns demonstrando nenhuma influência na evolução clínica da malária grave ou com acometimento cerebral (178).

Estudos epidemiológicos recentes indicaram que essa complexa interação representa um desafio tanto para a ecologia de parasitos como para a saúde humana. Os dados de coinfeccção existentes na literatura são focados na coinfeccção malária-helminto, existindo raríssimos dados a respeito das coinfeccções de plasmódio com protozoários intestinais.

Considerando que nas áreas endêmicas de malária brasileiras a população também esteja exposta a outros patógenos e que os trabalhos que abordam as coinfeccções entre plasmódio e parasitoses intestinais são raros, e que estes são principalmente voltados para *P. falciparum*, é importante o desenvolvimento de estudos direcionados para *P. vivax*, já que esta espécie é a principal responsável pelos casos de malária no Brasil. Portanto, o nosso estudo foi realizado na periferia e área rural do município de Porto Velho, estado de Rondônia, onde a ausência de saneamento básico é marcante em toda região. É o terceiro estado com maior número de casos de malária no Brasil (180) e possui uma alta prevalência de parasitoses intestinais.

Os nossos dados mostram que entre os 280 indivíduos que participaram de nosso estudo, a prevalência de malária encontrada na região foi de 24,6% e de parasitoses intestinais 52,1%. O caso de coinfeccção de malária com parasitoses intestinais foi de 16%.

Destes com diagnóstico positivo para malária 79,7% estavam infectados com *P. vivax* e os outros 20,3% com *P. falciparum*, uma frequência de espécies plasmodiais semelhantes à registrada no Brasil em 2011 (*P. vivax* - 87% e *P. falciparum* 13%) (15). Nos grupos de indivíduos infectados, a proporção de homens foi maior do que a de mulheres, uma vez que os homens são mais acometidos pela

malária devido aos seus hábitos e atividades fora da casa que geralmente oferecem maior risco de infecção (181).

Quanto às parasitoses intestinais, 52,1% da população estava infectada por pelo menos um parasito intestinal, sendo que a infecção por protozoário intestinal foi mais frequente que a por helminto. No geral, foram encontradas 10 espécies de parasitos intestinais, onde *Giardia lamblia* foi a espécie mais prevalente e entre os helmintos, a espécie *Ancylostoma duodenale* foi a mais frequente. Os estudos de prevalência de parasitos intestinais em todo o território são raros, inconsistentes e variáveis, com prevalência de 15 a 80% dependendo da região e dos grupos de indivíduos estudados (182,183). Um trabalho realizado em um assentamento agrícola no Acre analisando participantes com idade entre 1 e 90 anos encontrou prevalência de indivíduos positivos para parasitos intestinais de 53,4%, muito semelhante a prevalência encontrada em nosso estudo. Da mesma maneira, *G. lamblia* foi também a espécie mais prevalente, *A. duodenale* o helminto mais comum e o poliparasitismo intestinal bastante comum (24,5%) (184). A alta prevalência de parasitose intestinal foi concordante com outros dados encontrados na Região Amazônica (184) e os dados de coinfeção malária com parasitoses intestinais é o primeiro nesta região.

Como mostrado, a prevalência de helmintos foi muito baixa na população estudada e no grupo de indivíduos coinfectados, por isso avaliamos a coinfeção com plasmódio e parasitos intestinais independente de serem helmintos e/ou protozoários

Os enteroparasitos podem causar danos aos seus portadores como obstrução intestinal (*A. lumbricoides*), desnutrição (*A. lumbricoides* e *T. trichiura*), quadros de diarreia (*G. lamblia* e *E. histolytica*) e anemia (ancilostomídeos) (24). Como a anemia é uma característica hematológica também fortemente associada à malária, avaliamos o impacto da coinfeção de malária com parasitoses intestinais sobre a anemia nos indivíduos portadores dos dois tipos de parasitos. Os nossos dados mostram que a frequência de indivíduos anêmicos foi maior nos indivíduos com malária e coinfectados quando comparados aos indivíduos somente com parasitos intestinais e expostos, indicando que neste caso a malária é a principal causa de anemia. Além da anemia, a coinfeção com parasitos intestinais não parece alterar os dados hematológicos, visto que as alterações encontradas nos indivíduos coinfectados com parasitoses intestinais são aquelas atribuídas aos infectados

somente com malária como plaquetopenia, leucopenia (27), linfopenia e eosinopenia (30). Por fim o número de bastões foi maior somente nos grupos que apresentavam a infecção por *Plasmodium* spp., como já descrito na literatura (31) e não apresentaram diferenças devido às parasitoses intestinais.

Como dito anteriormente, a influência das infecções helmínticas na prevalência e gravidade da anemia causada pela malária ainda é controversa, mas alguns trabalhos corroboram os dados achados em nosso estudo, onde a presença dos parasitos intestinais não influencia na anemia em indivíduos com malária. Trabalhos que estudaram coinfeção de malária e helmintos também mostraram que a frequência de anemia nas crianças coinfectadas com *P. falciparum* e *A. lumbricoides* não foi diferente da frequência de indivíduos anêmicos portadores somente de *P. falciparum* (117). Já em um estudo realizado no estado do Amazonas crianças que além da malária por *P. vivax* também estavam infectadas com helmintos intestinais apresentavam uma maior concentração de hemoglobina quando comparado às crianças que estavam somente com *P. vivax*, sugerindo que a infecção helmíntica concomitante estava protegendo as crianças de desenvolver anemia (119).

Como mostrado acima, estudos recentes que investigam as interações existentes entre o parasito causador da malária e helmintos durante uma coinfeção são conflitantes. É provável que em uma coinfeção possa existir uma interação negativa entre os parasitos, caracterizada por um efeito protetor do indivíduo e por um efeito supressor em um dos patógenos ou uma interação positiva, onde ocorre a facilitação de uma infecção a partir da presença do outro parasito. Dessa forma é possível que a coinfeção de *P. vivax* e parasitos intestinais modifique o perfil de resposta imunológica a determinados antígenos específicos do plasmódio.

O nosso grupo tem caracterizado determinantes naturalmente imunogênicos de células B e T de vários antígenos de *P. vivax* candidatos a uma vacina através da análise da resposta celular específica, do reconhecimento de anticorpos específicos (classes e subclasses) nas amostras de soro da população com diferentes níveis de exposição à infecção malárica, e utiliza esses dados, em associação com os dados epidemiológicos, para determinar quais epitopos são promissores e podem estar envolvidos na imunidade protetora. Dentro deste contexto abordamos a influência da coinfeção malária com parasitoses intestinais na resposta imune às proteínas de

superfície de merozoítas AMA-1, MSP-1, e CVC, candidatas a uma vacina antimalárica.

Populações residentes em áreas endêmicas de malária apresentam alta prevalência de indivíduos com resposta positiva de anticorpos contra diversos antígenos plasmodiais candidatos vacinais como proteína de circunsporozoíta (185), GLURP (186), MSP-1 (187), MSP-9 (188), entre outros.

Os nossos dados mostram que 90,3% da população estudada apresentaram resposta de anticorpos contra pelo menos uma das proteínas estudadas. A presença de anticorpos IgG específicos foi semelhante para as proteínas AMA-1 (62,9%), MSP-1 (65,7%) e CVC (68,6%). Entretanto, observamos diferenças significativas na magnitude de resposta para as 3 proteínas estudadas. As médias do índice de reatividade (IR) de IgG anti-AMA-1 e do IR de IgG anti-MSP-1 foram significativamente maiores que o IR de IgG anti-CVC. Vale ressaltar que a frequência de reconhecimento, bem como os níveis de anticorpos encontrados por nós, são comparáveis aos encontrados a outros antígenos de *P. vivax* que são candidatos vacinais como AMA-1 (146) e MSP-1 (189).

A resposta humoral de anticorpos IgG totais contra AMA-1 parece não sofrer nenhuma modificação na presença de parasitoses intestinais visto que os grupos de indivíduos somente com malária e dos coinfetados com parasitoses intestinais apresentaram prevalências e índices de reatividade dos anticorpos similares. Entretanto foram mais altos quando comparados com os grupos de indivíduos somente com parasitoses intestinais ou sem nenhuma das duas infecções.

Com relação aos anticorpos anti- MSP-1, a prevalência e o IR de IgG total, assim como o IR de IgG1 foram menores no grupo Parasitoses Intestinais que no grupo Exposto. A frequência de IgG total anti-MSP-1 foi maior no grupo Malária que no grupo Coinfetado e embora o IR não tenha sido estatisticamente diferente, foi ligeiramente maior no grupo Malária ( $5,21 \pm 2,87$ ) que no Coinfetado ( $3,40 \pm 3,29$ ). Estes dados sugerem que anticorpos IgG totais MSP-1, mas não suas subclasses, podem estar sofrendo influência da imunomodulação desencadeada pelas infecções por helminto. Resultado semelhante foi encontrado em crianças gabonenses infectadas com o helminto *Trichuris trichiura* que quando vacinadas com o antígeno candidato vacinal GMZ2 apresentaram menores níveis de anticorpos contra este antígeno quando comparadas as crianças vacinadas não portadoras deste helminto.

Neste mesmo estudo verificou-se que diferente de *T. trichiura*, *A. lumbricoides* não alterou a resposta humoral à vacina (190).

