

Universidade do Grande Rio Professor José de Souza Herdy –
UNIGRANRIO
Escola de Ciências da saúde- ECS
Curso de Biomedicina



JENIFER PEIXOTO DE BARROS

Avaliação da resposta imune humoral contra as proteínas
GLURP e MSP-3 de *Plasmodium falciparum* em indivíduos
residentes na Amazônia brasileira

DUQUE DE CAXIAS- RIO DE JANEIRO

Universidade do Grande Rio Professor José de Souza Herdy –
UNIGRANRIO

Escola de Ciências da saúde- ECS

Curso de Biomedicina

JENIFER PEIXOTO DE BARROS

**Avaliação da resposta imune humoral contra as proteínas GLURP e
MSP-3 de *Plasmodium falciparum* em indivíduos residentes na Amazônia
brasileira**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade do Grande
Rio Professor José de Souza Herdy,
como requisito necessário à obtenção
do título de Bacharelado em
Biomedicina

Orientadores:
Dr Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro
Drª Lilian Rose Pratt Riccio

Laboratório de Pesquisa em Malária
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

DUQUE DE CAXIAS-RIO DE JANEIRO

2018

Nº ACERVO

93253

CATALOGAÇÃO NA FONTE/BIBLIOTECA - UNIGRANRIO

BZ77a

Barros, Jenifer Peixoto de.

Avaliação da resposta imune humoral contra as proteínas GLURP e MSP-3 de *Plasmodium falciparum* em indivíduos residentes na Amazônia brasileira/Jenifer Peixoto de Barros. – 2018.

69 f. : il. ; 31 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em Biomedicina) – Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy", Escola de Ciências da Saúde, Duque de Caxias, 2018.

"Orientadores: Dr. Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro, Dr^a Lillian Rose Pratt Riccio".

Bibliografia: f. 61-69.

1. Biomedicina. 2. Malária. 3. *Plasmodium falciparum*. I. Ribeiro, Cláudio Tadeu Daniel. II. Riccio, Lillian Rose Pratt. III. Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy". IV. Título.

EXEMPLAR

Universidade do Grande Rio Professor José de Souza Herdy –
UNIGRANRIO

Escola de Ciências da saúde- ECS

Laboratório de Pesquisa em Malária



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Termo de Aprovação

AUTORA: JENIFER PEIXOTO DE BARROS

**Avaliação da resposta imune humoral contra as proteínas GLURP e
MSP-3 de *Plasmodium falciparum* em indivíduos residentes na Amazônia
Brasileira**

Aprovada em: 30/11/18

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade do Grande Rio Professor José de Souza Herdy, como requisito necessário à obtenção do título de Bacharelado em Biomedicina, pela seguinte banca examinadora:



Profª Drª Lilian Rose Pratt Riccio
Orientadora- Laboratório de Pesquisa em Malária
Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ



Profª Msc Barbara de Oliveira Baptista
Doutoranda- Laboratório de Pesquisa em Malária
Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ



Prof. Dr. Júlio Vianna Barbosa
Universidade do Grande Rio Professor José de Souza Herdy, UNIGRANRIO

Rio de Janeiro, 30 de novembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus toda honra, toda glória e todo louvor! Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado a oportunidade e a bênção de ter concluído a Graduação de Biomedicina pela qual se não fosse Ele, não teria condições financeiras e emocionais.

Agradeço ao meu tio Davi Gonçalves pelo apoio financeiro da Graduação e por ter confiado em mim! Ele foi usado como um canal de bênçãos para a minha vida e creio que Deus irá abençoá-lo muito.

Agradeço aos meus pais Marcos Magalhães e Dayse Peixoto e irmão João Pedro Peixoto que acreditaram e me apoiaram em tudo desde o começo! Sem o apoio de vocês eu não teria conseguido.

Aos meus avós Cléa Gonçalves, Elias Soares, Bernadete Magalhães e Jonas Barros, e aos meus tios Fernanda Magalhães e Ramon Gonçalves pelo apoio financeiro e emocional que me deram durante todo o curso.

Agradeço imensamente aos meus orientadores Dr. Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro e Dr^a Lillian Rose Pratt-Riccio por terem me recebido no Laboratório de Pesquisa em Malária (FIOCRUZ), me dando oportunidade, estímulo e orientação com a qual pude me capacitar durante o tempo de estágio.

Agradeço especialmente à minha orientadora Dr^a Lillian Riccio e à minha "co-orientadora" Barbara Baptista por todo incentivo, orientação, apoio e confiança. Obrigada por toda a ajuda, todos os conselhos e críticas que me deram e eu só tenho a agradecer por Deus ter colocado vocês na minha vida que além de companheiras de trabalho, nos tornamos amigas.

As minhas amigas Heloisa Martins e Alessandra Paradella que estiveram comigo durante toda a graduação me dando apoio, incentivo e passando comigo por todo desespero, ansiedade e alegria de ter concluído a faculdade. Obrigada por terem me garantido ótimos momentos juntas e por termos construído essa linda amizade que começou no início da graduação.

Obrigada aos meus amigos Edgar Vieira e João Gabriel Lopes por me escutarem, apoiarem, e sempre me incentivarem, dando os melhores conselhos, durante todo o curso de graduação. Obrigada por estarem comigo nos piores e melhores momentos da minha vida.

Agradeço às minhas amigas Juliana Gomes e Paloma Sant'Anna que conheci

na faculdade e desde então estiveram comigo em todos os momentos da graduação, sempre ajudando uma a outra.

Agradeço à todos que foram comigo para o trabalho de campo no Acre: Barbara Baptista, Evelyn Riccio, Hugo Amorim, Lillian Rose e Paulo Tolino. Obrigada por terem me proporcionado toda essa experiência profissional e emocional que adquiri nessa incrível viagem.

Obrigada a toda equipe do Laboratório de Pesquisa em Malária da Fiocruz: Aline Lavigne, Aline Moreira, Barbara, Bruno, Carina, Cláudio Tadeu, Cláudia, Daiana, Evelyn, Fabiana, Flávia, Gabriela, Guilherme, Hugo, Isabela, Jéssica Kamilla, Larissa, Leonardo, Lillian Rose, Luana, Lucas Freire, Lucas Tavares, Luciana, Marcos, Fátima, Marília, Micaela, Paulo, Paloma, Thalita, Uyla, Saba e Victor, por terem me proporcionado boas risadas e momentos descontraídos.

A todos os professores que tanto me ensinaram na graduação, não só com conteúdos, mas também com experiências profissionais.

A todos que me motivaram e me ajudaram direta e indiretamente nos momentos de dificuldade, sempre me dando as melhores palavras de incentivo. Meus agradecimentos são para todos vocês!

*Deleita-te no Senhor, e Ele concederá o
desejo do teu coração. Entrega o teu
caminho ao Senhor, confia nEle e o mais
Ele fará.*

Salmos 37:4,5

RESUMO

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Estima-se que ocorram 216 milhões de casos e 445 mil mortes decorrentes de malária anualmente, principalmente devido à infecção por *P. falciparum*. Assim, uma vacina eficaz é possivelmente a principal arma para reduzir de forma drástica essas estatísticas. Entretanto, embora mais de 30 antígenos tenham sido identificados como candidatos à vacina, até o momento nenhum deles gerou uma perspectiva sólida de que uma vacina possa estar disponível nos próximos anos. Toma-se, assim, fundamental a pesquisa de novos candidatos vacinais. As proteínas GLURP e MSP-3 de *P. falciparum* são fortes antígenos candidatos à vacinas antimaláricas, visto que vários estudos tem demonstrado que a resposta imune contra esses antígenos está associada à proteção. Esses antígenos foram selecionados a partir de um racional que utilizou vários parâmetros. A maioria dos critérios correspondeu aos comumente utilizados para antígenos candidatos vacinais, como a imunogenicidade em condições naturais de exposição, a correlação dos títulos de anticorpos específicos contra o antígeno em diversos graus de proteção clínica de indivíduos em áreas endêmicas e o papel funcional de anticorpos específicos de inibir o crescimento *in vitro* de *P. falciparum*. Importa, entretanto, verificar se o mesmo potencial é apresentado pelas populações-alvo no Brasil, uma vez que os parasitos circulantes aqui podem ser geneticamente diferentes dos que circulam em outras áreas endêmicas de malária e também porque a constituição genética das populações pode influenciar na resposta imune aos antígenos vacinais. No presente trabalho, nos propomos a avaliar a resposta imune humoral contra as proteínas GLURP e MSP-3 em indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária da Amazônia Brasileira. O estudo foi concentrado nas cidades de Cruzeiro do Sul (AC), Mâncio Lima (AC) e Guajará (AM). Foram coletadas 124 amostras em Cruzeiro do Sul (grupo CZS), 88 em Mâncio Lima (grupo ML) e 87 em Guajará (grupo GJ). A pesquisa de anticorpos IgG e as sub-classes de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-GLURP e anti-MSP-3 foi realizada pela técnica de ELISA. Nossos dados mostraram que a maior parte dos indivíduos dos grupos CZS, ML e GJ apresentavam anticorpos IgG que reconheciam as proteínas GLURP e MSP-3. A GLURP-R0 foi a mais amplamente reconhecida nos três grupos estudados e as subclasses de IgG que predominaram foram as citofílicas (IgG1 e IgG3), fato importante considerando que a aquisição de uma imunidade protetora está associada a presença e maiores níveis de IgG1 e IgG3. Em conjunto, nossos dados mostraram que as proteínas GLURP e MSP-3 são amplamente reconhecidas por anticorpos naturalmente adquiridos nas populações estudadas e a GLURP se revelou mais imunogênica durante a infecção natural.

ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium*. According to the latest estimates approximately 216 million cases and 445 000 deaths due to malaria occur worldwide, mainly due *P. falciparum* infection. Thus, an effective vaccine is possibly the potential weapon to drastically reduce these statistics. However, although more than 30 antigens have been identified as vaccine candidates, so far none have generated a solid prospect that a vaccine may be available in the next years. The search for new vaccine candidates is therefore fundamental. *P. falciparum* GLURP and MSP-3 proteins are important antimalarial vaccine candidates, since several studies have shown that the immune response against these antigens is associated with protection. These antigens were selected from a rationale that used several parameters. Most of the criteria corresponded to those commonly used for vaccine candidate antigens, such as immunogenicity in natural species of exposure, correlation of specific antibody titers and the functional role of specific antibodies with varying degrees of clinical protection of individuals living in endemic areas and the functional role of specific antibodies to inhibit the *in vitro* growth of *P. falciparum*. However, it is important to verify if this potential is also observed in individuals living in Brazil, since circulating parasites can be genetically different from those in different malaria-endemic areas and the genetic background of the population can influence the immune response to the vaccine antigens. In this work, we evaluated the humoral immune response against GLURP and MSP-3, in individuals living in malaria-endemic areas in the Brazilian Amazon. This study was carried out in Cruzeiro do Sul (AC), Mâncio Lima (AC) and Guajará (AM). A total of 124 samples were collected in Cruzeiro do Sul (CZS group), 88 in Mâncio Lima (ML group) and 87 in Guajará (GJ group). IgG antibodies and IgG subclass (IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4) against GLURP and MSP-3 proteins were evaluated by ELISA. Our data showed that most individuals in the CZS, ML and GJ groups had IgG antibodies that recognized the GLURP and MSP-3 proteins. GLURP-R0 was the most widely recognized in the three groups studied and that the cytophilic IgG1 and IgG3 were predominant IgG subclasses, important fact considering that the acquisition of a protective immunity is associated with IgG1 and IgG3 levels. Our data showed that GLURP and MSP-3 proteins are widely recognized by antibodies in the studied populations and GLURP has been shown to be more immunogenic during natural infection.

Sumário

1. Introdução	10
1.1. A malária	10
1.2. A malária no Brasil	11
1.3. Inseto vetor	13
1.4. Ciclo biológico	14
1.4.1 O Ciclo no homem	14
1.4.2 O Ciclo no mosquito	15
1.5. Proteínas candidatas à vacina antimalárica	16
2. Justificativa	20
3. Objetivos	21
3.1. Geral	21
3.2. Específicos	21
4. Material e métodos	22
4.1. Descrição das áreas	22
4.2. Coleta de dados pessoais e epidemiológicos	25
4.3. Coleta de sangue	26
4.4. Diagnóstico	26
4.4.1 Diagnóstico microscópico	26
4.4.2 Diagnóstico molecular	27
4.5. Proteínas recombinantes	28
4.6. Avaliação da resposta imune humoral contra as proteínas recombinantes GLURP-R0eMSP-3Ct	28
4.7. Análise dos dados epidemiológicos e estatísticos	30
4.7.1 Teste de Spearman	30
4.7.2 Teste do Qui-quadrado	30
4.7.3 Teste de Mann Whitney	31
4.7.4 Teste de Wilcoxon	31
5. Resultados	34

5.1 Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos dos participantes do estudo da Região Amazônica.....	34
5.2 Prevalência da resposta anticorpo para GLURP e MSP-3	40
5.2.1 Prevalência da resposta anticorpo da classe IgG para GLURP e MSP-3.....	44
5.2.2 Prevalência de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra GLURP e MSP-3	48
6. Discussão	54
7. Conclusões.....	60
8. Referências Bibliográficas	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Malária

A malária é uma doença parasitária que surgiu na África, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, único gênero da família *Plasmodidae*, subordem *Haemosporina* (Suárez-Mutis *et al.*, 2013), no qual os parasitos são todos intracelulares obrigatórios. Existem mais de 250 espécies de *Plasmodium* que parasitam mamíferos, aves e répteis (Faust & Dobson, 2015), entretanto, somente seis espécies parasitam naturalmente o homem: *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium knowlesi* (White, 2008) e *Plasmodium simium*, recentemente descrito como causador de zoonose na região de Mata Atlântica (Brasil *et al.*, 2017). A transmissão da malária se dá através da picada do inseto vetor, a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, no qual o *An. Darlingi* é a principal espécie transmissora no Brasil (Consoli & Lourenço-de Oliveira, 1994; Blandin *et al.*, 2004; Mirabello & Conn, 2008).

Dentre as espécies de *Plasmodium* que parasitam o homem, o *P. falciparum* e o *P. vivax* são responsáveis por cerca de 95% dos casos de malária registrados anualmente (WHO, 2017). O *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo e responsável por cerca de 4% dos casos registrados no mundo. Fora da África, o *P. vivax* é a espécie mais prevalente nas Américas, sendo responsável por 64% dos casos de malária, além de ser responsável por 30% dos casos no sudeste da Ásia e 40% no Mediterrâneo Oriental. O *P. falciparum* é a espécie responsável pelas formas mais graves da doença, incluindo a anemia grave e a malária cerebral, e a responsável pela maioria das mortes por malária. (WHO, 2017). Existem alguns casos registrados de malária grave em indivíduos infectados por *P. vivax*. No entanto, na maioria das vezes, essas infecções não são letais.

A doença é de elevada prevalência e morbidade, sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo, estando presente em 91 países das regiões tropicais e subtropicais do mundo, (Figura 1), colocando em risco 61% da população mundial. No ano de 2017 foram registrados 216

milhões de casos de malária no mundo e 445 mil mortes, sendo a maioria, crianças menores de cinco anos de idade (WHO, 2017).

Mesmo com a maioria dos casos notificados na África, as Américas contribuem com um elevado número de casos de malária. De todos os 35 países e territórios da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS/PAHO), 21 (Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Haiti, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela) possuem áreas com risco de transmissão ativa de malária, sendo registrados 451.242 casos no ano de 2015 (PAHO, 2017). Dentre esses, o Brasil possui cerca de 24% dos casos de malária das Américas (WHO, 2017).



Figura 1: Distribuição global da malária, 2016. Fonte: Adaptado de WHO, 2016.

1.2 A Malária no Brasil

No Brasil, em 2017, foram registrados 174.522 casos de malária, a grande maioria, mais de 99%, na região Amazônica. Cerca de 74 mil casos foram registrados no estado do Amazonas, 33 mil no estado do Pará e 32 mil no estado do

Acre, de acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO, 2018). A doença também é endêmica nos estados de Amapá, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte dos estados do Mato Grosso e Maranhão (Figura 2).

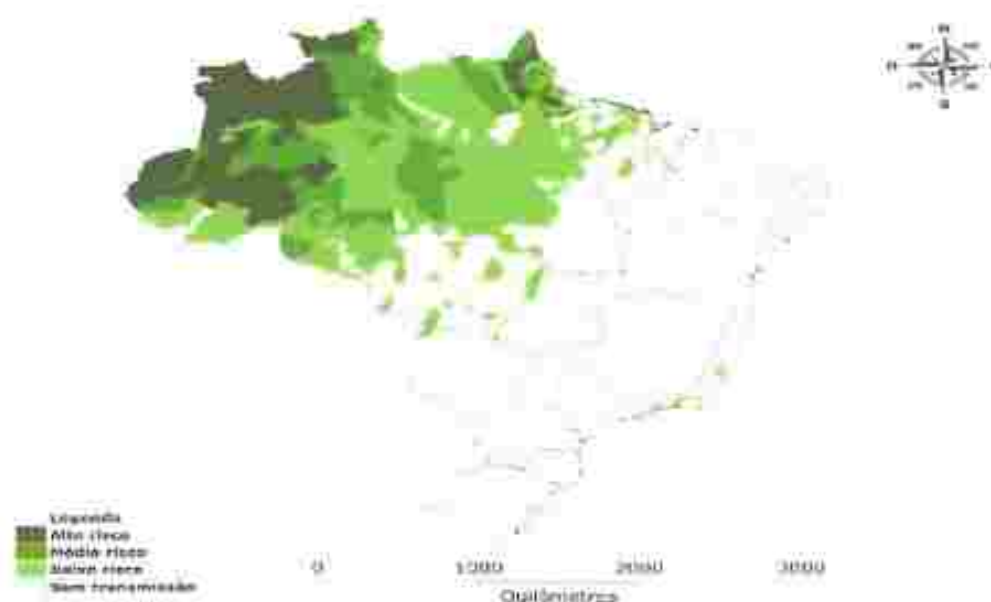


Figura 2: Mapa de risco da malária em áreas brasileiras de acordo com a Incidência Parasitária Anual (IPA - casos/1000 habitantes) do ano de 2015. Alto risco: ≥ 50 . Médio risco: ≥ 10 e < 50 . Baixo risco: < 10 . Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS, 2015).

