



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**IMUNIDADE EM MALÁRIA:
CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DE ANTICORPOS EM
INDIVÍDUOS COM ESTADIA EM ZONA ENDÉMICA**

Daniela Cristina Portugal Calisto

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE
TROPICAL**

ESPECIALIDADE DE PATOLOGIA TROPICAL

MARÇO, 2015



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**IMUNIDADE EM MALÁRIA:
CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DE ANTICORPOS EM
INDIVÍDUOS COM ESTADIA EM ZONA ENDÉMICA**

Autor: Daniela Cristina Portugal Calisto

Orientador: Professora Doutora Rosa Teodósio

Coorientador: Investigador Doutor Marcelo Sousa Silva

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde Tropical, na especialidade de Patologia Tropical, realizada sob a orientação científica da Professora Rosa Teodósio e coorientação científica do Doutor Marcelo Sousa Silva.

MARÇO, 2015

Aos meus pais, pelo amor incondicional.

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Rosa Teodósio, grande profissional e grande mulher, por todo o acompanhamento nesta jornada, pelo incentivo, simpatia e constante disponibilidade. Foi incasável.

Ao meu orientador, Doutor Marcelo Sousa Silva, por todo o apoio científico, pelo optimismo contagiante, pelas palavras de encorajamento, pela paciência, pela confiança depositada em mim e pelos muitos ensinamentos.

À Doutora Fátima Nogueira e à sua aluna Fernanda, pela completa disponibilidade na cedência das suas culturas. Muito obrigada.

Ao Professor Jorge Atougua, quem considero meu mentor, porque sem se aperceber foi o responsável pelo meu percurso e interesse na medicina tropical. Obrigada pelos seus ensinamentos científicos e humanos.

Ao Sr. Francisco Janeiro (da ADFA), à Enf^a. Teresa Mendonça (do Lar Militar da Cruz Vermelha), à Dra. Sónia Faria (do Laboratório de Análises Dr. Francisco Faria) e à Dra. Maria Leonor Barreira (do laboratório Topcare, Oeiras) por me terem permitido concretizar este estudo, com o recrutamento dos participantes nas vossas instituições.

Aos meus colegas e amigos com quem partilhei a bancada: Sónia Pestana, Cláudia Moreno, Joana Monteiro, Catarina Azevedo e Adriana Temporão, pelas conversas, pelas gargalhadas e pela amizade.

Um obrigado especial ao Jailson, pela amizade e ajuda, e à Filipa, pela amizade e pela partilha de brincadeiras e confidências.

Aos meus amigos e familiares, pela amizade, pelo apoio e pelos sorrisos.

Ao Sushi, a minha bola de pêlo felina que me aconhega a alma e me reduz o *stress* dos dias complicados.

Ao Rúben, pela amizade, pelo amor, pelo companheirismo e pela partilha. Obrigada por todos os dias.

Aos melhores do mundo: os meus pais. Pelo apoio incondicional, amor, carinho, por me terem feito chegar até aqui e por acreditarem sempre que consigo mais e melhor. Obrigada por tudo.

Índice Geral

1. Introdução	1
1.2. Distribuição e Epidemiologia	3
1.2.1. Viagens internacionais e Malária importada	4
1.2.2. Malária em Portugal	7
1.3. Transmissão da Malária	10
1.3.1. Ciclo de Vida de <i>Plasmodium</i> sp. no vector <i>Anopheles</i> sp	14
1.4. O Parasita	14
1.4.1. Biologia do Parasita	14
1.4.2. Ciclo de Vida e Infecção	15
1.5. Aspectos Clínicos da Malária: Sinais e Sintomas	22
1.6. Diagnóstico Laboratorial e Terapêutica	24
1.6.1. Diagnóstico Laboratorial da Malária	24
1.6.2. Terapêutica da Malária	28
1.7. Imunologia da Malária	29
1.7.1. Resposta imunológica direccionada ao ciclo pré-eritrocitário	31
1.7.2. Resposta imunológica direccionada ao ciclo eritrocitário	33
1.7.3. Resposta imunológica humoral	38
1.7.4. Resposta imunológica durante o quadro de malária grave	44
1.8. Medidas de Controlo e Prevenção da Malária	45
1.9. Perspectivas futuras no desenvolvimento de vacinas	46
2. Objectivos do Estudo	49
3. Materiais e Métodos	51
3.1. Tipo de Estudo	52
3.2. Amostragem	52
3.3. Instrumento de recolha de dados	53
3.4. Condições de colheita e armazenamento das amostras de sangue	54
3.5. Extracção de proteínas totais de <i>Plasmodium falciparum</i>	54
3.6. Quantificação de proteínas totais de <i>Plasmodium falciparum</i>	54

3.7. Determinação de anticorpos totais anti- <i>Plasmodium</i> spp.	55
3.8. Determinação de anticorpos totais IgG e IgM anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	56
3.9. Imunodeteção de proteínas de <i>Plasmodium falciparum</i> por <i>Western Blot</i>	57
3.10. Extracção e amplificação de DNA de <i>Plasmodium</i> spp.	58
3.11. Metodologia estatística	60
3.12. Considerações éticas	60
4. Resultados e Discussão	62
4.1. Caracterização sociodemográfica da população estudada	63
4.2. Estadias/Viagens a zonas endémicas de malária	64
4.3. Caracterização do grupo de indivíduos com uma só estadia/viagem A zona endémica de malária	65
4.4. Caracterização do grupo de indivíduos com mais do que uma Estadia/viagem a zona endémica de malária	67
4.5. Caracterização das estadias/viagens relativamente à variável “história de malária”	70
4.6. Determinação de anticorpos totais anti- <i>Plasmodium</i> spp.	72
4.7. Pesquisa de DNA de <i>Plasmodium</i> spp.	77
4.8. Determinação de anticorpos totais IgG anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	78
4.9. Determinação de anticorpos IgM anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	83
4.10. Imunodeteção de proteínas de <i>Plasmodium falciparum</i>	86
5. Conclusões e Perspectivas Futuras	90
6. Referências Bibliográficas	94
7. Anexos	106

Índice de Figuras

Figura 1 – Distribuição mundial da malária.	4
Figura 2 – Mapa representativo de zonas com malária estável e instável.	13
Figura 3 – Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> sp. no mosquito vector.	14
Figura 4 – Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> sp.	16
Figura 5 – Ciclo pré-eritrocitário: inoculação dos esporozoítos e estabelecimento da infecção.	17
Figura 6 – Composição estrutural dos merozoítos de <i>Plasmodium</i> sp.	18
Figura 7 – Etapas do processo de invasão do eritrócito por <i>Plasmodium</i> sp.: libertação dos merozoítos, adesão, reorientação e invasão parasitária.	19
Figura 8 – Rosetas: visualização ao microscópio óptico e ao microscópio electrónico.	21
Figura 9 – <i>P. falciparum</i> em esfregaço de sangue periférico, corado com Giemsa 10%.	25
Figura 10 – Exemplo de teste rápido de diagnóstico.	26
Figura 11 – Fases de actuação das vacinas na infecção por <i>Plasmodium</i> sp.	47
Figura 12 – Perfil electroforético do extracto total de <i>P. falciparum</i> em gel de poliacrilamida a 10% corado com Azul brilhante Coomassie.	86
Figura 13 – Perfis de <i>Western Blot</i> dos soros mais reactivos por ELISA anti- <i>P.falciparum</i> .	89

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Viagens internacionais por meio de transporte e por motivo de viagem.	5
Gráfico 2 – Número de hospitalizações, duração do internamento e letalidade devido a malária importada (casos notificados).	9
Gráfico 3 – Aquisição de imunidade de acordo com a idade, em zonas hiperendêmicas e holoendêmicas.	30
Gráfico 4 – Naturalidade dos respondentes (n= 315).	64
Gráfico 5 – Número de estadias/viagens a zona endêmica de malária (n=285).	64
Gráfico 6 – Intervalo de tempo decorrido entre a última estadia/viagem a zona endêmica de malária e a participação dos respondentes no estudo (n=319).	65
Gráfico 7 – País de estadia, nos indivíduos com uma estadia/viagem a zona endêmica de malária (n=107).	65
Gráfico 8 – Motivo pelo qual os respondentes estiveram para zona endêmica de malária, nos indivíduos com uma estadia/viagem a zona endêmica de malária (n=105).	66
Gráfico 9 – Duração da estadia nos indivíduos com uma estadia/viagem a zona endêmica de malária (n=106).	66
Gráfico 10 – Intervalo de tempo decorrido entre a estadia/viagem a zona endêmica de malária e a participação dos respondentes no estudo, nos indivíduos com uma estadia/viagem a zona endêmica de malária (n=107).	67
Gráfico 11 - Países de estadia/viagem, nos indivíduos com mais de uma estadia/viagem a zona endêmica de malária (Primeira estadia/viagem: n=148; Última estadia/viagem: n=170).	68
Gráfico 12 – Motivo pelo qual os respondentes viajaram para zona endêmica de malária, nos indivíduos com mais de uma estadia/viagem a zona endêmica de malária (Primeira estadia/viagem: n=151; Última estadia/viagem: n=167).	68

Gráfico 13 – Duração da(s) estadia(s)/viagem(ns), nos indivíduos com mais de uma estadia/viagem a zona endémica de malária (Primeira estadia/viagem: n=151; Última estadia/viagem: n=166).	69
Gráfico 14 – Intervalo de tempo entre o regresso de zona endémica e a participação no estudo, nos indivíduos com mais de uma estadia/viagem a zona endémica de malária (Primeira estadia/viagem: n=178; Última estadia/viagem: n=176).	70
Gráfico 15 – Percentagem de respondentes com ou sem história de malária, de acordo com o número de estadias/viagens (n=284)	70
Gráfico 16 – Distribuição dos participantes no estudo de acordo com o número de episódios de malária e o número de estadias/viagens a zona endémica de malária (n=155).	71
Gráfico 17 – Resultado do ensaio serológico utilizando o teste comercial ELISA anti- <i>Plasmodium</i> spp., na totalidade das amostras (n=321).	72
Gráfico 18 – Determinação da concentração de extrato proteico total a utilizar nos ensaios para determinação da reactividade serológica específica de <i>P. falciparum</i> .	79
Gráfico 19 – Determinação da diluição de anticorpo primário a utilizar nos ensaios para determinação da reactividade serológica específica de <i>P. falciparum</i> .	79
Gráfico 20 – Resultado do ensaio serológico para cálculo da sensibilidade e especificidade da técnica de ELISA para <i>P. falciparum</i> , para determinação do <i>cut-off</i> e respectivo factor de ponderação de SD.	81
Gráfico 21 – Resultado do ensaio serológico para determinação da reactividade a IgG total anti- <i>P. falciparum</i> , nas amostras serologicamente reactivas pelo teste comercial ELISA anti- <i>Plasmodium</i> spp. (n=76).	82
Gráfico 22 – Distribuição de tipos de imunoglobulinas detectadas, de acordo com o ano da última estadia em zona endémica de malária.	82
Gráfico 23 – Resultado do ensaio serológico para determinação da reactividade a IgM anti- <i>P. falciparum</i> , nas amostras serologicamente reactivas pelo teste comercial ELISA anti- <i>Plasmodium</i> spp. (n=76).	84
Gráfico 24 – Distribuição de tipos de imunoglobulinas detectadas, de acordo com o ano da última estadia em zona endémica de malária.	85

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Casos de malária importada na Europa.	6
Tabela 2 – Números de casos notificados de Malária Importada em Portugal.	8
Tabela 3 – Níveis de endemicidade para a malária.	12
Tabela 4 – Critérios de definição da malária grave.	23
Tabela 5 – Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> utilizados.	58
Tabela 6 – Condições da mistura de reacção.	59
Tabela 7 – Condições de amplificação de DNA de <i>Plasmodium</i> spp.	59
Tabela 8 – Resultado do ensaio serológico utilizando o teste comercial ELISA anti- <i>Plasmodium</i> spp., na totalidade das amostras, relacionado com as respostas sobre história de episódios de malária (n=319).	73
Tabela 9 – Distribuição dos participantes no estudo, de acordo com o resultado serológico no teste comercial ELISA para <i>Plasmodium</i> spp.	76
Tabela 10 – Distribuição percentual dos indivíduos com serologia positiva ou negativa para IgM anti- <i>P.falciparum</i> , de acordo com os resultados de PCR.	85
Tabela 11 – Percentagem de indivíduos com infecção actual e infecção ocorrida no passado que apresenta cada tipo de proteína detectada.	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCI – inibição celular mediada por anticorpos

AMA – antigénio membranar apical

CD – agregado de diferenciação

CSP – proteína do circunsporozoíto

DNA – ácido desoxiribonucleico

DO – densidade óptica

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*

GPI – glicofosfatidilinositol

HRP – peroxidase de rábano

IFN – interferão

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

LLPC – células plasmáticas de vida longa

MBC – linfócitos B de memória

MHC – complexo major de histocompatibilidade

MSP – proteína de superfície do merozoíto

NK – linfócitos *natural killer*

NKT – linfócitos T *natural killer*

NO – óxido nítrico

NOI – espécies de azoto reactivo

PAMPS – padrão molecular associado ao patogéneo

PBS – tampão fosfato salino

*Pf*EMP1 – proteína membranar 1 de *Plasmodium falciparum* de ligação ao eritrócito

ROI – espécies reactivas de oxigénio

SLPC – células plasmáticas de vida curta

TA – temperatura ambiente

TGF – factor de transformação de crescimento

Th – linfócito T auxiliares

TNF – factor de necrose tumoral

Treg – linfócitos T reguladores

Resumo

A malária é uma doença infecciosa causada por um protozoário do género *Plasmodium*. A sua transmissão ao homem é efectuada sobretudo pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*, podendo ser também transmitida por via transfusional e congénita.

Tendo em conta as zonas endémicas de malária, 3,2 mil milhões de pessoas estão em risco de infecção, sendo a África Subsariana a região mais afectada. No entanto, com o aumento das viagens internacionais, nomeadamente para países tropicais, aumenta o risco de importação de malária para zonas não endémicas, pelo que esta doença deve continuar a ser vigiada cuidadosamente.

O desenvolvimento de imunidade protectora é um processo complexo e moroso, sendo necessárias repetidas exposições ao parasita. Uma vez adquirida, essa imunidade pode ser perdida se o indivíduo permanecer durante algum tempo fora de zona endémica de malária. No entanto, não é claro o período de persistência dos anticorpos no sangue, quando o sistema imune do indivíduo deixa de ser estimulado pelo contacto com o parasita.

Em estudos anteriores, foram verificados anticorpos anti-*Plasmodium* spp. em indivíduos cujas estadias em zona endémica de malária ocorreram 10 ou mais anos antes da sua participação no estudo.

Assim, o objectivo geral deste trabalho é investigar a natureza biológica das imunoglobulinas (subclasses e tempo de persistência na circulação sanguínea) e identificar as proteínas parasitárias responsáveis pela sua estimulação, em indivíduos com estadia prévia em zona endémica.

De acordo com o resultado serológico por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) distinguiram-se duas populações: com (n=76) e sem (n=242) reactividade serológica para *Plasmodium* spp.

Os resultados serológicos obtidos foram relacionados com as características socio-demográficas, história de malária e número de estadias/viagens a zona endémica, não se tendo encontrado diferenças estatisticamente significativas.

Nos indivíduos com resultado serológico positivo para *Plasmodium* spp. (n=76) procedeu-se à caracterização das subclasses de imunoglobulinas, IgM (n=11) e IgG (n=51) anti-*P. falciparum*.

Com base nos resultados de PCR, realizados para identificar infecções em indivíduos com teste serológico positivo para *Plasmodium* spp. (n=76), dois grupos surgiram: i) grupo com infecção actual (n=8) e ii) grupo com infecção ocorrida no passado (n=68).

As amostras com reactividade serológica para anticorpos anti-*P. falciparum* foram analisadas por *Western Blot*, a fim de se identificarem os antígenos responsáveis pela reactividade serológica dos anticorpos. As proteínas identificadas encontram-se aproximadamente entre o peso molecular de 30 – 60 e 70 – 100 kDa.

A análise dos perfis proteicos demonstrou maior reactividade no grupo de infecção actual do que no grupo de infecção ocorrida no passado. Não obstante, o grupo de participantes com infecção actual apresenta um perfil proteico semelhante entre si,

enquanto que no grupo de infecção ocorrida no passado este perfil é heterogéneo entre os indivíduos.

Este trabalho poderá ser o ponto de partida para estudos futuros que visem compreender a longevidade dos anticorpos anti-*Plasmodium* spp., o seu mecanismo de imunopatogénese da resposta imune humoral e/ou a identificação de proteínas como novos alvos para vacinas contra a malária.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium falciparum*, anticorpos anti-*Plasmodium* spp., viajantes, ELISA, *Western Blot*.

Abstract

Malaria is an infectious disease caused by a protozoa of the genus *Plasmodium*. Its transmission to humans is mainly due to the bite of the female *Anopheles* mosquito, although it can also be transmitted by blood transfusion and congenital transmission.

In the totality of regions where malaria is endemic, there are 3.2 billion people at risk of contracting malaria, being the sub-Saharan Africa the most affected region. However, with the increase of international travelling, in particular to tropical countries, there is an ease of malaria importation from non-endemic areas, making it important to maintain this disease cautiously monitored.

The development of protective immunity is a complex and time-consuming process, requiring repeated exposure to the parasite.

Acquired immunity can be lost if the individual remains some time away from an endemic area of malaria. However, the time of antibody persistence in the subjects' bloodstream is not clear, especially when the individual is no longer stimulated by repeated contact with the parasite.

In previous studies, *Plasmodium* spp. antibodies were found to be present in the blood of subjects who had stayed in an endemic malaria zone and had returned for more than 10 years. Thus, the general objective of this work was to investigate the biological nature of immunoglobulins (subclass and persistence time in the bloodstream) and identify parasitic proteins responsible for stimulation of these immunoglobulins in patients who have had previous stays in an endemic area.

Through enzyme immunoassays (ELISA) two populations were distinguished: with (n=76) and without (n=242) serological reactivity to *Plasmodium* spp..

The participants were studied regarding to their socio-demographic characteristics, malaria history, number of stays/travel to an endemic area of malaria and cross matched with their serological results. No statistically significant difference was found.

P. falciparum immunoglobulins subclasses in individuals with a positive *Plasmodium* spp. serological result (n=76) were characterized regarding the antibodies IgM (n=11) and IgG (n= 51).

Based on PCR results, done to identify infection at the time of the study in individuals with a positive *Plasmodium* spp. serological result (n=76), two groups emerged: i) group with current infection (n=8) and ii) group with a past infection (n=68).

Anti-*P. falciparum* serologically positive samples were analyzed by Western Blot in order to identify the antigens responsible for antibody reactivity. The spectral analysis showed a higher reactivity for the group with a current infection. In the group of participants with past infection a diverse protein profile was obtained, whereas in the group with current infection the identified proteins are equally distributed among individuals. Overall, the molecular weight obtained range from 30 – 60 and 70 – 100 kDa.

This study can be the starting point for further studies aiming to understand the longevity of anti-*Plasmodium* spp. antibodies, the immunopathogenesis mechanism of

the humoral immune response to malaria infection and/or the identification of different proteins as a new target for a malaria vaccine.

Keywords: Malaria, *Plasmodium falciparum*, anti-*Plasmodium* spp. antibodies, travelers, ELISA, Western Blot.

1. Introdução

1. Introdução

1. Introdução

A malária é uma doença parasitária, causada por um protozoário do género *Plasmodium* sp., com cinco espécies infectantes para o Homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi* (White *et al.*, 2013). *Plasmodium* sp. é geralmente transmitido de forma mecânica, necessitando, por isso, de um vector: o mosquito *Anopheles* sp. (Cox, 2010). Este, quando infectado com o parasita, transmite a infecção ao hospedeiro vertebrado no momento da sua refeição sanguínea (White, Cook and Zumla 2009).

A distribuição da malária concentra-se na faixa do Equador entre os Trópicos de Câncer e de Capricórnio correspondendo, portanto, à zona da América do Sul, África (sobretudo na África Subsaariana), sul e sudeste Asiático e algumas zonas da Oceania (WHO, 2012, White, Cook and Zumla 2009).

1.1. Aspectos Históricos

A malária é uma doença antiga, tendo sido referenciada em documentos chineses datados de 2700 a.C., em ardósias na Mesopotâmia de 2000 a.C, em papiros egípcios de 1570 a.C. e em textos hindus do século VI a.C. Gregos como Homero (em 850 a.C.), Empédocles de Agrigento (550 a.C.) e Hipócrates (em torno de 400 anos a.C.) conheciam a malária como um estado de saúde pobre, caracterizada por febre e esplenomegalia, que ocorria em pessoas que residiam em zonas pantanosas. Este conceito persistiu por mais de 2 500 anos e deu origem ao nome da doença, com origem do italiano “*mal’ aria*”, que significa “mau ar”, devido à crença de que esta se transmitia pelo ar (Cox, 210).

Muitos foram os investigadores que deram o seu contributo para o que hoje se sabe ser a malária, alguns cujas descobertas foram fundamentais para o nosso conhecimento sobre a doença como Charles Laveran, Camillo Golgi, Albert King, Patrick Manson, Giovanni Grassi e Ronald Ross (Cox, 210).

1. Introdução

1.2. Distribuição e Epidemiologia

A malária é uma doença endêmica em 97 países e territórios, onde se estima que 3,2 mil milhões de pessoas estejam em risco de transmissão. Em 2013, ocorreram cerca de 198 milhões de casos de malária a nível global, levando a cerca de 584 000 mortes (WHO, *report* 2014).

A presença de malária depende da existência de condições favoráveis à existência do parasita e do vector, sendo dependente de factores climáticos como a temperatura, a humidade relativa do ar e a ocorrência de chuva. Assim, é nas regiões intertropicais que a malária pode ser adquirida, ocorrendo as maiores taxas de transmissão na África Subsariana e na Melanésia, nomeadamente nas Ilhas Solomão e Papua Nova Guiné (Figura 1) (CDC, 2010, Pasvol, 2005).

A África Subsariana, Papua Nova Guiné e Haiti são as regiões onde *P. falciparum* predomina, enquanto *P. vivax* é mais prevalente em regiões menos quentes, como na América Central e do Sul, no Norte de África, no Médio Oriente e no Subcontinente Indiano, devido à sua capacidade para se desenvolver no vector a temperaturas mais baixas. Nestas regiões menos quentes, a transmissão é menos frequente e de carácter sazonal (CDC, 2010, Pasvol, 2005, White, Cook and Zumla 2009). No entanto, a prevalência de ambas as espécies é igual em algumas partes da América do Sul, do Sudeste Asiático e da Oceania. *P. ovale* pode ser encontrado na zona oeste de África, enquanto *P. malariae* está distribuído por todo o continente Africano, sendo raro fora deste (White, Cook and Zumla 2009).

1. Introdução



Figura 1 - Distribuição mundial da malária. Adaptado de WHO, 2014b.

A malária foi endémica na América do Norte, no Norte Asiático e na Europa, mas foi eliminada destas regiões, na maior parte das ilhas das Caraíbas e de algumas zonas da América do Sul e Central no século XX (White, Cook and Zumla 2009, WHO, 2008, CDC, 2012a). A possibilidade de o parasita ressurgir nestas zonas é reduzida. No entanto, este deve ser um assunto tratado com precaução devido à importação da malária para países não endémicos, pelos viajantes internacionais.

Na região europeia da Organização Mundial de Saúde (OMS), a malária existe ainda no Tajiquistão, Turquia e Grécia, tendo sido reportados apenas 44 casos de malária autóctone em 2013, nos três países (WHO, *report* 2014).

1.2.1. Viagens Internacionais e Malária Importada

A malária importada continua a ser motivo de precaução para os países desenvolvidos. Devido à procura de melhores condições económicas, as populações procuram economias mais sólidas, aumentando a probabilidade de importação dos casos de malária.

O número de viajantes internacionais tem vindo a aumentar, tendo passado de 25 milhões em 1950 para 278 milhões em 1980, 528 milhões em 1995 e 1 087 milhões em

1. Introdução

2013, estimando-se cerca de 1,8 mil milhões de viajantes internacionais em 2030 (UNWTO, 2014).

A maioria das viagens é efectuada por transporte aéreo (Gráfico 1), facilitando a importação do vector infectado transportado, portanto, nos aviões ou nas bagagens (*bagage malaria*) e com possibilidade de infectar pessoas no país não endémico. Assim, é nas zonas adjacentes aos aeroportos que o risco de exposição no país não endémico é mais elevado, podendo ocorrer infecção nos indivíduos que aí residem (*airport malaria*) (UNWTO, 2014, Askling *et al.*, 2012).

As viagens internacionais realizadas em 2013 foram maioritariamente por motivos de lazer (52%), para visitar amigos e familiares (VFRs, *visiting friends and relatives*), por motivos de saúde, religião ou outros (27%) e por razões profissionais (14%) (Gráfico 1) (UNWTO, 2014).

Os VFRs são o grupo de viajantes internacionais com maior risco de aquisição de malária devido ao destino das suas viagens, que são, muitas vezes, zonas rurais endémicas de malária; ao tipo de acomodação, preferindo as casas de pessoas locais em vez dos itinerários turísticos; ao seu comportamento e aos seus padrões culturais, que contribuem para a não aderência à quimioprofilaxia e outras medidas de prevenção da infecção; e devido à crença de possuírem um longo estado de imunidade contra a doença (Pavli e Maltezos, 2010).

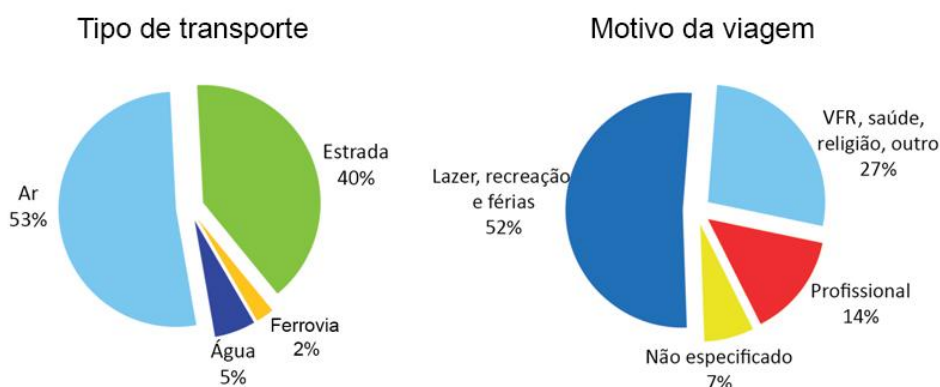


Gráfico 1 - Viagens internacionais por meio de transporte e por motivo de viagem. Adaptado de UNWTO, 2014.

1. Introdução

Estima-se que 25-30 milhões de indivíduos viajem anualmente da Europa para regiões endémicas de malária (Askling *et al.*, 2012).

Segundo a OMS, a Europa foi o destino que mais viajantes internacionais recebeu em 2013, sobretudo o sul europeu e costa mediterrânica (201 359 000), onde a Organização Mundial de Turismo (OMT) inclui Portugal, Grécia, Itália, Espanha e Turquia, entre outros (UNWTO, 2014).

A malária importada para a Europa deve-se sobretudo a viajantes que regressam de zona endémica, migrantes que vivem em zona endémica e regressam ao seu país de origem (zona não endémica) para visitar amigos e familiares e a migrantes que vivem na Europa e regressam aos seus países de origem (zonas endémicas) para visitar amigos e familiares (Askling *et al.*, 2012).

Nos últimos anos registou-se um aumento dos casos de malária importada para a Europa de 14% para 83%, devido à população migrante. Em 2013 houve 5 969 casos de malária importada reportados à OMS, um número subestimado devido à subnotificação dos casos (Askling *et al.*, 2012, WHO-CISID, 2014).

Os países que contabilizam mais casos de malária importada na Europa encontram-se apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Casos de malária importada na Europa. Adaptado de WHO-CISID, 2014 e de DGS, 2014b.

Países	Ano										
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Alemanha	819	708	628	566	540	547	523	617	562	547	637
Bélgica	235	212	259	195	193	181	181	213	250	218	
Espanha	356	351	307	377	319	295	362	346	404	484	500
França	6392	6107	5300	5267	4403	2239	2218	2438		1856	2171
Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	1722	1660	1754	1758	1548	1370	1495	1761	1677	1378	1501
Holanda	356	307	299	253	214	226	241		247	200	153
Itália	672	661	637	630	573						
Portugal	50	53	47	48	43	41	44	54*	64*	64	117
Suécia	99	102	112	93	88	90	81	115	95	85	119
Suíça	230	229	204	189	188	216		228	203	147	157
Turquia	40	50	48	45	45	49	46	78	132	157	
Ucrânia	340		119						101		

*informação do relatório de Doenças de Declaração Obrigatória 2009-2012 (DGS, 2014b).