Como *G. lamblia* foi o parasito intestinal mais prevalente foi feita uma pequena análise do perfil de resposta de anticorpos totais contra as três proteínas plasmodiais estudadas nos indivíduos infectados e não infectados por *G. lamblia* nos grupos Parasitoses Intestinais e Coinfectado. Foi constatada uma única diferença que estava no menor IR de anticorpos anti-MSP-1 nos indivíduos positivos quando comparado aos indivíduos negativos para *G. lamblia* no grupo Coinfectado. Esta alteração pontual em apenas um parâmetro de anticorpos contra uma única proteína não nos permite chegar a uma conclusão final sobre o papel das infecções por giárdia na resposta imune contra o plasmódio, mas dado este resultado certo grau de interferência pode estar sendo exercido pela presença da infecção por *G. lamblia*. Nestas infecções intestinais, a alta produção de TNF- $\alpha$  (191) que atua na eliminação deste protozoário intestinal (192) pode estar configurando um ambiente Th1 que se contrapõe a produção de citocinas de perfil Th2, como IL-4, que por sua vez está associada a proliferação de células B (193) e consequente produção de anticorpos, podendo causar assim a diminuição da resposta de anticorpos contra antígenos plasmodiais nas coinfeções malária-giardíase.

Uma resposta imune efetiva contra a malária necessita do estabelecimento de um perfil de resposta Th1 seguida por desenvolvimento lento de uma resposta de anticorpos protetores (81). A resposta de anticorpos é direcionada principalmente aos estágios sanguíneos assexuados atuando prevenindo a entrada dos merozoítas nos eritrócitos, aglutinando ou opsonizando os eritrócitos infectados, ou possibilitando a resposta mediada por células dependente de anticorpo, que pode matar os parasitos (41), sendo as principais subclasses de IgG envolvidas na eliminação dos plasmódios IgG1 e IgG3, anticorpos do tipo citofílico, enquanto IgG2 e IgG4, subclasses não citofílicas parecem se contrapor as subclasses citofílicas protetoras (56). Na população total estudada o perfil de subclasses foi semelhante para as AMA-1 e MSP-1, com predomínio das subclasses citofílicas IgG1 e IgG3, como também foi visto em estudos com estas e outras proteínas plasmodiais (55,189,194). Como estas subclasses parecem estar envolvidas na resposta imune protetora é de grande importância avaliar se a presença de parasitos intestinais modifica o perfil de subclasses específicas para os antígenos estudados.

Observamos uma predominância de anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 tanto para AMA-1 quanto para MSP-1, independente de estarem coinfectedados ou não por parasitos intestinais. Entretanto, no grupo de indivíduos com somente parasitoses intestinais o IR da subclasse IgG1 para MSP-1 e AMA-1 foi menor quando comparado ao grupo Exposto. Em contraste, neste mesmo grupo Parasitoses Intestinais, os IR das subclasses IgG2 e IgG4 foram maiores quando comparados com o grupo Exposto. Estes resultados sugerem que a presença da parasitose intestinal pode induzir anticorpos não citofílicos e estes podem estar interferindo na resposta dos anticorpos citofílicos. No caso de infecções por helmintos que polarizam a resposta para o perfil Th2, ocorre também a presença de altas concentrações séricas de IgE e anticorpos não citofílicos (88). No Senegal, os níveis de anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 específicos para MSP-3 de *P. falciparum*, antígeno candidato a uma vacina antimalárica, estavam diminuídos enquanto os níveis de IgG4 não-citofílico anti- MSP-3 encontravam-se aumentados em indivíduos coinfectedados com plasmódio e helmintos (110). Indivíduos com malária e portadores de *Schistosoma haematobium* apresentaram menor nível de anticorpos IgG1 específicos aos antígenos MSP-1 e GLURP de *P. falciparum* quando comparados à indivíduos não infectados por este helminto (111). Entretanto, outro estudo relatou resultados contrários a estes: Dialo e colaboradores encontraram níveis mais elevados de anticorpos IgG1 anti-PfMSP-1 e de IgG1 e IgG3 anti-extrato antigênico de esquizonte de *P. falciparum* em crianças coinfectedadas com malária e *S. haematobium* quando comparadas as crianças infectadas somente com *P. falciparum* (195).

Mesmo que os anticorpos sejam muito importantes na resposta à malária, outros mediadores como óxido nítrico e citocinas também atuam na eliminação da infecção plasmodial. Considerando que a maioria das informações sobre citocinas na malária e sua participação na resposta imune provém de estudos abordando os níveis séricos de uma citocina específica, ou de grupos de citocinas em pacientes infectados exclusivamente com um parasito, ou até mesmo utilizando modelos murino. Considerando ainda a existência de variações no perfil de citocinas produzidas mediante a infecção com mais de uma espécie de parasito; somado ao limitado número de trabalhos em áreas endêmicas do Brasil que estudem o perfil de citocinas e suas variações mediante as situações de coinfecção por diferentes parasitos, o nosso objetivo foi comparar o padrão de produção de citocinas entre os

grupos estudados e ainda observar a influência desses mediadores na produção de anticorpos IgG contra as proteínas estudadas.

Primeiramente, ao avaliarmos os níveis séricos médios de citocinas e quimiocinas da população encontramos alterações em todas as citocinas de perfil inflamatório estudadas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2) nos grupos estudados. Inicialmente observamos que os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-2 apresentaram um perfil muito semelhante, com níveis elevados nos grupos de indivíduos com malária e coinfectado. Tal observação sugere que apenas a infecção malárica e não as parasitoses intestinais influenciem o aumento destes níveis. A elevação dos níveis séricos de citocinas durante a infecção já havia sido relatada tanto na malária não complicada como na malária grave (196–198), contudo, sua participação na redução da carga parasitária é um dado que ainda permanece controverso. De fato vários trabalhos sugerem um papel importante desempenhado pelo TNF- $\alpha$  e IL-2 durante a infecção.

Embora pareça existir esse sinergismo entre as citocinas de perfil inflamatório na malária nós observamos dados diferentes em relação às concentrações de IFN- $\gamma$  em indivíduos coinfectados. A presença de concentrações mais elevadas nos indivíduos coinfectados e nos indivíduos apenas com parasitoses intestinais em relação ao grupo Exposto, pode sugerir que a infecção malárica somada à presença de parasitoses intestinais induza uma produção ainda mais elevada de IFN- $\gamma$ . Entretanto, vale ressaltar que diversos trabalhos demonstram que infecções helmínticas podem polarizar a resposta do hospedeiro para um perfil imune Th2 caracterizado por altos níveis de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, eosinofilia, altas concentrações no soro de IgE (87,88). Já a resposta imune contra protozoários intestinais não é tão destacadamente imunorregulatória como a resposta induzida por helmintos, entretanto infecções crônicas por protozoários foram sugeridas como possivelmente associadas ao perfil de resposta imune reguladora do tipo 1 (112). Portanto, a resposta imune regulatória desencadeada por helmintos que poderia prejudicar a resposta imune Th1 nas fases iniciais da infecção por plasmódio pode não estar sendo observada em nossos pacientes devido ao baixo número de coinfectados que apresentem infecções helmínticas (6 indivíduos).

Tal observação também pode ser corroborada quando observamos as citocinas de perfil Th2 como a IL-4 e IL-10, pois ambas também apresentaram um perfil aumentado em indivíduos com malária, independente da coinfecção. De fato,

os altos níveis de IL-10 e sua elevada frequência de produtores dentre os grupos infectados com malária (M e CI), estão de acordo com a hipótese de que esta citocina, possuindo um papel anti-inflamatório, atue inibindo mecanismos pró-inflamatórios relacionados ao *clearance* parasitário após as fases iniciais da infecção (199). Além disso, outros dados de nosso grupo ainda não publicados relatam a elevação dos níveis de IL-10 no momento do diagnóstico em pacientes da Amazônia brasileira com malária, e a drástica redução dos níveis desta citocina 15 dias após o início do tratamento. Portanto, as variações na produção de citocinas de perfil Th1 (TNF- $\alpha$  e IL-2) e Th2 (IL-4 e IL-10) estudadas em nosso trabalho parecem não sofrer alterações associadas a coinfeção malária e parasitoses intestinais.

Levando em consideração que, relacionadas a um grande repertório de ações, determinadas quimiocinas podem ser produzidas por diferentes células em resposta a estímulos inflamatórios, recrutando leucócitos para os locais de inflamação, enquanto outras são naturalmente produzidas por vários tecidos e recrutam leucócitos, especialmente linfócitos, para esses tecidos na ausência de inflamação (193) avaliamos também as diferenças no perfil de produção das quimiocinas IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  nos indivíduos estudados. Nossos dados demonstraram que indivíduos infectados apenas com parasitoses intestinais apresentavam níveis elevados de IL-8 quando comparados a todos os demais grupos. Considerando que a IL-8 é um potente quimiotático e ativador de neutrófilos (200); que sua produção pode ser ativada por prostaglandinas (201); e protozoários intestinais como *Entamoeba histolytica* são capazes de induzir uma alta produção de IL-8 em células em cultura (202), os nossos dados sugerem que outros parasitos intestinais também podem atuar estimulando a produção de IL-8. Por fim, com relação aos níveis de MCP-1, observamos um aumento nos grupos Malária, Parasitoses Intestinais e Coinfectado quando comparados ao grupo Exposto, indicando que a produção dessa quimiocina não está associada à malária especificamente. Esses dados são corroborados por Gu e colaboradores (1999) que já haviam demonstrado que a MCP-1 está fortemente envolvida a processos inflamatórios, atuando como mediadora da atração de monócitos/macrófagos aos sítios inflamatórios (203).

Vale ressaltar que os IRs dos anticorpos IgG totais contra AMA-1, MSP-1 e CVC na população correlacionaram-se significativamente com os níveis de algumas citocinas estudadas, porém não houve um padrão claro de associação destes IRs

com um dos perfis de citocinas (pró-inflamatório ou anti-inflamatório). Destacadamente IL-10 foi correlacionado ao IR de IgG contra as três proteínas, positivamente com AMA-1 e MSP-1 e negativamente com CVC. Foi sugerido que IL-10 pode induzir uma resposta com perfil Th2 e maturação de célula B levando a um aumento da produção de anticorpos como já foi visto em ensaios *in vitro* (Xu et al, 2004).