Existem casos autóctones de malária em outros estados brasileiros em regiões cobertas pela Mata Atlântica, como as regiões sul e sudeste do país. Nessas regiões, foram registrados 1032 casos autóctones nos anos de 2006 a 2016 (Brasil *et al.*, 2017). Embora os casos de malária no Rio de Janeiro em regiões de Mata Atlântica tenham sido interrompidos, desde 2008 estão sendo notificados alguns casos em Guapimirim, Macaé e Nova Friburgo (Pina-Costa *et al.*, 2014). Além dessas áreas, outras vêm sendo descritas como área de transmissão de malária autóctone, onde a doença é causada pelo *P. vivax* (Brasil *et al.*, 2017) (Figura 3).

É perceptível que os casos de malária nessas áreas ocorrem de forma endêmica, sendo 20 casos notificados em 2017 (SVS, 2017). Essa região também vem sendo descrita como área de malária zoonótica, na qual os indivíduos são infectados com espécies de parasitos que geralmente infectam primatas não-humanos. A malária zoonótica também é um problema grave de saúde pública,

sendo difícil o controle da doença, devido à natureza de seu reservatório e a dinâmica de sua transmissão (BRASIL *et al.*, 2017).

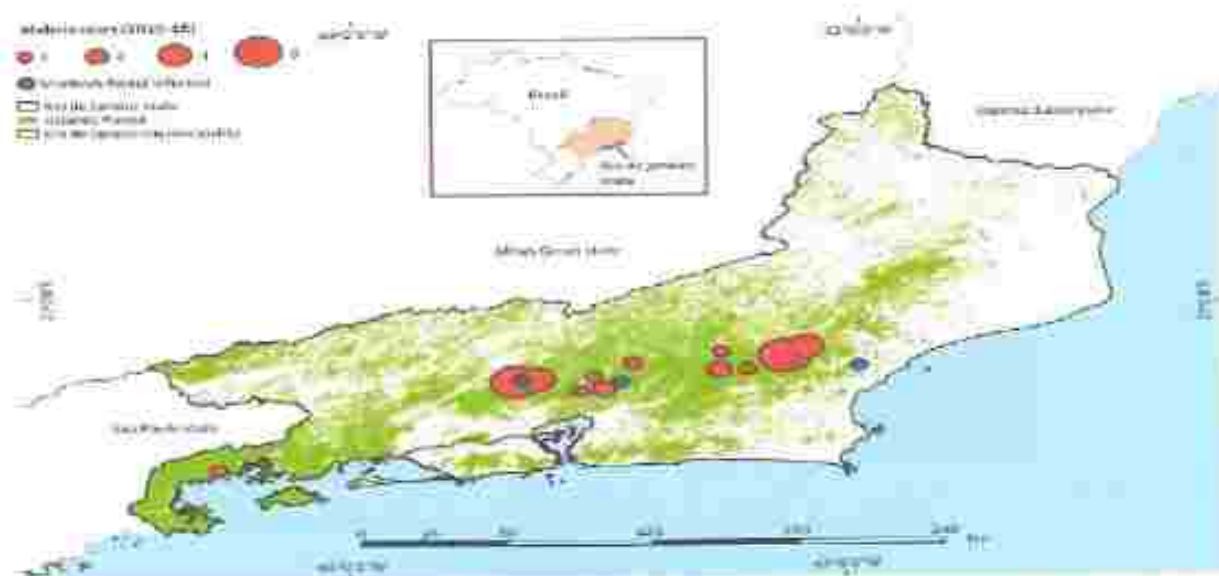


Figura 3: Mapa do estado do Rio de Janeiro mostrando as regiões de Mata Atlântica onde foram detectados casos de malária humana e os macacos infectados com o *P. simium*. Fonte: BRASIL, P. *et al.*, 2017.

1.3 Inseto Vetor

Os vetores da malária são fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, pertencentes à ordem Díptera e à família Culicidae (Figura 4). Existem cerca de 380 mil espécies do gênero *Anopheles* no mundo, sendo 60 responsáveis por transmitir a doença (Stanley, 1991). No Brasil, são conhecidas mais de 50 espécies e 33 destas ocorrem na Amazônia Brasileira (Deane *et al.*, 1986; Tadel *et al.*, 1998). Apenas 9 dessas 33 espécies podem ser infectadas com o *Plasmodium* (Tadel *et al.*, 1998).

Assim como nas zonas rurais, as zonas urbanas também apresentam as principais espécies de *Anopheles* transmissoras de malária: *An. darlingi*, *An. aquasalis*, *An. albiteris*, *An. cruzii* e *An. bellator*. Na Amazônia, o principal inseto vetor da malária é o *An. darlingi*, um vetor primário que é capaz de se infectar por diferentes espécies de *Plasmodium*, além de possuir um comportamento fortemente antropofílico e endofágico (Hiwat & Bretas, 2011; Rosa-Freitas *et al.*, 1998).



Figura 4: Inseto vetor: Mosquito do gênero *Anopheles*.

Fonte: Centers for Disease Control (CDC, 2012).

1.4 Ciclo Biológico

Existem dois tipos de hospedeiros: os vertebrados, também considerados como hospedeiros intermediários, onde ocorre o ciclo esquizogônico ou assexuado, e os invertebrados, os vetores, considerados hospedeiros definitivos, onde ocorre o ciclo esporogônico ou sexuado (Coura, 2013) (Figura 5).

1.4.1 O Ciclo no homem

Ao picarem o homem durante o repasto sanguíneo, as fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, inoculam em sua pele, os esporozoítas (formas infectantes para o homem), que estão acumulados em suas glândulas salivares. Esses esporozoítas migram do tecido cutâneo para a corrente sanguínea, onde rapidamente chegam ao fígado e infectam hepatócitos, se reproduzindo assexuadamente. Nos hepatócitos, os plasmódios passam pela primeira esquizogonia, se desenvolvendo em esquizontes e se reproduzindo, gerando os merozoítas, os quais são estágios invasivos (Coura, 2013).

Ao final do ciclo pré-eritrocítico, os merozoítas são liberados na luz dos sinusóides, dentro de estruturas denominadas merossomos. Na corrente sanguínea,

os merossomos se rompem e liberam os merozoítas capazes de invadir eritrócitos, iniciando o estágio eritrocítico da infecção. Após invadir os eritrócitos, os merozoítas começam um novo processo de esquizogonia, evoluindo em três estágios: trofozoito jovem, trofozoito maduro e esquizonte. Ao final do ciclo eritrocítico, os merozoítas são liberados na circulação e invadem novos eritrócitos. Depois de completar alguns ciclos eritrocitários, alguns parasitos evoluem para gametócitos fêmea (macrogametócitos) e gametócitos machos (microgametócitos), os quais são ingeridos pelos mosquitos *Anopheles*, dando início ao ciclo esporogônico, sexuado (Suarez- Mutis *et al.*, 2013).

1.4.2 O Ciclo no mosquito

No estômago do mosquito os eritrócitos se rompem, liberando os gametócitos. O núcleo dos microgametócitos se divide em diversas partículas de cromatina, em forma de flagelo, e sofre o processo de exflagelação, onde os microgametas se desprendem do corpo residual e se movimentam no intestino do mosquito até encontrar o macrogameta. Quando os gametócitos feminino e masculino se encontram, ocorre a fertilização, originando um zigoto. Se não há o encontro dos gametócitos, eles se degeneram. O zigoto móvel, denominado oocineto, penetra no epitélio do estômago do mosquito quando seu "vermículo" força uma passagem através das células de revestimento do estômago do inseto. Depois de se transformar em oocisto, o zigoto se envolve em uma membrana elástica que, em parte, é formada pelo próprio parasito. O oocisto aumenta rapidamente quando a temperatura é favorável, atingindo cerca de 50 a 60 μ de diâmetro (Suárez-Mutis *et al.*, 2013).

Após atingir a maturação, o oocisto rompe-se, liberando os esporozoítas, na hemocele do mosquito, que, ao atingirem as glândulas salivares, se tornam formas infectantes para o homem, dando continuidade ao ciclo (Coura, 2013).

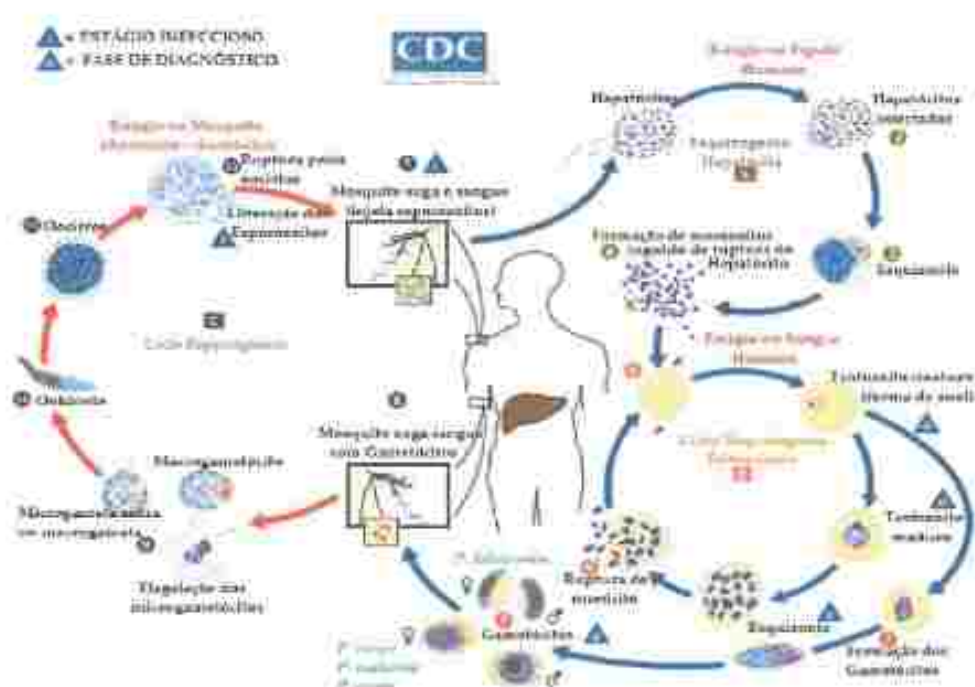


Figura 5: Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* causadoras de malária em humanos.

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2017).

1.5 Proteínas Candidatas à Vacina Antimalárica

O tratamento da malária é complexo e tem como objetivos proporcionar ao paciente uma cura clínica duradoura e evitar o avanço para as formas graves da doença e morte. Os métodos de controle não são totalmente eficazes para combater a doença (Carvalho *et al.*, 2002) e já existem casos de resistência de *P. falciparum* à artemisinina (ACT), última linha de tratamento contra a malária falciparum, no sudeste asiático, Suriname e Guiana Francesa, fazendo com que o Brasil fique atento à introdução de isolados resistentes (Pribluda *et al.*, 2014). Assim, uma estratégia de grande impacto no controle da doença seria o desenvolvimento de uma vacina antimalárica, objetivo de vários Centros de Pesquisa no mundo. No entanto, existem algumas dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina, principalmente devido à complexidade do parasito e de seu ciclo biológico. Assim, mesmo com a identificação de mais de 30 antígenos candidatos vacinais, (Tabela 1) nenhum deles obteve uma perspectiva consistente para a criação de uma vacina nos próximos anos, sendo necessária a pesquisa de novos candidatos vacinais.

Tabela 1: Antígenos candidatos para a formulação da vacina antimalárica de diversos estágios do ciclo evolutivo do parasito. Fonte: Adaptado de Coura, 2013.

ALVOS	ANTÍGENOS CANDIDATOS A VACINA ANTIMALÁRICA
Esporozoíta	Proteína Circunsporozoíta (CSP) Proteína adesiva relacionada com a trombospondina (TRAP) Antígeno de esporozoíta e do estágio hepático (SALSA) Proteína de esporozoíta rica em treonina e asparagina (STARP)
Estágio pré-eritrocítico	Proteína Circunsporozoíta (CSP) Antígenos do estágio hepático (LSA) -1, -2, -3 SALSA STARP
Macrozoíta	Proteína de superfície do merozoíta (MSP) -1, -2, 3 -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10 Antígeno 175 de ligação à hemácia (EBA) -175 Antígeno da membrana apical (AMA) -1 Proteína associada à roptria (RAP) -1 e -2 Antígeno de repetição acidobásico (ABRA) Proteína de ligação ao duffy (<i>P. vivax</i>)
Estágio eritrocítico	Antígeno de superfície da hemácia fase de anel (RESA) Proteína rica em serina (SERA) Proteína de membrana da hemácia (EMP) -1, -2 e -3 Proteína rica em glutamato (GLURP)
Estágio sexuado	Ps25, Ps28, Pg48/45, Pg230

As proteínas GLURP (Proteína Rica em Glutamato) e MSP-3 (Proteína de Superfície de Merozoíta 3) de *P. falciparum* são importantes antígenos candidatos à vacinas antimaláricas, visto que vários estudos tem demonstrado que a resposta imune contra esses antígenos está associada à proteção (Carvalho *et al.*, 2002). Além disso, os anticorpos anti-GLURP e anti-MSP-3 são capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, independentemente da presença de monócitos (Pratt-Riccio *et al.*, 2011, Oeuvray *et al.*, 2004).

A proteína GLURP é expressa em todas as formas do ciclo de vida do parasito no hospedeiro vertebrado, tanto no estágio pré-eritrocítico quanto no eritrocítico, e está presente no vacúolo parasitóforo dos esquizontes hepáticos e sanguíneos, no citoplasma de eritrócitos parasitados com gametócitos, e na superfície dos merozoítos, sendo liberada com o rompimento dos esquizontes (Borre *et al.*, 1991). A GLURP possui 3 regiões: R0 (N- terminal não repetitiva) e 2 sequências repetitivas, nomeadas como R1 e R2, as quais se encontram na porção central e C-terminal da molécula, respectivamente (Borre *et al.*, 1991) (Figura 6). Estudos indicam que a região R2 da proteína GLURP seja a mais imunogênica. No entanto, a região R0 é a mais conservada e estudos tem mostrado que anticorpos anti-R0 são mais potentes em inibir o cultivo *in vitro* de *P. falciparum*.

A proteína MSP-3 é formada durante o estágio de esquizonte do parasito, como um precursor de peso molecular variável e liberada no vacúolo parasitóforo, onde sofre processamento proteolítico. Alguns desses fragmentos estão associados à superfície dos merozoítas, mas a maioria é eliminada na circulação sanguínea e no sobrenadante de cultura *in vitro* com a ruptura do esquizonte. A MSP-3 possui uma região N-terminal composta de três blocos de quatro repetições de um heptapeptídeo, separados por regiões não repetitivas e, uma região C-terminal rica em resíduos de ácido glutâmico, seguido por outro motivo de repetição hepta "heptad repeats" semelhante ao encontrado nos zíperes de leucina (McColl *et al.*, 1997). Estudos tem demonstrado que a MSP-3 possui um limitado número de polimorfismo em isolados de diferentes regiões geográficas, sendo sua maioria na região N-terminal, entretanto, a estrutura geral é conservada (Huber *et al.*, 1997; Polley *et al.*, 2007; Sawaswong *et al.*, 2015; Pattaradilokrat *et al.*, 2016).

Devido ao fato do merozoíto ser a única forma do parasito diretamente exposta à anticorpos, a GLURP e a MSP-3 são importantes candidatas à vacina alvo da resposta imune humoral.

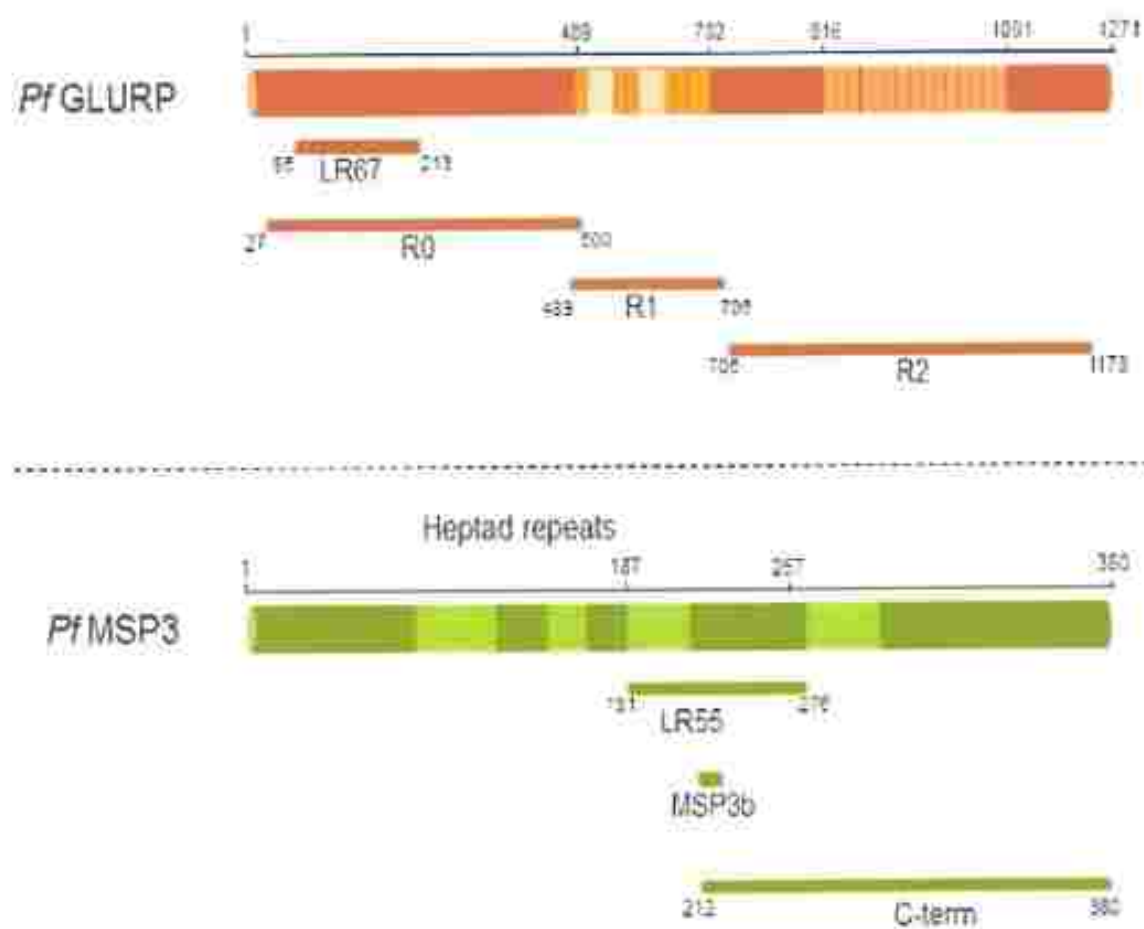


Figura 6: Representação esquemática das proteínas GLURP e MSP-3 de *P. falciparum*. Fonte: Adaptado de Theisen, 2017.