1. Introdução

De salientar que a Alemanha reportou um caso de malária importada por *P. knowlesi* em 2013, numa mulher alemã, de 55 anos, com estadia na Tailândia (Orth *et al.*, 2013) e em 2014 foi reportado um caso de malária grave por *P. knowlesi*, também na Alemanha, num homem alemão de 73 anos de idade, que viajou para Myanmar e Tailândia (Seilmaier *et al.*, 2014).

1.2.2. Malária em Portugal

Em Portugal, a malária faz parte do Programa de Vigilância de Doenças Transmissíveis de Declaração Obrigatória, segundo o Despacho 5681-A-2014 de 29/Abril (DGS, 2014a).

A malária (também conhecida em Portugal por sezonismo) permaneceu endémica em Portugal até 1950, estando associada à forte actividade de cultivo de arroz. As bacias hidrográficas do Sado, do Tejo, do Mondego e, em menor extensão do Douro e Guadiana, constituíam as principais áreas de foco da doença. Com a introdução do inseticida diclorodifeniltricloroetano (DDT) e uma vigilância próxima dos casos de malária com aplicação de tratamento eficaz, em 1958 a transmissão da malária foi interrompida em quase todo o território da então denominada Metrópole Portuguesa. Seguiu-se uma fase de vigilância dos casos de malária importada, com acompanhamento médico dos grupos de trabalhado sazonal com sintomatologia e dos imigrantes, sobretudo militares combatentes nas então colónias portuguesas (Angola, Moçambique e Guiné-Bissau) (Bruce-Cwatt, 1977).

Entre 1961 e 1972 aproximadamente 100 000 militares serviram em África e 10 000 a 20 000 por ano regressavam a casa. Este influxo de pessoas com estadias prolongadas em zona endémica foi considerado um problema de grande importância, devido à elevada incidência de doenças tropicais observadas nesses indivíduos. No ano de 1972, o número de casos reportados de malária em portugueses com estadia nas colónias portuguesas nesse ano foi de 4 400, tendo sido registados 584 casos de malária importada em Portugal (Bruce-Cwatt, 1977).

1. Introdução

Em 1973 a OMS declarou oficialmente o estado de erradicação da malária na referida Metrópole Portuguesa, tendo nesse mesmo ano, sido registados 594 casos de malária importada, 903 em 1974 e 971 em 1975. Todos os casos foram considerados importados, com excepção de um caso em Beja, neste último ano, cuja etiologia ficou por esclarecer (Bruce-Cwatt, 1977).

Em Portugal, têm sido reportados 40 a 50 casos de malária importada entre 2003 e 2012, tendo aumentado para 117 casos notificados em 2013 (Tabela 1) (WHO-CISID, 2014). Este aumento verificado pode dever-se ao aumento das notificações de malária ou ao aumento do número de viagens internacionais (UNWTO, 2014) que, possivelmente devido à conjuntura económica portuguesa, levou à expatriação de portugueses para países da África Subsariana, com economias emergentes como Angola e Moçambique.

Dados dos registos consulares estimam que, em 2012, 113 194 portugueses viviam em Angola e 20 415 em Moçambique, representando um aumento de 56 e 24%, respectivamente, desde 2008. A maior estadia durante o ano em zona endémica, o uso de infra-estruturas locais, o maior envolvimento com as comunidades locais, as frequentes viagens de e para Portugal e a baixa adesão à quimioprofilaxia podem justificar a importação dos casos de malária (Fonseca *et al.*, 2014).

Aproximadamente 40 a 50 casos de malária importada são notificados todos os anos (Tabela 2), sendo um número subestimado devido à não notificação dos casos, apesar da sua obrigatoriedade (Fonseca *et al.*, 2014, DGS, 2014b).

Tabela 2 - Números de casos notificados de Malária Importada em Portugal. Adaptado de DGS, 2014b.

ARS e NUTS III \ Ano	2009	2010	2011	2012	Total
Norte	17	17	24	16	74
Centro	2	6	7	4	19
LVTejo	16	22	15	24	77
Alentejo	1	0	0	0	1
Algarve	0	1	1	2	4
R.A. Açores	0	0	2	0	2
R.A. Madeira	5	5	8	9	27
Estrangeiro	0	3	7	2	12
Desconhecido	0	0	0	1	1
Total	41	54	64	58	217

1. Introdução

O Gráfico 2 mostra a situação portuguesa desde 2003. Embora contabilize apenas as hospitalizações, reflecte a tendência dos últimos anos, bem como a subnotificação dos casos (Fonseca *et al.*, 2014).

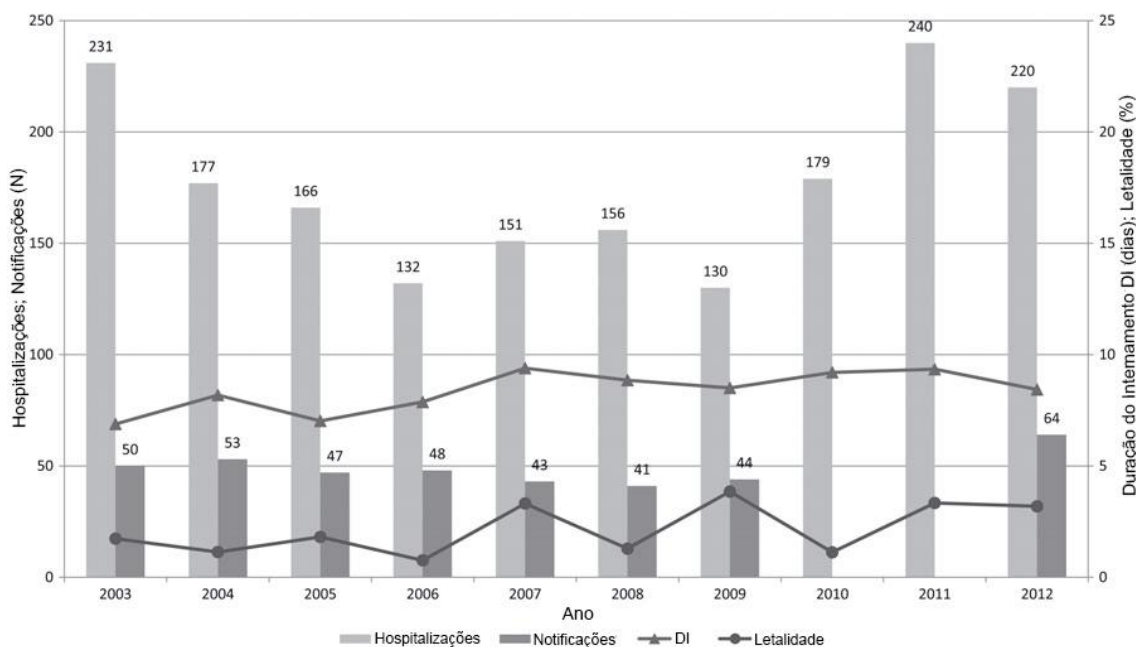


Gráfico 2 - Número de hospitalizações, duração do internamento e letalidade devido a malária importada (casos notificados). Adaptado de Fonseca *et al.*, 2014

A legislação portuguesa também preconiza os critérios de elegibilidade dos dadores de sangue, constantes no Decreto-Lei nº267/2007 de 24 de Julho (Ministério da Saúde, 2007). Relativamente à malária, são aceites para a dádiva de sangue os indivíduos nas seguintes condições:

1. Indivíduos que viveram numa zona com paludismo durante os cinco primeiros anos de vida: Três anos após o regresso da última visita a uma zona endémica, desde que assintomático; o período de suspensão pode ser reduzido para quatro meses se o teste imunológico ou do genoma molecular a cada dádiva for negativo.
2. Indivíduos com antecedentes de paludismo: Suspensão da dádiva de sangue durante três anos após cessação do tratamento e ausência de sintomas. Aceite posteriormente apenas se o teste imunológico ou do genoma molecular for negativo.

1. Introdução

3. Visitantes assintomáticos de zonas endémica: suspensão durante 12 meses depois de abandonar a zona endémica, a menos que o teste imunológico ou do genoma molecular seja negativo.
4. Indivíduos com antecedentes de afecção febril não diagnosticada durante uma visita a uma zona endémica ou seis meses após essa visita: Três anos depois do desaparecimento dos sintomas; o período de suspensão pode ser reduzido para quatro meses se o teste imunológico ou do genoma molecular for negativo.

1.3. Transmissão da Malária

A transmissão da malária faz-se entre o entardecer e o amanhecer pela fêmea do mosquito *Anopheles* sp. A infecção por *Plasmodium* sp. só foi observada em cerca de 70 das 450 espécies de *Anopheles* sp. existentes e apenas 27 espécies ou complexos de espécies são associados a níveis elevados de transmissão da malária, variando de malária estável a não estável (ver definição mais abaixo nesta secção). São sobretudo mosquitos do complexo *A. gambiae* e *A. funestus* (ambos vectores na África Subariana) que apresentam elevados índices antropofílicos¹ (75-80%), enquanto que *A. pharoensis*, por exemplo, possui um índice antropofílico de apenas 5%, preferindo alimentar-se de outros animais (Wensdorfer, 2012).

A temperatura é também um importante factor ambiental que interfere na existência de criadouros, no desenvolvimento larval, na taxa de sobrevivência do mosquito adulto e na duração dos seus ciclos gonotrófico e esporogónico (Texier *et al.*, 2013).

A humidade relativa do ar regula a manutenção dos criadouros, a taxa de sobrevivência e a longevidade do vector. Assim, as condições óptimas para a transmissão de *Plasmodium* sp. são temperaturas entre 20°C e 30°C, com elevadas taxas de humidade relativa. As chuvas aumentam a humidade relativa do ar e geram mais criadouros. No entanto, quando em excesso ou acompanhadas de ventos fortes podem arrastar os criadouros ou transportar os mosquitos adultos para novas áreas.

¹ Medida da eficiência do vector. Quanto maior o índice antropofílico, maior a capacidade de o vector transmitir a infecção ao homem.

1. Introdução

A vegetação natural providencia um ambiente sustentável para algumas espécies de *Anopheles* sp. A fauna autóctone fornece alimento aos mosquitos, actuando, em contrapartida, na predação aos estadios larvares nos criadouros, reduzindo a população de vectores (Wensdorfer, 2012).

As alterações ao meio ambiente natural provocadas pelo homem vieram desestabilizar o desenvolvimento dos vectores. Por um lado, a construção de barragens e outros locais de recolha e/ou de armazenamento de água, estradas e outras vias, e a existência de estaleiros de construção civil vieram favorecer a existência de criadouros. Por outro lado, o desenvolvimento da agricultura conduziu à redução dos criadouros e locais de repouso, devido à constante manutenção das terras para a prática agrícola. Também o desenvolvimento dos centros urbanos provocou alterações nas populações de vectores, contribuindo para a diminuição 1) do rácio entre o hospedeiro humano e o vector, 2) da distribuição do vector na região, 3) da existência de água não poluída necessária à existência de criadouros, 4) da disponibilidade de locais naturais de repouso, 5) bem como a diminuição de hospedeiros reservatórios, uma vez que no meio urbano existe maior facilidade em adquirir antimaláricos do que em zona rural (Wensdorfer, 2012, Texier *et al.*, 2013).

Apesar de a transmissão da malária poder ser constante durante todo o ano, a malária é normalmente uma doença sazonal, que ocorre na estação das chuvas e, portanto, no período de aumento da população de mosquitos (White, Cook and Zumla 2009).

A nomenclatura mais commumente utilizada para se descrever o risco de transmissão de malária em determinada área geográfica, denomina-se por taxa de inoculação entomológica (EIR do inglês *entomological inoculation rate*), ou seja, o número de inoculações infecciosas que um indivíduo recebe por dia, e categoriza-se tendo por base taxas de prevalência de esplenomegalia e de parasitémia (Tabela 3) (Hay *et al.*, 2008, White, Cook and Zumla 2009).

1. Introdução

Tabela 3 - Níveis de endemicidade para a malária. Seixas and Atouguia, 2006.

Classificação	Prevalência de esplenomegalia (%)	Prevalência da parasitemia (%)	Padrão Clínico
Holoendémica	> 75	> 75	Anemia grave e malária cerebral em crianças
Hiperendémica	51 - 75	51 - 75	Malária cerebral e anemia grave em crianças
Mesoendémica	11 - 50	11 - 50	Malária cerebral e anemia grave em crianças
Hipoendémica	0 - 10	0 - 10	Malária grave e cerebral em todas as faixas etárias

Existem outras definições que se referem aos diferentes riscos de transmissão de malária, como os conceitos de malária estável e malária instável (Figura 2) (Macdonald, 1952).

A transmissão da malária estável define-se por uma elevada taxa de inoculação (EIR)>10 por ano. São zonas em que os indivíduos não experienciam malária grave (a não ser que saiam dessas áreas por alguns anos), devido à contínua exposição ao parasita e, conseqüentemente contínua estimulação do sistema imunológico. Também o seu estado de premunição (ver definição na secção 1.7) evita graves conseqüências para a saúde do indivíduo. Assim, estas zonas de malária estável correspondem a zonas hiperendémicas e holoendémicas e a maioria das infecções nestes indivíduos são assintomáticas (WHO, 2010, White, Cook and Zumla 2009).

As zonas de transmissão de malária instável são áreas cuja transmissão de malária é baixa, irregular, sazonal ou por focos, o estado de premunição não é alcançado e as infecções sintomáticas são comuns em indivíduos de qualquer idade, podendo progredir para malária grave, se não tratada de forma eficaz e atempadamente. São zonas com EIR <5 por ano ou até de EIR<1 por ano (WHO, 2010, White, Cook and Zumla 2009).

1. Introdução

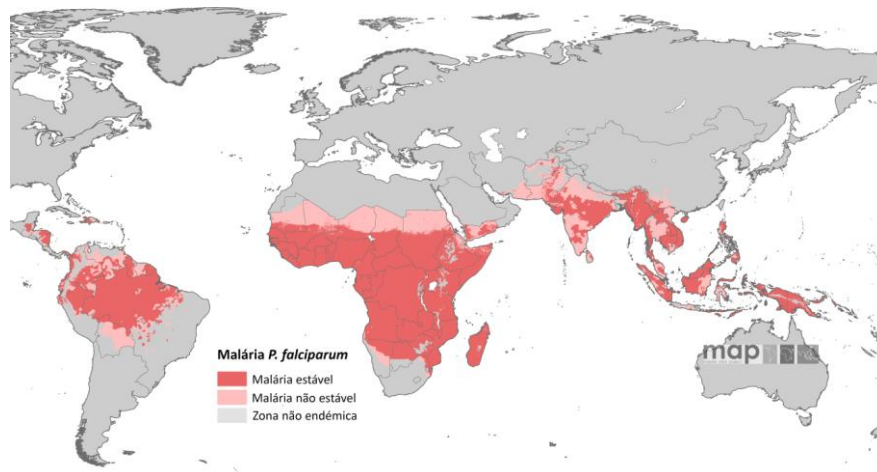


Figura 2 – Mapa representativo de zonas com malária estável e instável. Adaptado de Snow *et al.*, 2008.

A transmissão da malária é essencialmente mecânica, através do mosquito vector. No entanto, a malária pode também ser transmitida por outras vias como transfusões de sangue, transplante de órgãos ou através da partilha de seringas (Cook and Zumla, 2009).

A transmissão de malária através da transfusão de sangue a partir de indivíduos assintomáticos constitui um problema em África, onde a pesquisa de *Plasmodium* sp. em dadores de sangue não é efectuada (Askling *et al.*, 2012, Owuu-Ofori *et al.*, 2010). A OMS recomenda que todo o processo da dádiva de sangue (colheita, avaliação laboratorial, processamento dos componentes sanguíneos, armazenamento e distribuição) seja regulado por políticas nacionais que assegurem a qualidade e a segurança do sangue e dos seus componentes (WHO, 2014a).

Em 2012, 70% dos países possuíam legislação nacional referente à segurança do sangue, comparativamente a 60% em 2004. A maioria dos países com implementação dessa legislação são países de alta renda (81%), seguidos dos países de média renda (60%) enquanto que são poucos os países de baixa renda que garantem a qualidade e a segurança das suas dádivas (44%) (WHO, 2014a).

1. Introdução

1.3.1. Ciclo de vida de *Plasmodium* sp. no vector *Anopheles* sp.

O ciclo sexuado do *Plasmodium* sp. decorre no mosquito vector (Figura 3), sendo este, portanto, o seu hospedeiro definitivo. Apenas as fêmeas do mosquito são hematófagas, o que quer dizer que apenas as fêmeas infectadas são transmissoras de malária (White, Cook and Zumla 2009).

Este processo de desenvolvimento do parasita no mosquito vector designa-se por esporogonia e tem uma duração de 8 a 35 dias, dependendo de condições ambientais e das espécies do mosquito e do parasita (White, Cook and Zumla 2009).

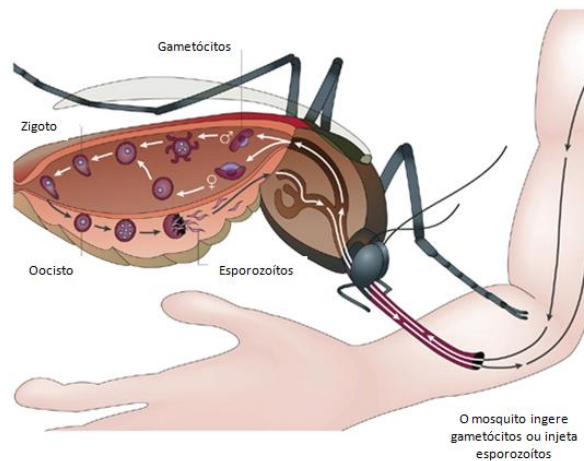


Figura 3 – Ciclo de vida de *Plasmodium* sp. no mosquito vector. Adaptado de Su *et al.*, 2007.

1.4. O Parasita

1.4.1. Biologia do Parasita

O Género *Plasmodium* sp. pertence ao Filo Apicomplexa e é composto por três elementos genéticos: o genoma nuclear, o genoma mitocondrial e um genoma circular extracromossomal de DNA situado numa região apical – o apicomplasto, que resulta da evolução dos cloroplastos das células eucariotas (nomeadamente, das plantas e das algas), sendo por isso, seu homólogo (White, Cook and Zula 2009).

Dos parasitas responsáveis pela malária humana, *Plasmodium falciparum* é o mais estudado, provavelmente devido à sua capacidade para causar malária grave.

1. Introdução

Em 1996 foi possível conhecer a sequência genómica de *Plasmodium falciparum*, permitindo novas intervenções na investigação da malária. Gardner e colaboradores estudaram em detalhe o genoma e o proteoma de *Plasmodium falciparum* estirpe 3D7, bem como os seus processos de evolução, metabolismo, e de escape ao sistema imunológico do hospedeiro, entre outros (Gardner *et al.*, 2002). Este parasita possui um genoma nuclear de 22.8 Mb (megabases), correspondente a 5268 genes distribuídos ao longo de 14 cromossomas e com 53.9% de intrões. O seu genoma codifica cerca de 5268 proteínas, das quais 3208 (60.9%) se desconhece as suas funções e não apresentam similaridade com outros organismos para que as mesmas se possam extrapolar (Gardner *et al.*, 2002).

De acordo com os genomas dos parasitas intracelulares, *Plasmodium* sp. possui poucos genes que codifiquem para enzimas e transportadores, mas uma grande quantidade de genes estão focalizados para as interações com o hospedeiro: pelo menos 1,3% dos genes estão envolvidos no processo de adesão ou invasão das células do hospedeiro e 3,9% (208 genes) são responsáveis pela evasão ao sistema imunológico do mesmo. O genoma do apicomplasto codifica apenas 30 proteínas, sendo suplementado por proteínas produzidas por genes do núcleo (10,4 %) e transportadas para a região apical (Gardner *et al.*, 2002).

1.4.2. Ciclo de Vida e Infecção

O ciclo de vida de *Plasmodium* sp. pode ser dividido em três fases: o desenvolvimento pré-eritrocitário, o desenvolvimento dos estadios assexuados e uma terceira fase de desenvolvimento das formas sexuadas (que ocorre no mosquito vector) (Figura 4) (White, Cook and Zumla 2009).

A infecção inicia-se quando a fêmea infectada do mosquito *Anopheles* faz uma refeição sanguínea no hospedeiro vertebrado (Figura 5). A picada que o mosquito efectua para retirar sangue humano é o ponto de inoculação dos esporozoítos que se encontram nas glândulas salivares do mosquito. Geralmente são inoculados 8 a 15 esporozoítos, embora por vezes possam ser inoculados até 100 esporozoítos. Estes são inoculados na pele ou directamente nos capilares sanguíneos e, ao entrarem na

1. Introdução

circulação sanguínea ou nos vasos linfáticos, iniciam o seu percurso em direcção às células do parênquima hepático. As proteínas SPECT-1 (*sporozoite protein essential for cell traversal*), SPECT-2 e uma fosfolipase capacitam os esporozoítos para atravessar as membranas celulares do hospedeiro e alcançar os vasos sanguíneos ou linfáticos (White, Cook and Zumla 2009, Silvie *et al.*, 2008).

Os esporozoítos entram no fígado pelas células de *Kupffer*, através da interacção entre a proteína CSP (*circumsporozoite protein*), que cobre a superfície dos esporozoítos, com a molécula HSPGs (*heparan sulfate proteoglycans*), localizada nas células hepáticas. Esta migração continua por vários hepatócitos até o parasita se fixar num deles onde inicia a formação de um compartimento especializado, o vacúolo parasitóforo, dentro do qual o parasita se desenvolve e se multiplica em dezenas de merozoítos, formando o merozoítos ou esquizonte hepático. Pensa-se que um grupo de proteases – SERA (*serine repeat antigens*) – medeia o processo de libertação dos merozoítos a partir dos hepatócitos, um processo designado *egress* (Silvie *et al.*, 2008, White, Cook and Zumla 2009). Os merozoítos são então libertados para a corrente sanguínea e inicia-se a fase sintomática da infecção (Silvie *et al.*, 2008).

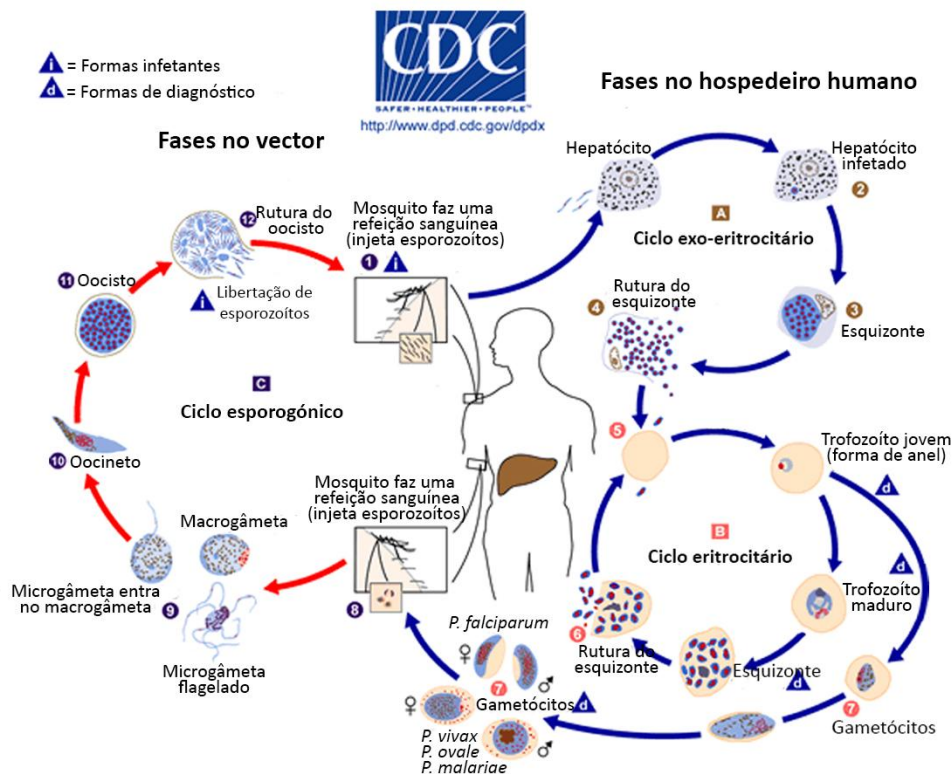


Figura 4 – Ciclo de vida de *Plasmodium* sp. Adaptado de CDC, 2014c.

1. Introdução

Nas espécies *P. vivax* e *P. ovale* nem todos os parasitas intrahepáticos se desenvolvem e são libertados. Alguns permanecem numa forma inerte, como que “adormecidos” (designados por hipnozoítos) e são responsáveis pela reincidência da doença semanas ou meses mais tarde. Esta fase pré-eritrocitária que ocorre no fígado é assintomática. Este processo de reincidência deve ser distinguido de recrudescência. A recrudescência ocorre em consequência de uma infecção por *P. malariae* cujo tratamento foi incompleto. Na recrudescência, o parasita persiste em circulação em níveis de parasitemia que não causam sintomas, elevando a sua parasitemia em determinado momento (White, Cook and Zumla 2009).

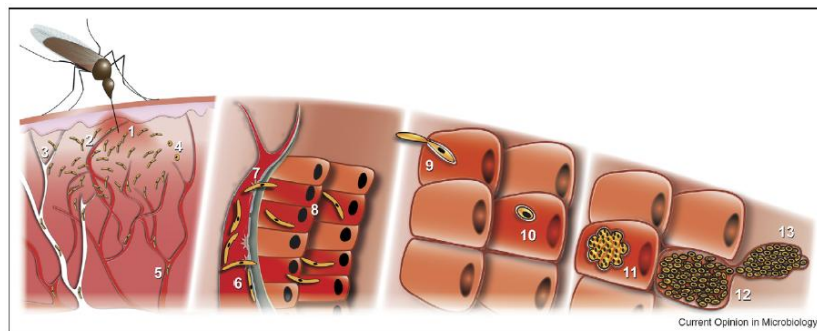


Figura 5 – Ciclo pré-eritrocitário: inoculação dos esporozoítos e estabelecimento da infecção. Silvie *et al.*, 2008.

O merozoíto é formado pelos elementos convencionais das células eucarióticas e por uma região apical onde armazena organelos de secreção (exonemas) dentro de compartimentos designados por micronemas e roptrias (Figura 6) (Cowman *et al.* 2012).

1. Introdução

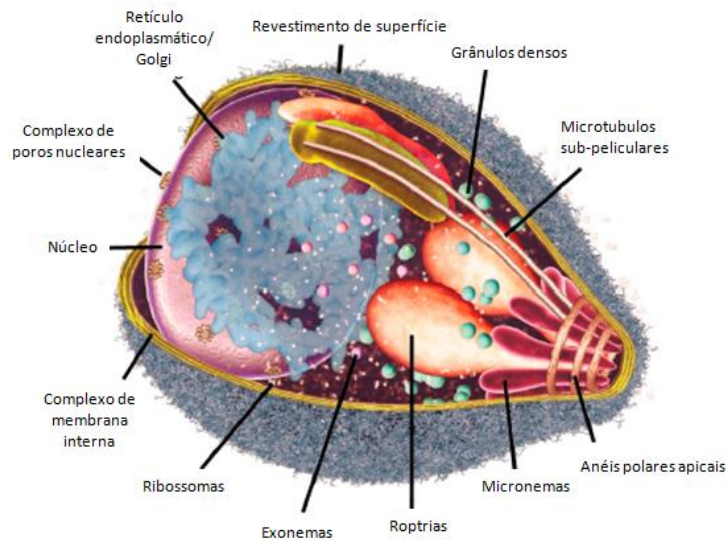


Figura 6 – Composição estrutural dos merozoítos de *Plasmodium* sp. Adaptado de Cowman *et al.*, 2012.

As proteínas segregadas pelo exonema são importantes para o contacto inicial do merozoítio com o eritrócito do hospedeiro e para a sua penetração, sendo a mais importante a MSP-1 (*merozoite surface protein 1*). O primeiro contacto exige muito movimento do merozoítio e a deformação da superfície do eritrócito (Cowman *et al.* 2012).