Nossos dados sugerem que as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-10 e MIP-1 $\beta$  apresentam aumentos significativos em sua concentração plasmática quando os indivíduos estão infectados com *P. falciparum* ou *P. vivax*, entretanto apenas o IFN- $\gamma$  parece ter seus níveis influenciados em situações de coinfeção malária e parasitoses intestinais. Já as quimiocinas parecem atuar nos processos inflamatórios inespecificamente não exercendo nenhuma influência na coinfeção. Entretanto ainda são necessários estudos de grande abrangência que avaliem as espécies de parasitos intestinais presentes em áreas endêmicas de malária e a sua relação com a resposta imune de indivíduos infectados com *Plasmodium* spp para determinar essa relação.

Considerando que os IR de AMA-1 correlacionou-se positivamente com os parâmetros epidemiológicos tempo de residência em área endêmica (TRAE), número de malárias anteriores (NMA) e número de malária na última coleta (NMAC), parece que estas variáveis indicadoras de tempo de exposição e história pregressa de malária estão influenciando na magnitude da resposta de anticorpos contra esta proteína. Já o tempo desde a última malária (TDUM) apresentou correlação negativa com o IR de anticorpos anti-AMA-1, ou seja, quanto menor o TDUM maior a magnitude da resposta destes anticorpos. Com relação ao IR de anticorpos contra MSP-1, NMA e NMAC correlacionaram-se positivamente com o IR de IgG anti-MSP-1 enquanto TDUM demonstrou uma correlação negativa de valor médio com este IR. Esses resultados indicam que a magnitude de resposta de anticorpos contra AMA-1 e MSP-1 está associada com o tempo passado desde a última infecção malárica e assim, a intensidade de resposta destes anticorpos pode servir como indicador de infecção recente.

A associação entre os níveis de anticorpos IgG anti-AMA-1 e IgG anti-MSP-1 com o tempo de residência em área endêmica de malária, infecção recente, tempo desde a última malária e o número de malárias anteriores sugerem que a resposta

imune aos antígenos testados é modulada por estas variáveis epidemiológicas citadas acima e não parece ser modulada pela infecção com parasitoses intestinais.

## 6 CONCLUSÕES

1- Em Porto Velho, Rondônia, existe a coinfeção de malária com parasitoses intestinais, e a prevalência desta coinfeção é igual a 16%.

2- Os parâmetros hematológicos não diferiram em virtude da presença das coinfeções com parasitos intestinais e as alterações hematológicas encontradas nos indivíduos foram àquelas atribuídas à malária.

3- A resposta humoral para AMA-1 e CVC parece não sofrer nenhuma modificação na presença de parasitoses intestinais visto que nos grupos de indivíduos com malária e coinfectados com parasitoses intestinais apresentaram prevalências e índices de reatividade dos anticorpos similares.

4- A resposta humoral de anticorpos IgG contra MSP-1 parece ser modulada pela presença de parasitoses intestinais visto que a prevalência de resposta foi menor no grupo Coinfectado quando comparado com o grupo de indivíduos somente com malária.

5- Na população estudada o perfil de subclasses foi semelhante contra as proteínas AMA-1 e MSP-1, com predomínio das subclasses citofílicas IgG1 e IgG3, independente de estarem coinfectados ou não por parasitos intestinais.

6- Nos grupos estudados encontramos alterações em todas as citocinas de perfil inflamatório (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2). Entretanto, somente os níveis séricos de IFN- $\gamma$  foram maiores no grupo coinfectado quando comparado ao grupo só com malária indicando influência da coinfeção no nível desta citocina.

7- A correlação existente entre os índices de reatividade de anticorpos contra AMA-1 e MSP-1 com os parâmetros epidemiológicos tempo de residência em área endêmica, número de malárias anteriores, número de malárias no ano da coleta e tempo desde a última malária indicam que a resposta destes anticorpos

parece estar mais associada com estes parâmetros epidemiológicos do que com a presença da coinfeção com parasitoses intestinais.

## **7 PERSPECTIVAS**

- 1-** Realizar o diagnóstico molecular por PCR para a detecção dos casos de baixa parasitemia, o que pode rearranjar os indivíduos pelos grupos.
  
- 2-** Avaliar os dados de parasitemia e verificar a sua influência nas coinfeções e nos dados hematológicos e imunológicos.
  
- 3-** Analisar a influência das coinfeções na resposta imune celular e nos perfis fenotípicos celulares mais frequentes em cada grupo.
  
- 4-** Determinar o perfil das subclasses de IgG contra a proteína PvCVC.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tuteja R. Malaria - an overview. *FEBS J.* 2007 Sep;274(18):4670–9.
2. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet.* 2004 Mar 27;363(9414):1017–24.
3. Muriu SM, Coulson T, Mbogo CM, Godfray HCJ. Larval density dependence in *Anopheles gambiae* s.s., the major African vector of malaria. *J Anim Ecol.* 2013 Jan;82(1):166–74.
4. Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988 Mar;38(2):223–30.
5. Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell. Microbiol.* 2007 May;9(5):1215–22.
6. Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz J-F, et al. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe.* 2008 Feb 14;3(2):88–96.
7. Silvie O, Mota MM, Matuschewski K, Prudêncio M. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008 Aug;11(4):352–9.
8. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat. Rev. Immunol.* 2004 Mar;4(3):169–80.
9. Krotoski WA, Garnham PC, Bray RS, Krotoski DM, Killick-Kendrick R, Draper CC, et al. Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. I. Discovery of a new latent form of *Plasmodium cynomolgi* (the hypnozoite), and failure to detect hepatic forms within the first 24 hours after infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1982 Jan;31(1):24–35.
10. Goel VK, Li X, Chen H, Liu S-C, Chishti AH, Oh SS. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 Apr 29;100(9):5164–9.
11. Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, Dluzewski AR, Bannister LH. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect. Immun.* 2004 Jan;72(1):154–8.
12. Cowman AF, Crabb BS. The *Plasmodium falciparum* genome--a blueprint for erythrocyte invasion. *Science.* 2002 Oct 4;298(5591):126–8.
13. Aikawa M, Miller LH, Rabbege J. Caveola--vesicle complexes in the plasmalemma of erythrocytes infected by *Plasmodium vivax* and *P. cynomolgi*. Unique structures related to Schüffner's dots. *Am. J. Pathol.* 1975 May;79(2):285–300.

14. Akinyi S, Hanssen E, Meyer EVS, Jiang J, Korir CC, Singh B, et al. A 95 kDa protein of *Plasmodium vivax* and *P. cynomolgi* visualized by three-dimensional tomography in the caveola-vesicle complexes (Schüffner's dots) of infected erythrocytes is a member of the PHIST family. *Mol. Microbiol.* 2012 Jun;84(5):816–31.
15. WHO | World Malaria Report 2012 [Internet]. WHO. [cited 2013 Feb 27]. Available from: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/report/en/index.html](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/index.html)
16. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Raffaele-Netto I, Camargo LMA, Barral A, et al. Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malaria severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(4):e650.
17. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med.* 2008 Jun 17;5(6):e128.
18. Lacerda MVG, Fragoso SCP, Alecrim MGC, Alexandre MAA, Magalhães BML, Siqueira AM, et al. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: to what extent does this parasite kill? *Clin. Infect. Dis.* 2012 Oct;55(8):e67–74.
19. Taylor WRJ, Hanson J, Turner GDH, White NJ, Dondorp AM. Respiratory manifestations of malaria. *Chest.* 2012 Aug;142(2):492–505.
20. Sim JE, Choi Y-C, Kim W-J. Facial Diplegia in *Plasmodium vivax* Malaria. *J Clin Neurol.* 2010 Jun;6(2):102–3.
21. Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerging Infect. Dis.* 2005 Jan;11(1):132–4.
22. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar. J.* 2010;9:115.
23. SVS M da S. SIVEP [Internet]. SIVEP - MALÁRIA Notificação de Casos. [cited 2013 Jan 10]. Available from: [http://portalweb04.saude.gov.br/sivep\\_malaria/](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/)
24. Secretaria de Vigilância em Saúde. Plano Nacional de Vigilância e Controle das Enteroparasitoses. 2005.
25. Knowles SCL. The effect of helminth co-infection on malaria in mice: a meta-analysis. *Int. J. Parasitol.* 2011 Aug 15;41(10):1041–51.
26. Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2000 Jun;13(2):277–99.
27. Hänscheid T, Längin M, Lell B, Pötschke M, Oyakhrome S, Kremsner PG, et al. Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity. *Malar. J.* 2008;7:109.