2 JUSTIFICATIVA

Estima-se que ocorram cerca de 216 milhões de novos casos e mais de 400 mil de mortes por ano no mundo, sendo a maioria absoluta das mortes causada por *P. falciparum* (WHO, 2017). O desenvolvimento de novas armas de combate a essa endemia é de grande prioridade para o bem-estar e para melhoria dos índices de desenvolvimento humano das populações afetadas. O desenvolvimento de uma vacina tem sido uma das principais estratégias de pesquisa para enfrentar esse problema. Entretanto, embora mais de 30 antígenos tenham sido identificados como candidatos à vacina, até o momento nenhum deles gerou uma perspectiva sólida de que uma vacina possa estar disponível nos próximos anos (Carvalho *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 2006; Vaughan & Kappe, 2012), tornando-se fundamental a pesquisa de novos candidatos vacinais.

As proteínas GLURP e MSP-3 de *P. falciparum* são consideradas candidatas à vacina antimalárica. Esses antígenos foram selecionados como candidatos vacinais a partir de um racional que utilizou vários parâmetros. A maioria dos critérios correspondeu aos comumente utilizados para antígenos candidatos vacinais, como a imunogenicidade em condições naturais de exposição, a correlação dos títulos de anticorpos específicos contra o antígeno com os diversos graus de proteção clínica de indivíduos vivendo em áreas endêmicas de malária brasileira e o papel funcional de anticorpos específicos de inibir o crescimento *in vitro* de *P. falciparum*.

O papel protetor dos anticorpos antiplasmodiais em seres humanos tem sido demonstrado desde os experimentos realizados por Cohen e colaboradores, utilizando soro de adultos imunes em crianças com malária, que mostraram acentuado efeito no tratamento com anticorpos, tanto na diminuição da parasitemia quanto na melhora dos sintomas clínicos. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar o perfil da resposta imune humoral contra as proteínas GLURP e MSP-3 de *P. falciparum* em populações da Amazônia brasileira, visando identificar o potencial antigênico e imunogênico de moléculas que possam fornecer informações que contribuam para o delineamento de estratégias vacinais.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a resposta imune humoral contra as proteínas MSP-3 e GLURP de *Plasmodium falciparum* em indivíduos residentes na Amazônia brasileira.

3.2 Específicos

1. Avaliar o perfil da resposta imune humoral naturalmente adquirida contra as proteínas GLURP e MSP-3 de *P. falciparum* em indivíduos residentes em regiões endêmicas de malária da Amazônia brasileira, com diferentes níveis de endemicidade.
2. Traçar o perfil das respostas imune anti-MSP-3 e anti-GLURP e sua relação com o grau de imunidade antiparasitária.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição das áreas

O estudo foi realizado nas cidades de Mâncio Lima e Cruzeiro do Sul no estado do Acre e Guajará, no estado do Amazonas (**Figura 7.2**). O Acre se encontra na região sudoeste da Amazônia brasileira e ocupa uma área de 152.581 km², que equivale a 4% desta região e a 1,9% do território nacional. O Amazonas ocupa uma área de 1.571.000 km², correspondendo aproximadamente à 30% da região Amazônica brasileira e representando 18,5% do território nacional.

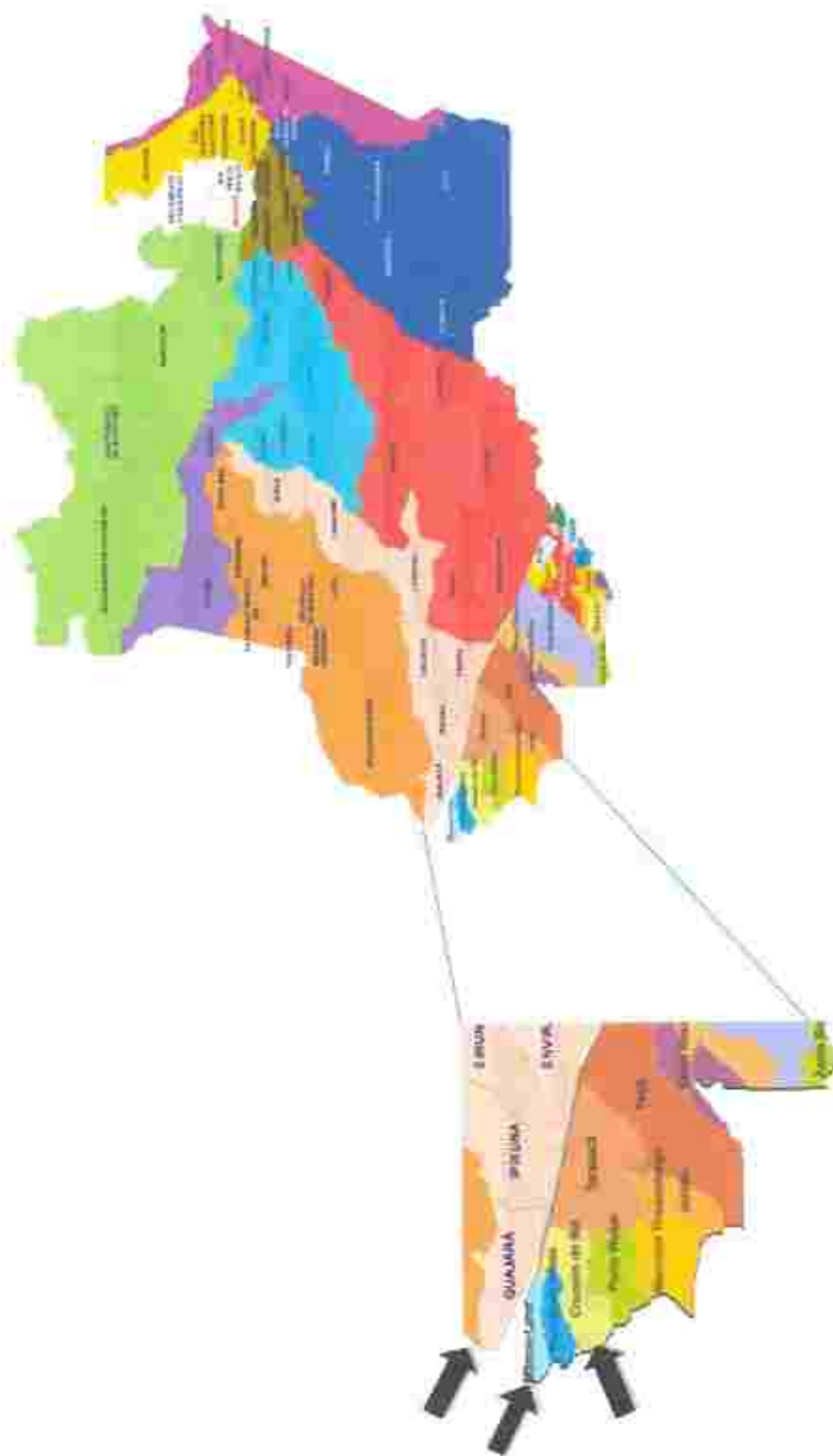


Figure 7.2: Mapa dos Estados do Amazonas e Acre, Brasil. Em destaque, as áreas estudadas: Mâncio Lima (AC), Cruzeiro do Sul (AC) e Guajará (AM). Fonte: Elaborado pela autora.

As cidades de Mâncio Lima, Cruzeiro do Sul e Guajará estão categorizadas entre as 15 que concentram 80% da malária causada pelo *P. falciparum* no País (3ª, 1ª e 7ª, respectivamente) e serão alvos prioritários de ações do Ministério da Saúde (MS) que priorizam a eliminação do *P. falciparum* do Brasil. Elas registraram em 2017, respectivamente, 1.837, 4.528 e 673 casos de malária, com uma Incidência Parasitária Anual (IPA) de *P. falciparum* de 107,2, 55,5 e 42,5/1.000 habitantes em Mâncio Lima, Cruzeiro do Sul e Guajará, respectivamente (Figura 7.3). Para referência, áreas com IPA ≥ 50 são consideradas de alto risco de transmissão.

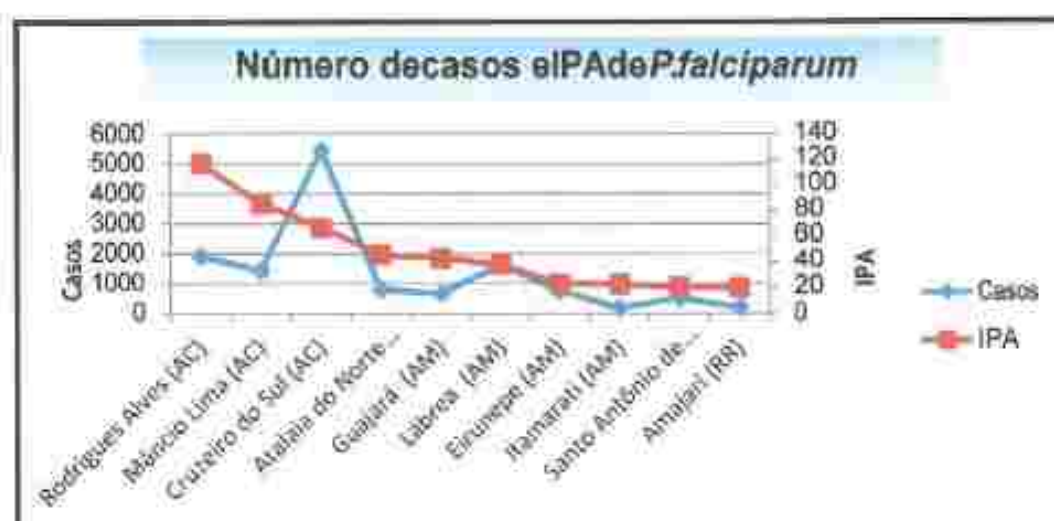


Figura 7.3: Número de casos e Índice Parasitário Anual (IPA) das 10 cidades com maior incidência de malária por *Plasmodium falciparum* no Brasil. Fonte: SVS, 2016.

O trabalho de campo foi realizado com o apoio da Coordenação de Endemias de Cruzeiro do Sul, de Mâncio Lima e de Guajará. Em Mâncio Lima, indivíduos que procuravam assistência médica no Hospital Dr. Abel Pinheiro Maciel Filho foram convidados para participar do estudo. Além da busca passiva, também foi realizada a busca ativa em colaboração com a equipe de agentes de saúde da Unidade de Saúde da Família Sofia de Almeida Barreto. Em Cruzeiro do Sul foram realizadas busca ativa - em colaboração com os agentes de saúde - e passiva dos pacientes que procuravam assistência na Unidade de Saúde Gilmar Cândido da Silva, localizado em Lagoinha. Em Guajará, a busca foi exclusivamente ativa, também com o apoio dos agentes de saúde do local.

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre – Campus Floresta (UFAC), em Cruzeiro do Sul (Acre) (Figura 8).



Figura 8: Processamento de amostras de pacientes na Universidade Federal do Acre (UFAC).

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2 Coleta de dados pessoais e epidemiológicos

As coletas foram realizadas através de visitas domiciliares (busca ativa) ou por busca passiva (nos hospitais). Todos os indivíduos foram informados sobre as formas de transmissão da malária e as medidas profiláticas, durante as visitas. O projeto foi explicado ao indivíduo, ressaltando que a sua participação era de livre e de espontânea vontade sem prejuízo para seu atendimento ou tratamento. Os indivíduos que aceitaram participar do estudo leram e foram informados do conteúdo do termo de consentimento. Após consentimento dos indivíduos, foi obtida uma autorização por escrito de todos os voluntários ou de seus responsáveis, caso menor de idade. Após a assinatura, todos os voluntários participaram de uma entrevista com o objetivo de preencher um questionário de investigação para a coleta de dados pessoais e epidemiológicos.

4.3 Coleta de sangue

Após a coleta dos dados pessoais e epidemiológicos e da obtenção do consentimento, aproximadamente 20 mL de sangue foram coletados por via endovenosa em tubos Vacutainer com heparina ou com EDTA (Becton & Dickinson). As amostras foram centrifugadas à 2.000 rpm durante 10 minutos e os plasmas correspondentes foram aliquotados e estocados à -20°C até o momento do uso. As amostras coletadas em tubos com EDTA foram criopreservadas, utilizando o mesmo volume da solução criopreservadora glicerolyte (0.9% NaCl, 4.2% sorbitol, 20% glicerol, *Sigma*) e, então, estocadas à -70°C até o momento do uso.

No total, foram coletadas 352 amostras, sendo 124 de Cruzeiro do Sul, 88 de Mâncio Lima e 87 de Guajará. Também foram coletadas 53 amostras de indivíduos que residem nas áreas estudadas sem histórico de malária (controles de área).

4.4 Diagnóstico

4.4.1 Diagnóstico microscópico

Durante a coleta de sangue foram feitas lâminas de distensão sanguínea e gota espessa, coradas pelo *Giemsa* (*Merck*) para identificação e quantificação de parasitos circulantes por microscopia. A avaliação da parasitemia se baseou na contagem do número de parasitos por 200 leucócitos e o resultado foi expresso em parasitas/ μ L, de acordo com a fórmula:

$$\text{parasitas}/\mu\text{L} = \frac{\text{número de parasitas} \times 8\,000}{\text{número de leucócitos}}$$

Considerando uma leucometria média de 8.000 leucócitos/ μ L de sangue para todo paciente com malária foi realizado uma regra de três para obter a parasitemia/ μ L de sangue. Na presença de poucos parasitos (menos de 9 em 200 leucócitos), 300 leucócitos adicionais foram contados, para maior precisão do diagnóstico.

4.4.2 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular foi realizado nas 352 amostras de CZS, ML e GJ. O DNA foi extraído de, aproximadamente, 200µL de sangue, utilizando o kit QIAmp (QIAGEN), de acordo com as indicações do fabricante. Após a extração de DNA, foi realizada a técnica de *Nested PCR* (Reação em Cadeia da Polimerase), usando *primers* específicos para gênero (rPlu5 e rPlu6) e espécies (rVIV1 e rVIV2 para *P. vivax* e rFAL1 e rFAL2 para *P. falciparum*), como descrito previamente (Snounou, 1993). A amplificação foi realizada no termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystem) e Veriti 96 WellCycler (Applied Biosystem), nas seguintes condições:

Tabela 2: Alternância de temperaturas dos ciclos para a amplificação.

		24 ciclos para 1º reação e 30 ciclos para 2º reação				
Plu5 / Plu6; Fal1 / Fal2	95°C - 05'	58°C - 02'	72°C - 02'	94°C - 01'	58°C - 02'	72°C - 05'

Ao final da reação, 10µL do produto amplificado foram homogeneizados à 3µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0.25 %, xileno cianol 0.25% e glicerina 30%) para eletroforese em gel de agarose 2 % em tampão TAE (Tris- Acetato- EDTA) 1X contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, a uma corrente constante de 95 V/cm durante aproximadamente 45 min. Após a eletroforese, os fragmentos foram visualizados, utilizando o transiluminador High Performance UV transilluminator (UVP).

4.5 Proteínas recombinantes

As proteínas vacinais recombinantes GLURP-R0 e MSP-3 foram doadas pelo colaborador Dr. Michael Theisen (*Statens Seruminstitut, Copenhagen, Dinamarca*).

4.6 Avaliação da resposta imune humoral contra as proteínas recombinantes GLURP-R0 e MSP-3Ct

A pesquisa de anticorpos contra as proteínas recombinantes GLURP-R0, MSP-3Ct foi realizada pelo ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Placas de 96 poços (Nunc Maxisorp) foram sensibilizadas com cada uma das proteínas recombinantes e os ELISAs foram realizados de acordo com os protocolos mostrados na Tabela 3. A reação foi revelada com uma solução contendo 0.4 mg/mL de orto-fenilenodiamino (OPD, *Sigma*) em tampão citrato-fosfato pH 5,4 (ácido cítrico 24 mM, *Sigma*, e fosfato de sódio dibásico 51mM, *Sigma*) e de peróxido de hidrogênio 30% (*Merck*) diluído 1:2000 durante, aproximadamente, 5 min. A reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico 2 N (*Merck*).