As fases posteriores são organizadas e coordenadas por moléculas envolvidas directamente no processo invasivo. Destas destacam-se dois grandes grupos: as adesinas (funcionam como ligandos directos a receptores específicos do eritrócito, sendo responsáveis por variações fenotípicas, conferindo, por isso, especificidade de espécie e de estirpe) e as invasinas (actuam no processo de penetração do eritrócito, mas não se ligam necessariamente a receptores celulares) (Cowman *et al.* 2012).

Das adesinas fazem parte as famílias EBL (*erythrocyte binding-like* ou EBA *erythrocyte binding antigen*) e PfRh (*reticulocyte binding-like*). A coordenação entre estas duas famílias permite uma entrada eficiente e mantém a possibilidade de o parasita optar por uma ampla diversidade de vias de invasão (Cowman *et al.* 2012).

A reorientação do merozoítio que consiste na colocação da extremidade apical em contacto com a superfície do eritrócito para que a invasão ocorra é sobretudo da responsabilidade da proteína AMA1 (*apical membrane antigen 1*), uma invasina essencial para a penetração do merozoítio no eritrócito, mas que parece ser dispensável

1. Introdução

ao processo invasivo dos esporozoítos nos hepatócitos, segundo um estudo realizado com *P. berghei* em ratinhos (Giovannini *et al.*, 2011). O complexo de proteínas RON (*ropthry neck protein*) é libertado e introduzido no eritrócito. RON 2 actua como uma âncora na membrana eritrocitária para o estabelecimento de outras proteínas do complexo. A interacção AMA1 – RON2 cria uma ligação irreversível que actua como ponto de tracção para a entrada do merozoíto, com formação de um espaço de proximidade entre as células que permite a comunicação e a passagem de proteínas e lípidos (das roptrias) necessárias à formação da membrana do vacúolo parasitóforo e do próprio vacúolo parasitóforo, onde o merozoíto se vai estabelecer dentro do eritrócito. Esse espaço de proximidade designa-se por *tight junction*. O merozoíto é então impulsionado para dentro do eritrócito por um motor de actina-miosina e à medida que o merozoíto entra no eritrócito e que a *tight junction* alcança a extremidade posterior do merozoíto, dá-se a fusão da membrana do eritrócito e do vacúolo parasitóforo, por um mecanismo ainda desconhecido, finalizando o processo invasivo (Figura 7). O parasita internalizado no eritrócito, então na forma de anel, inicia alterações na sua forma e começa a expor as proteínas parasitárias necessárias ao seu metabolismo e desenvolvimento (Cowman *et al.*, 2012).

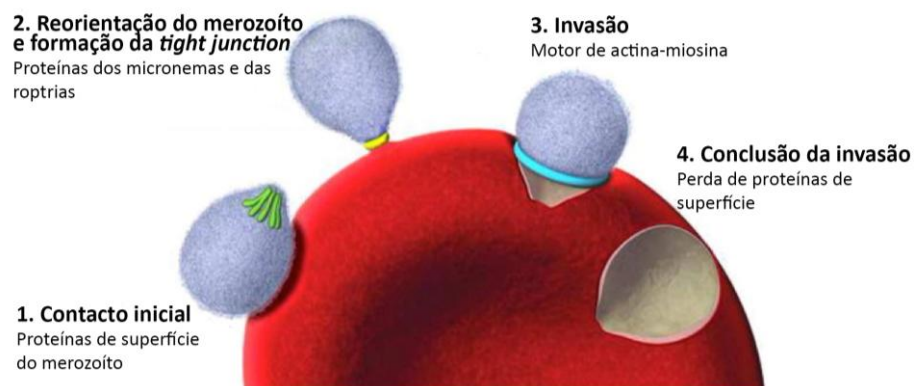


Figura 7 – Etapas do processo de invasão do eritrócito por *Plasmodium* sp.: libertação dos merozoítos, adesão, reorientação e invasão parasitária. Adaptado de Cowman *et al.*, 2012.

Para o seu desenvolvimento, o parasita utiliza o conteúdo do eritrócito, sobretudo hemoglobina. A proteólise da hemoglobina liberta aminoácidos que o parasita utiliza para formação de proteínas necessárias ao seu desenvolvimento. No entanto, o

1. Introdução

grupo heme libertado como consequência da proteólise de hemoglobina oxida-se para a sua forma férrica que é tóxica para o parasita. Assim, para evitar a toxicidade intracelular o parasita forma dímeros do grupo heme libertado, formando um composto inerte cristalino: a hemozoína. Para obter aminoácidos e outros nutrientes e para controlar o ambiente electrolítico no interior do eritrócito, o parasita insere transportadores especializados e outras proteínas na membrana celular do eritrócito que parasita. Às 12h-14h de desenvolvimento intraeritrocitário, *P. falciparum* começa a exhibir uma proteína de alto peso molecular específica desta espécie e que possui grande papel na fisiopatologia da malária: PfEMP1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*) (White, Cook and Zumla 2009). Esta proteína é expressa na superfície do eritrócito infectado e a sua função é aderir ao endotélio vascular (fenómeno designado por citoaderência), permitindo ao parasita permanecer retido no endotélio microvascular, desaparecendo do sistema circulatório e causando obstrução à perfusão dos tecidos. Este mecanismo de evasão à *clearance* pelo baço denomina-se por sequestração e ocorre apenas em *P. falciparum*, sendo um dos seus mecanismos de virulência (White, Cook and Zumla 2009). *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* não efectuam citoaderência, pelo que todos os estadios do desenvolvimento parasitário ocorrem ao longo da circulação sanguínea (White, Cook and Zumla 2009). Outro mecanismo da fisiopatologia de *P. falciparum* e do qual a proteína PfEMP1 é também responsável é a formação de rosetas (Figura 8). Ou seja, é a capacidade de *P. falciparum* aderir e se rodear de eritrócitos não infectados. Além de este processo permitir ao parasita passar despercebido ao sistema imunológico, facilita também o processo de citoaderência e sequestração por diminuir a velocidade do fluxo sanguíneo (White, Cook and Zumla 2009).

A severidade da doença está, então, relacionada com a sua capacidade de multiplicação, com a capacidade de aderir ao endotélio e de formar rosetas, com a distribuição destes processos nos órgãos vitais, com o seu potencial para induzir a produção de citocinas, com a antigenicidade e com a sua resistência aos antimaláricos (White, Cook and Zumla 2009).

1. Introdução

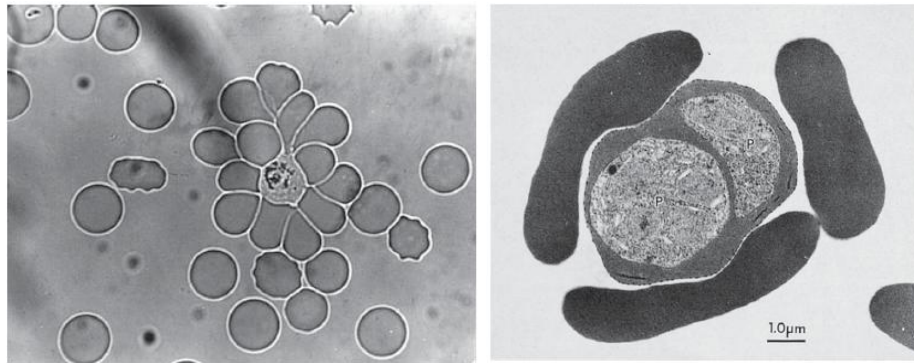


Figura 8 – Rosetas: visualização ao microscópio óptico e ao microscópio electrónico. White, Cook and Zumla 2009.

Aproximadamente 36 horas após invasão do eritrócito (54 horas no caso de *P. malariae*) o parasita entra em múltiplas divisões dentro do eritrócito formando o esquizonte. Quando o parasita matura, ocupa toda a célula e há gasto de hemoglobina, o esquizonte rebenta e os merozoítos (entre 6 a 36) são libertados na corrente sanguínea e procuram re-infectar novos eritrócitos, dando início a um novo ciclo assexuado (White, Cook and Zumla 2009).

A infecção expande logaritmicamente a um ritmo de 10 vezes por ciclo. Cada ciclo assexuado demora aproximadamente 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, 72 horas para *P. malariae* e 24h para *P. knowlesi*. No entanto, não existe uma sincronia perfeita na invasão de novos eritrócitos pelo que, essencialmente no caso de *P. falciparum*, a duração de cada ciclo não é exacta (White, Cook and Zumla 2009).

Após alguns ciclos assexuados, o parasita diferencia-se em formas sexuadas: os gametócitos. Estes, móveis e de vida longa, são as formas infectantes para o vector e, portanto, são as formas que permitem a perpetuação do parasita.

A gametocitogonia demora entre 7 a 10 dias em *P. falciparum*, enquanto que em *P. vivax* demora cerca de 4 horas, iniciando-se assim que o parasita se instala no eritrócito. Quando os gametócitos são ingeridos pelo mosquito vector este fica infectado e *Plasmodium* sp. desenvolve o seu ciclo sexuado no interior do mosquito (White, Cook and Zumla 2009).

1. Introdução

1.5. Aspectos Clínicos da Malária: Sinais e Sintomas

A duração do período de incubação varia de espécie para espécie, sendo de pelo menos 5.5 dias para *P. falciparum*, 8 dias para *P. vivax*, 9 dias para *P. ovale*, 15 dias para *P. malariae* e de cerca de 7 dias para *P. knowlesi* (White, Cook and Zumla 2009).

A malária não complicada define-se pela existência de sintomatologia sem ocorrência de sinais de gravidade ou de evidência clínica ou laboratorial de disfunção orgânica. Essa sintomatologia é inespecífica, assemelhando-se a um síndrome gripal (WHO, 2010). O sinal cardinal da malária é a febre que pode ser precedida por cefaleias, mialgias, desconforto abdominal/diarreia, letargia, fadiga e astenia. A malária apresenta-se classicamente por paroxismos: calafrios aos quais se sucedem episódios de febre (com picos entre os 39 e os 41.5°C), seguindo-se uma fase de suores exuberantes, devido à vasodilatação dos vasos periféricos para diminuir a temperatura corporal. Os paroxismos podem ser acompanhados por perda de apetite, cefaleias intensas, mialgias e mal-estar geral e são mais evidentes em *P. vivax* e *P. ovale*. No entanto, pode não existir febre em indivíduos semi-ímmunes (White, Cook and Zumla 2009).

À medida que a infecção progride, há desenvolvimento de anemia e hepatoesplenomegalia, podendo ocorrer obstipação intestinal ou diarreia. O arrastamento da infecção pode levar a uma forma mais grave de malária que pode levar à morte do indivíduo (White, Cook and Zumla 2009).

A malária grave é causada mais frequentemente por *P. falciparum*, tendo sido, no entanto, reportados casos de malária grave por *P. vivax* (White, Cook and Zumla 2009). *P. knowlesi* pode também causar malária grave devido ao seu curto ciclo de vida (24 horas) que permite o aumento rápido da densidade parasitária, apresentando sintomas semelhantes ao *P. falciparum*, mas sem ocorrência de coma (WHO, 2012).

A OMS define a malária grave pela evidência clínica ou laboratorial de disfunção multi-orgânica, com ocorrência de pelo menos um dos critérios resumidos na Tabela 4:

1. Introdução

Tabela 4 – Critérios de definição da malária grave. Adaptado de White, Cook and Zumla 2009, WHO, 2012.

Critérios Clínicos	Critérios Laboratoriais e Imagiológicos
1) malária cerebral (coma irreversível não atribuível a outra causa em indivíduos com <i>P. falciparum</i>)	1) hiperparasitémia
2) alteração do estado de consciência	2) hipoglicémia
3) prostração	3) acidose metabólica
4) múltiplas convulsões (mais de dois episódios em 24 horas)	4) anemia normocítica grave
5) respiração acidótica	5) hemoglobinúria
6) edema pulmonar agudo e síndrome de dificuldade respiratória aguda	6) hiperlactatémia
7) colapso circulatório ou <i>shock</i> e pressão sanguínea sistólica < 80mm Hg em adultos e <50mm Hg em crianças	7) insuficiência renal
8) lesão renal aguda	8) edema pulmonar
9) icterícia clínica com evidência de disfunção de órgão	
10) hemorragias abundantes	

Na malária grave, a microvasculatura dos órgãos vitais é obstruída. O processo de sequestração dos eritrócitos tende a ser maior no cérebro e no coração, existindo, no entanto, o envolvimento de outros órgãos como o intestino, rins, tecido adiposo, fígado, pulmão, medula óssea e pele (White, Cook and Zumla 2009).

Os grupos de risco são indivíduos não-imunes ou com imunidade incompleta, (crianças e viajantes), grávidas nos segundo e terceiro trimestres de gestação, indivíduos com VIH/SIDA e esplenectomizados (WHO, 2012).

Alguns factores genéticos auxiliam no controlo da doença. Por exemplo, a anemia falciforme possui alguma capacidade de resistência ao processo de invasão e, uma vez efectuado, os eritrócitos falciformam rapidamente de modo a serem prontamente retirados da circulação. Também a hemoglobina F, existente nos eritrócitos de bebés, não suporta o crescimento do parasita. Outras hemoglobinopatias têm também

1. Introdução

um papel protector, como talassémias, a hemoglobina E e a deficiência da enzima G6PD (glucose-6-fosfato desidrogenase), embora o seu efeito não seja ainda conhecido (White, Cook and Zumla 2009).

Manter um elevado nível de suspeição, perceber as histórias de viagens realizadas, tendo em conta o risco de exposição e não esquecer a possibilidade de um indivíduo adquirir malária por outras vias como transplante, transfusão ou partilha de agulhas contaminadas é, portanto, vital para evitar a fatalidade da doença, especialmente nos grupos de risco.

1.6. Diagnóstico Laboratorial e Terapêutica

1.6.1. Diagnóstico Laboratorial da Malária

O diagnóstico da malária efectuado de forma rápida e precisa é fulcral para identificar e tratar os indivíduos, uma vez que atrasos no diagnóstico podem ser fatais, e para evitar o uso de antimaláricos em indivíduos com outras patologias que cursam com febre, evitando assim o desenvolvimento de resistências aos antimaláricos (Wilson, 2013, Tangpukdee *et al.*, 2009). O diagnóstico laboratorial da malária envolve a identificação do parasita, dos antígenos ou de produtos do mesmo no sangue do indivíduo (Tangpukdee *et al.*, 2009).

O diagnóstico clínico deve incluir o exame físico e o historial de viagens do indivíduo, e deve ser confirmado/apoiado pelos exames laboratoriais (Wilson, 2013).

1.6.1.1. Métodos diretos: microscopia óptica

A técnica de referência para o diagnóstico da malária é o exame microscópico do esfregaço de sangue periférico e da gota espessa corados pelas colorações de Giemsa, Field ou Wright (Moody, 2002). Ao microscópio óptico, o parasita assemelha-se a um anel com cromatina avermelhada no núcleo, um citoplasma circular e uma zona central pálida (Figura 9). No entanto, a morfologia parasitária é visualizada de forma diferente consoante o estadio da infecção e a espécie infectante (White, Cook and Zumla 2009).

1. Introdução

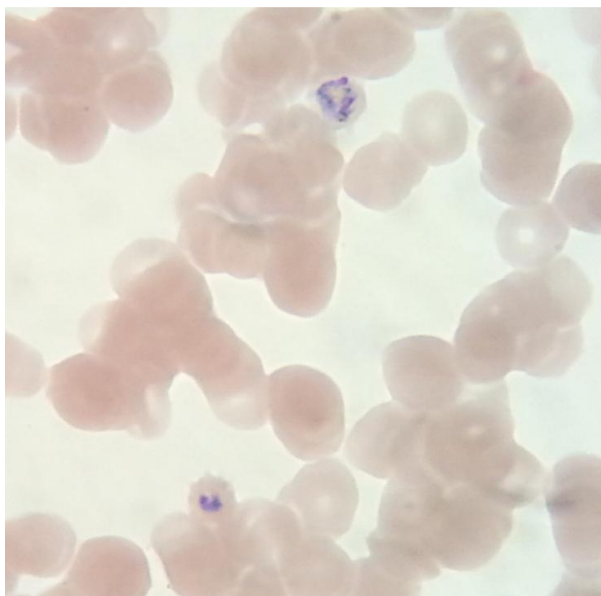


Figura 9 – *P. falciparum* em esfregaço de sangue periférico, corado com Giemsa 10%. Imagem do autor.

Esta é uma técnica simples, de baixo custo, com possibilidade de identificação da espécie infectante, de quantificação da densidade parasitária e de monitorização da resposta à terapêutica. No entanto, requer uma boa técnica de coloração, é demorada e exige profissionais experientes para a correcta identificação da espécie e quantificação da parasitémia, sobretudo quando existem baixas parasitémias ou infecções mistas. A sua utilização não é possível em zonas remotas sem acesso a electricidade e a recursos laboratoriais. A manutenção de uma elevada *performance* por parte dos profissionais de saúde pode também ser um problema em zonas não endémicas, onde a doença é raramente diagnosticada (Tangpukdee *et al.*, 2009). A sensibilidade e a especificidade do método depende da experiência do microscopista, da qualidade das lâminas e do microscópio, e do tempo dispendido para a examinação da gota espessa e do esfregaço de sangue periférico (White, Cook and Zumla 2009).

1.6.1.2. Métodos diretos: Testes de Diagnóstico Rápido

O uso dos testes de diagnóstico rápido tem vindo a intensificar-se e é uma ferramenta utilizada sobretudo quando outras formas de diagnóstico por método directo são inexistentes ou imprecisas. Estes são testes imunocromatográficos, em que o sangue

1. Introdução

do indivíduo migra por uma membrana de nitrocelulose juntamente com um tampão contendo um anticorpo conjugado (por exemplo, com partículas de ouro) (fase móvel). Essa migração permite que ocorra a captura do antígeno na zona de captura através da sua ligação aos anticorpos específicos de *Plasmodium* sp. aí adsorvidos (fase imóvel), formando imunocomplexos. O conjugado permite a visualização dessa ligação antígeno-anticorpo através da formação de uma linha colorida ao longo da zona de captura (Figura 10) (Moody, 2002).



Figura 10 – Exemplo de teste rápido de diagnóstico. “C” indica a linha de controlo que permite validar o teste; “P” indica positividade para o género *Plasmodium* e “Pf” refere-se a positividade para *P. falciparum*. Imagem do autor.

Estes testes são rápidos, fáceis de interpretar e não carecem de electricidade ou de equipamento laboratorial (Wongsrichanalai *et al.*, 2007). No entanto, possuem algumas limitações nomeadamente na detecção de *Plasmodium* não-*falciparum* ou na monitorização da resposta à terapêutica (Moody, 2002). Falsos positivos podem ocorrer devido a reacções cruzadas com anticorpos heterófilos ou com factor reumatoide. Falsos negativos podem dever-se a uma deleção ou mutação no gene *hrp-2* ou a baixas parasitémias. Outros factores podem afectar a qualidade do teste, como a humidade e a temperatura (Wongsrichanalai *et al.*, 2007, CDC, 2012b). Assim, o uso de testes rápidos de diagnósticos não elimina a necessidade da microscopia.

1.6.1.3. Métodos diretos: Técnicas Moleculares

Das técnicas moleculares pode salientar-se a PCR (*Polimerase chain reaction*). Esta é uma das técnicas mais sensíveis e específicas, tendo vindo a demonstrar-se com sensibilidade e especificidade superior à microscopia óptica. Esta técnica detecta os ácidos nucleicos do parasita, sendo muito utilizada para confirmar a infecção, detectar parasitas em baixas parasitémias e em infecções mistas, constituindo, por isso, um importante auxílio quando os meios de diagnóstico convencional são inconclusivos. Pode também ser utilizada para averiguar a resposta à terapêutica e identificar mutações

1. Introdução

ou genes do parasita implicados na resistência aos fármacos (Tangpukdee *et al.* 2009, Moody, 2002). Apesar de muito sensível e específica e de permitir a análise de um amplo número de amostras, esta técnica é muito dispendiosa, pois requer profissionais especializados, equipamento específico e alguns recursos laboratoriais (Tangpukdee *et al.*, 2009).

1.6.1.4. Métodos indiretos: técnicas serológicas

O diagnóstico laboratorial pode também ser apoiado por técnicas serológicas. Estas incluem técnicas de EIA (*enzyme immunoassay*), ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e IFAT (*immunofluorescence antibody testing*) (Tangpukdee, 2009, Gan and Patel, 2013). São geralmente utilizadas em estudos epidemiológicos, para a triagem de doadores de sangue, para verificar infecção em indivíduos com estadia em zona endémica (com possível infecção crónica ou infecções repetidas) ou para clarificar um diagnóstico que permanece duvidoso, após tratamento do indivíduo (Tangpukdee *et al.*, 2009, CDC, 2012b). São também muito utilizadas em investigação para detecção e quantificação de antígenos ou anticorpos presentes em determinada amostra (Gan and Patel, 2013).

O EIA e o ELISA são técnicas qualitativas e quantitativas que se baseiam na ligação antígeno-anticorpo, permitindo a detecção de pequenas quantidades de proteínas, péptidos, hormonas ou anticorpos numa amostra líquida. Estas técnicas utilizam anticorpos ligados a uma enzima (o conjugado) que, na presença de um composto metabolizado pela enzima, produz uma reacção cromogénea que indica a presença do antígeno (Gan and Patel, 2013).

O IFAT permanece o método de referência para as técnicas serológicas e consiste na formação de imunocomplexos quando o soro de indivíduos com malária é adicionado a uma lâmina cujo parasita se encontra adsorvido. Os imunocomplexos formados são visualizados ao microscópio de fluorescência (Tangpukdee *et al.*, 2009).

Para o diagnóstico de malária, todas as técnicas acima referidas possuem vantagens e desvantagens e a escolha da técnica a realizar deve ser adaptada a cada

1. Introdução

contexto tendo em conta o indivíduo, a espécie de *Plasmodium* sp. epidemiologicamente predominante e os recursos materiais e humanos de cada serviço médico.

1.6.2. Terapêutica da Malária

O diagnóstico baseado apenas na evidência clínica é impreciso, mas continua a ser aceite como base terapêutica para pacientes (sobretudo crianças) que se apresentem febris, em zonas onde a malária é a maior causa de febre e onde o apoio do laboratório é inexistente (Wongsrichanalai *et al.*, 2007, Cook and Zumla, 2009). Nesse caso, a decisão de administrar antimaláricos deve basear-se na probabilidade de a doença febril ser malária. No entanto, sempre que possível, a OMS recomenda a confirmação da suspeita clínica por métodos laboratoriais (WHO, 2010).

O tratamento da malária não complicada tem como objectivo a cura do indivíduo (isto é, a eliminação do parasita do organismo do indivíduo) o mais rapidamente possível, de forma a evitar a progressão da infecção para malária grave. A nível global, o tratamento dos indivíduos infectados tem como objectivo a redução da transmissão da infecção para outros indivíduos, se considerarmos o indivíduo infectado como reservatório, e a prevenção da disseminação da resistência aos antimaláricos (WHO, 2010).

Vários fármacos estão disponíveis para o tratamento da malária, sendo divididos em três famílias: as quinolonas, os antifolatos e as artemisininas. Estão também disponíveis diversos antibacterianos com actividade antimalárica, embora o seu tempo de actuação seja lento. Estes dizem respeito às famílias das sulfonamidas e sulfonas, tetraciclinas, clindamicina, macrólidos e cloranfenicol (White, Cook and Zumla 2009).

O fármaco deverá ser escolhido tendo em conta vários factores: a idade do indivíduo, a espécie infectante, a existência de resistência do parasita aos antimaláricos, o estadio da infecção, os efeitos adversos e a cinética do fármaco.

Na suspeita de malária grave deve ser efectuada uma rápida avaliação clínica do indivíduo, atentando para o seu estado de consciência, entre outros. O indivíduo deve

1. Introdução

ser admitido para o mais elevado nível de cuidados, com bons cuidados de enfermagem. Se o exame microscópico não estiver disponível rapidamente, o tratamento deve ser iniciado com base no exame clínico (WHO, 2012).

O tratamento da malária grave tem como objectivo principal evitar a morte do indivíduo, bem como prevenir sequelas neurológicas no caso da malária cerebral. Numa situação de malária grave na gravidez, o objectivo da terapêutica é preservar a vida da mãe. A prevenção de recrudescência e a minimização dos efeitos adversos são aspectos secundários neste contexto (WHO, 2010). Deve ser administrado artesunato por via endovenosa e, se não disponível, artemeter intramuscular ou quinino endovenoso. Os antimaláricos devem continuar a ser administrados por via parentérica por um período mínimo de 24 horas (mesmo que exista tolerância à medicação oral) e o esquema terapêutico de artimisinina (oral) combinada deve ser realizado posteriormente. A resposta à terapêutica deverá ser monitorizada com sucessivas visualizações da gota espessa e do esfregaço de sangue periférico (WHO, 2012).

1.7. Imunologia da Malária

A resposta imune à malária é um processo complexo e ainda não totalmente compreendido. A resposta imunológica contribui para prevenir a infecção e para a eliminação dos parasitas, embora possa estar também implicada na patologia da malária, se o processo inflamatório for excessivo e/ou desregulado, ou demorado na sua duração (Beeson *et al.*, 2008, Erdman *et al.*, 2008).

O desenvolvimento da imunidade protetora contra *Plasmodium* sp. é um processo demorado que precisa de alguns episódios de infecção durante alguns anos para se estabelecer e conferir protecção específica de estirpe. Assim, uma imunidade efectiva só seria alcançada com a exposição a várias estirpes gerando-se, deste modo, um amplo repertório de memória imunológica (White, Cook and Zumla 2009, Crompton *et al.*, 2014).

Em zonas hiperendémicas ou holoendémicas, as taxas de morbidade e mortalidade são significativas nas crianças abaixo dos 5 anos de idade (cerca de 78% do número total de mortes), devido ao seu sistema imunológico estar em desenvolvimento

1. Introdução

(WHO, 2014). É, portanto, por volta dessa idade que o indivíduo adquire uma imunidade parcial que protege das formas graves da doença. No início da idade adulta, essa imunidade pode desenvolver-se e conferir alguma protecção contra os sinais e sintomas clínicos da malária não complicada, devido à exposição continuada a várias estirpes do parasita. No entanto, o desenvolvimento de imunidade contra a infecção raramente ou nunca ocorre, passando o indivíduo a conviver com o parasita, sem desconforto para o primeiro, através do desenvolvimento de premunição, uma forma de imunidade que controla a infecção, mas não a evita (Gráfico 3) (White, Cook and Zumla 2009, Crompton *et al.*, 2014). Este estado de premunição é, portanto, alcançado com a idade e é mais rapidamente adquirida em indivíduos não-imunes que entrem em zona endémica já numa idade adulta do que em crianças residentes em zona endémica (Cook and Zumla, 2009).

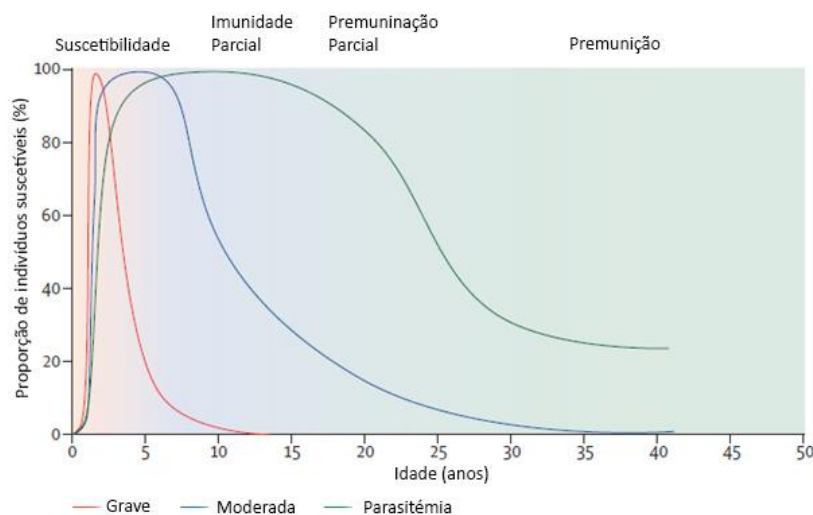


Gráfico 3 – Aquisição de imunidade de acordo com a idade, em zonas hiperendémicas e holoendémicas. Adaptado de White *et al.*, 2013.

São necessárias repetidas exposições ao parasita para que se desenvolva imunidade protectora contra os sinais e sintomas de malária. Contudo, mesmo com o alcance desse estado protector, o parasita pode não ser completamente eliminado e a imunidade adquirida pode ser perdida se o indivíduo não for continuamente exposto ao parasita (Stephens and Langhorne, 2006).