28. Maina RN, Walsh D, Gaddy C, Hongo G, Waitumbi J, Otieno L, et al. Impact of *Plasmodium falciparum* infection on haematological parameters in children living in Western Kenya. *Malar. J.* 2010;9 Suppl 3:S4.
29. Kurtzhals JA, Reimert CM, Tette E, Dunyo SK, Koram KA, Akanmori BD, et al. Increased eosinophil activity in acute *Plasmodium falciparum* infection--association with cerebral malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 1998 May;112(2):303–7.
30. Davis TM, Ho M, Supanaranond W, Looareesuwan S, Pukrittayakamee S, White NJ. Changes in the peripheral blood eosinophil count in falciparum malaria. *Acta Trop.* 1991 Jan;48(3):243–6.
31. Lima-Junior J da C, Rodrigues-da-Silva RN, Pereira VA, Storer FL, Perce-da-Silva D de S, Fabrino DL, et al. Cells and mediators of inflammation (C-reactive protein, nitric oxide, platelets and neutrophils) in the acute and convalescent phases of uncomplicated *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2012 Dec;107(8):1035–41.
32. Haldar K, Mohandas N. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009;87–93.
33. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitol. Today (Regul. Ed.).* 2000 Nov;16(11):469–76.
34. Lacerda MVG, Mourão MPG, Coelho HCC, Santos JB. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011 Aug;106 Suppl 1:52–63.
35. Chaudhary SC, Sonkar SK, Kumar V, Gupta A. Falciparum malaria presenting as subdural hematoma. *J Assoc Physicians India.* 2011 May;59:325–6.
36. Misra DP, Das S, Pattnaik M, Singh SC, Jena RK. Relationship of hepatic and renal dysfunction with haemorrhological parameters in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Assoc Physicians India.* 2011 Sep;59:552–6.
37. Seshadri P, Dev AV, Viggswarpu S, Sathyendra S, Peter JV. Acute pancreatitis and subdural haematoma in a patient with severe falciparum malaria: case report and review of literature. *Malar. J.* 2008;7:97.
38. Doolan DL, Dobano C, Baird JK. Acquired Immunity to Malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):13–36.
39. Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural Acquisition of Immunity to *Plasmodium vivax*: Epidemiological Observations and Potential Targets. *Adv. Parasitol.* 2013;81:77–131.
40. Hollingdale MR, Nardin EH, Tharavanij S, Schwartz AL, Nussenzweig RS. Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. *J. Immunol.* 1984 Feb;132(2):909–13.
41. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* 2006 Feb;28(1-2):51–60.

42. Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*. 1961 Nov 25;192:733–7.
43. McGregor IA. The passive transfer of human malarial immunity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1964 Jan;13:SUPPL 237–239.
44. Hodder AN, Crewther PE, Anders RF. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infect. Immun.* 2001 May;69(5):3286–94.
45. Joos C, Marrama L, Polson HEJ, Corre S, Diatta A-M, Diouf B, et al. Clinical protection from falciparum malaria correlates with neutrophil respiratory bursts induced by merozoites opsonized with human serum antibodies. *PLoS ONE*. 2010;5(3):e9871.
46. Wickramasinghe SN, Phillips RE, Looareesuwan S, Warrell DA, Hughes M. The bone marrow in human cerebral malaria: parasite sequestration within sinusoids. *Br. J. Haematol.* 1987 Jul;66(3):295–306.
47. Jafarshad A, Dziegiel MH, Lundquist R, Nielsen LK, Singh S, Druilhe PL. A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcγR2 and FcγR3. *J. Immunol.* 2007 Mar 1;178(5):3099–106.
48. Pratt-Riccio LR, Bianco C Jr, Totino PRR, Perce-Da-Silva DDS, Silva LA, Riccio EKP, et al. Antibodies against the Plasmodium falciparum glutamate-rich protein from naturally exposed individuals living in a Brazilian malaria-endemic area can inhibit in vitro parasite growth. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011 Aug;106 Suppl 1:34–43.
49. Polley SD, Mwangi T, Kocken CHM, Thomas AW, Dutta S, Lanar DE, et al. Human antibodies to recombinant protein constructs of Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine.* 2004 Dec 16;23(5):718–28.
50. Metzger WG, Okenu DMN, Cavanagh DR, Robinson JV, Bojang KA, Weiss HA, et al. Serum IgG3 to the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasite Immunol.* 2003 Jun;25(6):307–12.
51. Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N, et al. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat. Med.* 2000 Jun;6(6):689–92.
52. Egan AF, Morris J, Barnish G, Allen S, Greenwood BM, Kaslow DC, et al. Clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J. Infect. Dis.* 1996 Mar;173(3):765–9.
53. Corran PH, O'Donnell RA, Todd J, Uthaipibull C, Holder AA, Crabb BS, et al. The fine specificity, but not the invasion inhibitory activity, of 19-kilodalton

- merozoite surface protein 1-specific antibodies is associated with resistance to malarial parasitemia in a cross-sectional survey in The Gambia. *Infect. Immun.* 2004 Oct;72(10):6185–9.
54. Okech BA, Corran PH, Todd J, Joynson-Hicks A, Uthaipibull C, Egwang TG, et al. Fine specificity of serum antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein, PfMSP-1(19), predicts protection from malaria infection and high-density parasitemia. *Infect. Immun.* 2004 Mar;72(3):1557–67.
  55. Doodoo D, Theander TG, Kurtzhals JA, Koram K, Riley E, Akanmori BD, et al. Levels of antibody to conserved parts of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in Ghanaian children are not associated with protection from clinical malaria. *Infect. Immun.* 1999 May;67(5):2131–7.
  56. Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect. Immun.* 1992 Apr;60(4):1473–81.
  57. Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J. Exp. Med.* 1990 Dec 1;172(6):1633–41.
  58. Green TJ, Kreier JP. Demonstration of the role of cytophilic antibody in resistance to malaria parasites (*Plasmodium berghei*) in rats. *Infect. Immun.* 1978 Jan;19(1):138–45.
  59. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J. Exp. Med.* 1995 Aug 1;182(2):409–18.
  60. Stanicic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect. Immun.* 2009 Mar;77(3):1165–74.
  61. Groux H, Gysin J. Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. *Res. Immunol.* 1990 Aug;141(6):529–42.
  62. Smith EC, Taylor-Robinson AW. Parasite-specific immunoglobulin isotypes during lethal and non-lethal murine malaria infections. *Parasitol. Res.* 2003 Jan;89(1):26–33.
  63. Matsumoto S, Yukitake H, Kanbara H, Yamada H, Kitamura A, Yamada T. *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guérin induces protective immunity against infection by *Plasmodium yoelii* at blood-stage depending on shifting immunity toward Th1 type and inducing protective IgG2a after the parasite infection. *Vaccine.* 2000 Nov 22;19(7-8):779–87.

64. Smith NC, Favila-Castillo L, Monroy-Ostria A, Hirunpetcharat C, Good MF. The spleen, IgG antibody subsets and immunity to *Plasmodium berghei* in rats. *Immunol. Cell Biol.* 1997 Jun;75(3):318–23.
65. Hirunpetcharat C, Tian JH, Kaslow DC, Van Rooijen N, Kumar S, Berzofsky JA, et al. Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1[19]) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4+ T cells. *J. Immunol.* 1997 Oct 1;159(7):3400–11.
66. Shi YP, Sayed U, Qari SH, Roberts JM, Udhayakumar V, Oloo AJ, et al. Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Infect. Immun.* 1996 Jul;64(7):2716–23.
67. Dubois B, Deloron P, Astagneau P, Chougnet C, Lepers JP. Isotypic analysis of *Plasmodium falciparum*-specific antibodies and their relation to protection in Madagascar. *Infect. Immun.* 1993 Oct;61(10):4498–500.
68. Deloron P, Dubois B, Le Hesran JY, Riche D, Fievet N, Cornet M, et al. Isotypic analysis of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Cameroon, and relationship with risk of *P. falciparum* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 1997 Nov;110(2):212–8.
69. Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N, et al. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet.* 2002 Aug 24;360(9333):610–7.
70. Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu. Rev. Immunol.* 2005;23:69–99.
71. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol.* 2002 Sep 15;169(6):2956–63.
72. Choudhury HR, Sheikh NA, Bancroft GJ, Katz DR, De Souza JB. Early nonspecific immune responses and immunity to blood-stage nonlethal *Plasmodium yoelii* malaria. *Infect. Immun.* 2000 Nov;68(11):6127–32.
73. De Souza JB, Williamson KH, Otani T, Playfair JH. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infect. Immun.* 1997 May;65(5):1593–8.
74. Mohan K, Moulin P, Stevenson MM. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J. Immunol.* 1997 Nov 15;159(10):4990–8.
75. Sam H, Su Z, Stevenson MM. Deficiency in tumor necrosis factor alpha activity does not impair early protective Th1 responses against blood-stage malaria. *Infect. Immun.* 1999 May;67(5):2660–4.

76. Langhorne J, Cross C, Seixas E, Li C, Von der Weid T. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 Feb 17;95(4):1730–4.
77. Von der Weid T, Honarvar N, Langhorne J. Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. *J. Immunol.* 1996 Apr 1;156(7):2510–6.
78. Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, Fletcher H, et al. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity.* 2005 Sep;23(3):287–96.
79. Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat. Med.* 2004 Jan;10(1):29–30.
80. Maitland K, Marsh K. Pathophysiology of severe malaria in children. *Acta Trop.* 2004 Apr;90(2):131–40.
81. Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TT, et al. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J. Infect. Dis.* 1999 Oct;180(4):1288–97.
82. Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S. Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol.* 2011 Oct;27(10):442–9.
83. May J, Lell B, Luty AJ, Meyer CG, Kremsner PG. Plasma interleukin-10:Tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J. Infect. Dis.* 2000 Nov;182(5):1570–3.
84. Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koech D, Orago AS, Udhayakumar V. A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *J. Infect. Dis.* 1999 Jan;179(1):279–82.
85. Grainger JR, Smith KA, Hewitson JP, McSorley HJ, Harcus Y, Filbey KJ, et al. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-β pathway. *J. Exp. Med.* 2010 Oct 25;207(11):2331–41.
86. Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE. Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol. Rev.* 2004 Oct;201:89–116.
87. Smits HH, Everts B, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2010 Jan;10(1):3–12.
88. Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 2003 Sep;3(9):733–44.