Após a revelação, a leitura da densidade óptica (DO) foi feita em espectrofotômetro Spectramax (*Molecular Devices, Califórnia, EUA*) a 492nm. Todos os plasmas foram testados em duplicata e cada placa recebeu um controle "branco" (sem plasma), dois soros-padrão reativos e cinco soros- padrão não reativos, sendo estes últimos, plasmas de indivíduos que não residem em área endêmica e que nunca tiveram malária. O resultado foi analisado pelo limite mínimo de positividade (*cut off*), que foi calculado a partir da média da DO dos controles não reativos mais três vezes o desvio padrão (DP). A positividade foi determinada pela razão (*Ratio*) entre a DO das amostras testadas e o *cut off*. As amostras com resultados superiores a 1,0 foram consideradas positivas.

Tabela 3: Protocolos estabelecidos para realização dos ELISAs para as proteínas recombinantes GLURP-R0 e MSP-3

Antígeno	Diluição antígeno	Lavagem	Bloqueio	Soro	Anticorpo (*)
GLURP-R0	1µg/mL em Carbonato/Bicarbonato	4 vezes com PBS Tween 20 0,05%	2% de leite mólico em PBS por 2 horas em temperatura ambiente	Diluído (1:100) em 1% de leite mólico em PBS + 0,05% Tween 20 por 1 hora em temperatura ambiente	Diluído (1:1000) em 1% de leite mólico em PBS + 0,05% Tween 20 por 1 hora em temperatura ambiente
MSP-3Ct	5µg/mL em Carbonato/Bicarbonato	3 vezes com PBS Tween 20 0,05%	5% de leite mólico em PBS + 0,05% Tween 20 por 1 hora a 37°C	Diluído (1:100) em 1% de leite mólico em PBS + 0,05% Tween 20 por 1 hora a 37°C	Diluído (1:1000) em 1% de leite mólico em PBS + 0,05% Tween 20 por 1 hora a 37°C

(*) Anti-IgG (Anti-IgG1 – Anti-IgG4)

4.5 Análise dos dados epidemiológicos e estatísticos

Os dados epidemiológicos e os resultados dos experimentos foram armazenados no banco de dados Epi-Info 6 (Centers for Disease Control and Prevention) e analisados utilizando os programas Epi-Info e GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc). Os testes estatísticos utilizados para verificar as associações e correlações entre os resultados experimentais e os dados epidemiológicos foram selecionados a partir do tipo e tamanho das amostras de cada variável. Considerou-se que a diferença era significativa quando a probabilidade de erro era igual ou inferior a 5% ($P \leq 0.05$).

4.5.1 Teste de Spearman

Spearman é um método estatístico não-paramétrico de associação entre duas variáveis mensuradas a nível ordinal, onde a correlação é calculada pelo coeficiente de *Spearman*. Esse foi o método estatístico utilizado na avaliação da correlação entre variáveis estudadas, utilizado para verificar as associações entre dados epidemiológicos numéricos, como por exemplo, tempo de residência em área endêmica e dados de resposta imune humoral.

4.5.2 Teste do Qui-quadrado

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 2×2 , sendo os valores esperados deduzidos matematicamente, e onde se procura determinar se as proporções observadas nas diferentes categorias são independentes ou estão associadas. Esse foi o teste utilizado para a avaliação das frequências entre as variáveis analisadas como, por exemplo, o número de respondedores e não respondedores em cada um dos grupos estudados.

4.5.3 Teste de Mann Whitney

O teste não-paramétrico de *Mann Whitney* compara as médias de dois grupos não-pareados. Esse foi o teste escolhido para a avaliação estatística das diferenças existentes entre duas variáveis estudadas de indivíduos diferentes, como por exemplo, diferenças entre médias dos níveis de anticorpos (Ratio) entre indivíduos parasitados e não parasitados.

4.5.4 Teste de Wilcoxon

O teste não-paramétrico de *Wilcoxon* com para as médias de dois grupos pareados. Esse foi o teste escolhido para a avaliação estatística das diferenças existentes, por exemplo, nos níveis de anticorpos (Ratio) antes (Dia 0) e 15 dias após o início do tratamento (Dia 15).



Figura 9: Casas de indivíduos residentes no Amazonas. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 10: Casa de farinha- Acre. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 11: Busca Ativa em Cruzeiro do Sul (Acre). Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 12: Unidade de Saúde da Família Sofia de Almeida Barreto, localizado em Mâncio Lima (AC). Fonte: Arquivo pessoal.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos dos participantes do estudo da Região Amazônica

Para a avaliação do perfil da resposta anticorpo às proteínas GLURP e MSP-3 foram utilizadas amostras de 124 indivíduos residentes em Cruzeiro do Sul (Grupo CZS), de 88 indivíduos residentes em Mâncio Lima (Grupo ML) e de 87 indivíduos residentes em Guajará (Grupo GJ). Como controles de área (grupo CO), foram utilizadas as amostras de 53 indivíduos residentes em áreas endêmicas sem histórico de malária.

As principais características dos grupos CZS, ML, GJ e CO estão apresentadas nas Figuras: 13.1, 13.2 e 13.3.

O grupo CZS era constituído de 58 indivíduos do sexo feminino (46,7%) e 66 do sexo masculino (53,3%), com idades variando entre 12 e 73 anos (33 ± 15). Uma porcentagem de 98,2% desses indivíduos era proveniente da região amazônica e estava residindo em área endêmica, em média, há 33 anos (33 ± 15). Os indivíduos desse grupo descreveram uma média de 10 episódios de malária (10 ± 13), sendo que, dos indivíduos que descreveram ter apresentado pelo menos um episódio da doença (99,2%), 67% relataram infecção prévia por *P. falciparum* e *P. vivax*, 23% relataram infecção prévia apenas por *P. vivax*, 10% apenas por *P. falciparum*. Esses indivíduos também relataram o último episódio de malária há 60 meses (60 ± 97), sendo *P. falciparum* a última espécie plasmodial infectante em 35% dos casos, *P. vivax* em 61% dos casos e infecção mista (*P. falciparum* e *P. vivax*) em 4% dos casos. Durante o momento da coleta, 72 indivíduos (58%) apresentavam sintomas iniciados, em média 4 dias antes da coleta (4 ± 4), sendo cefaléia, febre e calafrio os mais frequentes, relatados por 74%, 68% e 48% dos indivíduos, respectivamente. Do total, 64 indivíduos (51,6%) apresentavam parasitos circulantes no momento da coleta, 25 (20,2%) estavam infectados com *P. falciparum* e 39 (31,4%) estavam infectados com *P. vivax*, com média de parasitemia de 16000 ± 20092 parasitos por microlitro de sangue para *P. falciparum* e 19142 ± 17599 para parasitos por microlitro de sangue para *P. vivax*.

O grupo ML era constituído de 44 indivíduos do sexo feminino (50%) e 44 do sexo masculino (50%), com idades variando entre 13 e 88 anos (35 ± 16). Todos os indivíduos eram provenientes da região amazônica e estavam residindo em área endêmica, em média, há 35 anos (35 ± 16). Os indivíduos desse grupo descreveram uma média de 13 episódios prévios de malária (13 ± 13). Todos os indivíduos relataram ter apresentado pelo menos um episódio da doença, sendo que 19% relataram infecção prévia apenas por *P. vivax* e 81% relataram infecção prévia por *P. vivax* e por *P. falciparum*. Esses indivíduos também relataram o último episódio de malária há 28 meses (28 ± 45), sendo *P. falciparum* a última espécie plasmodial infectante em 17% dos casos e *P. vivax* em 83% dos casos. Durante a coleta, 48 indivíduos (55%) apresentavam sintomas iniciados, em média, 6 dias antes da coleta (6 ± 14), sendo cefaléia, febre e calafrio os mais frequentes, relatados por 75%, 92% e 57% dos indivíduos, respectivamente. Do total, 37 indivíduos (42%) apresentavam parasitos circulantes no momento da coleta, 12 (13,6%) estavam infectados com *P. falciparum* e 25 (28,4%) estavam infectados com *P. vivax*, com média de parasitemia de 5600 ± 3577 parasitos por microlitro de sangue para *P. falciparum* e 23294 ± 15507 parasitos por microlitro de sangue para *P. vivax*.

O grupo GJ era constituído de 42 indivíduos do sexo feminino (48,3%) e 45 do sexo masculino (51,7%), com idades variando entre 13 e 83 anos (37 ± 17). Todos os indivíduos eram provenientes da região amazônica e estavam residindo em área endêmica, em média, há 35 anos (37 ± 17). Os indivíduos desse grupo descreveram uma média de 9 episódios de malária (9 ± 10), sendo que, dos indivíduos que relataram ter apresentado pelo menos um episódio da doença (93%), 70% relataram infecção prévia por *P. falciparum* e *P. vivax*, 22% relataram infecção prévia apenas por *P. vivax*, 8% apenas por *P. falciparum*. Esses indivíduos também relataram o último episódio de malária há 48 meses (48 ± 73), sendo *P. falciparum* a última espécie plasmodial infectante em 28% dos casos e *P. vivax* em 70% dos casos e infecção mista (*P. falciparum* e *P. vivax*) em 2% dos casos. Durante a coleta, 21 indivíduos (24,1%) apresentavam sintomas iniciados, em média, 8 dias antes da coleta (8 ± 8), sendo cefaléia, febre e artralgia os mais frequentes, relatados por 86%, 62% e 48% dos indivíduos, respectivamente. Do total, 17 indivíduos (19,5%) apresentavam parasitos circulantes no momento da coleta, 6 (6,7%) estavam infectados com *P. falciparum* e 11 (12,8%) estavam infectados com *P. vivax*, com

média de parasitemia de 8000 ± 5656 parasitos por microlitro de sangue para *P. falciparum* e 10666 ± 8326 parasitos por microlitro de sangue para *P. vivax*.

O grupo CO (controle de área) era constituído de 37 indivíduos do sexo feminino (69,8%) e 16 do sexo masculino (30,2%), com idades variando entre 17 e 43 anos (23 ± 7). Uma porcentagem de 96,2% desses indivíduos era proveniente da região amazônica e estava residindo em área endêmica, em média, há 22 anos (22 ± 8). Todos esses indivíduos declararam nunca terem sido infectados e nenhum apresentava sintomatologia ou parasitos circulantes durante a coleta. Esse grupo apresentou uma maior prevalência de indivíduos do sexo feminino que os grupos CZS ($P = 0,008$), ML ($P = 0,03$) e GJ ($P = 0,02$), além de apresentar uma média de idade e de tempo de residência em área endêmica de malária menor que os grupos CZS, ML e GJ ($P < 0,0001$, para todas as análises).

O grupo ML apresentou um maior número de infecções anteriores de malária que os grupos CZS ($P = 0,01$) e GJ ($P = 0,0008$), e, o grupo GJ apresentou um maior tempo de início de sintomas que os grupos CZS e ML ($P = 0,003$, para ambos).

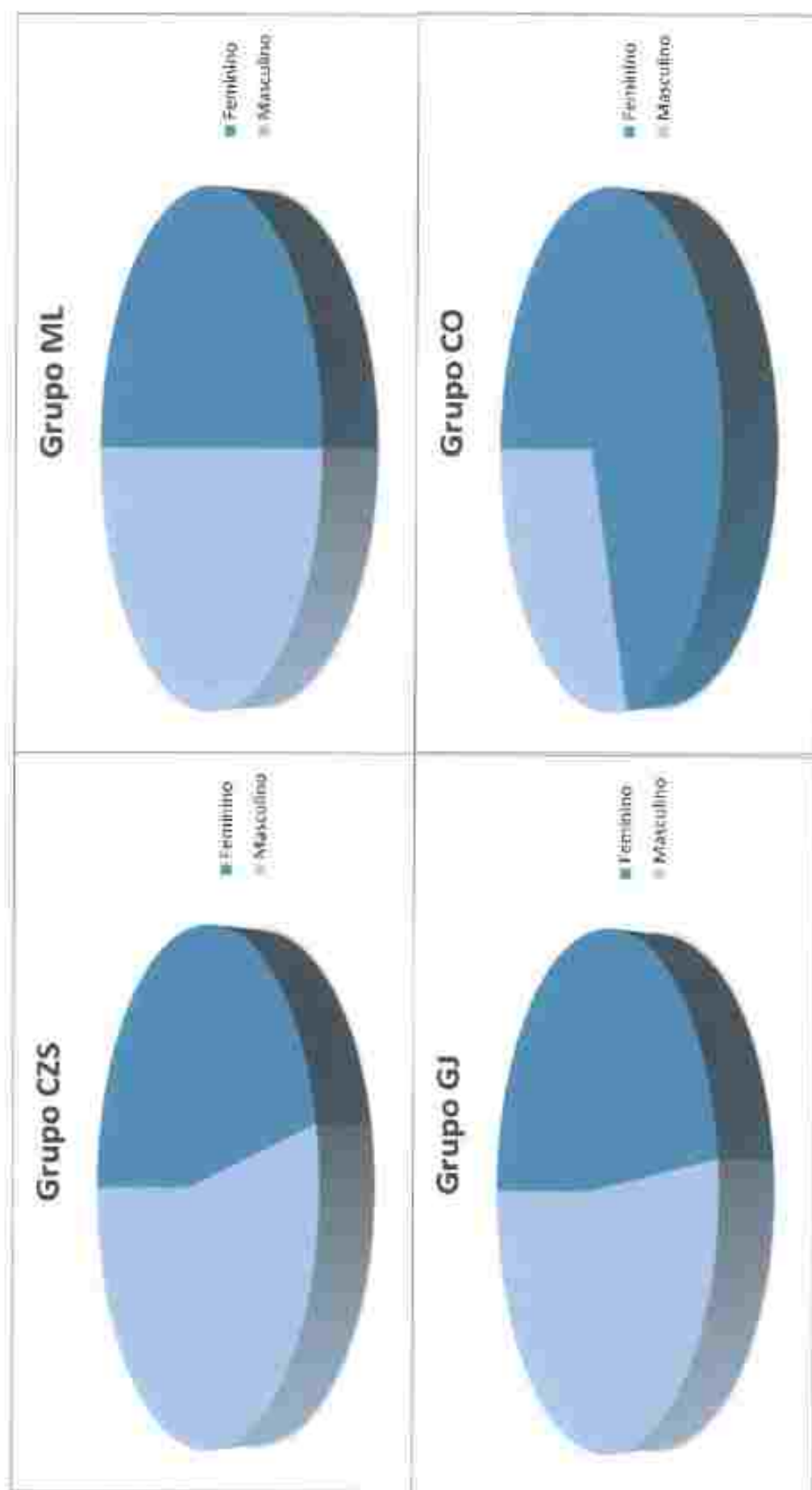


Figura 13.1: Distribuição dos indivíduos dos grupos CZS (Cruzeiro do Sul), ML (Mâncio Lima), GJ (Guajará) e CO (Controle de área) de acordo com o sexo.

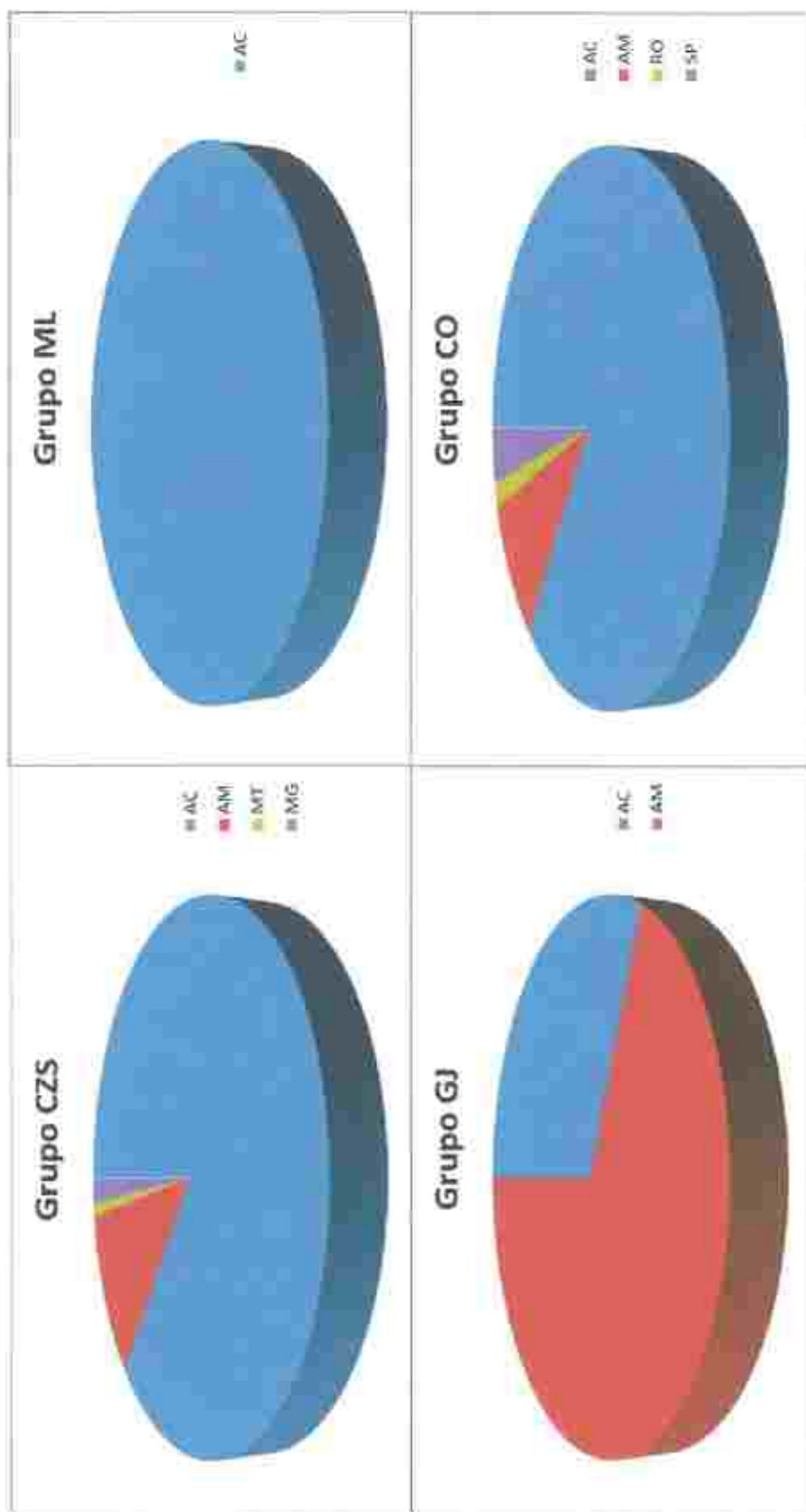


Figura 13.2: Prodescência dos indivíduos dos grupos CZS (Cruzeiro do Sul), ML (Mâncio Lima), GJ (Guajará), e CO (Controle). AC: Acre; AM: Amazonas; MT: Mato Grosso; MG: Minas Gerais; RO: Rondônia; SP: São Paulo.