1. Introdução

Na imunologia da malária estão envolvidas as respostas inata e adquirida, mediadas por processos de imunidade celular e humoral, provavelmente com funções complementares (Beeson *et al.*, 2008).

1.7.1. Resposta imunológica direccionada ao ciclo pré-eritrocitário

A resposta imune direccionada contra os esporozoítos e as formas hepáticas é pouco pronunciada, havendo recrutamento de células TCD4⁺ e TCD8⁺ e produção de anticorpos contra os esporozoítos. A resposta imunológica no ciclo pré-eritrocitário não é muito exuberante, pelo que é difícil estudar as reacções imunes naturalmente adquiridas nesta fase do ciclo. Assim, alguns investigadores recorrem à inoculação de esporozoítos atenuados por radiação em ratinhos, devido ao maior poder antigénico do inóculo (milhares de milhões de esporozoítos por inóculo). Desta forma, a resposta imune induzida é mais robusta (Nussenzweig *et al.*, 1967, Marsh and Kinyanjui, 2006).

Nesta fase do ciclo parasitário, estão implicadas proteínas parasitárias do esporozoíto como CSP, TRAP (*trombospondin related adhesive protein*) e LSA1 (*liver stage antigen 1*) (Nicoll *et al.*, 2011). A exposição a estes antigénios parece recrutar anticorpos e células NK, NKT, T γ δ , TCD4⁺ e TCD8⁺ que reagem contra os esporozoítos e contra as formas hepáticas, para opsonizar os esporozoítos, lisar os hepatócitos infectados ou bloquear a entrada do esporozoíto no hepatócito (Marsh and Kinyanjui, 2006, Beeson *et al.*, 2008).

Os linfócitos TCD4⁺ segregam IFN- γ que activa macrófagos e monócitos (promovendo a fagocitose); citocinas como IL-1 e IL-6 que inibem o desenvolvimento intra-hepático do parasita; e estão ainda implicados na activação de células B para produção de anticorpos que inibem a invasão hepática (Beeson *et al.*, 2008, Hoffman e Franke, 1994 *fidé* Leoratti, 2004 p.33).

Os linfócitos TCD8⁺ são a principal célula efectora nesta fase do ciclo parasitário. A apresentação de péptidos pelas células dendríticas dá-se pela via MHC-I, desencadeando a estimulação dos linfócitos Th1. Estes segregam IL-4, levando à estimulação dos linfócitos TCD8⁺. Os linfócitos TCD8⁺ actuam quer através de granzimas e perforinas da via citolítica que lisam os parasitas intra-hepáticos, quer pela indução de moléculas que se ligam aos receptores das células parasitadas causando a sua apoptose. Tanto as células TCD8⁺ como as células TCD4⁺ e NK estimulam a

1. Introdução

produção de IFN- γ . Esta é a principal molécula efectora na resposta imune da fase pré-eritrocitária. A sua acção estimula monócitos, macrófagos, neutrófilos, células Th2 e, através da indução de óxido nítrico (NO), causa a destruição de hepatócitos infectados (Crompton *et al.*, 2014, Doolan and Martinez-Alier, 2006, Malaguarnera and Musumeci, 2002). A activação de macrófagos liberta TNF- α , TGF- β , IL-1, IL-6, ROI, NOI e GM-CSF (*Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor*), que contribuem para a destruição dos hepatócitos infectados ou dos esquizontes hepáticos (Malaguarnera and Musumeci, 2002). A administração de IFN- γ em ratos com hepatócitos infectados por *P. berghei* mostrou protecção parcial contra os esporozoítos, enquanto que no tratamento *in vitro* com IFN- γ em culturas celulares verificou-se uma eliminação de *P. falciparum*, demonstrando a importância desta molécula no controlo da infecção (Malaguarnera and Musumeci, 2002).

Também se tem verificado um aumento da expressão dos receptores das células NK, NKT, T $\gamma\delta$ nos estadios iniciais da infecção por *P. falciparum* e *P. vivax*. Estudos destas células em ratinhos têm mostrado alguma discrepância que varia consoante a espécie de *Plasmodium* spp. e com o hospedeiro, podendo estar associados a patologia ou a mecanismos de protecção à malária (Engwerda and Good, 2005).

No modelo animal, os anticorpos contra os esporozoítos atenuados por radiação parecem contribuir para a remoção de esporozoítos, redução da sua mobilidade ou bloqueio da invasão hepática (Nussenzweig *et al.*, 1967).

Actualmente não existem evidências convincentes de que uma resposta imune naturalmente adquirida possa neutralizar completamente o parasita nestes estadios da infecção. Por isso, um indivíduo adulto semi-imune possui o mesmo risco de adquirir a infecção em relação a uma criança residente em zona endémica (ver secção 1.7). Talvez essa incapacidade de produzir uma resposta imune eficaz tenha que ver com a baixa quantidade de esporozoítos inoculados pelo mosquito vector (ver secção 1.4.2) ou com mecanismos de evasão desenvolvidos pelo parasita. Por exemplo, a pele é naturalmente rica em células T reguladores (Treg), o que faz com que Treg específicas de *Plasmodium* sp. sejam induzidas durante esta fase da infecção tornando as Treg da pele imunologicamente tolerante aos esporozoítos. Em paralelo, estudos em ratos sugerem que as Treg e as células dendríticas só são mobilizadas 30 minutos após a inoculação

1. Introdução

dos esporozoítos e que estas últimas suprimem a expressão de MHC-II (*major histocompatibility complex*) e de CD86 (ambos estimuladores do linfócito T), sugerindo que esta seja também uma resposta imunologicamente tolerante (Crompton *et al.*, 2014). Estudos indicam que este ambiente imunorregulador da pele pode ser reforçado pelas repetidas activações da resposta imunológica ou pela desregulação imunológica devido às repetidas exposições aos esporozoítos e formas hepáticas (Honda *et al.*, 2011). Também o polimorfismo antigénico apresentado, quer devido à existência de vários alelos, quer devido a variação clonal dos antigénios, parece conferir outra forma de evasão ao sistema imune, requerendo uma exposição prolongada para se conseguir uma resposta imune protectora (Marsh and Kinyanjui, 2006).

1.7.2. Resposta imunológica direccionada ao ciclo eritrocitário

A resposta imunológica na fase eritrocitária da infecção compreende uma complexa cascata de eventos que envolvem a interacção entre os receptores na superfície do eritrócito e as proteínas dos merozoítos (Marsh and Kinyanjui, 2006).

Em indivíduos não-ímmunes, a libertação dos merozoítos na corrente sanguínea é acompanhada de febre devido à produção de citocinas e quimoquinas pro-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12(p70), IFN- γ e TNF- α , estimuladas pelos antigénios parasitários (Crompton *et al.*, 2014).

Só recentemente se têm vindo a conhecer elementos estruturais filogeneticamente conservados – PAMPS (*pathogen-associated molecular pattern*) – que o sistema imunológico reconhece através de receptores de reconhecimento padrão PRRs (*pattern-recognition receptors*) contra os quais vai reagir (Arosa 2007). No caso de *Plasmodium* sp., essas moléculas PAMPS incluem a hemozoína, o componente GPI (*glycosylphosphatidylinositol*), fragmentos de DNA, entre outros. No entanto, o processo inflamatório pode ser induzido directamente por proteínas parasitárias como a PfEMP1 e a MSP1.

As células dendríticas, estimuladas pelos esquizontes sanguíneos, iniciam e regulam a resposta imune mediada por células causando a estimulação de linfócitos T naïve (Engwerda and Good, 2005). As células TCD4⁺ específicas contra *Plasmodium*

1. Introdução

sp. desempenham um papel importante na geração de células de memória B de vida longa, de plasmócitos e, portanto, na produção de anticorpos, sendo uma importante fonte de IFN- γ , produzido na resposta imunológica específica contra *Plasmodium* sp. (Beeson *et al.*, 2008, Malaguarnera and Musumeci, 2002).

Estudos experimentais no modelo murino sugerem que o IFN- γ tem função protectora na fase eritrocitária do ciclo de *Plasmodium* sp. por induzir a secreção de IgG específica de *Plasmodium* sp. e auxiliar no mecanismo de inibição celular dependente de anticorpos (ADCI) (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995). Existem evidências de que crianças com hiperparasitemia por *P. falciparum* possuem menores concentrações de células TCD4⁺ secretoras de IFN- γ do que crianças com malária não complicada, sugerindo que o IFN- γ é essencial para a resolução de uma infecção primária, limitando a fase inicial de replicação parasitária (Winkler *et al.*, 1999). Estudos *in vitro* com células humanas sugerem que também as células NK são uma importante fonte de IFN- γ . Para além disso, estas células activam os macrófagos que, por sua vez, fagocitam os parasitas e os eritrócitos parasitados. Assim, as células NK são responsáveis por uma resposta rápida à invasão dos eritrócitos pelo parasita (Horowitz *et al.*, 2010).

Estudos realizados em ratinhos mostram que nesta fase eritrocitária as células NK, NKT, T γ δ , monócitos/macrófagos, mastócitos e neutrófilos são recrutadas para o desenvolvimento da resposta imune inata, estando envolvidas em processos pro-inflamatórios, na inibição do crescimento parasitário e na formação da resposta imunológica adaptativa (Hansen *et al.*, 2014).

Os eritrócitos infectados por *Plasmodium* sp., o pigmento malárico, o componente GPI e outros glicolípidos activam os macrófagos, levando à produção de TNF- α . Os níveis de TNF- α variam entre indivíduos de uma mesma zona endémica, expostos a parasitas de estirpe semelhante e à mesma taxa de exposição, o que sugere que o melhor controlo dessa citocina possa ser feito a nível génico. No entanto, a concentração de TNF- α pode ser modulada por várias moléculas como NOI, ROI, leucotrienos e citocinas como IFN- γ , IL-4 e IL-10. Também diferentes estirpes de *P. falciparum* mostraram diferentes capacidades estimulatórias de TNF- α pelos macrófagos/monócitos, em crianças com malária não complicada e malária cerebral.

O TNF- α aumenta a capacidade fagocítica nos monócitos e actua também nos linfócitos e monócitos promovendo a inibição de *P. falciparum* por um mecanismo não

1. Introdução

fagocítico que permanece ainda por esclarecer (Malaguarnera and Musumeci, 2002). Esta citocina está também implicada na regulação da produção de IL-12 pelos macrófagos e é um co-factor para que a IL-12 estimule as células NK a produzir INF- γ . A presença de TNF- α e NO no plasma está associada à rápida resolução da febre e da *clearance* parasitária (Malaguarnera and Musumeci, 2002).

O excesso de produção de IFN- γ e/ou TNF- α predispõe à existência de malária grave, pelo que a IL-12 e IL-18 funcionam como imunomoduladores das duas primeiras moléculas. A IL-12 é uma potente citocina imunomoduladora cuja capacidade protectora tem sido verificada na fase eritrocitária de infecções no modelo murino. A produção de IFN- γ pelos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ precede e inicia a produção de IL-12 que, por sua vez, induz a produção de IFN- γ pelas células NK por um mecanismo de *feedback* positivo, amplificando a resposta imunológica. A produção de IL-12 é também estimulada pela fagocitose dos monócitos e macrófagos e pelas células B (entre outras), e parece ser necessária para o início da resposta imunológica mediada por células (Riley, 1999, O'Garra and Arai, 2000). Além de actuar nas células TCD4⁺ estimuladas por antígenos, a IL-12 promove a diferenciação das células T em Th1 (O'Garra and Arai, 2000).

As funções imunomoduladoras da IL-18 incluem a síntese de TNF- α , IFN- γ (em menor extensão do que a IL-12) e IL-1 pelos macrófagos, a indução de citotoxicidade das células NK e actua também na diferenciação das células Th1 (Malaguarnera and Musumeci, 2002).

As citocinas IL-12 e IL-18 actuam de forma sinérgica, aumentando a produção de IFN- γ pelos macrófagos. Malaguarnera e Musumeci verificaram que, numa fase precoce da infecção, a produção de IL-12 é realizada de forma não controlada, enquanto a IL-18 equilibra o aumento de IL-1, o que sugere que a IL-18 possa ter um papel importante no desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa (Malaguarnera and Musumeci, 2002).

A produção de citocinas pro-inflamatórias numa fase precoce da infecção parece levar a uma imunidade protectora, enquanto que respostas pro-inflamatórias numa fase tardia da doença parece contribuir para a patologia (Malaguarnera and Musumeci,

1. Introdução

2002). Não obstante, uma resposta inflamatória excessiva está relacionada com formas graves de malária, por vezes até fatais, verificadas, essencialmente, em indivíduos não-imunes (Crompton *et al.*, 2014). Assim sendo, é necessário alcançar um estado de equilíbrio entre as respostas pro-inflamatória e anti-inflamatória, de modo a evitar formas graves da doença pelo aumento exponencial e de carácter cumulativo da reacção imunológica. Tal resposta anti-inflamatória é exercida por citocinas, nomeadamente a IL-10, a IL-4 e o TGF- β .

A IL-10 tem sido reportada no plasma de pacientes em fase aguda de malária e é produzida principalmente pelas células Th2 CD4⁺, monócitos e linfócitos B (Crompton *et al.*, 2014, Malaguarnera and Musumeci, 2002). Apesar de não afectar a proliferação dos linfócitos Th1 e TCD8⁺, induz a proliferação de células B e a produção de imunoglobulinas, sendo essencial para o desenvolvimento e maturação de anticorpos anti-*Plasmodium* sp. (Malaguarnera and Musumeci, 2002). Por regular a expressão de moléculas MHC-II à superfície dos macrófagos, a IL-10 reduz a apresentação antigénica e, portanto, evita a constante estimulação de células T; inibe a produção de ROI e NOI; reduz a diferenciação e proliferação de células T, o que leva a uma menor produção de IFN- γ , IL-6, TNF- α e GM-CSF (Malaguarnera and Musumeci, 2002).

Um estudo realizado com crianças do Mali revelou um aumento de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-8) antes da manifestação da doença e, após alguns episódios febris, verificou-se uma alteração na resposta imune com uma produção baixa dessas citocinas e um aumento significativo da produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , e activação de células fagocíticas, o que significa que numa situação de reexposição, estas crianças desenvolvem rapidamente respostas imunorregulatórias que amortecem uma resposta inflamatória potencialmente patogénica e desenvolvem mecanismos que controlam a replicação parasitária (Bottius *et al.*, 1996, Baliraine *et al.*, 2009). Esta capacidade de controlar uma reacção inflamatória excessiva muito cedo na infância pode ser um mecanismo adaptativo que confere protecção a condições patológicas potencialmente fatais, em indivíduos que não possuem uma resposta humoral protectora desenvolvida (conseguida após muitas exposições ao longo dos anos), como em crianças com idade inferior a 5 anos (ver secção 1.7) (Crompton *et al.*, 2014). No entanto, outros autores indicam que a IL-10

1. Introdução

pode não possuir um carácter protector mas, pelo contrário, pode contribuir para formas graves da doença, se a sua produção for em quantidade insuficiente para antagonizar o efeito estimulador das citocinas pro-inflamatórias (Crompton *et al.*, 2014).

Num estudo em ratos C57BL/6 infectados com *P. yoelii*, a neutralização de IL-10 e TGF- β prolongou a sobrevivência dos ratos infectados e permitiu uma resolução completa da infecção em 40% dos mesmos (Engwerda and Good, 2005). Pombo e colaboradores demonstraram que indivíduos que apresentam protecção contra a malária evidenciam respostas imunológicas com proliferação de células TCD4⁺ e TCD8⁺, produção de IFN- γ e altas concentrações de actividade da enzima óxido nítrico sintetase (nas células mononucleares periféricas), mas não apresentam níveis de IL-10 ou IL-4 (Marsh and Kinyanjui, 2006). Não obstante, foi demonstrado que a anemia severa está associada à redução das concentrações de IL-10 e que um aumento do rácio entre TNF- α e IL-10 contribui para a supressão reversível da medula óssea, observada em pacientes com malária (Kurthzals *et al.*, 1998, Othoro *et al.*, 1999).

O papel funcional da IL-10 não é ainda muito claro relativamente à sua capacidade benéfica para reduzir a reacção inflamatória associada ao parasita ou a uma capacidade prejudicial que contribui para o decréscimo da resposta imunológica celular (Malaguarnera and Musumeci, 2002).

A IL-4 é produzida por linfócitos Th2 e por basófilos activados/mastócitos. Esta citocina actua na estimulação dos linfócitos Th2 com inibição de Th1 por diminuir a produção de IFN- γ . Está envolvida na proliferação e diferenciação das células TCD4⁺ e TCD8⁺, na activação de linfócitos TCD8⁺, células NK e macrófagos, modulando, por isso, a resposta imune inespecífica. A IL-4 e as células Th2 parecem ter papéis importantes na resposta humoral contra *Plasmodium* sp., aumentando os níveis séricos de anticorpos específicos contra *Plasmodium* sp. No entanto, existe uma controvérsia que permanece por esclarecer, uma vez que parece que a IL-4 pode inibir a capacidade de macrófagos naive destruírem o parasita (Malaguarnera and Musumeci, 2002).

O TGF- β é produzido por macrófagos, células NK e linfócitos T e B. Possui um papel primordial no controlo e transição da resposta pro-inflamatória (tipo Th1) para a resposta anti-inflamatória (tipo Th2) na infecção por *Plasmodium* sp. O nível de TGF- β

1. Introdução

regula a activação dos macrófagos, passando estes a serem activados na presença de baixos níveis dessa citocina e, contrariamente, são inibidos com a elevada presença de TGF- β . Esta citocina inibe também a produção de IFN- γ e TNF- α , estimula a produção de IL-10 e inibe a expressão de moléculas de adesão, necessárias ao processo de sequestração do parasita nos vários órgãos do hospedeiro vertebrado (como o cérebro), que pode levar a malária grave (Malaguarnera and Musumeci, 2002).

A cinética da molécula de TGF- β parece ser também crucial para um eficaz controlo da densidade parasitária. Assim, a produção precoce de TGF- β leva à inibição da resposta imune mediada por células Th1, pela inibição da produção de IFN- γ e TNF- α (inibindo a sua acção rápida no controlo da replicação parasitária), mas a produção demasiado tardia de TGF- β leva a uma sobrecarga da densidade parasitária e pode ser fatal devido à acção cumulativa e exacerbada da resposta pro-inflamatória Th1. Deste modo, este delicado equilíbrio conduz à possibilidade da citocina TGF- β possuir duas funções: 1) promover os mecanismos que levam ao controlo do desenvolvimento/multiplicação parasitária numa fase imediata da infecção; 2) controlar os efeitos da resposta pro-inflamatória, limitando a inflamação consequente da infecção, numa fase mais avançada da resposta imunológica (Malaguarnera and Musumeci, 2002).

O TGF- β está ainda implicado na estimulação das células B: baixas concentrações de TGF- β estimulam a produção das subclasses de IgG, enquanto elevados níveis de TGF- β inibem a produção desses anticorpos (Snapper *et al.*, 1995).

1.7.3. Resposta imunológica humoral

Devido ao pouco tempo em que as proteínas parasitárias se encontram expostas ao sistema imune do hospedeiro vertebrado, os anticorpos assumem um papel fundamental na formação da resposta imunológica dirigida aos merozoítos. O seu objectivo é evitar a entrada dos merozoítos nos eritrócitos e a sua acção é executada em várias frentes: a) opsonização dos merozoítos; b) indução da cascata do complemento; c) facilitação da fagocitose pelos macrófagos; d) prevenção da acção das proteínas de invasão; e) prevenção da libertação dos merozoítos, f) causando aglutinação dos

1. Introdução

merozoítos aquando da ruptura dos esquizontes; e g) bloqueio dos receptores na superfície dos eritrócitos aos quais o parasita se liga (Marsh and Kinyanjui, 2006).

A importância das imunoglobulinas foi demonstrada por Cohen e colaboradores em 1961, quando transferiram passivamente anticorpos IgG purificados de indivíduos imunes para crianças com infecção aguda de malária, verificando-se um decréscimo rápido e significativo da densidade parasitária no sangue periférico, acompanhada de resolução da febre (Cohen *et al.*, 1961 *fidé* Crompton *et al.*, 2014).

A associação entre protecção e os anticorpos IgG foi também observada noutros estudos em que a transferência passiva de imunoglobulinas de indivíduos infectados na África Ocidental reduziu a densidade parasitária em indivíduos na África Oriental (McGregor *et al.*, 1963), bem como em indivíduos tailandeses (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990), o que sugere a importância dos anticorpos no controlo da densidade parasitária.

Recentemente têm sido desenvolvidos estudos com a preocupação de dar respostas a algumas questões, nomeadamente quais as proteínas-alvo dos anticorpos anti-*Plasmodium* sp., o mecanismo exacto pelo qual esta protecção é executada e qual a razão para essa protecção só ser adquirida após repetidas exposições, ao longo de um período de tempo significativamente longo (Crompton *et al.*, 2014).

Estudos realizados em zona endémica de malária têm mostrado que a principal proteína-alvo da resposta humoral protectora gerada é a família clonalmente variante da proteína PfEMP1. A ineficiente aquisição de anticorpos protectores anti-*Plasmodium* sp. é atribuída à diversidade genética das proteínas de *P. falciparum* e à sua habilidade para efectuar variação clonal das suas proteínas à superfície do eritrócito infectado. Deste modo, pode demorar anos para que um indivíduo residente em zona endémica seja exposto a um número de clones proteicos do parasita que seja suficiente para gerar uma resposta humoral protectora (Crompton *et al.*, 2014).

A resposta humoral convencional numa infecção nova inicia-se pela elevação da IgM, com posterior substituição por uma das imunoglobulinas A, G ou E. Numa infecção por *Plasmodium* sp. verifica-se uma resposta humoral com predomínio de IgM e de IgG (Osier *et al.*, 2008, Oeuvray *et al.*, 1994). No entanto, apenas 5 a 10% da

1. Introdução

resposta humoral gerada é específica contra *Plasmodium* sp., sendo o restante anticorpos heterófilos e auto-anticorpos contra eritrócitos, linfócitos, factores do complemento, factor reumatóide e factores anti-nucleares que levam à activação policlonal de linfócitos B (Ferreira *et al.* 1988 *fidé* Leoratti, 2004). A resposta humoral específica é dirigida contra qualquer forma parasitária na fase sanguínea, seja esquizonte, trofozoíto jovem ou maduro (Leoratti, 2004).

Os anticorpos IgG são os mais frequentes em zona endémica de malária, parecendo estar associados a protecção ou a baixa probabilidade de manifestação clínica, provavelmente devido à permanência da exposição (Aribot *et al.*, 1996, Shi *et al.*, 1996). Os anticorpos citofílicos, IgG1 e IgG3, são as subclasses mais frequentes (Nhabomba *et al.*, 2014, Ramasamy *et al.*, 2001), mas a dúvida permanece sobre qual é produzido inicialmente ou qual tem maior preponderância na resposta imune, parecendo variar consoante o antigénio ou com o desenvolvimento da resposta imune anti-*Plasmodium* sp. (Pinto *et al.*, 2001, Medeiros *et al.*, 2013). Anticorpos não citofílicos como IgG2, IgG4 e IgM também foram descritos em indivíduos sintomáticos com infecção por *P. falciparum*, num estudo realizado no Brasil (Medeiros *et al.*, 2013).

Anticorpos contra as formas eritrocitárias, sobretudo as subclasses citofílicas IgG1 e IgG3, possuem capacidade para opsonizar o parasita, auxiliando o processo fagocítico do mesmo, e de actuar através do processo de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC). Para além disso, têm ainda mostrado maior eficácia em inibir o desenvolvimento parasitário quando actuam sinergisticamente com monócitos ou leucócitos, um processo designado por inibição celular mediada por anticorpos (ADCI) (Marsh and Kinyanjui, 2006, Dent *et al.*, 2008, Celada *et al.*, 1963 *fidé* Leoratti, 2004). Neste último processo, os monócitos libertam factores solúveis que possuem um efeito neutralizante contra o parasita, bloqueando a sua divisão nuclear dentro do eritrócito (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990, Garraud *et al.*, 2003).

Num estudo com crianças e adultos no Senegal, a IgG3 foi associada a uma redução do risco de desenvolvimento de malária clínica (Aribot *et al.*, 1996). Num estudo decorrente no Burkina Faso, a IgG2 foi associada a protecção por passar a exibir acção citofílica, conferida provavelmente pela sua ligação ao receptor Fc γ RIIA-H131 das células fagocíticas (Aucan *et al.*, 2000). Foi ainda estabelecida uma associação entre os altos níveis desta imunoglobulina e um baixo risco de aquisição de malária, em

1. Introdução

crianças de 6 meses (Deloron *et al.*, 1997). Por outro lado, anticorpos IgG4 não citofílicos foram relacionados com risco de manifestação clínica da malária, por bloquearem o mecanismo ADCI (Aucan *et al.*, 2000).

Estes anticorpos não citofílicos (IgG2 e IgG4) podem também bloquear o efeito dos anticorpos citofílicos por competirem com os mesmos domínios, causando um desequilíbrio na formação da resposta humoral, que pode culminar em resistência ou susceptibilidade à doença (Groux and Gysin, 1990, Bouharoun-Tayoun and Druilhe, 1992).

O papel dos anticorpos IgE numa infecção por *Plasmodium* sp. não é consensual. Alguns estudos realizados em ilhas de Madagáscar e ilhas da Tailândia (Perlmann *et al.*, 1994), do Burkina Faso (Calissano *et al.*, 2003) e da fronteira da Tailândia – Myanmar e Tailândia – Cambodja (Tangteerawatana *et al.*, 2007) relacionam a produção de IgE com a patologia da doença, mostrando elevados níveis dessa imunoglobulina em doentes com malária grave. Num estudo realizado na Tanzânia, com uma população de 1 a 84 anos de idade, elevados níveis de IgE foram relacionados com um baixo risco de desenvolver sintomatologia, independentemente da idade, sugerindo um possível papel da IgE na protecção contra a malária clínica (Berezcky *et al.*, 2004). Outro estudo realizado com crianças no Gabão, em que foram estudados autoanticorpos IgE, demonstrou alguma interacção dos autoanticorpos com os antígenos no cérebro dos indivíduos, sugerindo que esta imunoglobulina poderá ter um papel protector na malária grave (Duarte *et al.*, 2012).

A IgM parece neutralizar e aglutinar patogéneos intracelulares de forma bastante eficaz, através da ligação do eritrócito parasitado ao domínio Fc da IgM ou de moléculas efectoras como o complemento (Czajkowsky *et al.*, 2010). Muito poucos estudos têm sido desenvolvidos relativamente ao papel da IgM na malária, sendo o estudo mais recente de 2007, realizado numa população tribal do Mali, atribuindo à IgM uma função protectora na malária (Bolad *et al.*, 2005). Um estudo de revisão de 2012 refere o comportamento protector da IgM, ao limitar a replicação parasitária e promover a produção de células de memória. No entanto, esta parece estar também associada a

1. Introdução

malária grave, num estudo realizado com estirpes laboratoriais de *P. falciparum* (Czajkowsky *et al.*, 2010).

A IgA é também uma imunoglobulina pouco estudada, mas da qual é conhecida a sua capacidade de neutralizar patógenos e activar o sistema complemento (Arosa 2007). Não é, no entanto, conhecida nenhuma função específica na malária (Leoratti *et al.*, 2008).

Além de ser conhecida a capacidade de evasão de *Plasmodium* sp. ao sistema imune por polimorfismo genético e variação antigénica, sabe-se que este parasita possui também capacidade de evasão à resposta humoral, provocando uma desregulação funcional nos linfócitos TCD4⁺ e B (Tarlinton and Good-Jacobson, 2013).

Sabe-se hoje que uma resposta humoral protectora, com uma duração longa no tempo depende da produção de células B de memória – MBC (*memory B cells*) e de células plasmáticas de vida longa – LLPC (*long-lived plasma cells*), induzidas pelos linfócitos TCD4⁺. Estudos realizados em crianças mostram que a resposta humoral específica anti-*Plasmodium* sp. decresce para valores indetectáveis 3 a 9 meses após um episódio de malária, enquanto, por exemplo, é estimada uma semi-vida da resposta humoral específica contra o sarampo, após administração da vacina, superior a 300 anos (Amanna *et al.*, 2007, Portugal *et al.*, 2013). Esta evidência é corroborada por outro estudo em crianças, no qual a resposta humoral IgG direccionada contra centenas de antígenos de *P. falciparum* permanece no sangue durante a estação do ano em que houve transmissão da infecção (a estação das chuvas), mas essa resposta é quase totalmente perdida durante os 6 meses da estação seca que se segue. A quantidade de resposta imunológica que persiste durante a época seca aumenta gradualmente com a idade até ao início da idade adulta, altura em que os níveis de IgG se mantêm elevados (correspondendo à aquisição de imunidade à malária clínica) e tendem a flutuar menos em resposta à infecção (Crompton *et al.*, 2014).