89. Druilhe P, Tall A, Sokhna C. Worms can worsen malaria: towards a new means to roll back malaria? *Trends Parasitol.* 2005 Aug;21(8):359–62.
90. Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Co-infection of helminths and malaria: modulation of the immune responses to malaria. *Parasite Immunol.* 2006 Oct;28(10):497–506.
91. Taylor MD, LeGoff L, Harris A, Malone E, Allen JE, Maizels RM. Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. *J. Immunol.* 2005 Apr 15;174(8):4924–33.
92. Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Ordonez M, Strachan D, Griffin GE, et al. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003 May;111(5):995–1000.
93. Van den Biggelaar AH, Van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet.* 2000 Nov 18;356(9243):1723–7.
94. Lynch NR, Hagel I, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Alvarez N. Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1993 Sep;92(3):404–11.
95. Van den Biggelaar AHJ, Rodrigues LC, Van Ree R, Van der Zee JS, Hoeksma-Kruize YCM, Souverijn JHM, et al. Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren. *J. Infect. Dis.* 2004 Mar 1;189(5):892–900.
96. Cooper PJ, Espinel I, Paredes W, Guderian RH, Nutman TB. Impaired tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human onchocerciasis: a possible role for interleukin-10. *J. Infect. Dis.* 1998 Oct;178(4):1133–8.
97. Sabin EA, Araujo MI, Carvalho EM, Pearce EJ. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Infect. Dis.* 1996 Jan;173(1):269–72.
98. Farid A, Al-Sherbiny M, Osman A, Mohamed N, Saad A, Shata MT, et al. *Schistosoma* infection inhibits cellular immune responses to core HCV peptides. *Parasite Immunol.* 2005 May;27(5):189–96.
99. Lamb TJ, Graham AL, Le Goff L, Allen JE. Co-infected C57BL/6 mice mount appropriately polarized and compartmentalized cytokine responses to *Litomosoides sigmodontis* and *Leishmania major* but disease progression is altered. *Parasite Immunol.* 2005 Sep;27(9):317–24.
100. Cox FE. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology.* 2001;122 Suppl:S23–38.

101. Helmbj H, Kullberg M, Troye-Blomberg M. Altered immune responses in mice with concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* infections. *Infect. Immun.* 1998 Nov;66(11):5167–74.
102. Yoshida A, Maruyama H, Kumagai T, Amano T, Kobayashi F, Zhang M, et al. *Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice. *Int. Immunol.* 2000 Aug;12(8):1117–25.
103. Lyke KE, Dicko A, Dabo A, Sangare L, Kone A, Coulibaly D, et al. Association of *Schistosoma haematobium* infection with protection against acute *Plasmodium falciparum* malaria in Malian children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005 Dec;73(6):1124–30.
104. Le Hesran J-Y, Akiana J, Ndiaye EHM, Dia M, Senghor P, Konate L. Severe malaria attack is associated with high prevalence of *Ascaris lumbricoides* infection among children in rural Senegal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2004 Jul;98(7):397–9.
105. Murray MJ, Murray AB, Murray MB, Murray CJ. Parotid enlargement, forehead edema, and suppression of malaria as nutritional consequences of ascariasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 1977 Dec;30(12):2117–21.
106. Tshikuka JG, Scott ME, Gray-Donald K, Kalumba ON. Multiple infection with *Plasmodium* and helminths in communities of low and relatively high socio-economic status. *Ann Trop Med Parasitol.* 1996 Jun;90(3):277–93.
107. Naus CWA, Jones FM, Satti MZ, Joseph S, Riley EM, Kimani G, et al. Serological responses among individuals in areas where both schistosomiasis and malaria are endemic: cross-reactivity between *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium falciparum*. *J. Infect. Dis.* 2003 Apr 15;187(8):1272–82.
108. Correa-Oliveira R, Dusse LM, Viana IR, Colley DG, Santos Carvalho O, Gazzinelli G. Human antibody responses against schistosomal antigens. I. Antibodies from patients with *Ancylostoma*, *Ascaris lumbricoides* or *Schistosoma mansoni* infections react with schistosome antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988 Mar;38(2):348–55.
109. Mutapi F, Roussilhon C, Mduluzza T, Druilhe P. Anti-malaria humoral responses in children exposed to *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2007 Jun;102(3):405–9.
110. Roussilhon C, Brasseur P, Agnamey P, Pérignon J-L, Druilhe P. Understanding human-*Plasmodium falciparum* immune interactions uncovers the immunological role of worms. *PLoS ONE.* 2010;5(2):e9309.
111. Courtin D, Djilali-Saïah A, Milet J, Soulard V, Gaye O, Migot-Nabias F, et al. *Schistosoma haematobium* infection affects *Plasmodium falciparum*-specific IgG responses associated with protection against malaria. *Parasite Immunol.* 2011 Feb;33(2):124–31.

112. Díaz A, Allen JE. Mapping immune response profiles: The emerging scenario from helminth immunology. *European Journal of Immunology*. 2007;37(12):3319–26.
113. Deguchi M, Gillin FD, Gigli I. Mechanism of killing of *Giardia lamblia* trophozoites by complement. *J Clin Invest*. 1987 May;79(5):1296–302.
114. Faubert G. Immune Response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Jan;13(1):35–54.
115. Boef AGC, May L, Van Bodegom D, Van Lieshout L, Verweij JJ, Maier AB, et al. Parasitic infections and immune function: Effect of helminth infections in a malaria endemic area. *Immunobiology*. 2012 Aug 20;
116. Stephenson LS, Holland CV, Cooper ES. The public health significance of *Trichuris trichiura*. *Parasitology*. 2000;121 Suppl:S73–95.
117. Abanyie FA, McCracken C, Kirwan P, Molloy SF, Asaolu SO, Holland CV, et al. *Ascaris* co-infection does not alter malaria-induced anaemia in a cohort of Nigerian preschool children. *Malar. J*. 2013;12:1.
118. Midzi N, Mtapuri-Zinyowera S, Mapingure MP, Sangweme D, Chirehwa MT, Brouwer KC, et al. Consequences of polyparasitism on anaemia among primary school children in Zimbabwe. *Acta Tropica*. 2010 Jul;115(1–2):103–11.
119. Melo GC, Reyes-Lecca RC, Vitor-Silva S, Monteiro WM, Martins M, Benzecry SG, et al. Concurrent helminthic infection protects schoolchildren with *Plasmodium vivax* from anemia. *PLoS ONE*. 2010;5(6):e11206.
120. Leder K, Weller PF. Eosinophilia and helminthic infections. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2000 Jun;13(2):301–17.
121. Weller PF. The Immunobiology of Eosinophils. *New England Journal of Medicine*. 1991;324(16):1110–8.
122. Kurtzhals JAL, Reimert CM, Tette E, Dunyo SK, Koram KA, Akanmori BD, et al. Increased eosinophil activity in acute *Plasmodium falciparum* infection--association with cerebral malaria. *Clin Exp Immunol*. 1998 May;112(2):303–7.
123. Hill AVS. Vaccines against malaria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011 Oct 12;366(1579):2806–14.
124. Galinski MR, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: Merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)*. 1996 Jan;12(1):20–9.
125. Barnwell JW, Nichols ME, Rubinstein P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J. Exp. Med*. 1989 May 1;169(5):1795–802.
126. Mons B, Collins WE, Skinner JC, Van der Star W, Croon JJ, Van der Kaay HJ. *Plasmodium vivax*: in vitro growth and reinvasion in red blood cells of *Aotus nancymai*. *Exp. Parasitol*. 1988 Aug;66(2):183–8.

127. Escalante AA, Ayala FJ. Evolutionary origin of Plasmodium and other Apicomplexa based on rRNA genes. *PNAS*. 1995 Jun 20;92(13):5793–7.
128. Silvie O, Franetich J-F, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, et al. A Role for Apical Membrane Antigen 1 during Invasion of Hepatocytes by Plasmodium falciparum Sporozoites. *J. Biol. Chem.* 2004 Mar 5;279(10):9490–6.
129. Feng Z-P, Keizer DW, Stevenson RA, Yao S, Babon JJ, Murphy VJ, et al. Structure and Inter-domain Interactions of Domain II from the Blood-stage Malarial Protein, Apical Membrane Antigen 1. *Journal of Molecular Biology.* 2005 Jul 22;350(4):641–56.
130. Kocken CHM, Withers-Martinez C, Dubbeld MA, Van der Wel A, Hackett F, Valderrama A, et al. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infect. Immun.* 2002 Aug;70(8):4471–6.
131. Pizarro JC, Vulliez-Le Normand B, Chesne-Seck M-L, Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, et al. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science*. 2005 Apr 15;308(5720):408–11.
132. Peterson MG, Marshall VM, Smythe JA, Crewther PE, Lew A, Silva A, et al. Integral membrane protein located in the apical complex of Plasmodium falciparum. *Mol. Cell. Biol.* 1989 Jul;9(7):3151–4.
133. Nair M, Hinds MG, Coley AM, Hodder AN, Foley M, Anders RF, et al. Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate, Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (AMA1). *J. Mol. Biol.* 2002 Sep 27;322(4):741–53.
134. Hodder AN, Crewther PE, Matthew ML, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, et al. The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1. *J. Biol. Chem.* 1996 Nov 15;271(46):29446–52.
135. Li F, Dluzewski A, Coley AM, Thomas A, Tilley L, Anders RF, et al. Phage-displayed peptides bind to the malarial protein apical membrane antigen-1 and inhibit the merozoite invasion of host erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50303–10.
136. Chesne-Seck M-L, Pizarro JC, Vulliez-Le Normand B, Collins CR, Blackman MJ, Faber BW, et al. Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2005 Nov;144(1):55–67.
137. Chitnis CE, Blackman MJ. Host cell invasion by malaria parasites. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)*. 2000 Oct;16(10):411–5.
138. Treeck M, Zacherl S, Herrmann S, Cabrera A, Kono M, Struck NS, et al. Functional Analysis of the Leading Malaria Vaccine Candidate AMA-1 Reveals