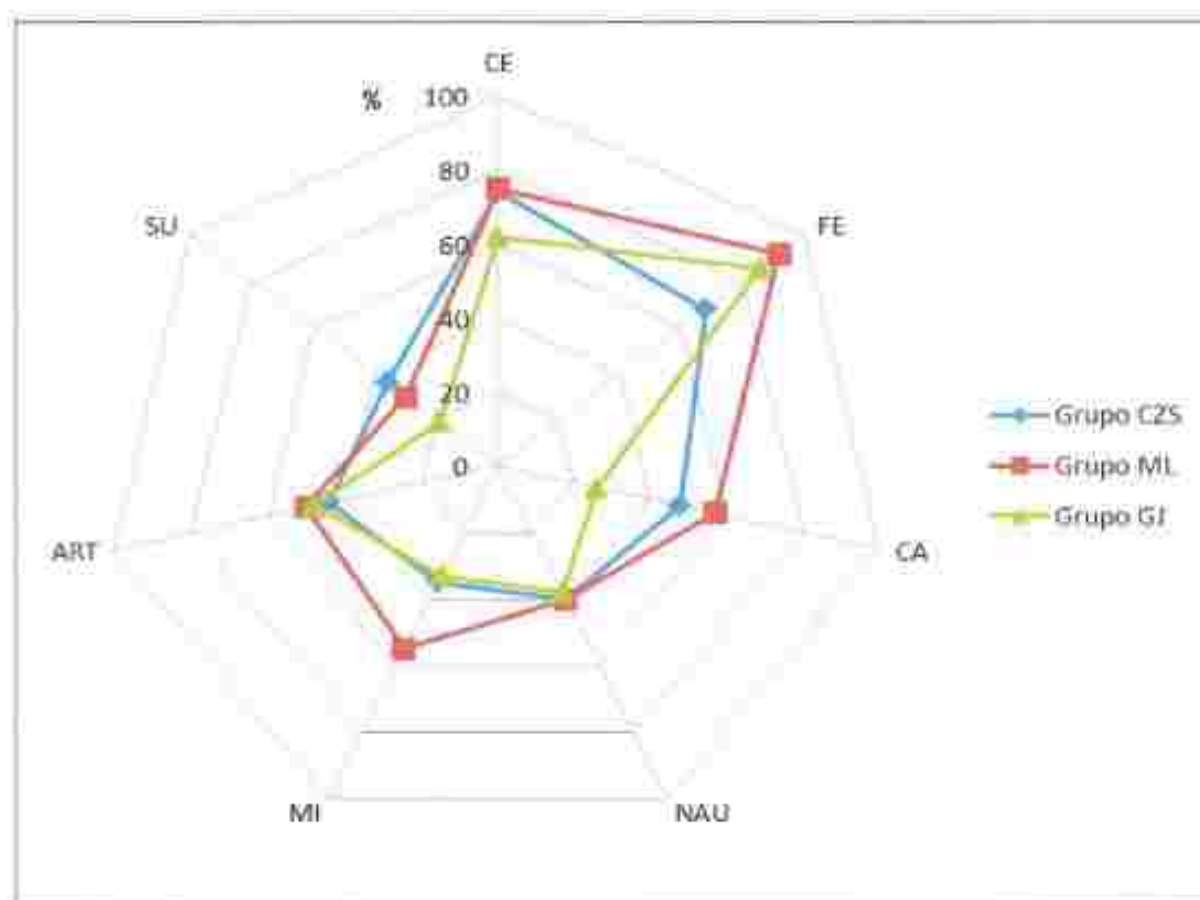


Figura 13.3: Prevalência de sintomas relatados pelos indivíduos dos grupos CZS (Cruzeiro do Sul), ML (Mâncio Lima) e GJ (Guajará), no momento da coleta. CE: Cefaleia; FE: Febre; CA: Calafrio; NAU: Náusea; MI: Mialgia; ART: Artralgia; SU: Sudorese.

5.2 Prevalência da resposta anticorpo para GLURP e MSP-3

Foi feita a avaliação do perfil da resposta imune humoral contra as proteínas GLURP e MSP-3 nos indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária brasileira dos grupos CZS ($n = 124$), ML ($n = 88$), GJ ($n = 87$) e CO ($n = 53$).

Os indivíduos que apresentaram anticorpos contra essas proteínas (indivíduos reativos) foram denominados de respondedores e aqueles que não apresentaram anticorpos contra as proteínas estudadas (indivíduos não reativos) foram chamados de não respondedores. As principais características dos indivíduos respondedores e não respondedores para GLURP e MSP-3 nos grupos CZS, ML e GJ estão mostrados nas tabelas 4.1 e 4.2.

Não observamos diferença na prevalência de indivíduos respondedores quando comparamos os grupos CZS, ML e GJ.

Quando comparamos as duas proteínas, observamos que a prevalência de indivíduos respondedores para GLURP e MSP3 foram, respectivamente, 50,8% (63/124) e 38,7% (48/124) no grupo CZS, 47,7% (42/88) e 27,4% (24/88) no grupo ML e 41,4% (36/87) e 12,6% (11/87) no grupo GJ (Figura 14).

Verificamos que a prevalência de indivíduos respondedores para MSP-3 foi menor no grupo GJ quando comparado aos grupos CZS e ML ($P < 0,0001$ GJ versus CZS; $P = 0,02$ GJ versus ML). Nos grupos ML e GJ, a prevalência de indivíduos com anticorpos contra a GLURP foi maior que a prevalência de indivíduos com anticorpos contra a MSP-3 ($P = 0,007$ em ML; $P < 0,0001$ em GJ).

Não observamos nenhuma associação entre a resposta anticorpo contra a MSP3 e idade, sexo, tempo de residência em área endêmica de malária, presença de sintomas no momento da coleta, espécie infectante, número de infecções anteriores de malária, espécies plasmodiais anteriores, última espécie infectante ou o tempo da última infecção. Entretanto, no grupo ML, observamos que a resposta contra a GLURP estava associada à idade, tempo de residência em área endêmica de malária e ao número de infecções anteriores ($P = 0,03$ para idade; $P = 0,04$ para tempo de residência em área endêmica de malária; $P = 0,03$ para número de infecções anteriores).

Um indivíduo dos 53 do grupo CO (1,9%) apresentou anticorpos contra a GLURP. Nenhum dos 53 indivíduos desse grupo apresentou anticorpos contra a MSP-3.

Tabela 5.1: Principais características dos indivíduos respondedores e não respondedores para a GLURP nos grupos CZS, ML e GJ.

	CZS		ML		GJ	
	Respondedor (n = 63)	Não respondedor (n = 61)	Respondedor (n = 42)	Não respondedor (n = 46)	Respondedor (n = 36)	Não respondedor (n = 51)
Idade (anos)						
	35 ± 17	31 ± 13	39 ± 16 ⁺	32 ± 15	36 ± 15	38 ± 18
Sexo						
Feminino	23	34	18	26	15	27
Masculino	39	26	23	21	21	24
Tempo de residência em área infectada						
	35 ± 17	31 ± 12	38 ± 12 ⁺⁺	31 ± 10 ⁺	36 ± 15	38 ± 18
Sintomas						
Sim	39	31	25	23	11	10
Não	24	30	17	23	25	41
Especie infectante						
<i>P. vivax</i>	19	17	8	11	1	2
<i>P. falciparum</i>	12	5	5	-	4	-
Não infectado	32	39	29	35	31	49
Momento de infecções anteriores						
	9 ± 9	12 ± 16	16 ± 12 ⁺⁺⁺	10 ± 8	11 ± 11	8 ± 10
Especie antelmíntica						
<i>P. vivax</i>	14	9	7	9	6	10
<i>P. falciparum</i>	4	8	-	-	2	4
<i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	30	37	34	4	24	27
Última espécie infectante						
<i>P. vivax</i>	29	30	33	35	10	27
<i>P. falciparum</i>	15	19	7	7	7	12
<i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	1	3	-	-	1	-
Tempo de última infecção (semanas)						
	69 ± 118	52 ± 72	28 ± 44	28 ± 47	37 ± 47	55 ± 87

CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará. n = número de indivíduos testados.

Tabela 5.2: Principais características dos indivíduos respondedores e não respondedores para a MSP-3 nos grupos CZS, ML e GJ.

	MSP-3				CZS		ML		GJ	
	Idade (anos)		Sexo		Tempo de residência na área endêmica		Sintomas		Espécie infectante	
	Tempo de última infecção (semanas)		Número de infecções anteriores		Espécies anteriores		Última espécie infectante		Tempo de última infecção (semanas)	
	Respondedor (n = 48)	Não respondedor (n = 76)	Respondedor (n = 24)	Não respondedor (n = 64)	Respondedor (n = 11)	Não respondedor (n = 11)	Respondedor (n = 11)	Não respondedor (n = 11)	Respondedor (n = 11)	Não respondedor (n = 11)
	32 ± 16	34 ± 14	37 ± 17	35 ± 15	42 ± 14	37 ± 17	37 ± 17	35 ± 15	42 ± 14	37 ± 17
	22	35	12	32	5	37	12	32	5	37
	25	40	12	32	8	27	12	32	8	39
	32 ± 16	34 ± 14	37 ± 18	33 ± 16	41 ± 14	37 ± 18	37 ± 18	33 ± 16	41 ± 14	36 ± 17
	24	48	11	37	4	37	11	37	4	17
	24	30	13	27	7	27	13	27	7	59
	12	24	2	17	-	17	2	17	-	3
	8	9	4	1	2	1	4	1	2	2
	28	43	18	48	9	48	18	48	9	71
	9 ± 9	11 ± 15	16 ± 17	12 ± 11	12 ± 12	16 ± 17	16 ± 17	12 ± 11	12 ± 12	9 ± 10
	5	18	2	14	1	14	2	14	1	15
	4	6	-	-	-	-	-	-	-	6
	28	39	22	48	8	48	22	48	8	43
	19	40	19	49	6	49	19	49	6	40
	14	20	5	9	3	9	5	9	3	16
	2	2	-	-	-	-	-	-	-	1
	67 ± 23	56 ± 77	24 ± 44	30 ± 46	29 ± 41	24 ± 44	24 ± 44	30 ± 46	29 ± 41	51 ± 77

CZS: Grupo Cruzairo do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará. n = número de indivíduos testados.

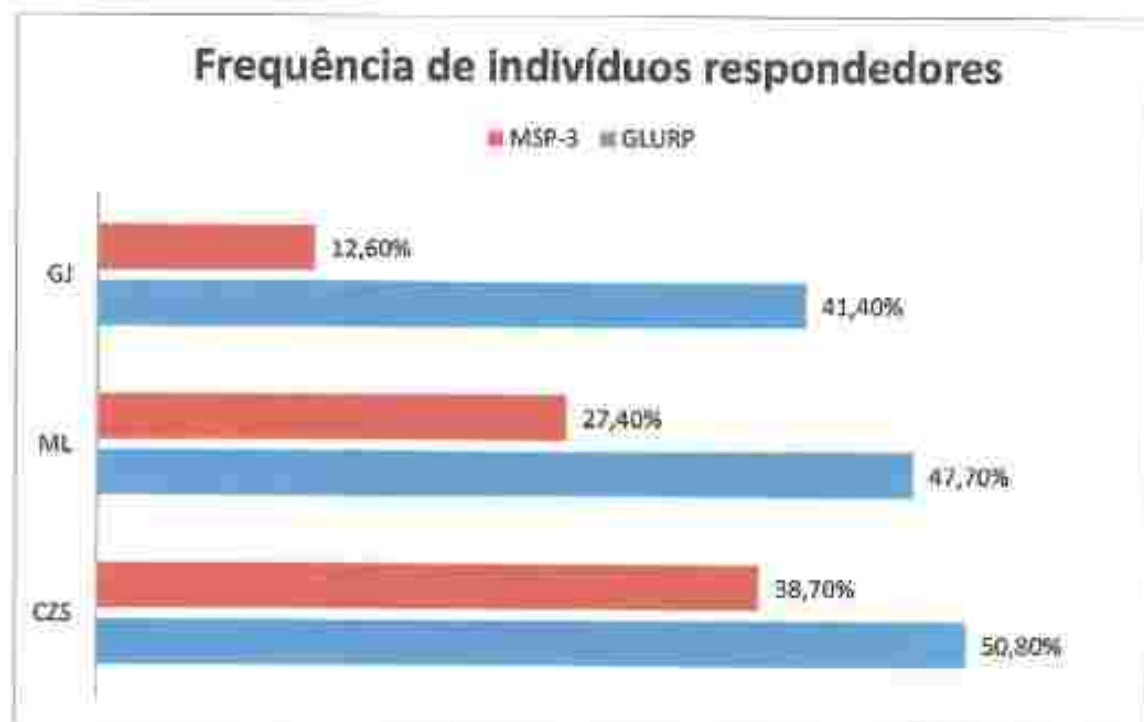


Figura 14: Frequência de indivíduos respondedores para GLURP e MSP-3 nos grupos: CZS, ML e GJ.

5.2.1 Frequência da resposta anticorpo da classe IgG para GLURP e MSP-3

A frequência da resposta anticorpo da classe IgG, contra as proteínas GLURP e MSP-3 está apresentada na (Figura 15.1 e 15.2). Verificamos que as prevalências de indivíduos com anticorpos IgG para a GLURP e MSP-3 foram, respectivamente, 37,1% (46/124) e 25% (31/124) no grupo CZS; 38,6% (34/88) e 8% (7/88) no grupo ML e 27,6% (24/87) e 5,7% (5/87) no grupo GJ.

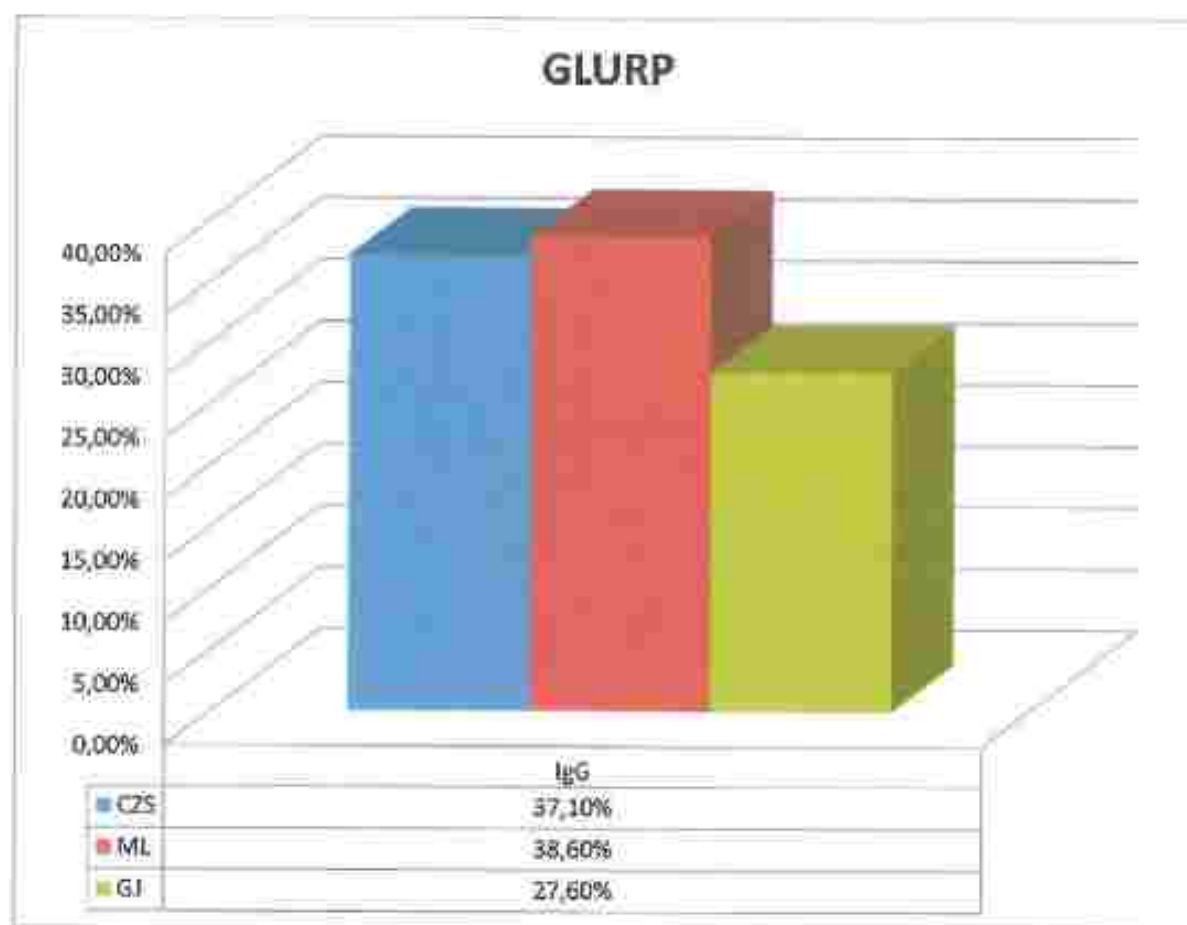


Figura 16.1: Frequência da resposta anticorpo da classe IgG, contra a proteína GLURP.