Estas observações sugerem que, durante a infância, a resposta humoral anti-*Plasmodium* sp. é predominantemente induzida por células plasmáticas de curta duração – SLPC (*short-lived plasma cells*), em vez de LLPC e que parecem ser necessárias repetidas infecções para completar o “compartimento” de LLPC específico de espécie,

1. Introdução

de forma a que os níveis de anticorpos se elevem acima de um determinado limiar de protecção e o indivíduo adquira imunidade clínica (Crompton *et al.*, 2014).

A resposta imune por MBC tem sido alvo de controvérsia. Alguns investigadores apontam para a possibilidade de que a resposta imunológica contra a malária não produza MBC, enquanto outros estudos evidenciam que células MBC específicas de *P. falciparum* são produzidas em resposta à infecção, cuja prevalência em adultos é relativamente baixa (aproximadamente 30-50%), mesmo em indivíduos já expostos, e que, uma vez produzidas, podem persistir durante mais tempo do que os anticorpos, sem exposição contínua ao parasita. Assim, parece que *P. falciparum* consegue também gerar uma resposta de longa duração com MBCs, mas de forma pouco eficiente. Por outro lado, a título exemplificativo, a imunização contra a varíola com células MBC gera uma resposta que persiste por um período de tempo igual ou superior a 50 anos, mesmo sem reexposição ao antígeno (Crompton *et al.*, 2014).

A dificuldade na aquisição de LLPC e MBC por exposição a *P. falciparum* pode ser o resultado de uma desregulação na diferenciação de células B, induzida pelos vários antígenos, uma alteração na função dos linfócitos que é verificada noutras infecções como o VIH e a hepatite C. Também as células TCD4⁺ podem sofrer uma desregulação da sua função na infecção por *Plasmodium* sp. A implicação dessa alteração funcional em humanos permanece por esclarecer. Contudo, em ratinhos parece culminar num aumento dos níveis de anticorpos e na remoção mais eficaz dos parasitas em circulação no sangue (Charles *et al.*, 2008, Crompton *et al.*, 2014).

1.7.4. Resposta imunológica durante o quadro de malária grave

A malária grave tem vindo a ser associada a respostas inflamatórias com produção de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , INF- γ , IL-1 β e IL-6 e diminuição de IL-10. Também características do parasita contribuem para a severidade da doença, como a proteína PfEMP1 (Crompton *et al.*, 2014).

Determinados factores genéticos têm sido implicados na aquisição de imunidade, contribuindo para a protecção ou para a susceptibilidade da malária grave: HbS e outras hemoglobinopatias (que dificultam a interacção do parasita com o

1. Introdução

eritrócito), o grupo sanguíneo O, os genes codificadores da molécula de MHC, de IL-12 e da proteína sintetase de NO, dificuldades na detecção de moléculas PAMPS, entre outros (Kwiatkowski, 2005). Também a depleção de células TCD4⁺, TCD8⁺ e de neutrófilos parece ser importante na protecção contra a malária grave, embora não se conheça o mecanismo pelo qual a presença destas células contribui para a severidade da doença (Crompton *et al.*, 2014).

A presença de genes codificadores para lupus eritematoso sistémico (LES) parece conferir alguma protecção na malária e a existência de malária parece também conferir protecção contra manifestações de LES (Crompton *et al.*, 2014). Esta associação tem por base a possível explicação de que a malária induz uma resposta inflamatória, provocando uma reacção anti-inflamatória que protege da doença autoimune e da malária. Esta observação é consequente de um estudo com crianças do Mali, em que se verificou uma alteração na resposta pro-inflamatória para uma resposta anti-inflamatória, com predomínio de IL-10, possivelmente devido à estimulação dos genes para LES com produção de resposta pro-inflamatória muito cedo na infância (Crompton *et al.*, 2014). Também em estudos com ratinhos susceptíveis a LES foi verificada uma grande produção de IL-10 que se considerou ser o parâmetro imunológico mais importante na resistência à malária grave (Waisberg *et al.*, 2011).

A malária cerebral é causada pela ligação da PfEMP1 ao receptor ICAM 1 que parece estar associada a uma activação de macrófagos no cérebro com posterior recrutamento e proliferação de TCD8⁺ (Crompton *et al.*, 2014, White, Cook and Zumla 2009). A malária cerebral resulta de níveis elevados de citocinas pro-inflamatórias no soro e no tecido cerebral, bem como da migração de leucócitos para locais de sequestração eritrocitária na microvasculatura cerebral, provocando alterações ao nível do cérebro, como lesão celular, disrupção da barreira hemato-encefálica e disfunção neuronal (Erdman *et al.*, 2008).

A malária cerebral é um evento raro em crianças de tenra idade de zonas endémicas, o que sugere que a imunidade a esta forma de malária é adquirida através da transferência de anticorpos maternos, durante a gravidez. Existe, no entanto, outra hipótese: de que a protecção à malária grave possa estar relacionada com a fisiologia

1. Introdução

cerebral da criança e a sua capacidade para desenvolver uma resposta inflamatória adequada (Crompton *et al.*, 2014).

O processo imunológico desencadeado responsável pela transição da malária não complicada à malária grave é ainda desconhecido, bem como de que forma um indivíduo adquire imunidade contra a malária grave ou se os mecanismos imunológicos que conferem protecção na malária não complicada são os mesmos na malária grave (Crompton *et al.*, 2014).

1.8. Medidas de Controlo e Prevenção da Malária

Para a prevenção da malária devem ser adoptadas um conjunto de medidas para evitar a picada do mosquito e/ou para interferir no estabelecimento da infecção. O uso de repelentes na pele e na roupa; de insecticidas para a casa; de redes mosquiteiras ao redor da cama; de roupa que cubra o máximo possível de pele; e de ar condicionado a baixa temperatura, em detrimento das correntes de ar natural, são medidas individuais que constituem a primeira linha de protecção contra a malária e devem ser utilizadas sobretudo ao amanhecer e ao entardecer (WHO, 2014b).

A quimioprofilaxia não previne a infecção, mas protege o indivíduo da sintomatologia e é indicada para viajantes expostos à malária. A quimioprofilaxia recomendada depende da susceptibilidade do parasita aos antimaláricos em determinado local geográfico e do estado imunológico do indivíduo relativamente à malária (White *et al.*, 2013).

O método de prevenção a adoptar contra a malária (prevenção da picada do mosquito *vs* quimioprofilaxia) irá depender do tipo de risco de adquirir malária no país a visitar. É essencial ter em consideração que nenhum método profilático é completamente eficaz e em qualquer síndrome febril deverá ser considerada a malária (WHO, 2014b).

A OMS recomenda uma estratégia realizada em várias frentes para o controlo e eliminação da malária: 1) redução da população do vector, pelo uso de insecticidas (diminuindo a intensidade de transmissão) e pela distribuição de redes mosquiteiras impregnadas (reduzindo o contacto mosquito-humano); 2) realização de testes de

1. Introdução

diagnóstico à população (reduzindo a morbidade e a mortalidade, devido ao diagnóstico rápido); 3) tratamento eficaz com artimisininas em combinação terapêutica (evitando a progressão da infecção para malária grave, reduzindo potenciais reservatórios do parasita, bem como prevenindo a disseminação de resistências a antimaláricos) e 4) uma boa monitorização dos casos de malária (permitindo responder a necessidades da população e reagir a situações inesperadas como surtos ou falhas nos planos de intervenção implementados) (WHO, 2013).

O controlo eficaz da doença envolve o compromisso da população a nível nacional, distrital e comunitário (WHO, 2013).

1.9. Perspectivas futuras no desenvolvimento de vacinas

Não existe ainda uma vacina para a malária, embora existam algumas em fases de desenvolvimento (Olotu *et al.*, 2013, Reyes-Sandoval *et al.*, 2010). A ausência de uma vacina tem que ver com a escassez de financiamento para a investigação nesta doença (cerca de 25% do financiamento fornecido para o estudo do vírus da imunodeficiência humana [VIH]), com a complexidade do seu ciclo de vida, com a sua extensa capacidade de variação antigénica e com a ainda pouca compreensão das interações entre o sistema imunológico do hospedeiro humano e o parasita (Crompton *et al.*, 2010).

Sabe-se ser possível a construção de uma vacina contra a malária, devido a estudos experimentais, nos quais esporozoítos atenuados por radiação induziram uma resposta imune totalmente protectora em humanos (Clyde, 1990), ratos (Nussenzweig *et al.*, 1967) e, num estudo que avaliou a resposta imune humoral contra o ciclo gonotrófico, houve também protecção em macacos e em humanos (Arévalo-Herrera *et al.*, 2011).

O objectivo da estratégia de vacinação é induzir respostas imunológicas de memória que confirmam protecção num contacto de *Plasmodium* sp. com o indivíduo, após imunização deste (Araman and Troye-Blomberg, 2014).

As vacinas anti-*Plasmodium* sp. estão a ser desenvolvidas com alvos terapêuticos presentes nas três fases do ciclo parasitário: contra as formas da fase pré-

1. Introdução

eritrocitária, contra as formas assexuadas da fase eritrocitária e contra as formas sexuadas do parasita (Figura 11) (Vaughan and Kappe, 2012).

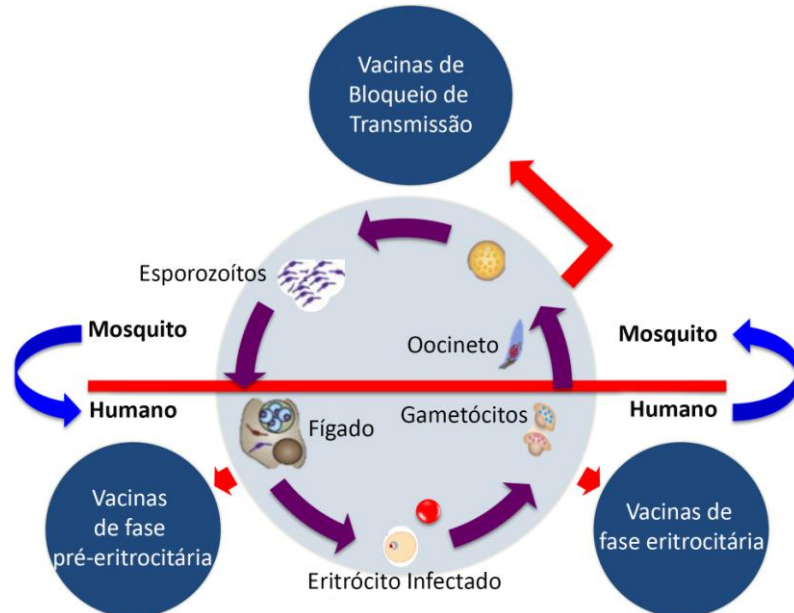


Figura 11 – Fases de actuação das vacinas na infecção por *Plasmodium* sp. Adaptado de Arama and Troye-Blomberg, 2014.

Na fase pré-eritrocitária, o objectivo é conter a infecção numa fase precoce e o alvo vacinal podem ser esporozoítos inteiros ou subunidades antigénicas das proteínas do esporozoíto (como a CSP) (Araman and Troye-Blomberg, 2014).

A vacina mais promissora actualmente é a RTS,S que consiste na combinação do antigénio de superfície da hepatite B (HBsAg) com o domínio da trombospondina da proteína CSP, com recurso a adjuvantes. Esta vacina mostrou ser protectora em 30-50% dos indivíduos malária-naive imunizados. Quando aplicada a adultos de zona endémica (Gambia e Quénia), a RTS,S conferiu protecção a 35% dos adultos e a 30-50% de crianças imunizadas em Moçambique, Tanzânia e no Quénia, contra a malária clínica, embora essa protecção tenha sido de curta duração (Crompton *et al.*, 2010).

O mecanismo de acção pelo qual estas vacinas conferem protecção permanece por esclarecer, mas é possível que a RTS,S induza protecção contra a malária clínica por reduzir o número de merozoítos que saem do fígado, prolongando a exposição às formas assexuadas, existentes em níveis subclínicos, e proporcionando, por isso, mais tempo ao sistema imunológico para desenvolver a resposta imune naturalmente adquirida (Crompton *et al.*, 2010).

1. Introdução

As vacinas em fase mais avançada contra as formas parasitárias da fase eritrocitária são direccionadas para AMA1 e MSP1. Apesar de não terem demonstrado eficácia em crianças africanas, estas vacinas estão em desenvolvimento com novos adjuvantes (Crompton *et al.*, 2010).

As vacinas contra os estadios sexuais são vacinas que visam bloquear a transmissão da infecção. Os seus alvos são os gâmetas, o oocineto ou o zigoto e os anticorpos ingeridos pelo vector devem evitar o desenvolvimento do ciclo sexual do parasita, pela opsonização dos antígenos (Crompton *et al.*, 2010). O facto de os antígenos no vector não serem naturalmente apresentados ao sistema imune humano, faz com que não ocorra a indução de uma resposta imune natural consequente da imunização, apresentando-se como uma limitação na eficácia deste tipo de vacinas (Arama and Troye-Blomberg, 2014). Esta vacina é uma boa estratégia a incluir nas medidas de eliminação da malária, apesar de ser difícil a sua implementação, quer devido à necessidade de imunizar toda a população de determinada comunidade, quer devido ao facto de não ser observável benefícios individuais, mas sim numa perspectiva comunitária (Crompton *et al.*, 2010, Vaughan and Kappe, 2012).

A combinação de uma vacina contra a fase pré-eritrocitária com uma vacina dirigida à fase eritrocitária pode fazer com que não haja manifestação de sinais e sintomas clínicos. Por outro lado, a combinação de uma vacina direccionada para o ciclo pré-eritrocitário com uma vacina de bloqueio da transmissão poderá constituir uma estratégia importante pelo potencial para reduzir a transmissão e promover protecção a nível individual (Crompton *et al.*, 2010).

Apesar da existência de alguns protótipos promissores no desenvolvimento de vacinas contra a malária, é necessário considerar que a malária em humanos é causada por cinco espécies de *Plasmodium* spp. e que, portanto, as vacinas devem conferir protecção entre espécies. Esta condição é mais facilmente alcançada utilizando o parasita como elemento imunogénico, em detrimento da subunidade proteica (Vaughan and Kappe, 2012).

2.Objectivos do Estudo

2. Objectivos do Estudo

2. Objectivos

São objectivos do estudo:

- 1) Caracterizar os participantes no estudo quanto aos seus factores sociodemográficos, estadias prévias em países tropicais e história de malária;
- 2) Determinar a prevalência de anticorpos anti-*Plasmodium* spp. presentes em amostras de sangue de indivíduos com estadias prévias em zona endémica de malária;
- 3) Caracterizar a subclasse dos anticorpos IgM e IgG total anti-*Plasmodium* spp. detectados;
- 4) Relacionar a existência ou ausência de anticorpos nas amostras estudadas, com os factores sociodemográficos, as variáveis de caracterização da estadia/viagem e a história de malária;
- 5) Efectuar a caracterização imunoquímica dos antígenos envolvidos na reatividade serológica em malária.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Tipo de Estudo

Este é um estudo descritivo, com uma componente analítica a fim de se verificar a existência de associações/diferenças entre variáveis.

3.2. Amostragem

A população alvo deste estudo é constituída por indivíduos com estadias em zona endémica de malária.

Este é um estudo não representativo da população, uma vez que a amostra é não aleatória, recorrendo a técnicas de amostragem por conveniência e por redes.

Os participantes foram recrutados em diversos postos de colheitas de análises clínicas, após autorização dos respectivos directores técnicos.

Para evitar o desconforto de uma punção venosa propositadamente para este estudo, incluímos os indivíduos que se deslocaram aos referidos postos com necessidade de realizarem análises sanguíneas para propósitos médicos.

Os participantes deste estudo são indivíduos que preenchem os seguintes critérios de inclusão:

- 1) idade superior a 18 anos;
- 2) estadia(s)/viagem(ns) em zona(s) endémica(s) de malária(s), independentemente da duração, motivo e do tempo decorrido após o regresso;
- 3) possuam capacidade de entendimento do estudo;
- 4) estejam informados sobre o estudo e tenham assinado o consentimento informado;
- 5) tenham fornecido informação clara sobre a(s) estadia(s)/viagem(ns).

A todos os participantes foi entregue um documento explicativo do estudo (Anexo A) e o mesmo foi explicado oralmente. Neste documento constavam os

3. Materiais e Métodos

contactos do investigador principal, para qualquer esclarecimento sobre o estudo, bem como a possibilidade de os participantes poderem vir a ser contactados para uma consulta no IHMT, caso fossem detectados parasitas no seu sangue. Simultaneamente foi feito um pedido de autorização para a cedência de uma amostra de sangue para este estudo, através de uma declaração do participante (Anexo B), que atestava a compreensão integral deste estudo e que deveria ser assinada pelo participante, certificando que compreendeu e autorizava o uso do seu sangue para o estudo. Foi aplicado um questionário autopreenchido (Anexo C) para caracterização dos participantes no estudo.

3.3. Instrumento de recolha de dados

A cada participante foi aplicado um questionário de auto-preenchimento, para colheita de dados sociodemográficos, de caracterização das suas estadias/viagens a zonas endémicas de malária e de história de malária (Anexo C).

O questionário era anonimizado, fazendo-se o cruzamento dos dados nele contidos, com a declaração do participante e com as amostras laboratoriais através de um código único para cada participante.

O questionário foi elaborado utilizando questões fechadas, de escolha única ou múltipla e, em menor quantidade, questões de resposta aberta.

Dado o cariz de auto-preenchimento do questionário, foi associada uma tabela de países endémicos de malária, tendo por base as informações mais actuais da OMS (WHO, 2013).

Na redação do questionário foi utilizada uma linguagem simples e adequada ao vocabulário dos participantes.

Antes do início do estudo foi realizado um pré-teste ao questionário, tendo sido aplicados 32 questionários a utentes das consultas de pré-viagem no IHMT, tendo em consideração os critérios de inclusão dos participantes neste estudo. Foram efectuadas algumas alterações ao questionário, conforme os resultados do pré-teste.

Após o questionário ter sido aplicado e quando incompleto, o investigador contactou telefonicamente o participante, para completar as questões mais relevantes para o estudo.

3. Materiais e Métodos

3.4. Condições de colheita e armazenamento das amostras de sangue

As amostras de sangue utilizadas neste estudo foram colhidas por punção venosa e temporariamente armazenadas em tubo de EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético) K3. Uma pequena alíquota de sangue total foi adsorvida em papel de filtro Whatman™, (GE Healthcare, UK) e armazenada a 4°C. Uma outra fracção da amostra foi centrifugada a 4000g durante 15 minutos e o plasma foi extraído e armazenado a -20°C.

3.5. Extracção de proteínas totais de *Plasmodium falciparum*

A extracção de proteínas totais de *P. falciparum* foi realizada segundo o protocolo de Costa *et al.*, 2013.

O cultivo *in vitro* de clones de *P. falciparum* 3D7 foi realizado em meio de cultura RPMI 1640 completo, mantendo um hematócrito de 5%, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, como descrito por Costa e colaboradores (Costa *et al.*, 2013).

A cultura com cerca de 10% de parasitémia a *P. falciparum* 3D7 foi centrifugada a 9000g, durante 5 minutos à temperatura ambiente (TA). O sobrenadante foi descartado. Adicionou-se PBS gelado e voltou-se a centrifugar a 9000g, durante 5 minutos à TA, descartando-se o sobrenadante. Os eritrócitos foram lisados com saponina 0,2% (m/v) em PBS e incubados a 37°C durante 20 minutos. Fez-se uma centrifugação a 18000g, durante 10 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante. O sedimento foi lavado 3 vezes com PBS gelado, centrifugando-o a 18000g, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado. Os parasitas foram lisados com tampão de lise (120mM NaCl; 50mM Tris-HCl; 0,5% NP-40 com acerto a pH 7,8). A amostra foi homogeneizada no vórtex e centrifugada a 18000g, durante 15 minutos, a 5°C. O sobrenadante foi recuperado e armazenado a -20°C.

3.6. Quantificação de proteínas totais de *Plasmodium falciparum*

Para a quantificação das proteínas totais de *P. falciparum* utilizou-se o método de MicroBCA. Todo o procedimento foi efectuado segundo as instruções do fabricante MicroBCA™ Protein Assay Reagent Kit (Pierce Perbio, USA). As placas de

3. Materiais e Métodos

quantificação utilizadas foram da marca Brand plates[®] - pureGrade[™] (Brand, Alemanha).

3.7. Determinação de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp.

Para identificar amostras com reatividade serológica para *Plasmodium* spp. utilizou-se um kit comercial de ELISA, o *Malaria EIA Test Kit* da BioRad, USA. Este teste utiliza quatro antigénios recombinantes e consiste num ELISA indirecto que detecta anticorpos totais do tipo IgM, IgG e IgA específicos de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, em qualquer fase do ciclo de vida parasitário, em amostras de soro ou plasma humano. Segundo o fabricante, este *kit* comercial possui uma sensibilidade de 94,4% para *P. falciparum* e 100% para *P. vivax*, e uma especificidade de 96%. Para *P. ovale* e *P. malariae* a sensibilidade é de 80% e 67%, respectivamente, devido ao pequeno número de amostras analisado. Todo o processamento das amostras foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

De acordo com o fabricante, todos os ensaios foram validados e a quantificação dos anticorpos nas amostras de soro foram calculadas frente ao valor de *cut-off* cuja fórmula de cálculo foi fornecida pelo fabricante.

O *cut-off* é então a média dos valores de densidade óptica (DO) dos controlos negativos (CN) à qual se soma 0,100:

$$\frac{CN1 + CN2 + CN3}{3} + 0,100$$

Assim, amostras com DO inferior ao valor de *cut-off* foram consideradas negativas e amostras com valores de dispersão óptica superiores ao valor de *cut-off* foram consideradas positivas. Valores de dispersão óptica 10% inferiores ou 10% superiores ao valor de *cut-off* foram retestadas, tal como sugerido no manual do fabricante.

De forma a serem comparáveis entre ensaios, foi calculada a razão entre a DO das amostras e o *cut-off* de cada ensaio (DO/*cut-off*).

3. Materiais e Métodos

3.8. Determinação de anticorpos totais IgG e IgM anti-*Plasmodium falciparum*

A determinação de anticorpos específicos de *P. falciparum*, nomeadamente IgG e IgM, foi realizada com base no protocolo desenvolvido por Costa e colaboradores (Costa *et al.*, 2013). A concentração do extrato proteico (antígeno de captura) foi adaptada para as amostras a analisar. Para isso foram testadas várias concentrações de extrato e foi escolhida aquela que apresentou melhor reactividade. O anticorpo primário foi também testado em várias diluições de forma a ser conhecida a diluição necessária para que fosse evidente a diferença de DO entre amostras serologicamente reactivas e amostras serologicamente não reactivas. Esta análise foi efectuada utilizando controlos negativos, consistindo em pessoas sem qualquer estadia em zona endémica, e com controlos positivos, cuja DO era já conhecida. Tanto a procura da concentração de extrato proteico, como a escolha da diluição de anticorpo primário se encontram representadas nos gráficos 18 e 19, na secção 4.8.

Assim, foram adsorvidos 200 ng/poço de extracto proteico total de *P. falciparum*/100µl diluído em tampão bicarbonato (0.1 M, pH 8.5) e incubado *overnight* a 4°C em placa de poliestireno, de 96 poços com fundo plano (Costar™, USA). O tampão de lavagem foi 0,05% Tween-20 (v/v) em PBS 1X. O tampão de bloqueio foi 5% leite em pó (m/v) em PBS 1X. O anticorpo primário foi utilizado na diluição de 1/100 (v/v), diluído em tampão anticorpo (1% tampão de bloqueio em tampão de lavagem). O anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) (AbD Serotec®, BioRad) foi utilizado na diluição 1:10000 (v/v), em tampão anticorpo. O substrato foi 10 mg *O-Phenylenediamine dihydrochloride* (OPD) (Sigma-Aldrich, USA) em 10 mL tampão citrato (ácido cítrico 0,1M; fosfato dissódico 0,1M; 0,0001% (v/v) peróxido de hidrogénio 30% [H₂O₂], pH a 5,0). A reacção foi terminada com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4N. Para a quantificação de anticorpos anti-IgM humanos, o extracto proteico e o anticorpo primário foram utilizados nas mesmas condições usadas para a quantificação de IgG. O anticorpo secundário foi um anticorpo de cabra anti-IgM humano (Calbiochem®, Alemanha) conjugado com fosfatase alcalina, numa diluição de 1:5000 (v/v), em tampão anticorpo. O substrato utilizado foi *4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate* (Sigma-Aldrich, USA), dissolvido em tampão (1mM MgCl₂, 10% dietanolamina, a perfazer

3. Materiais e Métodos

com H₂O até 100 ml, pH 9,8). A reacção foi terminada com hidróxido de sódio (NaOH) 3N.

3.9. Imunodeteccção de proteínas de *Plasmodium falciparum* por *Western Blot*

De forma a serem detectadas as proteínas de *P. falciparum* importantes para a reatividade serológica em malária no sangue de pessoas com anticorpos anti-*P. falciparum*, recorreu-se à técnica de *Western Blot*.

Para tal, o extracto proteico total de *P. falciparum* foi aplicado a um gel de poliacrilamida a 10% e submetido à técnica de SDS-PAGE.

O conteúdo proteico do gel de poliacrilamida foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Whatman Protran[®], Alemanha) sobre a qual se executaram as reacções de *Western Blot*. Assim, a membrana foi lavada duas vezes durante 10 minutos cada, com uma solução de lavagem Tween-20 0,05% (v/v) em PBS 1X e uma vez em PBS 1X. A membrana foi cortada em tiras e cada tira foi colocada numa placa. A membrana foi bloqueada com solução de bloqueio [3% leite em pó (m/v) em PBS 1X] durante 1 hora, com agitação orbital. Posteriormente, a membrana foi novamente lavada duas vezes durante 10 minutos cada com solução de lavagem e uma vez com PBS 1X. Foi adicionado a cada tira o anticorpo primário numa diluição de 1:10 (v/v) em tampão anticorpo (1% tampão de bloqueio em tampão de lavagem), correspondente às amostras dos participantes do estudo e incubado durante 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação orbital. Novo esquema de lavagem foi efectuado e foi adicionado o anticorpo secundário a cada tira (anticorpo anti-IgG humano conjugado com HRP) (AbD Serotec[®], BioRad) diluído 1:10000 (v/v), incubado durante 1 hora, à temperatura ambiente, com agitação orbital. Posteriormente a membrana foi lavada cinco vezes com solução de lavagem e uma vez com PBS 1X, mantendo em agitação orbital. Foi adicionada a solução de desenvolvimento que consiste em DAB (3,3' – *Diaminobenzidine tablets* – SigmaFast, Sigma-Aldrich, USA) 0,5 mg/mL (m/v) em PBS 1X com 0,02% de H₂O₂, e incubada à temperatura ambiente até ao desenvolvimento de cor (2-10 minutos). A reacção foi terminada com água desionizada e deixou-se a membrana secar ao ar.

3. Materiais e Métodos

3.10. Extracção e amplificação de DNA de *Plasmodium* spp.

Para a pesquisa de ácidos nucleicos do parasita, o DNA foi extraído segundo o protocolo estabelecido por Kain e colaboradores (Kain *et al.*, 1991).

Aproximadamente 75 µl de sangue total foi adsorvido em papel de filtro Whatman™ (GE Healthcare, UK) e armazenado a 4°C. Cerca de 4µl de sangue total foi colocado em 300 µl de Chelex®100 10%, homogeneizado no vortéx durante 15 segundos. Posteriormente foi efectuada uma curta centrifugação (até atingir cerca de 18000g) e aquecido a 95°C durante 20 minutos. Posteriormente a amostra foi novamente homogeneizada no vortéx durante 15 segundos, foi efetuada nova curta centrifugação (até 18000g) e o sobrenadante foi recuperado.

A todas as extracções de DNA parasitário foi adicionado um controlo de extracção para assegurar a não contaminação entre amostras durante o processo de extracção de DNA.

Para amplificação dos ácidos nucleicos de *Plasmodium* spp. foi utilizada uma técnica de *nested*-PCR. Os *primers* utilizados foram desenhados por Snounou G. (Snounou *et al.*, 1993), estando descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados.