- an Essential Role for the Cytoplasmic Domain in the Invasion Process. *PLoS Pathog.* 2009 Mar 6;5(3):e1000322.
139. Deans J a., Knight A m., Jean W c., Waters A p., Cohen S, Mitchell G h. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. *Parasite Immunology.* 1988;10(5):535–52.
  140. Stowers AW, Kennedy MC, Keegan BP, Saul A, Long CA, Miller LH. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. *Infect. Immun.* 2002 Dec;70(12):6961–7.
  141. Dicko A, Diemert DJ, Sagara I, Sogoba M, Niambele MB, Assadou MH, et al. Impact of a *Plasmodium falciparum* AMA1 Vaccine on Antibody Responses in Adult Malians. *PLoS ONE.* 2007 Oct 17;2(10):e1045.
  142. Polhemus ME, Magill AJ, Cummings JF, Kester KE, Ockenhouse CF, Lanar DE, et al. Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* apical membrane protein (AMA-1) FMP2.1, adjuvanted with AS02A, in malaria-naïve adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine.* 2007 May 22;25(21):4203–12.
  143. Malkin EM, Diemert DJ, McArthur JH, Perreault JR, Miles AP, Giersing BK, et al. Phase 1 Clinical Trial of Apical Membrane Antigen 1: an Asexual Blood-Stage Vaccine for *Plasmodium falciparum* Malaria. *Infect Immun.* 2005 Jun;73(6):3677–85.
  144. Thomas AW, Narum D, Waters AP, Trape JF, Rogier C, Gonçalves A, et al. Aspects of immunity for the AMA-1 family of molecules in humans and non-human primates malarias. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1994 Jan;89:67–70.
  145. Udhayakumar V, Kariuki S, Kolczack M, Girma M, Roberts JM, Oloo AJ, et al. Longitudinal study of natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Aug 1;65(2):100–7.
  146. Rodrigues MHC, Rodrigues KM, Oliveira TR, Cômado AN, Rodrigues MM, Kocken CHM, et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int. J. Parasitol.* 2005 Feb;35(2):185–92.
  147. Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettli AU, Braga EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006 Oct;75(4):582–7.
  148. Múfalo BC, Gentil F, Bargieri DY, Costa FTM, Rodrigues MM, Soares IS. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. *Microbes and Infection.* 2008 Oct;10(12–13):1266–73.

149. Gentil F, Bargieri DY, Leite JA, Franoso KS, Patricio MBM, Esp ndola NM, et al. A recombinant vaccine based on domain II of Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice. *Vaccine*. 2010 Aug 31;28(38):6183–90.
150. Natarajan R, Thathy V, Mota MM, Hafalla JCR, M nard R, Vernick KD. Fluorescent Plasmodium berghei sporozoites and pre-erythrocytic stages: a new tool to study mosquito and mammalian host interactions with malaria parasites. *Cellular Microbiology*. 2001;3(6):371–9.
151. Franke-Fayard B, Trueman H, Ramesar J, Mendoza J, Van der Keur M, Van der Linden R, et al. A Plasmodium berghei reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2004 Sep;137(1):23–33.
152. Grynberg P, Fernandes Fontes CJ, Braga EM. Association between particular polymorphic residues on apical membrane antigen 1 (AMA-1) and platelet levels in patients with vivax malaria. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007 Nov;13(11):1089–94.
153. Holder AA. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog Allergy*. 1988;41:72–97.
154. Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J. Exp. Med.* 1990 Jul 1;172(1):379–82.
155. Blackman MJ, Scott-Finnigan TJ, Shai S, Holder AA. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. *J. Exp. Med.* 1994 Jul 1;180(1):389–93.
156. Lim KJ, Park JW, Yeom J-S, Lee Y-H, Yoo SB, Oh JH, et al. Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can be remembered for more than 30 years in persons exposed to Plasmodium vivax. *Parasitol. Res.* 2004 Mar;92(5):384–9.
157. Chitarra V, Holm I, Bentley GA, P tres S, Longacre S. The crystal structure of C-terminal merozoite surface protein 1 at 1.8   resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. *Mol. Cell.* 1999 Apr;3(4):457–64.
158. O'Donnell RA, De Koning-Ward TF, Burt RA, Bockarie M, Reeder JC, Cowman AF, et al. Antibodies against Merozoite Surface Protein (Msp)-119 Are a Major Component of the Invasion-Inhibitory Response in Individuals Immune to Malaria. *J Exp Med.* 2001 Jun 18;193(12):1403–12.
159. Kumar S, Collins W, Egan A, Yadava A, Garraud O, Blackman MJ, et al. Immunogenicity and efficacy in aotus monkeys of four recombinant Plasmodium falciparum vaccines in multiple adjuvant formulations based on the 19-kilodalton C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect. Immun.* 2000 Apr;68(4):2215–23.

160. Daly TM, Long CA. Humoral response to a carboxyl-terminal region of the merozoite surface protein-1 plays a predominant role in controlling blood-stage infection in rodent malaria. *J. Immunol.* 1995 Jul 1;155(1):236–43.
161. Ling IT, Ogun SA, Holder AA. The combined epidermal growth factor-like modules of *Plasmodium yoelii* Merozoite Surface Protein-1 are required for a protective immune response to the parasite. *Parasite Immunol.* 1995 Aug;17(8):425–33.
162. Perera KLRL, Handunnetti SM, Holm I, Longacre S, Mendis K. Baculovirus Merozoite Surface Protein 1 C-Terminal Recombinant Antigens Are Highly Protective in a Natural Primate Model for Human *Plasmodium vivax* Malaria. *Infect Immun.* 1998 Apr;66(4):1500–6.
163. Yang C, Collins WE, Sullivan JS, Kaslow DC, Xiao L, Lal AA. Partial Protection against *Plasmodium vivax* Blood-Stage Infection in Saimiri Monkeys by Immunization with a Recombinant C-Terminal Fragment of Merozoite Surface Protein 1 in Block Copolymer Adjuvant. *Infect Immun.* 1999 Jan;67(1):342–9.
164. Lee EAM, Palmer DR, Flanagan KL, Reece WHH, Odhiambo K, Marsh K, et al. Induction of T Helper Type 1 and 2 Responses to 19-Kilodalton Merozoite Surface Protein 1 in Vaccinated Healthy Volunteers and Adults Naturally Exposed to Malaria. *Infect Immun.* 2002 Mar;70(3):1417–21.
165. Ockenhouse CF, Angov E, Kester KE, Diggs C, Soisson L, Cummings JF, et al. Phase I safety and immunogenicity trial of FMP1/AS02A, a *Plasmodium falciparum* MSP-1 asexual blood stage vaccine. *Vaccine.* 2006 Apr 5;24(15):3009–17.
166. Ferreira MU, Ribeiro WL, Tonon AP, Kawamoto F, Rich SM. Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*. *Gene.* 2003 Jan 30;304:65–75.
167. Jongwutiwes S, Tanabe K, Kanbara H. Sequence conservation in the C-terminal part of the precursor to the major merozoite surface proteins (MSP1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993 May;59(1):95–100.
168. Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1993 May;59(1):1–14.
169. Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Trop.* 1999 Jan 15;72(1):13–24.
170. Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettli AU, Braga EM. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. *Parasitol. Res.* 2005 Apr;95(6):420–6.

171. Soares IS, Da Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999 Mar;60(3):357–63.
172. Soares IS, Levitus G, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect. Immun.* 1997 May;65(5):1606–14.
173. Waters AP, Higgins DG, McCutchan TF. The Phylogeny of malaria: A useful study. *Parasitology Today.* 1993 Jul;9(7):246–50.
174. Matsumoto Y, Aikawa M, Barnwell JW. Immunoelectron microscopic localization of vivax malaria antigens to the clefts and caveola-vesicle complexes of infected erythrocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988 Oct;39(4):317–22.
175. Udagama PV, Atkinson CT, Peiris JS, David PH, Mendis KN, Aikawa M. Immunoelectron microscopy of Schüffner's dots in Plasmodium vivax-infected human erythrocytes. *Am. J. Pathol.* 1988 Apr;131(1):48–52.
176. Skinner-Adams TS, McCarthy JS, Gardiner DL, Andrews KT. HIV and malaria co-infection: interactions and consequences of chemotherapy. *Trends in Parasitology.* 2008 Jun 1;24(6):264–71.
177. Troye-Blomberg M, Berzins K. Immune interactions in malaria co-infections with other endemic infectious diseases: implications for the development of improved disease interventions. *Microbes Infect.* 2008 Jul;10(9):948–52.
178. Sokhna C, Le Hesran J-Y, Mbaye PA, Akiana J, Camara P, Diop M, et al. Increase of malaria attacks among children presenting concomitant infection by Schistosoma mansoni in Senegal. *Malar. J.* 2004 Nov 15;3:43.
179. Putaporntip C, Jongwutiwes S, Seethamchai S, Kanbara H, Tanabe K. Intragenic recombination in the 3' portion of the merozoite surface protein 1 gene of Plasmodium vivax. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000 Jul;109(2):111–9.
180. Katsuragawa TH, Cunha RP de A, De Souza DCA, Gil LHS, Cruz RB, Silva A de AE, et al. [Malaria and hematological aspects among residents to be impacted by reservoirs for the Santo Antônio and Jirau Hydroelectric Power Stations, Rondônia State, Brazil]. *Cad Saude Publica.* 2009 Jul;25(7):1486–92.
181. WHO | Publications: Gender [Internet]. WHO. [cited 2013 Mar 6]. Available from: <http://www.who.int/gender/documents/gender/en/index.html>
182. Santana LR, Alencar MJM, Rouquayrol MZ. Poliparasitismo intestinal e recidiva de enteroparasitoses em crianças de tenra idade; Intestinal polyparasitism and recidivous enteroparasitism in low age children. *Rev. bras. anal. clin.* 1994;26(2):50–2.