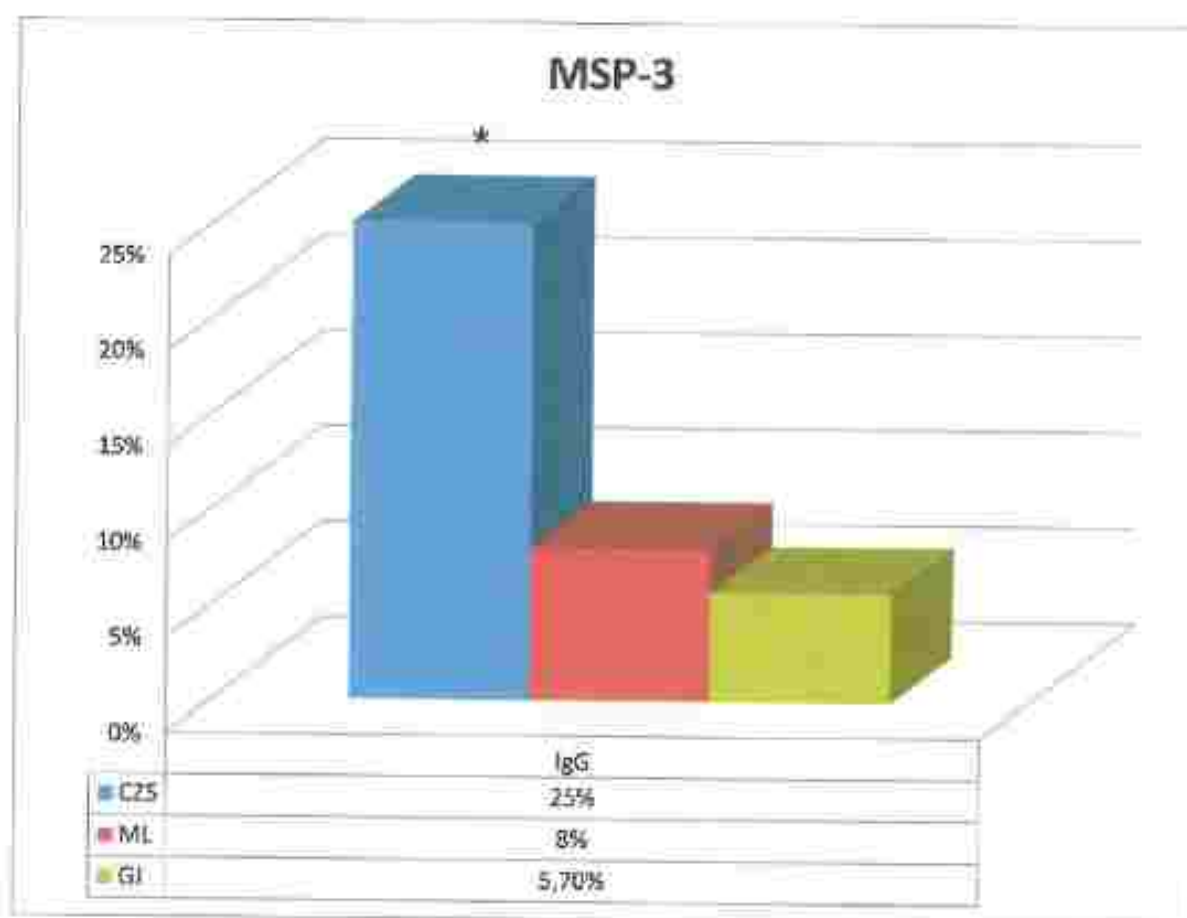


Figura 15.2: Frequência da resposta anticorpo da classe IgG, contra a proteína MSP-3.

A frequência de indivíduos com anticorpos IgG contra a MSP-3 foi maior no grupo CZS que nos grupos ML e GJ ($P = 0,001$, CZS *versus* ML; $P = 0,0002$, CZS *versus* GJ).

Nos grupos ML e GJ, a frequência de indivíduos com anticorpos IgG contra a GLURP foi maior que a prevalência de indivíduos com anticorpos IgG contra a MSP-3 ($P < 0,0001$, no grupo ML; $P = 0,0003$, no grupo GJ).

No grupo CZS, observamos maiores níveis de anticorpos IgG contra a GLURP que os níveis de anticorpos IgG contra a MSP-3 ($P = 0,0008$).

Nos grupos ML e GJ, os níveis de anticorpos IgG contra a GLURP estavam diretamente correlacionados com idade, tempo de residência e número de infecções anteriores de malária (ML: $P = 0,09$, $r = 0,2742$, IgG *versus* idade; $P = 0,01$, $r = 0,2622$, IgG *versus* tempo de residência em área endêmica de malária; $P = 0,0001$, $r = 0,2600$, IgG *versus* número de infecções anteriores de malária).

Não observamos associação entre anticorpos IgG contra GLURP, MSP-3 e sexo, presença de sintomas no momento da coleta, espécie infectante espécies plasmodiais anteriores, última espécie infectante, tempo da última infecção ou parasitemia.

Quando comparamos os níveis de anticorpos IgG contra a GLURP e MSP-3 entre indivíduos parasitados e não parasitados, independente do grupo, verificamos que os níveis de anticorpos IgG contra a GLURP e contra a MSP-3 foram maiores nos indivíduos parasitados (GLURP: $P < 0,0001$, para IgG; MSP-3, $P = 0,0007$ para IgG (Figura 16).

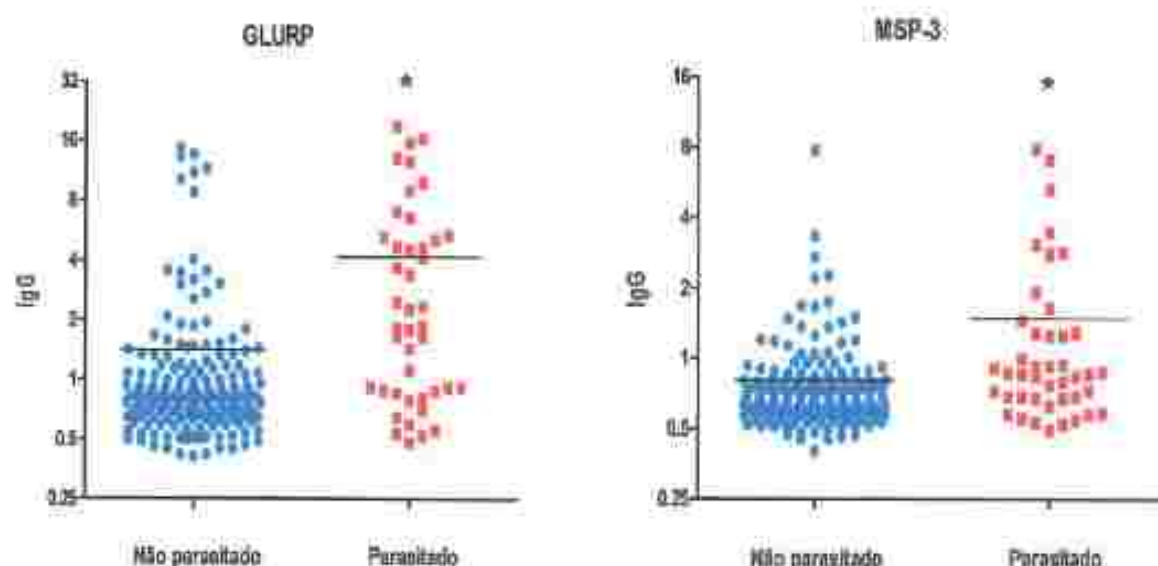


Figura 16: Níveis de anticorpos IgG contra a GLURP e MSP-3 entre indivíduos parasitados e não parasitados, independente do grupo.

5.2.2 Frequência de indivíduos com anticorpos das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra GLURP e MSP-3

A pesquisa de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foi realizada em todas as amostras que apresentaram anticorpos da classe IgG. As frequências de indivíduos com anticorpos das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GLURP e MSP-3 estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Frequência de indivíduos com anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GLURP e MSP-3, nos grupos CZS, ML e GJ.

Grupos	GLURP			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
CZS	40/46* (87%)	10/46 (21,7%)	33/46* (71,7%)	10/46 (21,7%)
ML	30/34* (88,2%)	7/34 (20,6%)	12/34 (35,3%)	6/34 (17,6%)
GJ	23/24** (95,8%)	1/24 (4,2%)	9/24** (37,5%)	2/24 (8,3%)
	MSP-3			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
CZS	28/31*** (90,3%)	0/31 (0%)	8/31 (25,8%)	0/31 (0%)
ML	6/7 (-)	0/7 (-)	3/7 (-)	0/7 (-)
GJ	5/5 (-)	1/5 (-)	4/5 (-)	2/5 (-)

CZS: Grupo Cruzeiro do Sul; ML: Grupo Mâncio Lima; GJ: Grupo Guajará.

Os níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GLURP, a MSP-3 estão mostradas nas Figuras 17.1, 17.2 e 17.3. Nos grupos CZS, ML e GJ, observamos maiores níveis de anticorpos anti-GLURP da classe IgG1 que os de classe IgG2, IgG3 e IgG4 (CZS: $P < 0,0001$ IgG1 *versus* IgG2 e IgG4; $P = 0,02$, IgG1 *versus* IgG3. ML: $P < 0,0001$ IgG1 *versus* IgG2, IgG3 e IgG4. GJ:

$P < 0,0001$, IgG1 *versus* IgG2, IgG3 e IgG4). Apenas no grupo CZS, observamos que os níveis de anticorpos IgG3anti-GLURP foram maiores que os níveis de anticorpos IgG2 e IgG4 (CZS: $P < 0,0001$, para todas análises).

Os níveis de anticorpos IgG1 contra a GLURP estavam positivamente correlacionados com o tempo da última infecção, no grupo CZS ($P = 0,04$; $r = 0,3585$) e com idade, tempo de residência em área endêmica de malária e o número de infecções anteriores de malária, no grupo GJ ($P = 0,01$, $r = 0,4856$, para IgG1 *versus* idade; $P = 0,01$, $r = 0,4846$ para IgG1 *versus* tempo de residência em área endêmica de malária; $P = 0,01$, $r = 0,4760$, para IgG1 *versus* número de infecções anteriores de malária). Já os níveis de anticorpos IgG3anti-GLURP estavam diretamente correlacionados com idade e tempo de residência em área endêmica de malária, no grupo CZS ($P = 0,04$, $r = 0,3340$, para IgG3 *versus* idade; $P = 0,03$, $r = 0,3104$, para IgG3 *versus* tempo de residência em área endêmica de malária).

Não notamos associação entre anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra GLURP e MSP-3 e presença de sintomas no momento da coleta, sexo, espécie infectante, espécies plasmodiais anteriores, última espécie infectante, tempo da última infecção ou parasitemia.

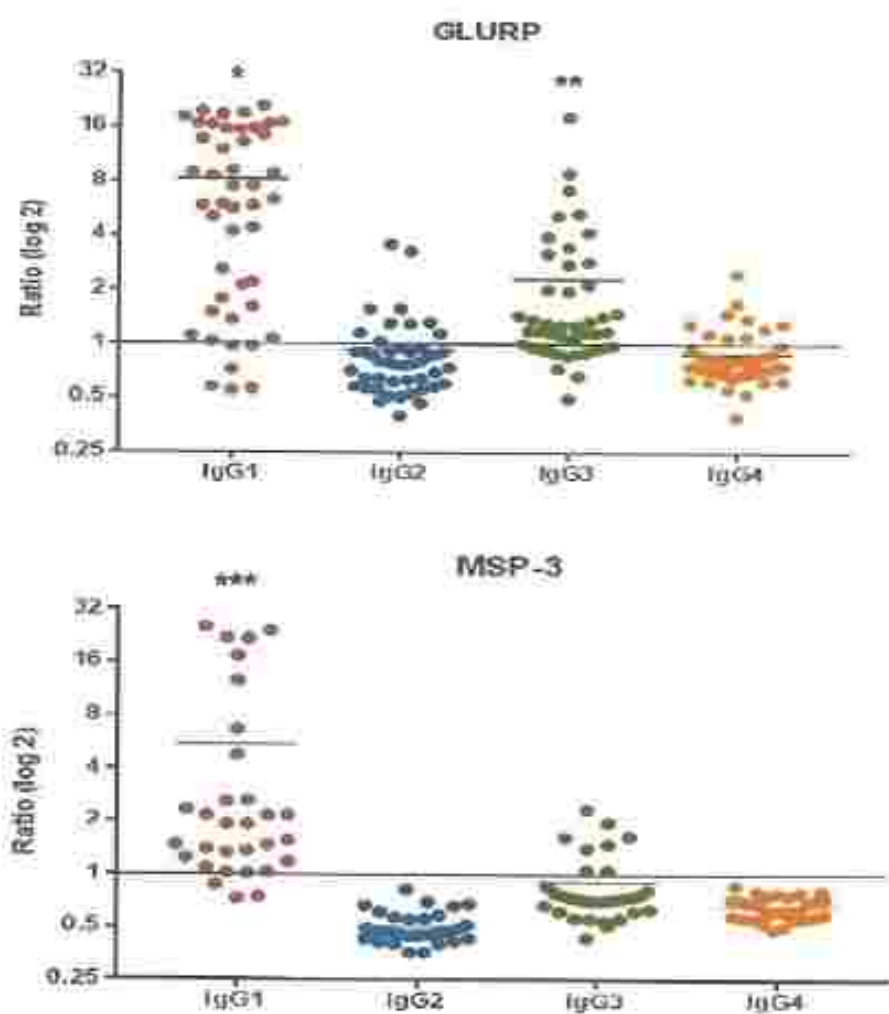


Figura 17.1: Níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra GLURP e MSP-3 no grupo CZS (Cruzeiro do Sul).

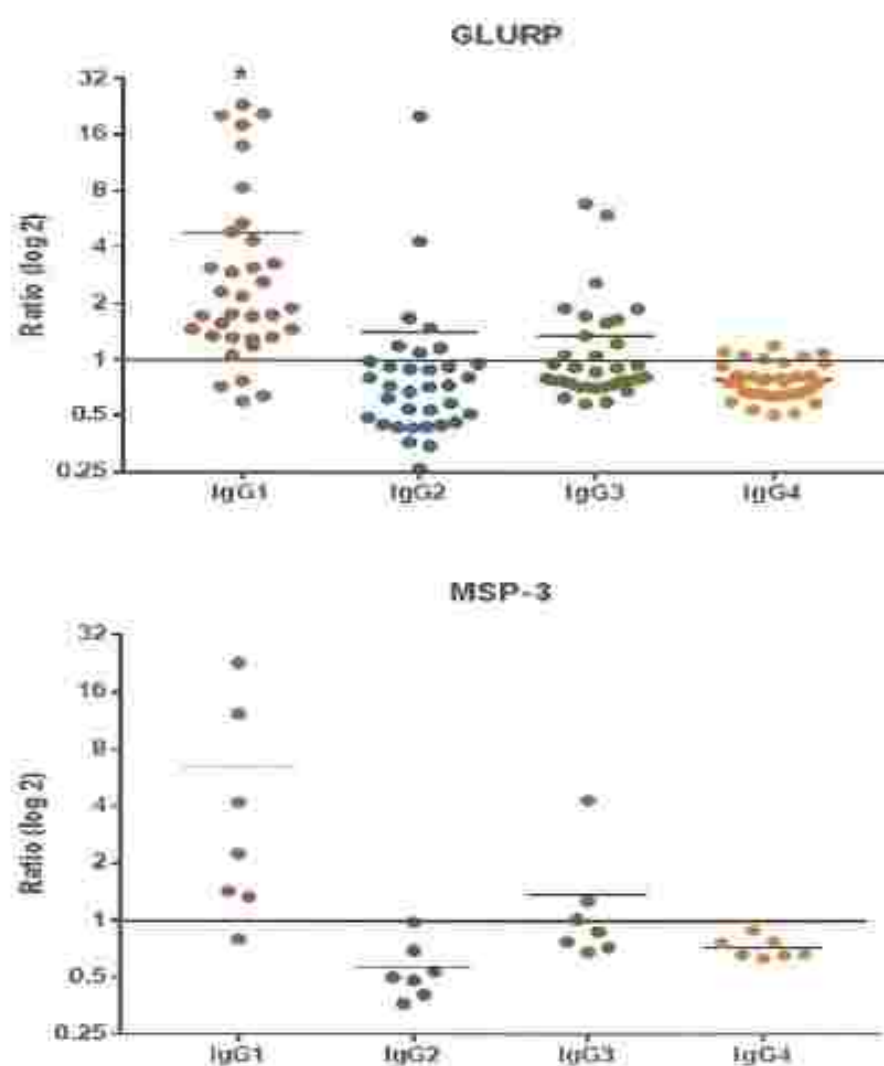


Figura 17.2: Níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra GLURP e MSP-3 no grupo ML (Márcio Lima).