Sequência dos <i>primers</i>	Especificidade	Tamanho do fragmento amplificado
5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3' 5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3'	<i>Plasmodium</i> spp.	1200 bp
5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3' 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3'	<i>P. falciparum</i>	205 bp
5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3' 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3'	<i>P. vivax</i>	120 bp
5'-ATCTCTTTTGCTATTTTTAGTATTGGAGA-3' 5'-GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG-3'	<i>P. ovale</i>	800 bp
5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC-3' 5'-AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA-3'	<i>P. malariae</i>	144 bp

3. Materiais e Métodos

A mistura de reacção de PCR foi adaptada do protocolo de *MyTaqTM Blood-PCR Kit* (Bioline, UK). Assim, as quantidades utilizadas foram as seguintes (Tabela 6):

Tabela 6 – Condições da mistura de reacção

Composto	Quantidade
<i>Taq polimerase (MyTaq Blood-PCR Mix, 2x)</i>	12.5µl
<i>Primer forward</i>	1µl
<i>Primer reverse</i>	1µl
DNA	1 µl
H ₂ O	perfazer até 25µl

As condições de amplificação constam na Tabela 7:

Tabela 7 – Condições de amplificação de DNA de *Plasmodium* spp.

Etapa	Temperatura	Duração	
Desnaturação inicial	94°C	02:00 min.	
Desnaturação	94°C	00:30 min.	40 ciclos
Hibridação	55°C	01:30 min.	
Extensão	72°C	02:00 min.	
Extensão final	72°C	10:00 min.	
Armazenamento	4°C	+ ∞	

Todas as reacções de PCR foram acompanhadas de controlos positivos para garantir o sucesso da técnica, bem como controlos negativos de reacção para evitar e controlar possíveis contaminações entre as amostras e/ou entre as amostras e os controlos positivos.

3. Materiais e Métodos

3.11. Metodologia estatística

O tratamento dos dados foi realizado com recurso ao programa IBM® SPSS® *Statistics* versão 20, recorrendo também ao programa EXCEL da Windows® versão 2007 para execução de alguns gráficos.

Nos testes estatísticos utilizados para comparação e verificação de diferenças entre variáveis utilizou-se um nível de significância de 5% para a probabilidade máxima de erro na rejeição da hipótese nula, quando esta hipótese é verdadeira. Considerou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas sempre que $p < 0,05$.

Na metodologia estatística foram utilizadas as seguintes técnicas de análise (Murteira, 1993, Siegel and Castellan, 1988):

- 1) Análise descritiva;
- 2) Testes de hipóteses estatísticas: Teste Qui-Quadrado (utilizado para verificar a homogeneidade), Teste de Mann-Whitney (para comparar medianas de variáveis em escala quantitativa, utilizado em alternativa ao Teste T-Student para duas amostras independentes, uma vez que não se verificaram os pressupostos teóricos de aplicabilidade de T-Student).

3.12. Considerações éticas

O protocolo de estudo relativo a este trabalho foi submetido e aprovado pelo Conselho de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Parecer nº 03-2014-TM) (Anexo D).

Em todas as fases do estudo o anonimato dos participantes e a confidencialidade dos dados foram mantidos, através da geração de códigos entre o questionário, o consentimento informado assinado e as amostras laboratoriais. Os resultados serológicos foram comunicados aos participantes.

Para todos os participantes com resultado serológico positivo no teste comercial ELISA para *Plasmodium* spp., foi efectuada uma reacção de PCR, de modo a averiguar

3. Materiais e Métodos

a existência de infecção. Os indivíduos com positividade na PCR foram observados em consulta médica no IHMT.

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente. Os resultados dessa análise estatística serão divulgados junto da comunidade científica.

4. Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

Os dados de caracterização sociodemográfica da população, as informações relativas às estadias/viagens a zona endémica de malária, bem como acerca de episódios anteriores de malária, apresentados nas tabelas e nos gráficos seguintes, foram obtidos a partir do questionário auto-preenchido, aplicado aos participantes no momento da colheita. Essas informações foram relacionadas com a presença ou ausência de anticorpos anti-*Plasmodium* spp., a fim de se averiguar a existência de associações e/ou diferenças estatísticas entre variáveis.

As amostras serologicamente positivas para anticorpos anti-*Plasmodium* spp. foram analisadas quanto às subclasses de imunoglobulinas. Para além disso, foram realizados ensaios de imunodeteção de antígenos específicos de *P. falciparum*, responsáveis por essa reactividade.

4.1. Caracterização sociodemográfica da população estudada

Neste estudo participaram 321 indivíduos, 71% do género masculino (228/321) e 29% do género feminino (93/321). A média das idades foi de 48,47 anos, com SD=15,326 anos, min.=23 anos e max.=85 anos, P₂₅=36 anos, P₅₀=48 anos e P₇₅=62 anos. A moda para a idade foi de 26 anos.

Relativamente à naturalidade (Gráfico 4), 72,4% (228/315) dos participantes nasceram em Portugal; 15,2% (48/315) nasceram em Angola; 4,1% (13/315) em Moçambique; 2,2% (7/315) em Cabo Verde; 1,6% (5/315) na Guiné-Bissau; 1,3% (4/322) em São Tomé e Príncipe; 0,6% (2/315) no Brasil e 2,5% (8/315) são naturais de países de língua oficial não portuguesa, onde se incluem África do Sul, Congo, França, Itália, Moldávia, Reino Unido, Roménia e Ucrânia.

4. Resultados e Discussão

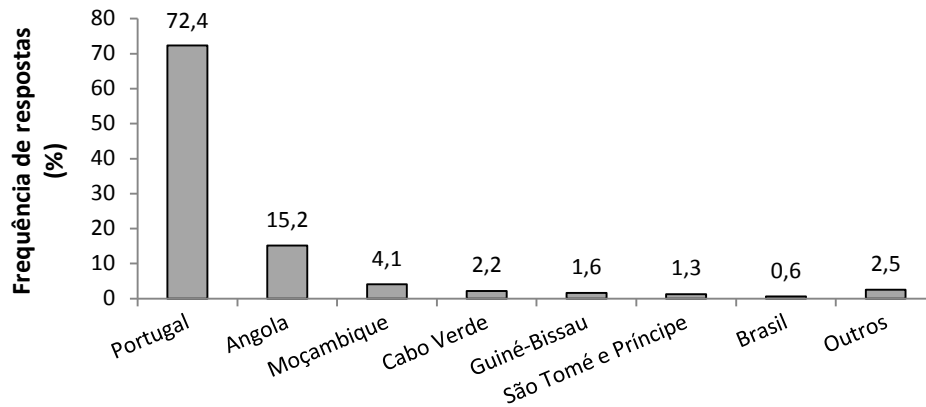


Gráfico 4 – Naturalidade dos respondentes (n= 315).

4.2. Estadias/viagens a zonas endémicas de malária

Considerando o número de estadias/viagens a zonas endémicas (Gráfico 5), verifica-se que 37,5% dos respondentes (107/285) fizeram uma única estadia/viagem a zona endémica; 42,5% (119/285) fizeram 2 a 9 estadias/viagens a zona endémica e 20% (57/285) responderam terem permanecido/viajado 10 ou mais vezes para zonas endémicas de malária.

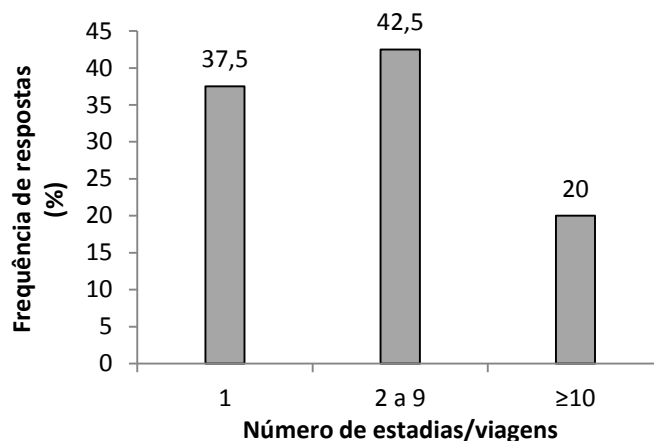


Gráfico 5 – Número de estadias/viagens a zona endémica de malária (n=285).

No que respeita ao intervalo de tempo entre a última estadia/viagem a zona endémica de malária e a participação no estudo (Gráfico 6), constata-se que a maioria dos indivíduos (206/319) efectuou a sua última estadia/viagem nos 6 meses anteriores à

4. Resultados e Discussão

sua participação no estudo, seguindo-se o grupo que regressou há 40 ou mais anos (56/319).

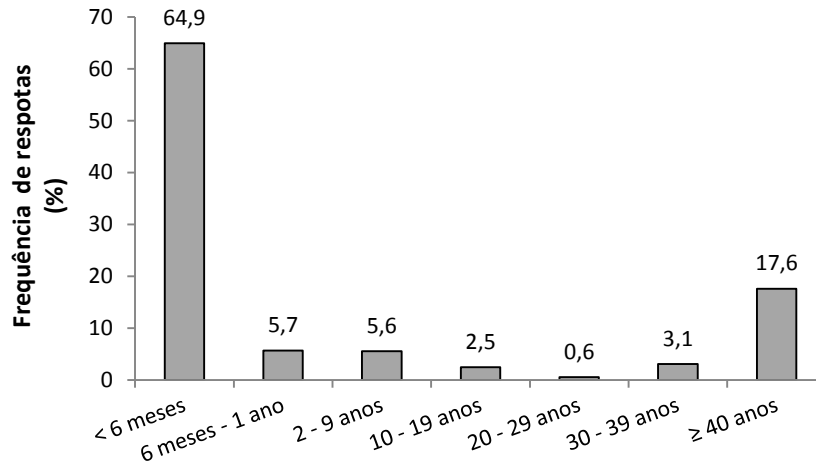


Gráfico 6 – Intervalo de tempo decorrido entre a última estadia/viagem a zona endémica de malária e a participação dos respondentes no estudo (n=319).

4.3. Caracterização do grupo de indivíduos com uma só estadia/viagem a zona endémica de malária

Dos indivíduos com uma só estadia/viagem a zona endémica de malária, os principais países de estadia foram Angola, Moçambique, Guiné-Bissau e Cabo Verde (Gráfico 7). Os principais motivos da realização da estadia/viagem foram Residência/Trabalho e Serviço Militar (Gráfico 8).

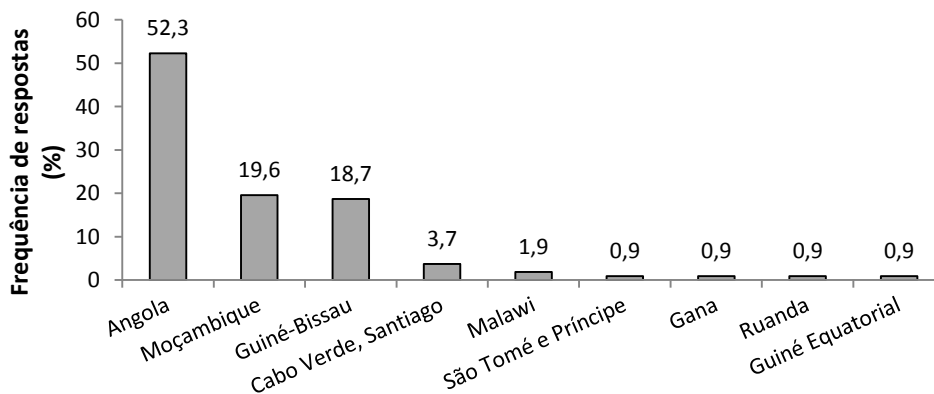


Gráfico 7 – País de estadia, nos indivíduos com uma estadia/viagem a zona endémica de malária (n=107).

4. Resultados e Discussão

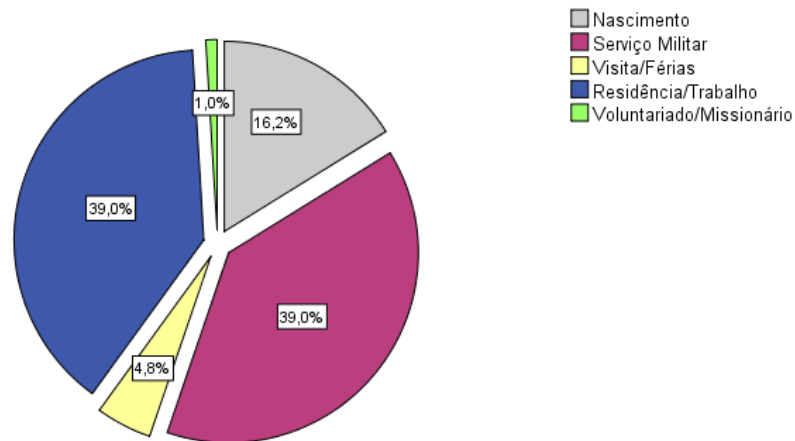


Gráfico 8 – Motivo pelo qual os respondentes estiveram para zona endémica de malária, nos indivíduos com uma estadia/viagem a zona endémica de malária (n=105).

No que respeita à duração da estadia/viagem (Gráfico 9), a maioria dos participantes apresenta estadias superiores a 6 meses, destacando-se o grupo de indivíduo com estadias de 2 – 5 anos.

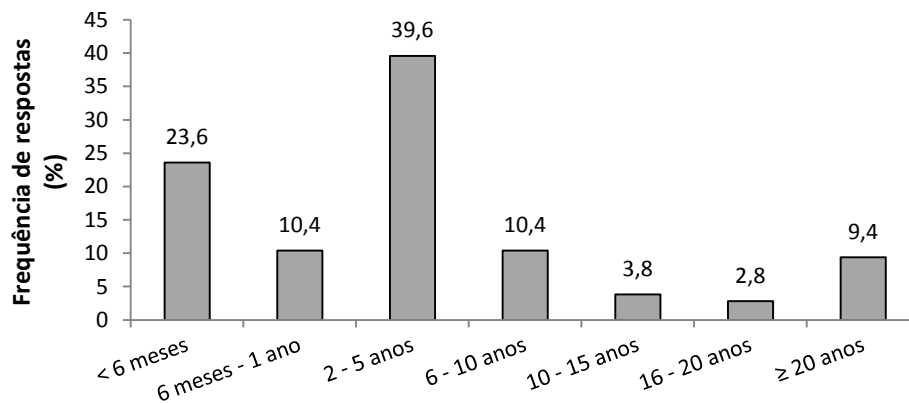


Gráfico 9 – Duração da estadia nos indivíduos com uma estadia/viagem a zona endémica de malária (n=106).

Relativamente ao intervalo de tempo decorrido entre a estadia/viagem a zona endémica de malária e a participação no estudo (Gráfico 10), evidenciam-se dois grupos principais: o grupo de indivíduos cujo regresso ocorreu nos 6 meses anteriores à participação no estudo e o grupo de indivíduos com regresso de zona endémica há 40 ou mais anos antes da participação no estudo.

4. Resultados e Discussão

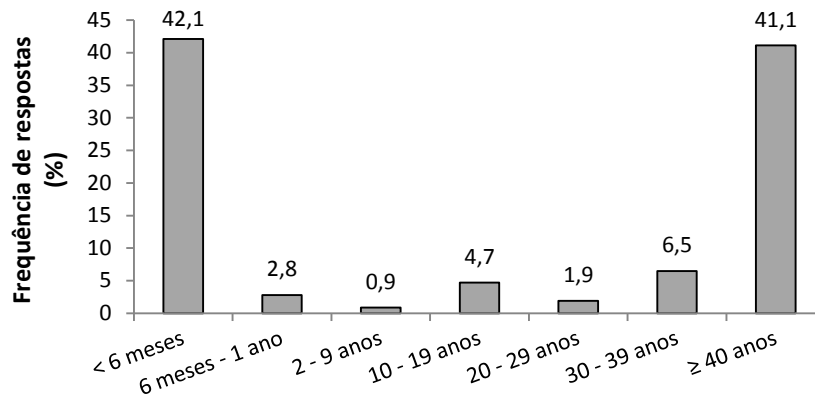


Gráfico 10 – Intervalo de tempo decorrido entre a estadia/viagem a zona endêmica de malária e a participação dos respondentes no estudo, nos indivíduos com uma estadia/viagem a zona endêmica de malária (n=107).

4.4. Caracterização do grupo de indivíduos com mais do que uma estadia/viagem a zona endêmica de malária

O país mais referido de estadia/viagem pelos indivíduos com mais do que uma estadia/viagem (Gráfico 11) é semelhante ao país de estadia do grupo de indivíduos com uma estadia/viagem (Gráfico 12), destacando-se os países africanos de língua oficial portuguesa como destino principal.

Na categoria “Outros” encontram-se países com pouca representação como Arábia Saudita, Belize, Cambodja, Chade, Congo, Costa Rica, Gabão, Guiné, Guiné Equatorial, Malásia, Mauritânia, Namíbia, Nepal, Paquistão, República do Congo, Ruanda, Suazilândia, Serra Leoa e Vietname.

4. Resultados e Discussão

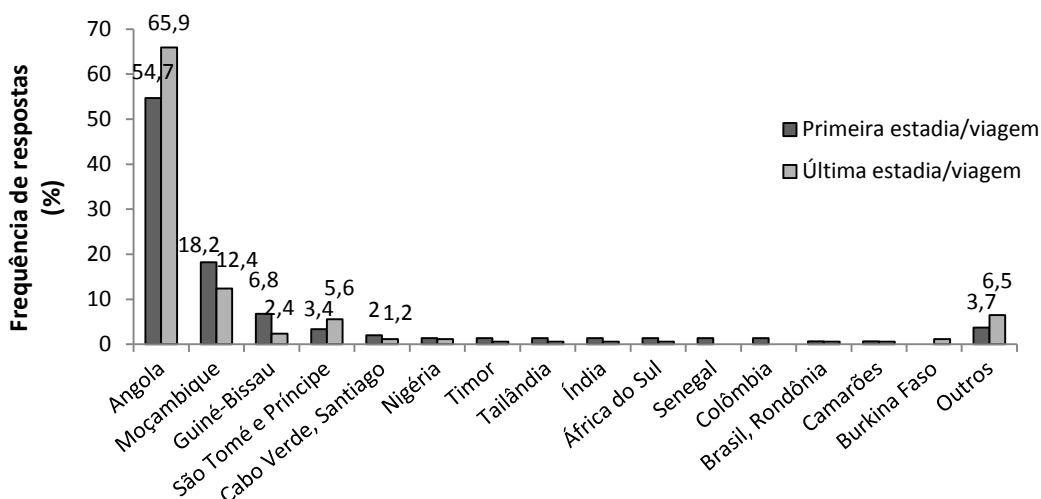


Gráfico 11 - Países de estadia/viagem, nos indivíduos com mais de uma estadia/viagem a zona endémica de malária (Primeira estadia/viagem: n=148; Última estadia/viagem: n=170).

No que respeita ao motivo das estadias/viagens (Gráfico 12), existe um número mais elevado de respostas na categoria “Residência/Trabalho” relativamente às restantes categorias, verificando-se um aumento acentuado da percentagem de indivíduos que referem este motivo de viagem na última deslocação a zona endémica de malária.

A categoria “Nascimento” refere-se a indivíduos que nasceram em zona endémica de malária, sendo esse o seu motivo de estadia em determinado país, independentemente do tempo que o indivíduo permaneceu no seu país de nascimento.

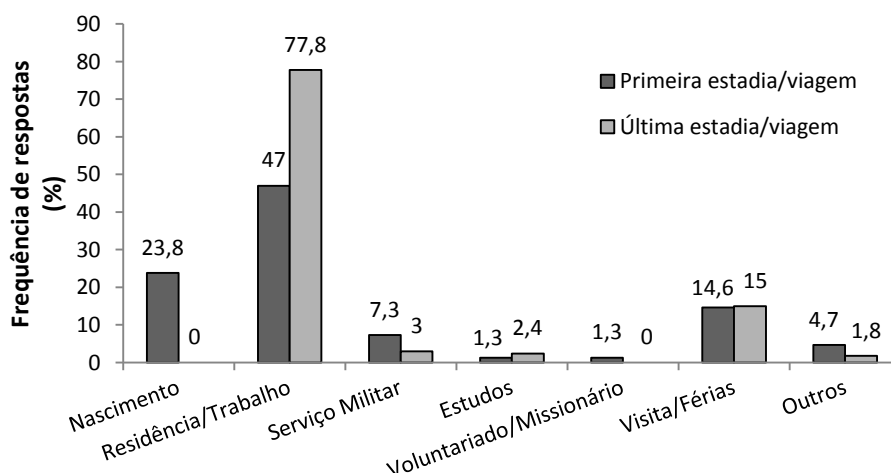


Gráfico 12 – Motivo pelo qual os respondentes viajaram para zona endémica de malária, nos indivíduos com mais de uma estadia/viagem a zona endémica de malária (Primeira estadia/viagem: n=151; Última estadia/viagem: n=167).

4. Resultados e Discussão

Enquanto que a duração da estadia/viagem no grupo com apenas uma estadia/viagem a zona endémica de malária se verificava um número elevado de respostas nas estadias de 2 a 5 anos (Gráfico 9), nos indivíduos com mais do que uma estadia/viagem quer a primeira como a última estadia/viagem apresentam maior número de respostas para as viagens inferiores a 6 meses (Gráfico 13). Este facto pode estar relacionado com a população que, por motivos profissionais faz viagens frequentes e de curta duração para zonas endémicas de malária, que são zonas coincidentes com os países de baixa renda para onde se tem observado um grande influxo de pessoas a partir da Europa. Estas observações vão ao encontro dos dados do Gráfico 14. A partir do elevado número de respostas relativamente ao regresso dos indivíduos de zona endémica nos 6 meses anteriores à participação no estudo, pode-se extrapolar e corroborar o perfil do grupo de indivíduos anteriormente sugerido: participantes que fazem estadias/viagens frequentes e de duração inferior a 6 meses a zonas tropicais, por motivos profissionais, sendo Angola e Moçambique os países que mais visitantes recebem, dois países com os quais Portugal mantém relações de proximidade, provavelmente devido a factores históricos e culturais (Fonseca *et al.*, 2014).

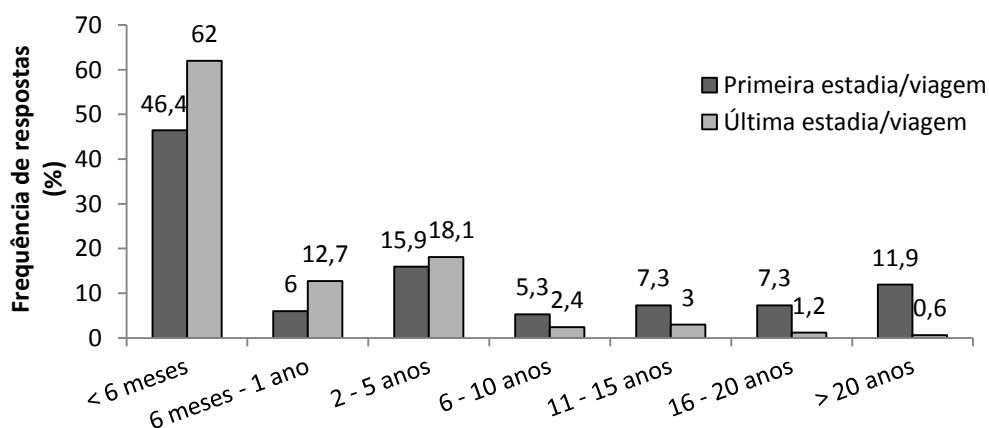


Gráfico 13 – Duração da(s) estadia(s)/viagem(ns), nos indivíduos com mais de uma estadia/viagem a zona endémica de malária (Primeira estadia/viagem: n=151; Última estadia/viagem: n=166).

4. Resultados e Discussão

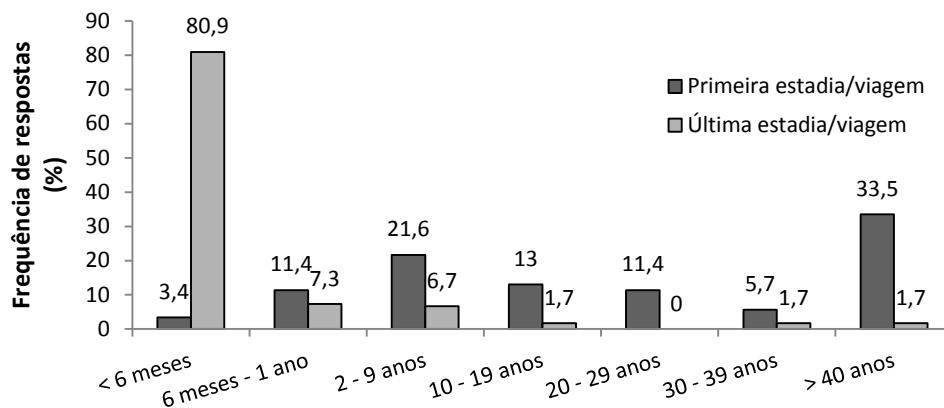


Gráfico 14 – Intervalo de tempo entre o regresso de zona endémica e a participação no estudo, nos indivíduos com mais de uma estadia/viagem a zona endémica de malária (Primeira estadia/viagem: n=178; Última estadia/viagem: n=176).

4.5. Caracterização das estadias/viagens relativamente à variável “história de malária”

De acordo com as respostas dos participantes, dos indivíduos que realizaram uma estadia/viagem 60,7% (65/284) reportaram episódios de malária. Do grupo de indivíduos com 2 a 9 estadias/viagens 54,5% (64/284) responderam terem tido episódios de malária, enquanto que do grupo de indivíduos com 10 ou mais estadias/viagens 53,6% (30/284) responderam que tiveram malária em algum momento da sua vida (Gráfico 15).

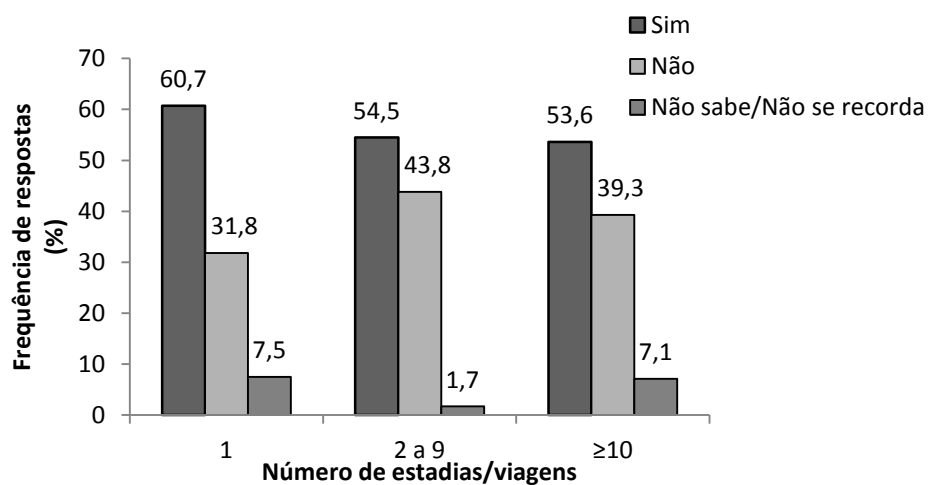


Gráfico 15 – Percentagem de respondentes com ou sem história de malária, de acordo com o número de estadias/viagens (n=284)

4. Resultados e Discussão

Relativamente ao número de episódios de malária nos subgrupos da variável “número de viagens/estadias” (Gráfico 16), o subgrupo dos indivíduos que realizaram uma estadia/viagem e o grupo dos indivíduos com 2 a 9 estadias/viagens apresentam um número idêntico da totalidade de episódios de malária. No entanto, enquanto no grupo de indivíduos com uma estadia/viagem existe mais indivíduos com apenas um episódio de malária reportado, no grupo dos indivíduos que estiveram 2 a 9 vezes em zona endémica existem mais indivíduos que tiveram malária 2 a 9 vezes. No grupo dos indivíduos com 10 ou mais estadias/viagens a zonas endémicas de malária, o número de episódios reportados é menor. Estes dados sugerem que os episódios de malária tendem a diminuir com o aumento das estadias/viagens a zonas endémicas de malária. Apesar de existirem estudos que corroboram esta tendência, os dados aqui apresentados possuem como limitação o viés de memória que poderá ter sido introduzido aquando do preenchimento dos questionários pelos participantes, e que poderá influenciar o resultado final.