183. Muniz PT, Ferreira MU, Ferreira CS, Conde WL, Monteiro CA. Intestinal parasitic infections in young children in São Paulo, Brazil: prevalences, temporal trends and associations with physical growth. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002 Jul;96(5):503–12.
184. Souza EA de, Silva-Nunes M da, Malafronte R dos S, Muniz PT, Cardoso MA, Ferreira MU. Prevalência e distribuição espacial de parasitoses intestinais em assentamento agrícola na Amazônia rural, Acre, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública.* 2007 Feb;23(2):427–34.
185. Arruda ME, Zimmerman RH, Souza RM, Oliveira-Ferreira J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2007 Jun;102(3):367–72.
186. Pratt-Riccio LR, Lima-Junior JC, Carvalho LJM, Theisen M, Espíndola-Mendes EC, Santos F, et al. Antibody response profiles induced by *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein in naturally exposed individuals from a Brazilian area endemic for malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005 Dec;73(6):1096–103.
187. Badu K, Afrane YA, Larbi J, Stewart VA, Waitumbi J, Angov E, et al. Marked variation in MSP-119 antibody responses to malaria in western Kenyan highlands. *BMC Infectious Diseases.* 2012 Mar 1;12(1):50.
188. Lima-Junior JC, Rodrigues-da-Silva RN, Banic DM, Jiang J, Singh B, Fabrício-Silva GM, et al. Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 Alleles on IgG Antibody Response to the *P. vivax* MSP-1, MSP-3 $\alpha$  and MSP-9 in Individuals from Brazilian Endemic Area. *PLoS ONE.* 2012 May 23;7(5):e36419.
189. Fernandez-Becerra C, Sanz S, Brucet M, Stanisic DI, Alves FP, Camargo EP, et al. Naturally-acquired humoral immune responses against the N- and C-termini of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay. *Malar. J.* 2010;9:29.
190. Esen M, Mordmüller B, De Salazar PM, Adegnikaa AA, Agnandji ST, Schaumburg F, et al. Reduced antibody responses against *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens in the presence of *Trichuris trichiura*. *Vaccine.* 2012 Dec 14;30(52):7621–4.
191. Bayraktar MR, Mehmet N, Durmaz R. Serum cytokine changes in Turkish children infected with *Giardia lamblia* with and without allergy: Effect of metronidazole treatment. *Acta Trop.* 2005 Aug;95(2):116–22.
192. Zhou P, Li E, Shea-Donohue T, Singer SM. Tumour necrosis factor alpha contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. *Parasite Immunol.* 2007 Jul;29(7):367–74.
193. MBBS AKA, PhD AHHLM, MD SP. *Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access, 7e.* 7th ed. Saunders; 2011.

194. Mourão LC, Morais CG, Bueno LL, Jimenez MC, Soares IS, Fontes CJ, et al. Naturally acquired antibodies to Plasmodium vivax blood-stage vaccine candidates (PvMSP-1<sub>19</sub> and PvMSP-3 $\alpha$ <sub>359-798</sub> and their relationship with hematological features in malaria patients from the Brazilian Amazon. *Microbes Infect.* 2012 Aug;14(9):730–9.
195. Diallo TO, Remoue F, Gaayeb L, Schacht A-M, Charrier N, De Clerck D, et al. Schistosomiasis Coinfection in Children Influences Acquired Immune Response against Plasmodium falciparum Malaria Antigens. *PLoS ONE.* 2010 Sep 15;5(9):e12764.
196. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, et al. Serum Levels of the Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 Beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and IL-12(p70) in Malian Children with Severe Plasmodium falciparum Malaria and Matched Uncomplicated Malaria or Healthy Controls. *Infect Immun.* 2004 Oct;72(10):5630–7.
197. Park J-W, Park S-H, Yeom J-S, Huh A-J, Cho Y-K, Ahn J-Y, et al. Serum cytokine profiles in patients with Plasmodium vivax malaria: a comparison between those who presented with and without thrombocytopenia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 2003;97(4):339–44.
198. Baptista JL, Vanham G, Wéry M, Van Marck E. Cytokine levels during mild and cerebral falciparum malaria in children living in a mesoendemic area. *Trop. Med. Int. Health.* 1997 Jul;2(7):673–9.
199. Akanmori BD, Kurtzhals JAL, Goka BQ, Adabayeri V, Ofori MF, Nkrumah FK, et al. Distinct patterns of cytokine regulation in discrete clinical forms of Plasmodium falciparum malaria. *European Cytokine Network.* 2000;11(1):113–8.
200. Montón C, Torres A. Lung inflammatory response in pneumonia. *Monaldi Arch Chest Dis.* 1998 Feb;53(1):56–63.
201. Yu Y, Chadee K. Prostaglandin E2 Stimulates IL-8 Gene Expression in Human Colonic Epithelial Cells by a Posttranscriptional Mechanism. *J Immunol.* 1998 Oct 1;161(7):3746–52.
202. Dey I, Chadee K. Prostaglandin E2 produced by Entamoeba histolytica binds to EP4 receptors and stimulates interleukin-8 production in human colonic cells. *Infect. Immun.* 2008 Nov;76(11):5158–63.
203. Gu L, Tseng SC, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem. Immunol.* 1999;72:7–29.

## **9 APÊNDICES**

### **9.1 Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Instituições:** Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro; Laboratório Central de Saúde – LACEN, Porto Velho.

**Título do Projeto de Pesquisa:** Malária e parasitoses intestinais: aspectos clínico-epidemiológicos, parasitológicos, bioquímicos e imunológicos e avaliação das co-infecções em área com população de assentamento no Estado de Rondônia.

**Coordenadores da Pesquisa:** Joseli de Oliveira Ferreira e Dalma Maria Banic (Malária), Antonio Teva e Fatima Conceição Silva (Leishmaniose Tegumentar Americana) e Paulo Zuquim Antas (Tuberculose).

**Pesquisadores:** Fatima Santos, Cesarino J. Lima Aprigio, Cleoni Mendes de Lima, Rui Rafael Durlacher, Fabio Luis Storer, Fatima Madeira, Fernanda Nazaré Morgado

**Telefone para contato:** 021-3865-8115; 069-3216-530

**Nome do Voluntário:** \_\_\_\_\_

As doenças infecciosas são um grande problema no Brasil. Em Rondônia a mais conhecida é a malária, mas outras doenças como a tuberculose, as leishmanioses e as parasitoses intestinais também tem sido diagnosticadas. Os pesquisadores que estão fazendo o estudo para o qual estou sendo convidado, me informaram que eles gostariam de estudar a presença destas doenças na população da área onde eu moro.

Assim, Eu, ....., declaro que sou voluntário no estudo sobre a presença destas doenças na minha região. Para que eu possa participar como voluntário, terei de fazer vários exames (item C) para ver se eu estou com uma ou mais das doenças que vão ser estudadas (malária, tuberculose, leishmaniose e parasitoses intestinais). Fui informado que este estudo é para obter mais conhecimentos sobre estas doenças e o que acontece quando mais de uma delas for encontrada na mesma pessoa. Fui também informado que, caso alguma dessas doenças for diagnosticada em mim, eu serei encaminhado a uma unidade de saúde para fazer o tratamento e o acompanhamento do meu caso. A minha participação em nada alterará o atendimento nas unidades de saúde, caso eu venha a precisar por outros motivos. Uma parte dos resultados deste estudo me beneficiará caso eu esteja com uma dessas doenças, pois terei o diagnóstico feito e poderei ser tratado, mas outra parte não me beneficiará diretamente, pois servirá para estudar estas doenças. No entanto, estes resultados poderão no futuro beneficiar outras pessoas que também tenham a minha doença. Todos os resultados serão relatados à minha pessoa e considerados confidenciais, podendo os mesmos serem divulgados na forma de comunicação e artigos científica. Entretanto não será permitido a minha identificação.

### **Pelo responsável fui informado de que:**

Este documento procura fornecer informações sobre as doenças que serão estudadas e o que será realizado, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e possíveis riscos. Poderei recusar-me a participar da pesquisa ou, mesmo, dela me afastar em qualquer tempo, sem que este fato me venha a causar qualquer constrangimento. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos. Os investigadores se obrigam a não revelar minha identidade em qualquer publicação resultante deste estudo, assim como, poderão interromper minha participação, a qualquer tempo, por razões técnico/ médicas quando então, me serão fornecidos aconselhamentos e orientação.

A minha participação no projeto consiste em autorizar a realização de exames para avaliar se tenho estas doenças e que esse material seja utilizado neste estudo. Também autorizo que parte das amostras coletadas seja estocada a fim de servir para outros estudos que tenham como objetivo a melhor compreensão da doença, o desenvolvimento e avaliação de novos métodos de diagnóstico; avaliação da resposta a antígenos candidatos a uma vacina etc. desde que tal estudo seja previamente analisado e autorizado por um Comitê de Ética em Pesquisa. É importante saber das seguintes informações:

**A- O problema de saúde objeto da investigação:**

As doenças que serão procuradas são: 1- malária- doença transmitida por mosquito, muito comum em Rondônia e que causa momentos de febre alta e calafrios após os quais eu fico cansado e sem forças para trabalhar; 2- leishmaniose cutânea- é uma doença da pele que produz uma ferida de tamanho variável de acordo com a reação do organismo do doente. É causada por um micróbio denominado *Leishmania* e também é transmitida por um inseto; 3- tuberculose- é uma doença que é transmitida pela respiração e começa nos pulmões dando febre, tosse e catarro, pode depois se espalhar pelo organismo, mas isto não é comum; 4- parasitoses intestinais- são vermes e pequenos agentes que se instalam no meu intestino e podem ou não causar doença. Existem os grandes vermes como as lumbrigas e outros, bem pequenos que são chamados de protozoários e que só podem ser vistos no microscópio. Para todas estas doenças existe tratamento, mas ainda não existe forma de prevenir com vacinas.