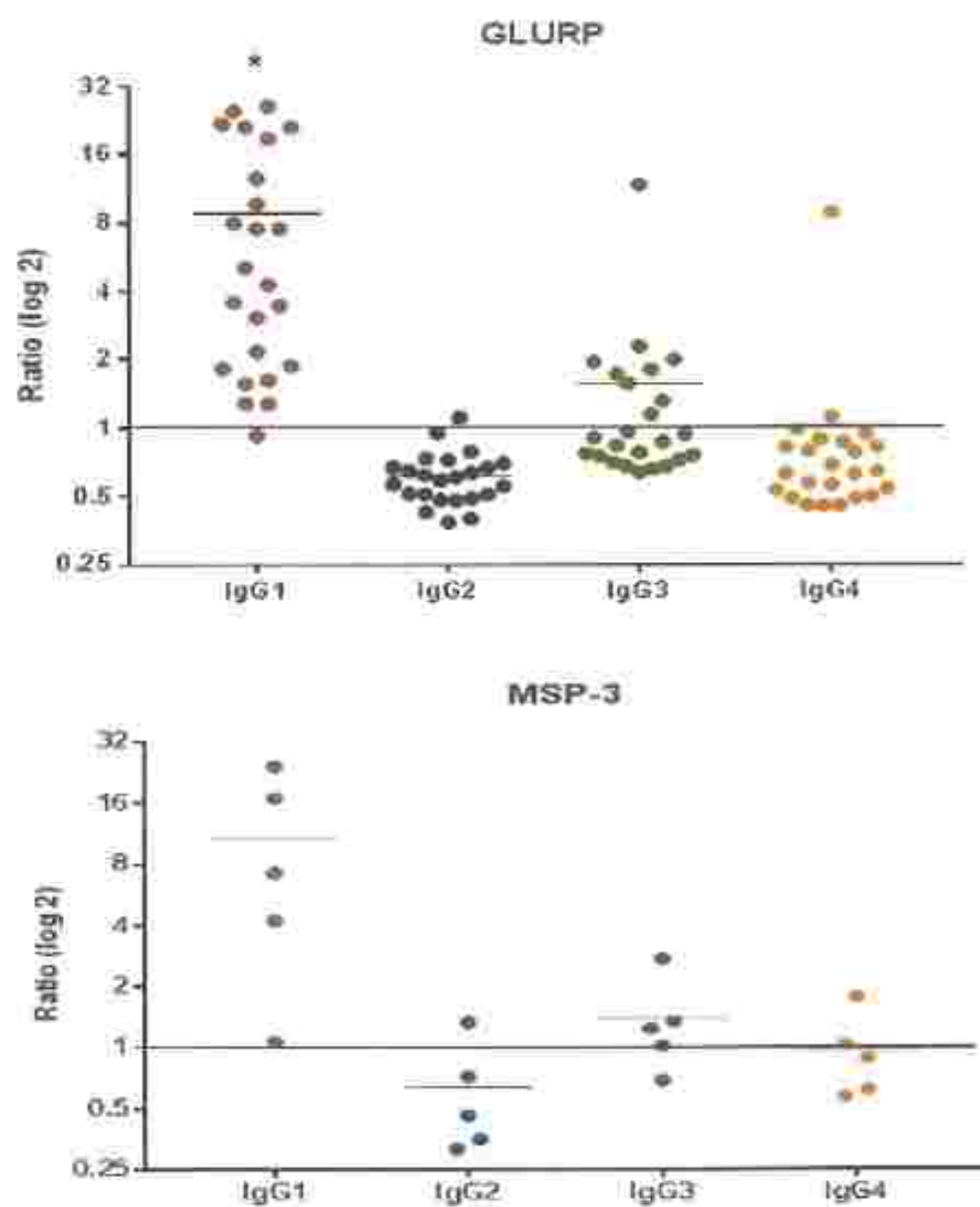


Figura 17.3: Níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra GLURP e MSP-3 no grupo G.I (Guajará).

Quando comparamos os níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra a GLURP e MSP-3 entre indivíduos parasitados e não parasitados, independente do grupo, verificamos que os níveis de anticorpos IgG1e IgG3 contra a GLURP e IgG1 contra a MSP3 foram maiores nos indivíduos parasitados (GLURP: $P < 0,0001$, para IgG1; $P = 0,0004$, para IgG4; MSP-3, $P = 0,03$ para IgG1) (Figura 18).

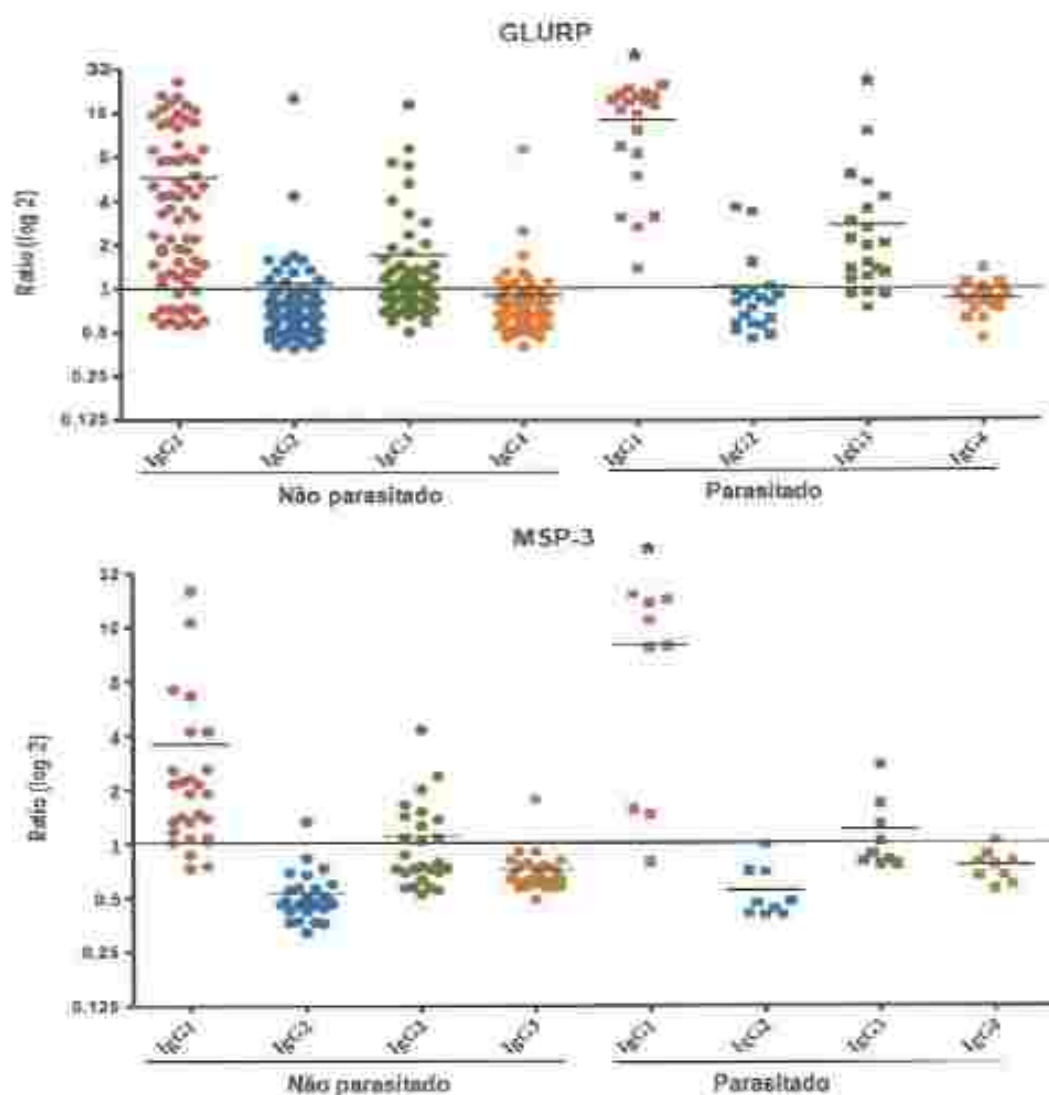


Figura 18: Níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 a GLURP e a MSP-3 em indivíduos parasitados e não parasitados, independente do grupo. Linhas representam a média.

6 DISCUSSÃO

Com a possibilidade crescente do aumento da resistência dos plasmódios aos antimaláricos atualmente disponíveis e dos anofelinos aos inseticidas (WHO, 2016), uma estratégia alternativa de grande impacto no controle da transmissão da malária seria a imunoprofilaxia. Assim, o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a malária tem sido uma das principais prioridades de pesquisa para o enfrentamento desse problema. O desenvolvimento de uma vacina antimalárica tem focado, principalmente, em antígenos únicos. Dada a complexidade do ciclo evolutivo do parasito, as complexas interações parasito-hospedeiro durante o curso da infecção, a extensa variabilidade genética do parasito e os mecanismos utilizados pelo plasmódio para evadir a resposta imune do hospedeiro, uma vacina ideal contra a malária deveria ser direcionada contra vários antígenos expressos em diferentes estágios do desenvolvimento do parasita (Singh *et al.*, 2012). As abordagens adotadas para desenvolver uma vacina antimalárica baseada em sub-unidades, multi antigênica, multiestágio e baseada em peptídeos sintéticos têm mostrado resultados promissores (Curtidor *et al.*, 2015). Nesse contexto, as proteínas GLURP e MSP-3 são fortes candidatas vacinais.

No presente trabalho, avaliamos o perfil de anticorpos IgG para as proteínas GLURP e MSP-3 de *Plasmodium falciparum* em indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária brasileira, com diferentes níveis de transmissão. A resposta imune humoral contra essas proteínas foi avaliada em indivíduos residentes em três cidades da Amazônia Brasileira: Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima, no Acre, e Guajará, no Amazonas. Essas áreas foram selecionadas, pois estão entre as 15 cidades que concentram 80% da malária por *P. falciparum* no país. Cruzeiro do Sul e Mâncio Lima são consideradas áreas de alta endemicidade de malária (IPA > 50) e Guajará é considerada área de média endemicidade (IPA >10 e <50).

Os indivíduos de Cruzeiro do Sul (CZS), Mâncio Lima (ML) e Guajará (GJ) eram similares na distribuição por sexo, idade, procedência e exposição prévia ao *Plasmodium*, embora os indivíduos do grupo ML tenham relatado uma maior média de número de infecções anteriores de malária que os indivíduos dos grupos GJ e CZS, mesmo sendo CZS uma cidade de alta endemicidade (IPA > 50) como ML.

Nosso trabalho mostrou que 37,1% e 25% dos indivíduos de CZS, 38,6% e 8% dos indivíduos de ML e 27,6% e 5,7% dos indivíduos de GJ apresentavam

anticorpos IgG que reconheciam as proteínas GLURP e MSP-3, respectivamente. Essa antigenicidade das proteínas parece ser independente do nível de endemicidade da área, visto que Mâncio Lima e Cruzeiro do Sul, que são áreas de alta endemicidade e Guajará, que é considerada área de média endemicidade, apresentaram prevalências similares de indivíduos com anticorpos que reconheciam a GLURP e MSP-3.

Estudos independentes têm sido conduzidos para avaliar a resposta imune humoral contra a GLURP-R0 e a MSP-3 e seu potencial em conferir imunidade contra malária clínica em diferentes áreas endêmicas de malária na África, incluindo Senegal, Uganda, Burkina Faso, Gana, Quênia, Mianmar e Sudão. Além da localização geográfica, essas localidades diferem em intensidade de transmissão: alta, com mais de 200 picadas infectantes por pessoa por ano (Senegal, Uganda e Burkina Faso), média, com aproximadamente 10 picadas infectantes por pessoas por ano (Gana, Quênia e Mianmar) e baixa, com aproximadamente 2 a 3 picadas infectantes por pessoa por ano (Sudão). Esses estudos têm mostrado uma grande variedade de resultados em relação a imunogenicidade natural de GLURP-R0 e da MSP-3 (Theisen *et al.*, 2017). Alguns trabalhos relataram a maior imunogenicidade da MSP-3 quando comparada com a GLURP-R0 (Dodoo *et al.*, 2000; Soe *et al.*, 2004), enquanto em outros trabalhos, a GLURP-R0 foi mais imunogênica quando comparado com MSP-3 (Pratt-Riccio *et al.*, 2011; Nebie *et al.*, 2008; Courtin *et al.*, 2009; Amoah *et al.*, 2017). A diferença observada na imunogenicidade natural da MSP-3 e da GLURP-R0 pode ser resultado das diferenças observadas na exposição, idade e tempo de residência das populações estudadas visto que vários estudos têm demonstrado o efeito direto desses parâmetros no desenvolvimento da resposta imune antiplasmodial (Pratt-Riccio *et al.*, 2005; Nebie *et al.*, 2008; Banic *et al.*, 2002; Sarr *et al.*, 2012). Outra hipótese é que a diferença no *background* genético das populações estudadas esteja influenciando no desenvolvimento da resposta imune à GLURP e à MSP-3. Estudos genéticos serão realizados para tentar avaliar essa possibilidade.

Nosso trabalho mostrou que grande parte dos indivíduos dos grupos CZS, ML e GJ apresentava anticorpos IgG que reconheciam as proteínas GLURP e MSP-3, embora a frequência de indivíduos com anticorpos IgG contra a GLURP-R0 tenha sido maior que a frequência de indivíduos com anticorpos anti-MSP-3. Esses dados corroboram estudos prévios realizados em nosso Laboratório que avaliaram a

resposta IgG contra as proteínas GLURP-R0 e MSP-3 em indivíduos residentes em área endêmica brasileira de malária (Porto Velho, Rondônia) e mostraram que a GLURP-R0 foi mais imunogênica (67%) quando comparada a MSP-3 (41%) (Pratt-Riccio, *et al.*, 2005; Pratt-Riccio *et al.*, 2011).

Anticorpos naturalmente adquiridos contra vários antígenos plasmodiais estão associados com idade e tempo de exposição à malária em regiões endêmicas, um fenômeno que tem sido frequentemente relatado para vários antígenos (Pratt-Riccio *et al.*, 2005; Nebie *et al.*, 2008; Banic *et al.*, 2002; Egan *et al.*, 1996; Branch *et al.*, 1998; Banic *et al.*, 1998; Roussilhon *et al.*, 2007; John *et al.*, 2008; Osier *et al.*, 2008; Riley *et al.*, 1992; Riley *et al.*, 1994). No presente trabalho, os níveis de IgG contra a GLURP (grupos ML e GJ) aumentaram com idade e tempo de residência em área endêmica de malária, provavelmente refletindo a exposição natural ao *P. falciparum* e, possivelmente, a maturação do sistema imune. Curiosamente, apenas no grupo ML, foi observada uma correlação entre anticorpos IgG anti-GLURP e número de infecções anteriores de malária. Nos grupos CZS e GJ nenhuma correlação com número de infecções foi observada. Pelo menos três hipóteses podem ser evocadas para explicar esse resultado. A primeira baseia-se no fato de que o dado do número de infecções anteriores de malária pode estar sendo subestimado devido à dificuldade dos indivíduos terem a exata lembrança de números de episódios anteriores desde a infância. A segunda hipótese baseia-se no fato de que os indivíduos que residem há vários anos em área endêmica de malária podem ter desenvolvido um certo grau de imunidade antimalárica, após terem apresentado vários episódios de malária, relatando, assim, menos episódios de malária clínica. Recentes trabalhos têm relatado um considerável número de infecções oligo e assintomáticas entre indivíduos com grande tempo de exposição (18 anos em média), que vivem em áreas hipoendêmicas de transmissão instável do Brasil (de Andrade *et al.*, 1995; Mendonça *et al.*, 2014). A terceira hipótese baseia-se no fato de que devido a alta prevalência de *P. vivax* em relação a *P. falciparum* na área, o número de infecções anteriores de malária não significa necessariamente a estimulação de uma resposta imune para a antígenos específicos de *P. falciparum*.

Considerando que (i) indivíduos protegidos da malária clínica possuem altos níveis de anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3) contra antígenos plasmodiais; (ii) quanto maior o grau de proteção desses indivíduos, maior é a razão entre anticorpos citofílicos e não citofílicos (IgG2 e IgG4) e; (iii) anticorpos não citofílicos podem

bloquear o mecanismo efetor dos anticorpos citofílicos (Oeuvray *et al.*, 2000; Soe *et al.*, 2004; Lusingu *et al.*, 2005; Groux *et al.*, 1990; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1992; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1992; Beck *et al.*, 1995; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995), avaliamos a qualidade da resposta anticorpo contra as proteínas GLURP e MSP-3 pela análise das subclasses de IgG. A pesquisa de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foi realizada em todas as amostras que apresentaram anticorpos IgG para cada uma das proteínas estudadas. Anticorpos das 4 subclasses foram detectados no plasma dos indivíduos dos grupos CZS, ML e GJ.

Nossos dados mostraram que indivíduos naturalmente expostos à infecção malárica apresentam predominantemente anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3) que reconhecem as proteínas GLURP e MSP-3, fato importante se considerarmos que a aquisição de uma imunidade protetora contra a malária está associada com a presença e altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG3 e reduzida proporção de IgG2 e IgG4 com a mesma especificidade visto que anticorpos não citofílicos bloqueiam os mecanismos efetores (Oeuvray *et al.*, 1994; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1992; Metzger *et al.*, 2003). A interação entre anticorpos citofílicos e receptores Fc (FcR) em células fagocíticas pode levar a ativação celular e desencadear funções efetoras tais como fagocitose, produção de citocinas e quimiocinas, citotoxicidade e geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Ortega *et al.*, 2007). Anticorpos citofílicos podem mediar a morte do parasito em cooperação com células mononucleares através do mecanismo de inibição celular dependente de anticorpo (ADCI), além da opsonização de merozoítas de *P. falciparum* (Theisen *et al.*, 2017; Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995; Drulhe *et al.*, 1994).