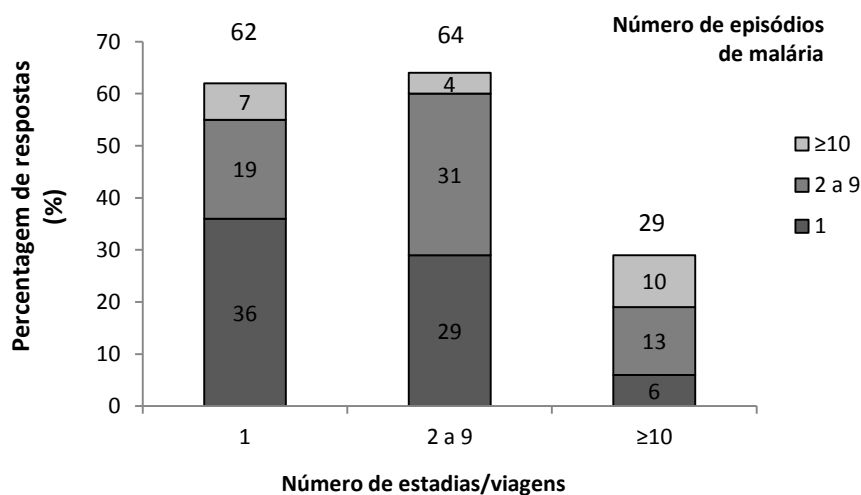


Gráfico 16 – Distribuição dos participantes no estudo de acordo com o número de episódios de malária e o número de estadias/viagens a zona endémica de malária (n=155).

4. Resultados e Discussão

4.6. Determinação de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp.

Amostras de plasma dos indivíduos participantes foram estudadas quanto à presença de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp. A técnica serológica utilizada foi um teste comercial de ELISA indirecto (*Malaria EIA Test Kit*, BioRad, USA) (ver secção 3.7).

Os resultados obtidos pelo teste comercial ELISA encontram-se apresentados no Gráfico 17.

A população serologicamente positiva possui um valor de relação $DO/cut-off$ superior a uma unidade, enquanto que a população serologicamente negativa apresenta um valor de relação $DO/cut-off$ inferior a uma unidade. Amostras cujo valor de DO é 10% inferior ou 10% superior ao *cut-off* do ensaio respectivo foram consideradas indeterminadas, segundo as instruções do fabricante (ver secção 3.7). Assim, obtiveram-se 76 amostras com reactividade serológica para *Plasmodium* spp., 242 amostras sem reactividade serológica e 3 amostras foram consideradas indeterminadas (Gráfico 17).

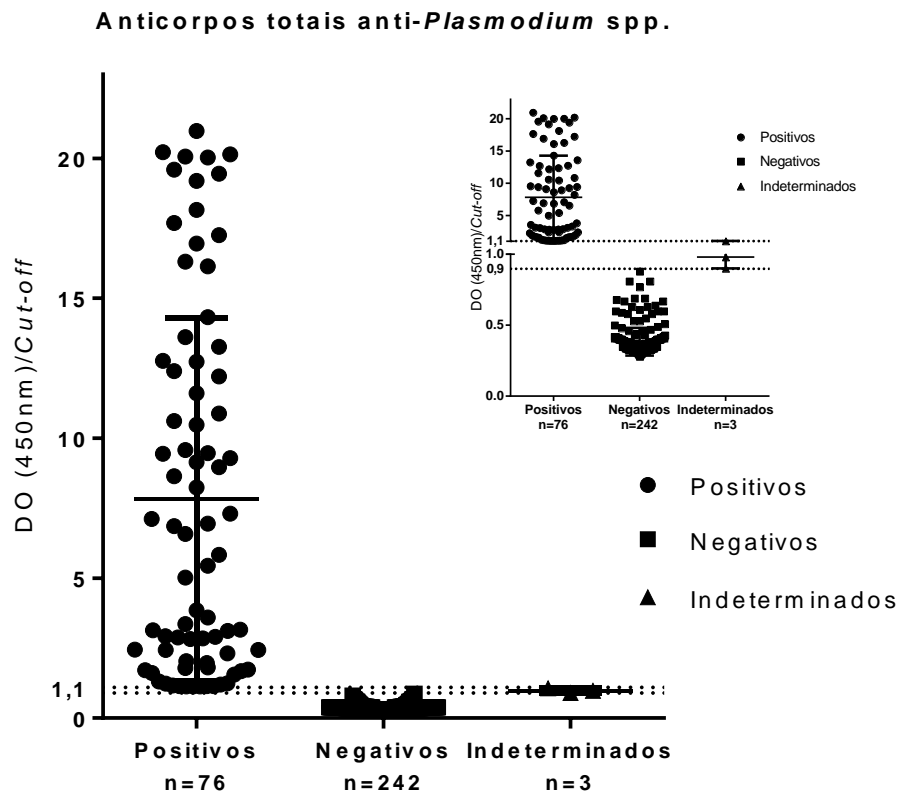


Gráfico 17 – Resultado do ensaio serológico utilizando o teste comercial ELISA anti-*Plasmodium* spp., na totalidade das amostras (n=321).

4. Resultados e Discussão

Quando confrontado o resultado do teste ELISA com a resposta à variável “história de malária” (Tabela 8) verifica-se que 84% dos indivíduos com serologia positiva responderam ter tido malária, enquanto 16% de indivíduos disseram não ter episódios de malária, sendo discrepante dos resultados do teste ELISA (que indica história de infecção por *Plasmodium* spp.). Uma quantidade elevada de respondentes com serologia negativa dissera ter tido malária. Isto pode dever-se a vários factores: 1) o(s) episódio(s) de malária foi há um intervalo de tempo suficiente para já não serem detectados anticorpos anti-*Plasmodium* spp.; 2) existe reactividade serológica em níveis não detectados pelo teste; 3) é o reflexo do viés de memória mencionado anteriormente; 4) os indivíduos que responderam não ter tido malária, mas apresentam serologia positiva, podem ter experienciado infecções assintomáticas, tendo conseguido controlar a parasitémia por já possuírem alguma imunidade específica desenvolvida. Outros estudos reportam o mesmo perfil de respostas, relativamente às duas variáveis aqui analisadas (Mamo *et al.*, 2013, Pratt-Riccio *et al.*, 2005).

Tabela 8 – Resultado do ensaio serológico utilizando o teste comercial ELISA anti-*Plasmodium* spp., na totalidade das amostras, relacionado com as respostas sobre história de episódios de malária (n=319).

		Serologia <i>Plasmodium</i> spp.	
		Positivo (%)	Negativo (%)
História de malária	Sim	84	50,6
	Não	16	43,2
	Não sabe/Não se recorda	0	6,2

Para o total da população estudada, procuraram-se associações ou diferenças estatísticas entre a variável “Resultado serológico positivo ou negativo para *Plasmodium* spp.” e as variáveis “Número de estadias/viagens” e “Tempo de estadia após nascimento em zona endémica”. Em ambas as relações não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis ($p=0,326$; $p=0,146$, respectivamente).

Para a análise estatística dos resultados sociodemográficos foram tidos em consideração dois grupos de indivíduos: consideraram-se como *visitantes* os indivíduos

4. Resultados e Discussão

que permaneceram/viajaram para zonas endémicas de malária por períodos inferiores a 6 meses e como *residentes* os indivíduos cuja(s) estadia(s)/viagem(ns) ocorreram por um período superior a 6 meses.

Considerando os indivíduos com uma estadia/viagem a zona endémica de malária, procuraram-se associações ou diferenças entre a variável “Resultado serológico positivo ou negativo para *Plasmodium* spp.”, relativamente às variáveis “Duração da estadia/viagem a zona endémica de malária”, “Intervalo de tempo desde o último episódio de malária e a participação no estudo” e “Intervalo de tempo decorrido desde o regresso de zona endémica de malária e a participação no estudo”.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos com resultado serológico positivo e negativo relativamente às seguintes variáveis (no grupo de indivíduos com uma estadia/viagem):

- 1) “Duração da estadia/viagem a zona endémica de malária” $\rho=0,170$;
- 2) “Intervalo de tempo desde o último episódio de malária e a participação no estudo” $\rho=0,584$;
- 3) “Intervalo de tempo decorrido desde o regresso de zona endémica de malária e a participação no estudo” $\rho=0,910$.

Tendo em conta os indivíduos com mais de uma estadia/viagem a zona endémica de malária, procuraram-se associações ou diferenças entre a variável “Resultado serológico positivo ou negativo para *Plasmodium* spp.”, em relação às variáveis “Motivo da última estadia/viagem”, “Duração da última estadia/viagem”, “Intervalo de tempo desde o último episódio de malária e a participação no estudo” e “Intervalo de tempo decorrido desde o regresso de zona endémica de malária e a participação no estudo”.

Neste grupo de indivíduos, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos com resultado serológico positivo ou negativo relativamente às seguintes variáveis estudadas:

- 1) “Última estadia/viagem por motivo de Residência/Trabalho ou Visita/Férias” $\rho=0,643$;
- 2) “Duração da última estadia/viagem” $\rho=0,168$;

4. Resultados e Discussão

- 3) “Intervalo de tempo desde o último episódio de malária e a participação no estudo” $\rho=0,575$;
- 4) “Intervalo de tempo decorrido desde o regresso de zona endémica de malária e a participação no estudo” $\rho=0,158$.

Não se procuraram relações estatísticas entre as variáveis “Resultado serológico positivo e negativo para *Plasmodium* spp.” e a duração e motivo da primeira estadia/viagem a zona endémica de malária, nos indivíduos com mais do que uma estadia. Esta deliberação tem por base a convicção de que estas não são variáveis adequadas para testar a sua eventual associação com a presença ou ausência de anticorpos anti-*Plasmodium* spp.

A Tabela 9 mostra a distribuição percentual dos participantes no estudo com resultado serológico positivo e negativo, de acordo com as variáveis “Naturalidade”; “Número de estadias/viagens a zona endémica”; “Intervalo de tempo decorrido desde o regresso de zona endémica de malária e a participação no estudo”; “Motivo da única/última estadia/viagem a zona endémica”; “Duração da única/última estadia” e “Intervalo de tempo desde o último episódio de malária e a participação no estudo”. Estas foram as variáveis seleccionadas por já terem sido sugeridas como factores relacionados com a variação da persistência/longevidade dos anticorpos anti-*Plasmodium* spp. (Faddy *et al.*, 2013, Fowkes *et al.* 2012).

4. Resultados e Discussão

Tabela 9 – Distribuição dos participantes no estudo, de acordo com o resultado serológico no teste comercial ELISA para *Plasmodium* spp.

	Elisa <i>Plasmodium</i> spp.			
	Positivo n=76		Negativo n=242	
		(%)		(%)
Naturalidade				
Portugal	38	52,1	187	78,2
País endémico de malária	34	46,5	45	18,9
Outros	1	1,4	7	2,9
Nº estadias/viagens a zona endémica				
1	23	41,8	83	36,7
2 a 9	19	33,9	101	44,5
≥10	14	25,5	43	19
Intervalo de tempo decorrido desde o regresso de zona endémica de malária e a participação no estudo				
< 6 meses	45	60,8	161	66,5
6 meses – 1 ano	5	6,8	13	5,4
2 – 9 anos	5	6,8	12	5
10 – 19 anos	1	1,4	7	2,9
20 – 29 anos	1	1,4	1	0,4
30 – 39 anos	2	2,7	8	3,3
≥ 40 anos	15	20,3	40	16,5
Motivo da única/última estadia/viagem a zona endémica				
Nascimento	6	9,4	11	4,7
Residência/Trabalho	37	57,8	149	63,9
Serviço Militar	13	20,3	41	17,6
Visita/Férias	7	10,9	24	10,3
Outros	1	1,6	8	3,4
Duração da única/última estadia/viagem a zona endémica				
< 6 meses	17	28,3	114	49,4
6 meses – 1 ano	5	8,3	27	11,7
> 1 ano	38	63,4	90	38,9
Intervalo de tempo desde o último episódio de malária e a participação no estudo				
< 6 meses	24	39,3	49	40,8
6 meses – 1 ano	9	14,8	15	12,5
2 – 9 anos	8	12,8	13	10,8
≥ 10 anos	20	33,1	43	35,9

Como se pode verificar na Tabela 9, o número de indivíduos com resultado serológico positivo é idêntico entre os participantes naturais de zona endémica de malária e os participantes nascidos em zona não endémica.

4. Resultados e Discussão

Relativamente ao resultado serológico positivo e o número de estadias/viagens, verifica-se que a percentagem de indivíduos com positividade serológica decresce com o aumento do número de estadias/viagens a zona endémica de malária.

No que respeita ao intervalo de tempo decorrido entre o regresso de zona endémica e a participação no estudo, observa-se uma maior percentagem de indivíduos com positividade serológica para *Plasmodium* spp. nos indivíduos cujo regresso ocorreu há um período de tempo inferior a 6 meses, seguido do grupo de indivíduos com regresso há 40 ou mais anos.

Relativamente ao motivo da única/última estadia/viagem, existe uma maior percentagem de indivíduos com serologia positiva nos grupos que viajaram por motivos de Residência/Trabalho e para cumprimento de Serviço Militar.

Em relação à duração da única/última estadia/viagem a zona endémica, é o grupo com estadias superiores a 1 ano quem apresenta maior percentagem de indivíduos com positividade serológica.

No que respeita ao historial de malária, são o subgrupo dos indivíduos que tiveram malária nos 6 meses anteriores ao estudo, bem como o subgrupo dos indivíduos com história de malária há 10 ou mais anos, que apresentam maior percentagem de indivíduos serologicamente positivos para *Plasmodium* spp.

Todos os indivíduos serologicamente positivos no teste comercial ELISA foram analisados quanto à presença de *Plasmodium* spp. em fase sanguínea por PCR, à presença de anticorpos específicos de *P. falciparum* e, aos serologicamente positivos específicos para IgG total anti-*P. falciparum*, foi realizada a imunodeteção de antígenos de *P. falciparum*, responsáveis pela resposta serológica.

4.7. Pesquisa de DNA de *Plasmodium* spp.

De forma a serem detectadas infecções actuais nos indivíduos serologicamente positivos para *Plasmodium* spp., foi efectuada a pesquisa de DNA de *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. ovale* no sangue dos participantes, por *nested*-PCR.

4. Resultados e Discussão

Apenas oito indivíduos foram positivos, tendo sido detectado DNA de *P. falciparum*. Estes eram indivíduos com sintomatologia, tendo regressado de zona endémica de malária nos 6 meses anteriores ao estudo. Assim sendo, não se verificaram resultados de PCR positivos nos indivíduos assintomáticos.

Os resultados das reacções de PCR, bem como a caracterização dos indivíduos positivos encontram-se apresentados em anexo (ANEXO E e F, respectivamente).

As amostras positivas por PCR indicam infecção actual e as amostras negativas com serologia positiva corresponderão a indivíduos com infecção ocorrida no passado.

4.8. Determinação de anticorpos totais IgG anti-*Plasmodium falciparum*

As amostras serologicamente positivas para *Plasmodium* spp. foram analisadas quanto à reactividade serológica específica de *P. falciparum*. Para tal, o protocolo de Costa R. (Costa *et al.*, 2013) (ver secção 3.8) foi ajustado às amostras em estudo, no que respeita à concentração de extrato total proteico, necessário para se obter uma boa reactividade serológica, e à diluição de anticorpo primário (amostra), de forma a conseguir-se uma boa diferenciação entre amostras serologicamente reactivas e amostras não reactivas.

Nos ensaios foram utilizados dois controlos negativos (C1 e C9) e dois controlos positivos (I85, I138).

O resultado do ensaio para determinação da concentração de extracto total proteico é apresentada no Gráfico 18. O resultado do ensaio para determinação da diluição de anticorpo primário a utilizar encontra-se representado no Gráfico 19.

4. Resultados e Discussão

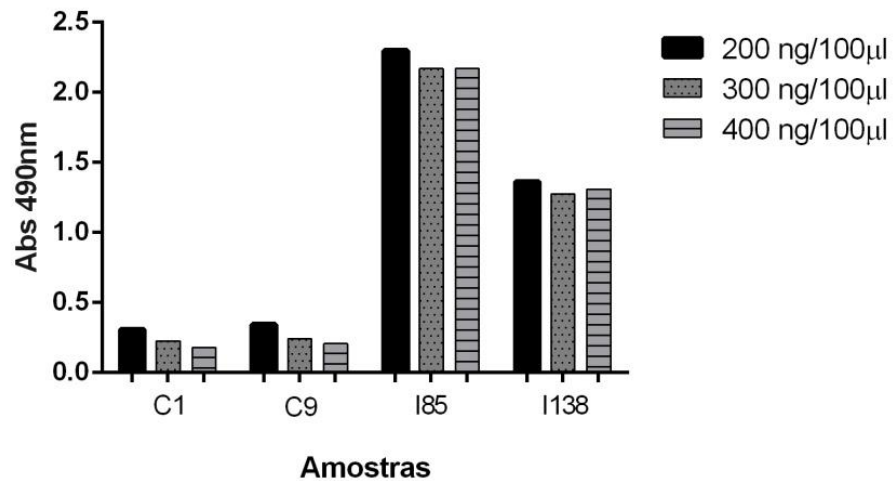


Gráfico 18 – Determinação da concentração de extracto proteico total a utilizar nos ensaios para determinação da reactividade serológica específica de *P. falciparum*.

A concentração de extracto proteico total escolhida para a realização dos ensaios foi de 200ng/100µl, tendo em consideração vários factores: 1) não limita a reacção antigénio-anticorpo, sendo a concentração saturante da reacção, que é possível observar no Gráfico 18 que quando se aumenta a concentração de extrato proteico, a reactividade dos controlos positivos não aumenta; 2) existe uma clara diferença entre a reactividade serológica dos controlos negativos e a reactividade serológica dos controlos positivos, permitindo validar o ensaio.

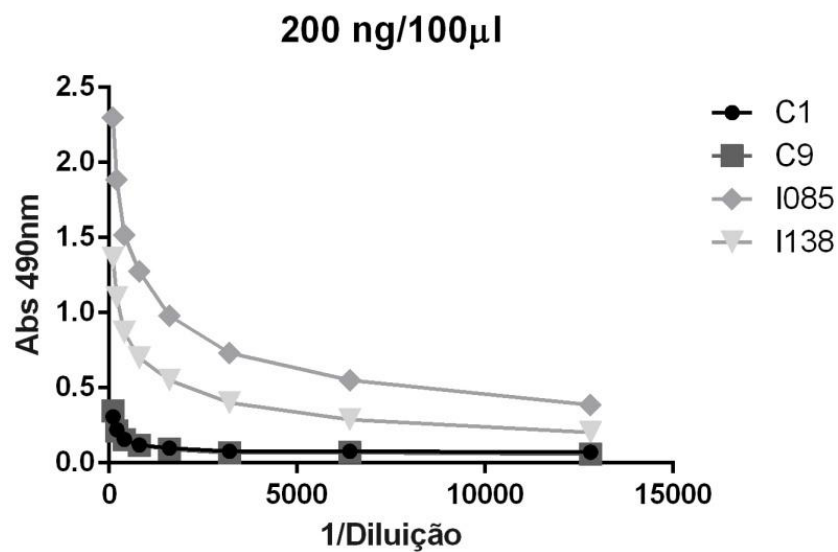


Gráfico 19 – Determinação da diluição de anticorpo primário a utilizar nos ensaios para determinação da reactividade serológica específica de *P. falciparum*.

4. Resultados e Discussão

Relativamente à diluição de anticorpo primário a usar, a diluição escolhida foi 1:100, uma vez que permite uma boa separação entre a reactividade serológica dos controlos negativos e a reactividade serológica dos controlos positivos (Gráfico 19).

Para se determinar a positividade ou a negatividade serológica de *P. falciparum* nas amostras foi necessário estabelecer um ponto de referência (*cut-off*), pelo qual se conseguem distinguir as amostras serologicamente reactivas das amostras serologicamente não reactivas.

O *cut-off* é dado pela média das absorvâncias corrigidas dos controlos negativos (em cada ensaio), à qual se soma uma ponderação de desvio-padrão (SD). Deste modo, foi realizado um ensaio com três controlos negativos (soros de indivíduos sem qualquer estadia em zona endémica de malária) e com três das amostras mais reactivas no teste comercial ELISA (que se consideraram controlos positivos), para se determinar o valor de ponderação do SD. A partir da média dos três controlos negativos foram calculados cinco pontos de *cut-off*, desde a ponderação de +1SD a +5SD. Para cada um desses pontos de *cut-off* foram calculadas a sensibilidade e a especificidade do ensaio (Gráfico 20) (utilizando os controlos negativos e os controlos positivos), de forma a obtermos a ponderação de SD a aplicar ao *cut-off* de cada ensaio, tornando os resultados de cada ensaio comparáveis entre si. Assim, adoptou-se a ponderação de +2SD (cujas sensibilidade e especificidade são de 100%), por ser o valor mínimo no qual se consegue um equilíbrio entre a sensibilidade e a especificidade do teste. A fórmula estabelecida para o cálculo do *cut-off* foi a seguinte:

$$cut-off = \frac{CN1+CN2+CN3}{3} \pm 2SD$$

4. Resultados e Discussão

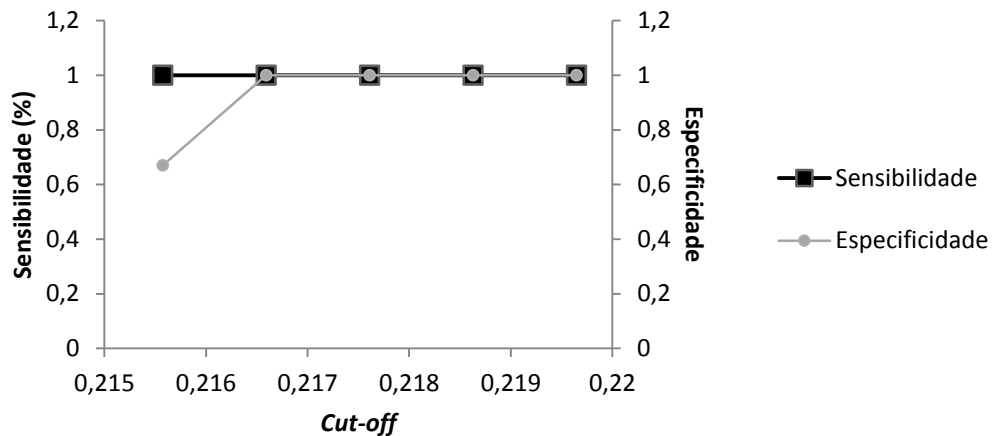


Gráfico 20 - Resultado do ensaio serológico para cálculo da sensibilidade e especificidade da técnica de ELISA para *P. falciparum*, para determinação do *cut-off* e respectivo factor de ponderação de SD.

Na análise dos resultados foram utilizados os seguintes critérios: amostras cujo resultado da razão $DO/cut-off$ se encontra 10% inferior ou 10% superior a 1 foram consideradas indeterminadas. Por conseguinte, são consideradas positivas todas as amostras cuja razão entre o valor de absorvância e o *cut-off* seja superior a 1,10. Da mesma forma, amostras cuja razão $DO/cut-off$ seja inferior a 0,90 são consideradas negativas. Os resultados serológicos encontram-se apresentados no Gráfico 21.

Dos 76 indivíduos positivos no teste comercial ELISA para *Plasmodium* spp., 51 foram positivos para anticorpos IgG anti-*P. falciparum*, 12 foram negativos e 13 amostras foram consideradas indeterminadas. O aumento do número de amostras indeterminadas relativamente aos resultados obtidos pelo teste comercial ELISA pode ter que ver com o facto de no teste comercial serem utilizados apenas quatro antígenos recombinantes (*Malaria EIA Test Kit*, Biorad, USA) adsorvidos à placa ELISA, enquanto que no ELISA específico de *P. falciparum* é utilizado extrato total.

4. Resultados e Discussão

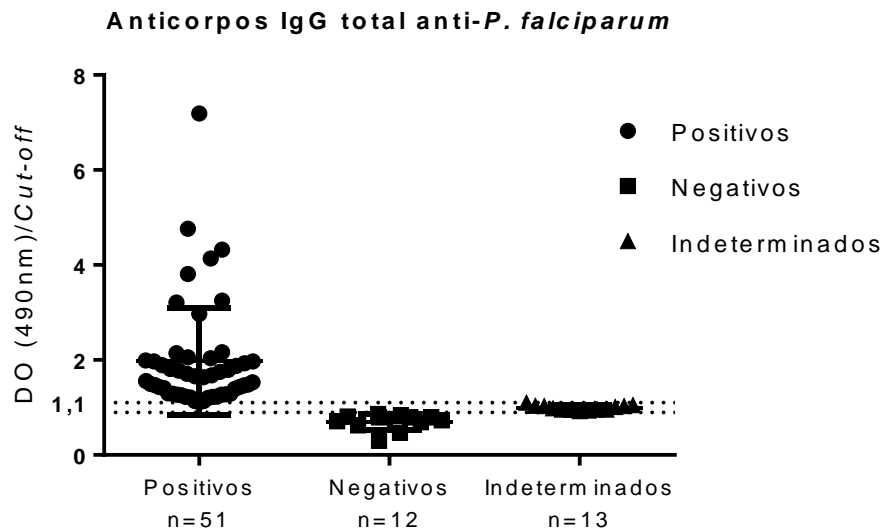


Gráfico 21 – Resultado do ensaio serológico para determinação da reactividade a IgG total anti-*P. falciparum*, nas amostras serologicamente reactivas pelo teste comercial ELISA anti-*Plasmodium* spp. (n=76).

Quando os resultados dos ensaios serológicos para determinação de anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp. e anticorpos IgG total anti-*P. falciparum* são contrapostos com o intervalo de tempo desde a última estadia em zona endémica de malária até à participação no estudo (Gráfico 22), verifica-se que a IgG detectada nestes ensaios se reporta principalmente a infecções que ocorreram nos últimos 10 anos, bem como há 40 – 50 anos atrás. Resultados similares foram descritos por Ferreira, 2013 e Faddy *et al.*, 2013.

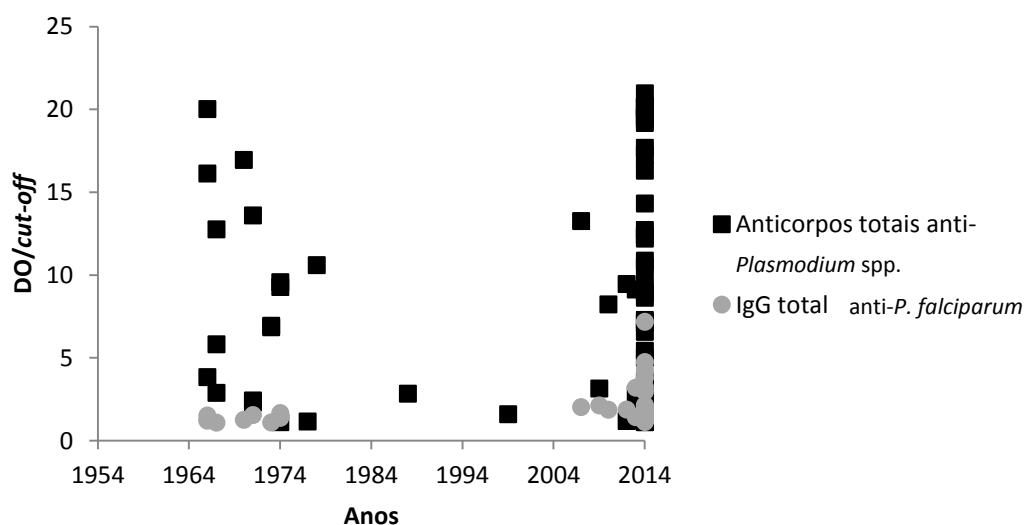


Gráfico 22 – Distribuição de tipos de imunoglobulinas detectadas, de acordo com o ano da última estadia em zona endémica de malária.

4. Resultados e Discussão

Faddy e colaboradores (2013) demonstraram também que a persistência de anticorpos anti-*Plasmodium* spp. tende a ser maior em residentes (estadias superiores a 6 meses) do que em visitantes (indivíduos com estadias inferiores a 6 meses) (Faddy *et al.*, 2013).

Assim, na tentativa de se identificar esses anticorpos, bem como de se compreender a natureza biológica dos mesmos, procedeu-se a uma técnica de imunodeteção: *Western Blot*.

4.9.Determinação de anticorpos IgM anti-*Plasmodium falciparum*

Os ensaios para determinação de anticorpos IgM anti-*P. falciparum* foram realizados sob as mesmas condições de extracto proteico total e de diluição de anticorpo primário utilizada nos ensaios para determinação de anticorpos IgG total anti-*P. falciparum*. Também para a análise dos resultados serológicos foram utilizados os mesmos critérios usados na determinação de anticorpos IgG total anti-*P. falciparum*.