**B- Objetivo do trabalho dos pesquisadores:**

O objetivo deste trabalho, além de verificar se eu tenho uma destas doenças, é estudar (identificar) que parasitas estão presentes na minha região, se a presença de mais de um deles na mesma pessoa pode fazer as doenças ficarem diferentes (para melhor ou para pior) e se os pesquisadores podem identificar um tipo de resposta do organismo (imunológica) dos pacientes que seja protetora (benéfica). O conhecimento desta resposta poderá ser importante para se tentar prever a evolução da doença e com isto tentar evitar ou diminuir as formas graves. Além disto, o melhor conhecimento destas doenças pode, no futuro, ajudar o desenvolvimento de novos tratamentos e mesmo de uma vacina.

**C- Exames, procedimentos e tratamento que serão utilizados:**

Inicialmente haverá coleta de informações sobre a doença através de uma entrevista detalhada e preenchimento de um questionário por um membro da equipe, exame médico e coleta de sangue para realização de vários exames (distensão e gota espessa para diagnóstico, hemograma completo, testes imunológicos, tipagem de células e produtos secretados por elas, entre outros). Para isto será necessária a coleta 30mL de sangue por via endovenosa em duas ocasiões: no dia do diagnóstico antes do tratamento (D0), podendo ser solicitada para uma coleta em outra ocasião para verificação de cura. Se a médica suspeitar que eu tenho Leishmaniose farão um teste na pele (injeção de 0,1 mL em um dos braços), chamado teste de Montenegro (para leishmaniose) para auxiliar no diagnóstico dessa doença. Além disso, se eu tiver alguma ferida no corpo que seja suspeita de leishmaniose, será feita uma biópsia (com anestesia) com retirada de um pedaço (não maior eu 6mm de diâmetro) da ferida, que será dividido em partes para o diagnóstico da doença, isolando o parasita e fazendo histopatologia, e para o estudo científico. No caso de suspeita de tuberculose eu terei de colher uma amostra de escarro para diagnóstico de tuberculose em pote limpo e levar um pote limpo para casa para colher uma amostra de escarro na manhã do dia seguinte ao despertar. Para verificar se eu tenho alguma verminose vou ter que colher uma amostra de fezes em um pote limpo (chamada amostra fresca) e uma amostra de fezes num pote contendo um líquido vermelho (chamada fezes conservadas). Fui informado que o líquido vermelho (MIF) não é para ser tomado, e sim para colocar as fezes nele dentro do pote (as fezes servem para fazer o diagnóstico das parasitoses intestinais). Todos estes procedimentos são usados na rotina de diagnóstico e servem para confirmar que estou com um dos parasitas que provocam as doenças que vão ser estudadas. Eu posso fazer todos os exames ou apenas alguns, mas como cada um deles serve para doenças diferentes poderei não ser diagnosticado para algumas deles se não fizer todos os exames.

**D- Benefícios:**

Com a exceção da malária, as outras doenças não são diagnosticadas com facilidade, e isto traz problemas para o controle delas na minha região. Com o diagnóstico poderei ser encaminhado a uma unidade de saúde para cuidar do meu caso. Além disto, alguns trabalhos têm mostrado que se uma pessoa tiver mais de um parasita produzindo doença ao

mesmo tempo, algumas vezes as doenças podem ter mais problema para serem curadas pelos remédios. O estudo da resposta imune em pacientes com as doenças do estudo tem apontado para um importante papel de algumas células e fatores do organismo (imunológicos) na evolução das doenças. No entanto, mais estudos são necessários para tentar esclarecer o seu papel na regulação da resposta imune levando à cura ou à proteção. Estes conhecimentos poderão fornecer importantes informações para se prever a evolução destas enfermidades nos indivíduos doentes e, para estabelecer uma futura vacina para uma ou mais delas.

**E- Inconvenientes:**

A reação positiva ao teste de Montenegro se acompanha de inflamação apenas (restrita) à área de aplicação do teste na pele. Este, no entanto, é o teste padrão para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. A coleta de sangue pode produzir em alguns casos hematoma (rouidão) local que desaparece em 3 a 5 dias. A biópsia é feita sob anestesia no local da lesão (ferida). Será realizado curativo compressivo após biópsia e não devo retirar o curativo por 24 horas. Após 24 horas, o curativo poderá ser retirado, e diariamente deverá ser feito novo curativo. Receberei gaze estéril e esparadrapo ou atadura de gaze para os curativos. O ponto poderá ser retirado em 5 dias pelo próprio médico ou em posto de cuidados de saúde. Fui também informado de que, como o ponto foi realizado em úlcera ele poderá sair sozinho sem prejuízo da cicatrização e o procedimento de biópsia não deixará cicatriz suplementar, pois será realizado sobre a úlcera e a cicatrização da mesma ocorrerá de forma a sobrepor o local da biópsia.

Serei informado de cada passo pelo médico responsável e qualquer alteração devo comunicar ao pessoal responsável que verificará a necessidade de cuidados locais.

**F- Riscos potenciais conhecidos até os dias atuais:**

Não há riscos potenciais visto que os procedimentos que serão utilizados durante este trabalho são os normalmente usados para o diagnóstico: da malária, leishmaniose tegumentar, tuberculose e parasitoses intestinais.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
**Nome do voluntário**

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
**Nome do Pesquisador**

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
**Testemunha 1<sup>1</sup>**

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
**Testemunha 2<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Apenas no caso de voluntários impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito.

<sup>2</sup> Apenas no caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.

## 9.2 Apêndice B: Questionário epidemiológico

	REGISTRO N°	Data:
<p><b>PROJETO:</b> Malária e parasitoses intestinais: aspectos clínicos, parasitológicos, bioquímicos e imunológicos e avaliação das co-infecções em área com população de assentamento no Estado de Rondonia.</p>		
<b>DADOS PESSOAIS</b>		
<b>NOME:</b>	<b>SEXO:</b> F M	
<b>IDENTIDADE:</b>		
<b>IDADE:</b>	<b>NATURALIDADE:</b>	<b>PROCEDÊNCIA:</b>
<b>ENDEREÇO ATUAL:</b>		
<b>FONE:</b>		
<b>NÚMERO DE RESIDENTES NO ENDEREÇO ATUAL:</b>		
<b>PROFISSÃO:</b>		
<b>TEMPO DE RESIDÊNCIA (ANOS):</b>		
Área endêmica malária (anos): Rondônia (anos):		
Endereço atual:		
<b>LOCAL DE MORADIAS ANTERIORES DENTRO E FORA DE RONDONIA:</b>		
<b>HISTÓRIA PREGRESSA DE MALÁRIA</b>		
<b>NÚMERO DE INFECÇÕES ANTERIORES DE MALÁRIA:</b>		
Espécies: <i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i> <i>P. malariae</i> Nenhuma Não lembra		
<b>NÚMERO DE INFECÇÕES ESSE ANO (2010):</b>		
Espécies: <i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i> <i>P. malariae</i> Nenhuma Não lembra		
<b>DATA DA ÚLTIMA INFECÇÃO:</b>		
Espécies: <i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i> <i>P. malariae</i> Nenhuma Não lembra		
<b>LOCAL PROVAVEL DE INFECÇÃO:</b>		
<b>FEZ O TRATAMENTO COMPLETO?:</b> Sim Não		
<b>JÁ FOI HOSPITALIZADO COM MALÁRIA:</b> Sim Não Data:		
<b>MALÁRIA GRAVE NA FAMÍLIA:</b> Sim Não Data: <b>OBS:</b>		
<b>TEM ALGUÉM NA FAMÍLIA COM MALÁRIA OU TEVE MALÁRIA RECENTEMENTE?</b> Sim Não Data:		

<b>EXPOSIÇÃO A INFEÇÃO MALÁRICA</b>				
<b>LOCALIZAÇÃO DA CASA</b>				
Cidade	Periferia	Floresta	Coleção d'água	Nenhuma
<b>TIPO DE CASA (PROTEÇÃO EM RELAÇÃO AO CONTATO COM MOSQUITO)</b>				
Boa	Parcial	Nenhuma		
<b>ATIVIDADES AO AMANHECER:</b>				
<b>ATIVIDADES AO ANOITECER:</b>				
<b>SABE COMO A MALÁRIA É TRANSMITIDA?</b>				
Sim	Não	Foi informado	Foi informado, mas não acredita	
<b>COMO?:</b>				
<b>USO DE MEDIDAS PROFILÁTICAS</b>				
Mosquiteiro	Inseticida	antimaláricos	Outras	Nenhuma
Data da última borrifação de inseticida (FNS):				
<b>INFEÇÃO ATUAL</b>				
<b>SINTOMAS</b>				
Febre, _____°C				
Cefaléia	Calafrios	Náusea	Mialgia	Nenhum
<b>DATA DO INICIO DOS SINTOMAS:</b>				
<b>DIAGNÓSTICO:</b> P. falciparum P. vivax P. malariae <i>Nenhuma</i>				
<b>PARASITEMIA:</b>				
<b>LOCAL PROVÁVEL DE INFEÇÃO:</b>				
<b>RECEBEU TRANSFUÇÃO DE SANGUE?:</b> Sim Não Data:				
<b>É DOADOR DE SANGUE?:</b> Sim Não Data da última doação:				
<b>COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO</b>				
<b>GOTA ESPESSA</b>	<b>ESFREGAÇO</b>	<b>PLASMA</b>		
<b>CÉLULAS</b>	<b>HLA</b>	<b>PARASITAS</b>		
<b>OBS:</b>				