Estudos têm demonstrado que as características inerentes aos antígenos plasmodiais influenciam nos eventos moleculares que levam à indução preferencial de diferentes subclasses de IgG. A presença de sequências de aminoácidos que são simultaneamente repetitivas e polimórficas induz uma resposta predominantemente IgG3, enquanto que a ausência dessas repetições polimórficas induz predominantemente uma resposta IgG1. Antígenos polimórficos sem sequência repetitiva induzem uma resposta IgG1+IgG3, com a predominância de IgG3 enquanto que antígenos repetitivos conservados induzem uma resposta IgG1 ou IgG1+IgG3 (Scopel *et al.*, 2006; Tongrenet *et al.*, 2006). Nossos dados mostraram que GLURP-R0 em indivíduos naturalmente expostos à infecção malárica induz uma resposta anticorpo predominantemente citofílica (IgG1 + IgG3), especialmente no

grupo CZS, enquanto que a MSP-3 induziu uma resposta predominantemente IgG1, nos 3 grupos estudados. Esses resultados podem ser devido à característica não repetitiva conservada da GLURP-R0 contrastando com a natureza repetitiva e relativamente mais polimórfica da MSP-3 (Huber *et al.*, 1997; Pattaradilokrat *et al.*, 2016; McColl *et al.*, 1994). Entretanto, fatores como a cumulativa exposição à malária, a idade dos indivíduos, o HLA e o polimorfismo dos receptores FC têm mostrado influenciar a distribuição das subclasses de IgG contra antígenos plasmodiais (Scopel *et al.*, 2006; Aucan *et al.*, 2001).

Trabalhos realizados em área de alta endemicidade de malária têm demonstrado correlação entre os níveis de anticorpos citofílicos e a parasitemia (Dodoo *et al.*, 2000; Lusingu *et al.*, 2005; Hogg *et al.*, 1993). Porém, em nosso trabalho não verificamos nenhuma correlação entre os níveis de anticorpos IgG1 e/ou IgG3 e/ou a relação entre anticorpos citofílicos e não citofílicos (dados não mostrados) e a parasitemia. Dados similares foram obtidos por Maya e colaboradores que também não observaram correlação entre níveis de anticorpos citofílicos e parasitemia em um estudo realizado no Gabão (Maya *et al.*, 2006). Um recente estudo que avaliou a resposta imune contra antígenos de esporozoítas e dos estágios hepático e eritrocítico em área endêmica brasileira de malária (Porto Velho, Rondônia) também não observou relação entre níveis de anticorpos IgG1 ou IgG3 ou a relação entre anticorpos citofílicos/não citofílicos e a parasitemia (Pratt-Riccio *et al.*, 2017). Uma possível explicação para esses resultados é o pequeno número de indivíduos parasitados por *P. falciparum* em nosso trabalho, apenas 25/124 indivíduos de CZS (20,2 %), 12/88 indivíduos de ML (13,6 %) e 6/87 indivíduos de GJ (6,7%). Além disso, dos 43 indivíduos parasitados com *P. falciparum*, em apenas 21 foi possível quantificar parasitos nas lâminas. Os 22 indivíduos restantes foram diagnosticados por métodos moleculares.

Nossos dados mostraram que os níveis de anticorpos IgG a GLURP e a MSP-3 foram maiores nos indivíduos parasitados quando comparado aos indivíduos não parasitados. Esse resultado pode ser reflexo de uma estimulação do sistema imune levando a produção de anticorpos antiplasmodiais, entre os quais anticorpos anti-GLURP e anti-MSP3, devido à infecção. Esse *booster*, em resposta à infecção, induziria uma resposta anticorpo predominantemente citofílica contra a GLURP (IgG1 e IgG3) e MSP-3 (IgG1).

Em conjunto, nossos dados mostraram que as proteínas GLURP e MSP-3 são amplamente reconhecidas por anticorpos naturalmente adquiridos de indivíduos residentes em Mâncio Lima, Cruzeiro do Sul e Guajará e que esse amplo reconhecimento parece ser independente do nível de endemicidade da área. Entre as duas proteínas, a GLURP se revelou a mais imunogênica na infecção natural. Além disso, a resposta anticorpo contra a GLURP e MSP-3 é predominantemente citofílica, IgG1 e/ou IgG3. Portanto, nossos dados ressaltam a importância das proteínas GLURP e MSP-3 como candidatas à vacina antimalárica.

7 CONCLUSÕES

Em conjunto, nossos dados permitiram concluir que:

- As proteínas GLURP e MSP-3 são reconhecidas por anticorpos IgG naturalmente adquiridos, principalmente os das subclasses IgG1 e IgG3 (citofílicos).
- O reconhecimento das proteínas por anticorpos naturalmente adquiridos parece ser independente do nível de endemicidade da área.
- A proteína GLURP é naturalmente mais imunogênica que a MSP-3.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Yaman F, Genton B, Anders RF, Falk M, Triglia T, Lewis D, et al. Relationship between humoral response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 and malaria morbidity in a highly endemic area of Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg.* 1994Nov;51(5):593–602.
- Amodah LE, Nuvor S V, Obboh EK, Acquah FK, Asare K, Singh SK, et al. Natural antibody responses to *Plasmodium falciparum* MSP3 and GLURP(R0) antigens are associated with low parasite densities in malaria patients living in the Central Region of Ghana. *Parasit Vectors.* 2017Aug 23;10(1):395.
- Aucan C, Traoré Y, Fumoux F, Rihet P. Familial correlation of immunoglobulin G subclass responses to *Plasmodium falciparum* antigens in Burkina Faso. *Infect Immun.* 2001;69(2):996–1001.
- Baldwin SL, RoeffenW, Singh SK, Tiendrebeogo RW, Christiansen M, Beebe E, et al. Synthetic TLR4 agonists enhance functional antibodies and CD4+ T- cell responses against the *Plasmodium falciparum* GMZ2.6C multi- stage vaccine antigen. *Vaccine.* 2016Apr;34(19):2207–15.
- Banic DM, De Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Conseil V, Gonçalves D, Flalho RR, et al. Immune response and lack of immune response to *Plasmodium falciparum* p126 antigen and its amino-terminal repeat in malaria- infected humans. *Am J TropMedHyg.* 1998 May;66(5):509–15.
- Banic DM, Goldberg AC, Pratt-Riccio LR, De Oliveira-Ferreira J, Santos F, Gras-Masse H, et al. Human leukocyte antigen class II control of the immune response to p126-derived amino terminal peptide from *Plasmodium falciparum*. *Am J TropMedHyg.* 2002 May;66(5):509–15.

- Beck HP, Felger I, Genton B, Alexander N, Al-Yaman F, Anders RF, et al. Humoral and cell-mediated immunity to the *Plasmodium falciparum* ring- infected erythrocyte surface antigen in an adult population exposed to highly endemic malaria. *Infect Immun*. 1995; 63(2):596-600.
- Blandin S, Shiao SH, Molta LF, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC, et al. Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell*. 2004; 116(5):661-70.
- Borre MB, Dziegiel M, Høgh B, Petersen E, Rieneck K, Riley E, Meis JF, Aikawa M, Nakamura K, Harada M, et al. Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1991; 49(1):119-31.
- Bouharoun-Tayoun H, Drulhe P. Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992; 87(Suppl 3):229-34.
- Bouharoun-Tayoun H, Drulhe P. *Plasmodium falciparum* Malaria: Evidence for an isotype imbalance Which May Be Responsible for Delayed Acquisition of Protective Immunity. *Infect Immun*. 1992; 14:73-81.
- Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Drulhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med*. 1995; 182(2):409-18.
- Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL, et al. A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kiloDalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Feb; 58(2):211-9.
- Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Heal*. 2017; 5.

- Carvalho LJM, Daniel-Ribeiro CT, Goto H. Malaria vaccine: **Candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects.** *Scand J Immunol.* 2002;56(4):327–43.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Editora Fiocruz. 1994 228p.
- Coura, J.R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.** Guanabara Koogan, p. 951-957,2013.
- Courtin D, Oesterholt M, Huismans H, Kusi K, Milet J, Badaut C, et al. **The quantity and quality of African children's IgG responses to merozoite surface antigens reflect protection against *Plasmodium falciparum* malaria.** *PLoS One.*2009;4(10).
- Curtidor H, Patarroyo ME, Patarroyo MA. **Recent advances in the development of a chemically synthesised anti-malarial vaccine.** *Expert OpinBiolTher.*2015Nov 2;15(11):1567–81.
- de Andrade AL, Martelli CM, Oliveira RM, Arias JR, Zicker F, Pang L. **High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil.** *ClinInfectDis.* 1995Feb;20(2):475.
- de Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-MutisMC, Santelli AC, Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Daniel-RibeiroCT. **Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region.** Scielo. 2014
- Deane, L.M. **Vetores de malária no Brasil.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 81:5– 14, 1986.
- Dodoo D, Theisen M, Kurtzhals J a, Akanmori BD, Koram KA, Jepsen S, et al. **Naturally acquired antibodies to the glutamate-rich protein are associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria.** *J Infect Dis.* 2000.
- Druilhe P, Pérignon JL. **Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stages in humans.** *Immunol Lett.* 1994;2(11):1135–44.

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. 1996Mar;173(3):765-9.

Faust C, Dobson AP. **Primate malarias: Diversity, distribution and insights for zoonotic *Plasmodium*.** One Health. 2015;66-75.

Groux H, Gysin J. **Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses.** Res Immunol. 1990;141(6):529-42.

Hiwat H., Bretas, G. **Ecology of *Anopheles darlingi* root with respect to vector importance: a review.** Parasit Vectors. 4:177, 2011.

Hogh B, Marbiah NT, Petersen E, Dolopaye E, Willcox M, Björkman A, et al. **Classification of clinical *falciparum* malaria and its use for the evaluation of chemosuppression in children under six years of age in Liberia, West Africa.** Acta Trop. 1993

Huber W, Felger I, Matile H, Joachim Lipps H, Steiger S, Beck H-P. **Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3.** MolBiochemParasitol. 1997 Aug;87(2):231-4.

Huber W, Felger I, Matile H, Joachim Lipps H, Steiger S, Beck H-P. **Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3.** MolBiochemParasitol. 1997Aug;87(2):231-4.

John CC, Tande AJ, Moormann AM, Sumba PO, Lanar DE, Min XM, et al. **Antibodies to pre-erythrocytic *Plasmodium falciparum* antigens and risk of clinical malaria in Kenyan children.** J Infect Dis. 2008Feb 15;197(4):519-26.

Lisa Mirabello, Joseph H Vineis, Stephen P Yanoviak, Vera M Scarpassa, Marinete M Póvoa, Norma Padilla, Nicole L Achee, and Jan E Conn **Microsatellite data suggest significant population structure and differentiation within the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America.** Biomed Central. 2008.

Lusingu JPA, Vestergaard LS, Alifrangis M, Mmbando BP, Theisen M, Kitua AY, et al. **Cytophilic antibodies to *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein are associated with malaria protection in an area of holoendemic transmission.** Malar J. 2005.

Maya DW, Mavoungou E, Deloron P, Theisen M, Ntoumi F. **Distribution of IgG subclass antibodies specific for *Plasmodium falciparum* glutamate-rich-protein molecule in sickle cell trait children with asymptomatic infections.** ExpParasitol. 2006Feb;112(2):92-8.

McColl DJ, Anders RF. **Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3).** MolBiochemParasitol. 1997;90(1):21-31.

McColl DJ, Silva A, Foley M, Kun JF, Favaloro JM, Thompson JK, et al. **Molecular variation in a novel polymorphic antigen associated with *Plasmodium falciparum* merozoites.** MolBiochemParasitol. 1994

Mendonça VR, Souza LC, Garcia GC, Magalhães BM, Lacerda MV, Andrade BB, et al. **DDX39B (BAT1), TNF and IL6 gene polymorphisms and association with clinical outcomes of patients with *Plasmodium vivax* malaria.** Malar J. 2014Jul 19;13(1):278.

Metzger WG, Okenu DMN, Cavanagh DR, Robinson J V., 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. 2003Jun1;25(6):307-12.

Neble I, Tiono AB, Diallo DA, Samandoulougou S, Diarra A, Konate AT, et al. **Do antibody responses to malaria vaccine candidates influenced by the level of malaria transmission protect from malaria?** Trop Med Int Heal. 2008

Oeuvray BC, Bouharoun-tayoun H, Gras-masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, et al. **Merozoite Surface Protein-3: A Malaria Protein Inducing Antibodies That Promote.** Blood.1994;84(5):1594-603.

Oeuvray C, Theisen M, Rogier C, Trape JF, Jepsen S, Drulhe P. **Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal.** Infect Immun. 2000

Ortega E, Soto-Cruz I. **Early biochemical events in leukocyte activation through receptors for IgG.** Signal Transduction. 2007;(7):415–26.

Osier FHA, Fegan G, Polley SD, Murungi L, Verra F, Tetteh KKA, et al. **Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria.** Infect Immun. 2008 May 1;76(5):2240–8.

Pan American Health Organization/World Health Organization. **Epidemiological Alert: Increase in cases of malaria.** report. 2017;(February).Disponívelem:<http://www.paho.org>

Pan American Health Organization/World Health Organization. **Epidemiological Alert: Increase in cases of malaria.** report. 2018. Disponívelem: <http://www.paho.org>.

Pattaradilokrat S, Sawaswong V, Simpalipan P, Kaewthamasorn M, Siripoon N, Harnyuttanakorn P. **Genetic diversity of the merozoite surface protein-3 gene in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand.** Malar J. 2016;15(1):517.

Polley SD, Tetteh KKA, Lloyd JM, Akpogheneta OJ, Greenwood BM, Bojang KA, et al. ***Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 is a target of allele-specific immunity and alleles are maintained by natural selection.** J Infect Dis. 2007;195(2):279–87.

Pratt-Riccio LR, Bianco-Junior C, Totino PRR, Perce-da-Silva D de S, 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.

Pratt-Riccio LR, Lima JC, Carvalho LJM, Thelsen M, Espindola-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 TropMedHyg. 2005.

Pratt-Riccio LR, Perce-da-Silva DS, Lima-Junior JC, Riccio EK, Ribeiro-Alves M, Santos F, et al. **Synthetic antigens derived from *Plasmodium falciparum* sporozoite, liver and blood stages: naturally acquired immune response and HLA associations in individuals living in a brazilian endemic area.** Am J Trop Med Hyg. No prelo. 2017

Pribluda VS, Evans L, Barillas E, Marmion J, Lukulay P, Chang J. **Were medicine quality and pharmaceutical management contributing factors in diminishing artemisinin efficacy in Guyana and Suriname?** Malar J. 2014;13(1):77.

Reed ZH, Friede M, Kieny MP. 2006. **Malaria vaccine development: progress and challenges.** CurrMol MedMar 1;6(2):231–45.

Riley EM, Olerup O, Bennett S, Rowe P, Allen SJ, Blackman MJ, et al. **MHC and malaria: the relationship between HLA class II alleles and immune responses to *Plasmodium falciparum*.** IntImmunol.1992;4(9):1055–63.

Rosa-Freitas,M.G.; Lourenço-De-Oliveira, R.; Carvalho-Pinto, C.J.; Floresmensonza, C.; Silva-Do-Nascimento,T.F. **AnophelineSpecies Complexes in Brazil.** Current Knowledge of Those Related to Malaria Transmission. Mem.Inst. Oswaldo Cruz.Vol.93, n.5, 1998.

Roussilhon C, Oeuvray C, Müller-Graf C, Tall A, Rogier C, Trape J-F, et al. **Long-term clinical protection from *falciparum* malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3.** Krishna S, editor. PLoS Med. 2007

Sarr JB, Samb B, Sagna AB, Fortin S, Doucoure S, Sow C, et al. **Differential acquisition of human antibody responses to *Plasmodium falciparum* according to intensity of exposure to *Anopheles* bites.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012Aug;106(8):460–7.

- Sawaswong V, Simpalipan P, Siripoon N, Harnyuttanakorn P, Pattaradilokrat S. **Allelic Diversity and Geographical Distribution of the Gene Encoding *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-3 in Thailand.** Korean J Parasitol. 2015;53(2):177–87.
- Scopel KKG, Fontes CJF, Ferreira MU, Braga Erika M. **Factors associated with Immunoglobulin G subclass polarization in naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins: A cross-sectional survey in Brazilian Amazonia.** ClinVaccineImmunol. 200613(7):810–3.
- Secretaria de Vigilância em Saúde. **Resumo Epidemiológico por Local de Notificação [Internet].** Data SUS. 2017. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br>.
- Singh B, Cabrera-Mora M, Jiang J, Moreno A. **A hybridmultistageprotein vaccine inducesprotectiveimmunityagainstmurinemalaria.** Infect Immun. 2010;80(4):1491–501.
- Soe S, Theisen M, Roussilhon C, Khin-Saw-Aye, Druilhe P. **Association between Protection against Clinical Malaria and Antibodies to Merozoite Surface Antigens in an Area of Hyperendemicity in Myanmar: Complementarity between Responses to Merozoite Surface Protein 3 and the 220-Kilodalton Glutamate-Rich Protein.** InfectImmun. 2004
- Suárez-Mutis, M.C.; Martínez-Espinosa, F.E.; De Albuquerque, B.C; **Malária.** In: COURA, J.R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, 2ª edição, Guanabara Koogan. 71, 885 – 909,2013.
- Tadei, W.P; Dutary Thatcher, B.; Santos, J.M.M. **Observações Ecológicas sobre anofelinos transmissores de malária na Amazônia brasileira.** Amer. J. Trop. Med. Hyg. 59: 325-335, 1998.
- Theisen M, Adu B, Mordmüller B, Singh S. **The GMZ2 malaria vaccine: from concept to efficacy in humans.** Expert Rev Vaccines. 2017Jul 21;1–11.
- Tongren JE, Drakeley CJ, McDonald SLR, Reyburn HG, Manjurano A, Nkya WMM,

et al. Target antigen, age, and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria. *Infect Immun*. 2006 74(1):257–64.

Vaughan AM, Kappa SH. Malaria vaccine development: persistent challenges. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(3):324–31.

White, N.J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis*. Jan 15;46(2):172–3, 2008.

World Health Organization. **World Malaria Report 2016**. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malariareport-2016/report/en/>

World Health Organization. **World Malaria Report 2017**. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malariareport-2017/report/en/>