Apenas 11 indivíduos apresentaram reactividade serológica para IgM anti-*P. falciparum*. Os resultados serológicos dos anticorpos IgM anti-*P. falciparum* encontram-se representados no Gráfico 23.

4. Resultados e Discussão

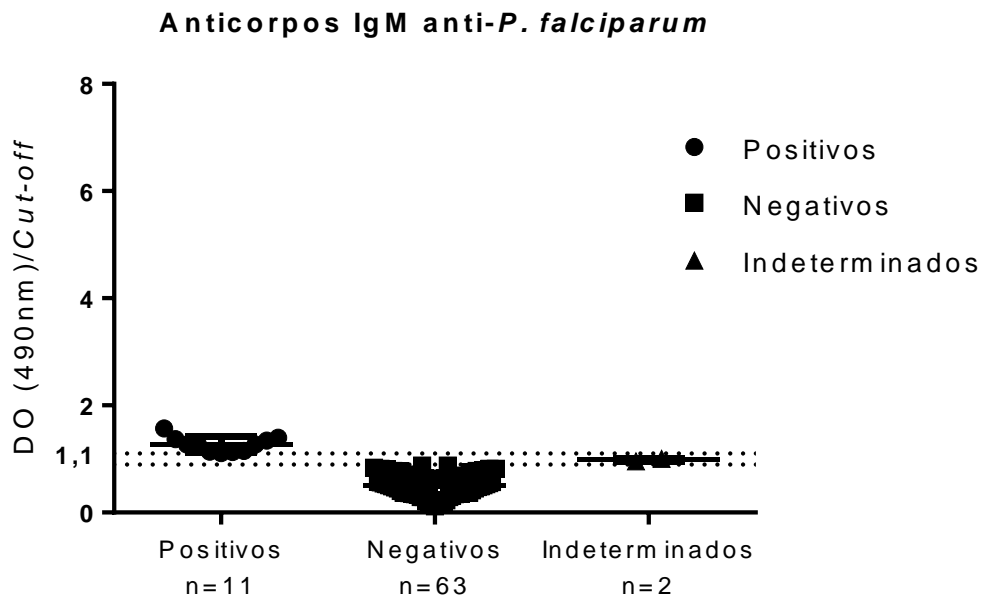


Gráfico 23 – Resultado do ensaio serológico para determinação da reactividade a IgM anti-*P. falciparum*, nas amostras serologicamente reactivas pelo teste comercial ELISA anti-*Plasmodium* spp. (n=76).

Uma vez que a IgM é a primeira imunoglobulina a elevar-se num processo infeccioso, os resultados positivos obtidos sugerem casos de infecção recente.

Sabe-se que a técnica de PCR detecta parasitas no sangue e, portanto, perante um quadro de infecção em fase aguda, seria de esperar que os resultados serológicos para IgM anti-*P. falciparum* fossem coerentes com os resultados da PCR. Pode, por isso, parecer controverso o facto de os resultados apresentados para IgM não acompanharem os resultados da PCR, existindo alguns casos em que a PCR é positiva, não havendo elevação da IgM e vice-versa (Tabela 10). No entanto, possíveis explicações poderão ser: 1) a pesquisa de DNA parasitário ocorreu numa fase tão inicial da infecção, que o sistema imunológico não teve tempo suficiente para desenvolver uma resposta imune, produzindo anticorpos específicos de *P. falciparum*; 2) podem ser falsos resultados negativos ou reacções cruzadas no ensaio de ELISA IgM anti-*P. falciparum* (Chattopadhyay *et al.*, 2003, Singh *et al.*, 2009); 3) a possível existência de problemas inerentes ao ensaio ELISA, como o não reconhecimento de determinados anticorpos nas amostras de plasma pelos antígenos recombinantes do teste comercial ELISA.

4. Resultados e Discussão

Nos casos em que são detectados anticorpos IgM anti-*P. falciparum*, sem positividade da PCR, podem já não existir parasitas em circulação no momento da colheita de sangue periférico (quer por eliminação consequente da acção farmacológica, quer devido ao cariz cíclico do ciclo replicativo do parasita), mas existirem anticorpos IgM circulantes como resultado da resposta imune ao parasita.

Tabela 10 – Distribuição percentual dos indivíduos com serologia positiva ou negativa para IgM anti-*P.falciparum*, de acordo com os resultados de PCR.

		Resultado PCR	
		Positivo	Negativo
Serologia IgM anti- <i>P. falciparum</i>	Positivo	9,1	90,9
	Negativo	9,5	90,5

O Gráfico 24 apresenta os resultados serológicos para os três tipos de ensaios ELISA efectuados, de acordo com o ano de regresso de zona endémica de malária dos participantes com resultados serológicos positivos.

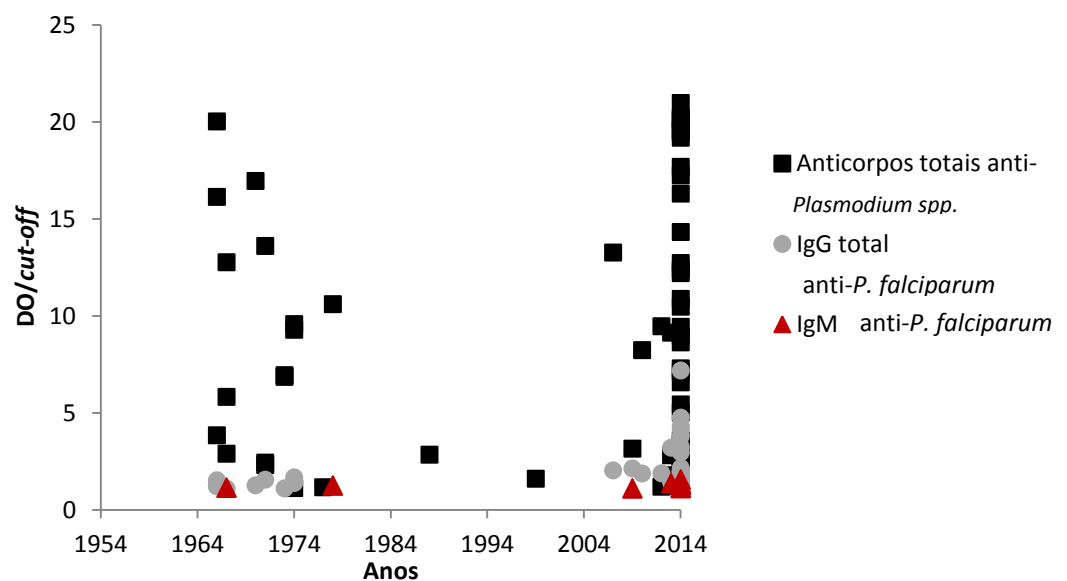


Gráfico 24 – Distribuição de tipos de imunoglobulinas detectadas, de acordo com o ano da última estadia em zona endémica de malária.

4. Resultados e Discussão

Verifica-se positividade serológica para IgM anti-*P. falciparum* essencialmente no último ano antes da participação dos indivíduos no estudo, encontrando-se também duas amostras positivas em indivíduos cujo regresso ocorreu há 40 ou mais anos. A serem falsos positivos, estes resultados podem dever-se a reacções cruzadas com outros anticorpos ou erros de leitura.

4.10. Imunodeteccção de proteínas de *Plasmodium falciparum*

Às amostras serologicamente reactivas para anticorpos IgG total anti-*P. falciparum* foi realizada a deteccção de antigénios de *P. falciparum*, por *Western Blot*.

Foi efectuado um SDS-PAGE com gel de poliacrilamida, posteriormente corado com Azul de Coomassie, para ser escolhida a concentração proteica que permite uma melhor resolução do gel e melhor visualização das proteínas de *P. falciparum* em membrana de nitrocelulose (Figura 12). Assim, a concentração proteica utilizada foi 23µg de extrato proteico total/poço.

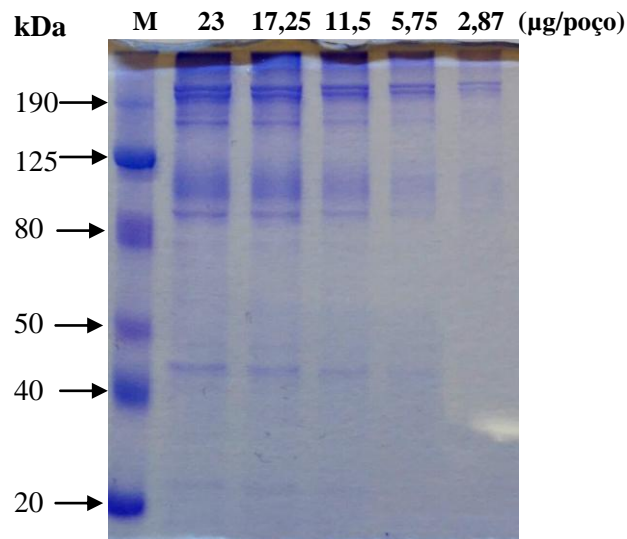


Figura 12 – Perfil electrotorético do extracto total de *P. falciparum* em gel de poliacrilamida a 10% corado com Azul brilhante Coomassie. M: marcador de massa molecular HyperPAGE® (Bioline, UK); Amostra 23 a 2,87µg/poço: quantidade (em massa) de extrato proteico total aplicada a cada poço.

Considerando os resultados da PCR, podemos dividir as amostras em infecção actual e infecção ocorrida no passado.

4. Resultados e Discussão

O fraccionamento proteico do extracto total de *P. falciparum* através de SDS-PAGE, associado à técnica de *Western Blot*, permitiu detectar antígenos parasitários, quer nos indivíduos agrupados em “Infecção actual”, quer nos “Indivíduos com infecção ocorrida no passado”, permitindo comparar os perfis proteicos de duas fases distintas da doença: uma fase aguda ou de infecção recente e uma fase de infecção ocorrida no passado.

Para facilitar a análise dos resultados, a frequência das proteínas detectadas para os dois grupos encontram-se esquematizadas na Tabela 11.

Tabela 11 – Percentagem de indivíduos com infecção actual e infecção ocorrida no passado que apresenta cada tipo de proteína detectada.

Peso proteico aproximado (kDa)	Infecção recente n=8 (%)	Infecção ocorrida no passado n=43 (%)
100	87,5	39,5
75	100	58,1
57	100	25,6
47	87,5	20,9
33	87,5	20,9

De uma forma geral, o grupo de infecção recente mostra maior reactividade proteica do que o grupo de infecção antiga. Este é um resultado expectável, uma vez que numa fase aguda da doença o parasita necessita de expressar proteínas a fim de exercer os seus processos biológicos (invasão e adesão às células do hospedeiro, transporte de nutrientes, entre outros) e funções moleculares (proteínas estruturais, capacidade de defesa ao sistema imunológico do hospedeiro, moléculas estruturais, entre outras) (Gardner *et al.*, 2002).

Foram excluídas da análise proteica as bandas proteicas detectadas nos controlos negativos, por serem sugestivas de reacções inespecíficas (reacções cruzadas com anticorpos não específicos de *P. falciparum*). Foram utilizados controlos positivos

4. Resultados e Discussão

(amostras de reactividade elevada para anticorpos IgG total anti-*P. falciparum*, em fase aguda da doença) para validar os ensaios e avaliar o perfil proteico de *P. falciparum*.

A percentagem de indivíduos com cada tipo de proteína é idêntica nos indivíduos com infecção actual (87,5 -100%).

As proteínas mais frequentemente detectadas no grupo de indivíduos com infecção ocorrida no passado são as de peso molecular de aproximadamente 75 e 100kDa, verificadas em 58,1% e 39,5% dos indivíduos deste grupo, respectivamente.

A realização de estudos de imunoproteómica poderão ser úteis para uma identificação mais exacta das proteínas detectadas, permitindo, posteriormente, relacioná-las com a reactividade serológica verificada neste estudo. No entanto, através da análise do peso molecular das proteínas é possível sugerir possíveis proteínas envolvidas na resposta imunológica dos participantes no estudo.

A proteína PF83/AMA-1, com 83kDa (uma proteína análoga da proteína PK66/AMA-1, de 66kDa de *P. knowlesi*) é expressa nos esquizontes maduros de *P. falciparum*. Após a sua clivagem é originado um fragmento *N*-terminal de 66kDa (Narum and Thomas, 1994). Mamo e colaboradores sugerem que a proteína AMA-1 pode permanecer estável e em níveis detectáveis por técnicas serológicas durante longos períodos de tempo e que, apesar de os seus níveis diminuírem ao longo do tempo, essa diminuição não é significativa (Mamo *et al.*, 2013).

Tendo em consideração os pesos proteicos detectados neste trabalho, bem como a persistência da proteína AMA-1 ao longo do tempo, esta surge como uma possibilidade para a proteína identificada com tamanho correspondente a 83 e/ou 66kDa.

As proteínas detectadas na zona dos 47 kDa são sugestivas de fragmentos proteicos resultantes da fragmentação da proteína MSP1, necessária ao processo invasivo dos merozoítos no eritrócito (Yamauchi *et al.*, 2007).

Em 1988, Epping e colaboradores identificaram um antigénio glicosilado com cerca de 51kDa, localizado na superfície da membrana de *P. falciparum* (Epping *et al.*,

4. Resultados e Discussão

1998). Em 1990, Ramasamy e colegas detectaram outro antigénio de superfície membranar do merozoíto com 45kDa (Ramasamy *et al.*, 1990).

Na Figura 13 estão apresentadas as amostras com maior reactividade no ensaio de *Western Blot*.

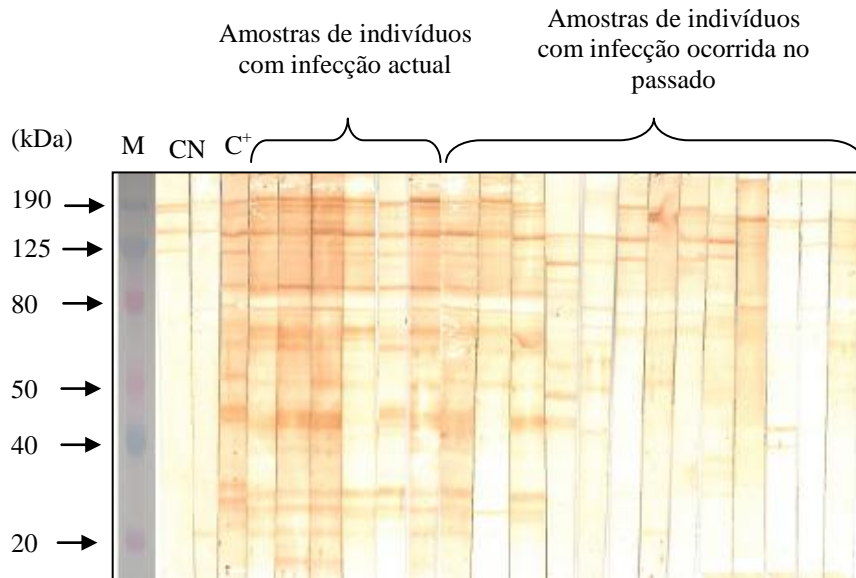


Figura 13 – Perfis de *Western Blot* dos soros mais reactivos por ELISA anti-*P.falciparum*. M: marcador de massa molecular HyperPAGE®; CN: soros de controlo negativo; C⁺: soro de controlo positivo, com infecção aguda.

A identificação de proteínas de *P. falciparum* que continuam a reagir com anticorpos IgG específicos de *P. falciparum* há 10 e mais anos após o regresso dos indivíduos de zona endémica de malária, pode vir a ser de extrema importância para o desenvolvimento de novos alvos proteicos vacinais.

5. Conclusões e Perspectivas Futuras

5. Conclusões e Perspectivas Futuras

5. Conclusões e Perspectivas Futuras

O trabalho desenvolvido visava a compreensão da natureza biológica dos anticorpos anti-*Plasmodium* spp. detectados, em indivíduos com estadias prévias em zonas endémicas de malária, quanto à sua caracterização e longevidade em circulação no sangue, e a imunoidentificação dos antígenos responsáveis pela reactividade serológica.

Os resultados laboratoriais foram analisados e discutidos tendo em consideração dados sociodemográficos, de estadia/viagem a zona endémica de malária e de historial de episódios de malária anteriores ao estudo.

Foi utilizada uma amostragem não aleatória, não sendo, por isso, possível extrapolar os resultados da análise estatística para a população de indivíduos com estadias prévias em zona endémica de malária. No entanto, os resultados obtidos e a discussão efectuada permitem alcançar algumas conclusões, relativamente aos vários objectivos propostos:

- 1) **Caracterizar os participantes no estudo quando aos seus factores sociodemográficos, estadias prévias em zonas endémicas e história de malária:** Os participantes foram na sua maioria do género masculino, com idades compreendidas entre os 23 e os 85 anos. A maioria dos participantes possuía naturalidade portuguesa; um quinto havia nascido em países africanos de língua oficial portuguesa.

Através da análise descritiva das variáveis estudadas no grupo de indivíduos com uma estadia/viagem, parece evidenciar-se dois tipos de viajantes: por um lado, os indivíduos que residem em zona endémica de malária e os indivíduos que fazem viagens frequentes de curta duração (inferiores a 6 meses) a zona endémica (sobretudo Angola, Moçambique e Guiné-Bissau). Por outro lado, os indivíduos que estiveram em zona endémica de malária 40 ou 50 anos antes do recrutamento para o estudo, correspondendo, provavelmente aos indivíduos que cumpriram serviço militar nas então colónias portuguesas.

Relativamente aos indivíduos com mais do que uma estadia/viagem, evidencia-se Angola como país de estadia/viagem, o motivo

5. Conclusões e Perspectivas Futuras

Residência/Trabalho, estadias curtas (inferiores a 6 meses) e regresso de zona endémica nos 6 meses anteriores à participação no estudo. Estas informações sugerem que a maior parte destes indivíduos se deslocam a países endémicos por motivos profissionais, efectuando estadias frequentes e de curta duração.

Quanto ao historial de episódios de malária anteriores ao estudo relativamente ao número de viagens, parece existir um decréscimo dos casos com o aumento do número de estadias/viagens.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis analisadas. Contudo, sugere-se o alargamento da população de estudo para se averiguar mais aprofundadamente as relações estatísticas entre as variáveis.

- 2) **Determinar a prevalência de anticorpos anti-*Plasmodium* spp. presentes em amostras de sangue de indivíduos com estadias prévias em zona endémica de malária**
e
- 3) **Caracterizar a subclasse dos anticorpos IgM e IgG total anti-*Plasmodium* spp. detectados:** Relativamente à prevalência de anticorpos anti-*Plasmodium* spp., foi detectada reactividade serológica em praticamente um quarto da população estudada. Deste grupo, 68% das amostras foram serologicamente positivas para IgG total anti-*P. falciparum* e apenas 15% apresentaram reactividade serológica para IgM anti-*P. falciparum*, indicando que a maioria dos participantes com reactividade serológica corresponde a infecções que ocorreram no passado.
- 4) **Relacionar a existência ou ausência de anticorpos nas amostras estudadas, com os factores sociodemográficos, as variáveis de caracterização da estadia/viagem e a história de malária envolvidos na reactividade serológica em malária:** As reactividades serológicas para anticorpos totais anti-*Plasmodium* spp. correspondem a indivíduos cujo regresso de zona endémica se realizou, principalmente, nos meses anteriores à participação no estudo e há cerca de 40 a 50 anos antes da participação no mesmo. Os resultados serológicos para IgG anti-*P. falciparum* apresentam

5. Conclusões e Perspectivas Futuras

uma distribuição idêntica ao longo do tempo após o regresso de zona endémica, enquanto que a reactividade serológica para IgM anti-*P.falciparum* se verifica quase exclusivamente nos meses próximos ao recrutamento dos participantes para o estudo.

- 5) **Efectuar a caracterização imunoquímica dos antígenos envolvidos na reactividade serológica em malária:** A análise dos perfis proteicos das amostras reactivas no teste comercial ELISA permitiu identificar proteínas com tamanho proteico aproximado de 19, 20, 42, 50, 63, 79, 80 e 120kDa. As proteínas mais frequentemente detectadas nos indivíduos cuja infecção ocorreu no passado, dizem respeito, essencialmente, a proteínas de 80 e 120kDa. Nos indivíduos com infecção actual, as proteínas detectadas não variam substancialmente entre indivíduos, apresentando ainda maior intensidade de reacção do que as proteínas observadas no grupo anterior. As proteínas imunogénicas identificadas poderão vir a ser importantes no desenvolvimento de alvos vacinais, de novos testes de diagnóstico, sendo também um ponto de reflexão na implementação de critérios de aceitação de dadores de sangue, na área da imunohemoterapia.

Tendo em conta os resultados obtidos, poderá ser importante estudar, com uma população mais alargada, a persistência dos anticorpos das subclasses IgG e IgM anti-*Plasmodium* spp., bem como caracterizar a qualidade dos anticorpos (IgG1, IgG2...) para se alcançar uma melhor compreensão sobre o mecanismo de imunopatogénese da resposta imune humoral. A caracterização dos antígenos mais imunorreactivos frente a diferentes níveis de reactividade serológica, em indivíduos com estadia em zona endémica, através da determinação da sequência proteica por imunoproteómica e da organização e estrutura génica por análise *in silico*, utilizando ferramentas de imunoinformática, seria também um importante contributo para o desenvolvimento de novos marcadores de diagnóstico e alvos para vacinas anti-*Plasmodium* sp., importantes no desenvolvimento de estratégias de prevenção e controlo da malária.

6. Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

AMANNA, I. J., CARLSON, N. E. and SLIFKA, M. K. (2007) Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N.Engl. F.Med.* 357. pp.1903-1915

ARAMA, C. and TROYE-BLOMBERG, M. (2014) The path of malaria vaccine development: challenges and perspectives. *Journal of Internal Medicine.* 275. pp.456-466.

ARÉVALO-HERRERA M., Solarte, Y., MARIN, C., SANTOS, M., CASTELLANOS, J., BEIER, J. C., and VALENCIA, S. H. (2011) Malaria transmission blocking immunity and sexual stage vaccines for interrupting malaria transmission in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 106(Suppl. I). pp. 202-211

ARIBOT, G., ROGIER, C., SARTHOU, J. L., TRAPE, J. F., BALDE, A. T., DRUILHE, P. and ROUSSILHON, C. (1996) Pattern of immunoglobulin isotype response to Plasmodium falciparum blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Diégo, west Africa). *Am J Trop Med Hyg.* 54. pp.449-57.

AROSA, F. A., CARDOSO, E. M. and PACHECO, F. C., (2007) Fundamentos de *Imunologia*. Sl. 2nd edition. Porto: Lidel.

ASKLING, H., BRUNEEL, F., BURCHARD, G., CASTELLI, F., CHIODINI, P., GROBUSCH, M., LOPEZ-VELEZ, R., PAUL, M., PETERSEN, E., POPESCU, C., RAMHARTER, M., SCHLAGENHAUF, P. (2012) Management of imported malaria in Europe. *Malaria Journal.* 11. p.328.

AUCAN, C., TRAORÉ, Y., TALL, F., NACRO, B., TRAORÉ-LEROUX, T., FUMOUX, F. and RIHET, P. (2000) High Immunoglobulin G2 (IgG2) and Low IgG4 Levels Are Associated with Human Resistance to Plasmodium falciparum Malaria. *Infection and Immunity.* 68. pp.1252-1258.

BALIRAINE, F. N., AFRANE, Y. A., AMENYA, D. A., BONIZZONI, M. and MENGE, D. M, (2009) High prevalence of asymptomatic Plasmodium falciparum infections in a highland area of western Kenya: a cohort study. *F. Infect. Dis.* 200. pp.66-74

BEESON, J. G., OSIER, F. H. and ENGWERDA, C. R. (2008) Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. *Trends Parasitol.* 24. pp.578-84.

BERECZKY, S., MONTGOMERY, S. M., TROYE-BLOMBERG, M., ROTH, I., SHAW, M. A. and FARNERT, A. (2004) Elevated anti-malarial IgE in asymptomatic individuals is associated with reduced risk for subsequent clinical malaria. *Int J Parasitol.* 34. pp.935-42.

6. Referências Bibliográficas

BOLAD, A., FAROUK, S. E., ISRAELSSON, E., DOLO, A., DOUMBO, O. K., NEBIÉ, I., MAIGA, B., KOURIBA, B., LUONI, G., SIRIMA, B. S., MODIANO, D., BERZINS, K. and TROYE-BLOMBERG, M. (2005) Distinct Interethnic Differences in Immunoglobulin G Class/Subclass and Immunoglobulin M Antibody Responses to Malaria Antigens but not in Immunoglobulin G Responses to Nonmalarial Antigens in Sympatric Tribes Living in West Africa. *Scandinavian Journal of Immunology*. 61. pp.380-386.

BOTTIUS, E., GUANZIROLLI, A., TRAPE, J. F., ROGIER, C., KONATE, L. and DRUILHE, P. (1996) Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90. pp.15-19.

BOUHAROUN-TAYOUN, H., ATTANATH, P., SABCHAREON, A., CHONGSUPHAJASIDDHI, T. and DRUILHE, P. (1990) 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.* 172. pp.1633-41.

BOUHAROUN-TAYOUN, H., OEUVRAY, C., LUNEL, F. and DRUILHE, P. (1995) Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med.* 182. pp.409-418.

BRUCE-CHWATT, L. J. (1977) Malaria eradication in Portugal. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 71. pp.232-40.

CALISSANO, C., MODIANO, D., SIRIMA, B. S., KONATE, A., SANOU, I., SAWADOGO, A., PERLMANN, H., TROYE-BLOMBERG, M. and PERLMANN, P. (2003) IgE Antibodies to *Plasmodium falciparum* and severity of Malaria in children of one ethnic group living in Burkina Faso. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 69. pp.31-35.

CDC. (2010) Malaria - *Where malaria occurs*. [Online] Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>. [Acedido: 19 de Setembro de 2014]

CDC. (2012a) *Malaria - Elimination of Malaria in the United States*. [Online] Disponível em: http://www.cdc.gov/malaria/about/history/elimination_us.html. [Acedido: 19 de Setembro de 2014]

CDC. (2012b) *Malaria - Malaria Diagnosis (U.S.) – Serology*. [Online] Disponível em: http://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/serology.html. [Acedido: 23 de Setembro de 2014]

CDC. (2012c) *Malaria - Biology*. [Online] Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>. [Acedido: 10 de Setembro de 2014]

6. Referências Bibliográficas

- CHARLES, E. D., GREEN, R. M., MARUKIAN, S., TALAL, A. H. and LAKE-BAKAAR, G. V. et al. (2008) Clonal expansion of immunoglobulin M⁺ CD27⁺B cells in HCV- associated mixed cryoglobulinemia. *Blood*.111. pp.1344-1356.
- CHATTOPADHYAY, SHARMA, R. A., SRIVASTAVA, V.K., PATI, S. S., SHARMA, S. K., B. S. DAS, B.S., and CHITNIS, C. E. (2003) Plasmodium falciparum infection elicits both variant-specific and cross-reactive antibodies against parasite surface antigen variants. *Infect. Immun.* 71. pp. 597-604
- CLYDE, D. F. (1990) Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, 1971-75. *Bulletin of the World Health Organization*. 68. pp.9-12.
- COHEN, S., MCGREGOR, I. A. and CARRINGTON, S. (1961)Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*. 192. pp.733-737.
- COSTA, R, 2011. *Análise serológica e imunológica de potenciais antigénios para a pesquisa de anticorpos anti-Plasmodium falciparum em pacientes com malária importada*. MSc. Lisboa: Universidade de Lisboa.
- COSTA, R. M., NOGUEIRA, F., DE SOUSA, K. P., VITORINO, R. and SILVA, M. S. (2013) Immunoproteomic analysis of Plasmodium falciparum antigens using sera from patients with clinical history of imported malaria. *Malar J.* 12. p.100.
- COX, F. (2010) History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites and Vectors*. 3. p.5.
- CROMPTON, P. D., MOEBIUS, J., PORTUGAL, S., WAISBERG, M., HART, G., GARVER, L. S., MILLER, L. H., BARILLAS-MURY, C. and PIERCE, S. K. (2014) Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annu Rev Immunol.* 32. pp.157-87.
- CROMPTON, P. D., PIERCE, S. K. and MILLER, L. H. (2010) Advances and challenges in malaria vaccine development. *J Clin Invest.* 120. pp.4168-78.
- CZAJKOWSKY, D. M., SALANTI, A., DITLEV, S. B., SHAO, Z., GHUMRA, A., ROWE, J. A. and PLEASS, R. J. (2010) IgM, FcμRs, and Malarial Immune Evasion. *The Journal of Immunology*. 184. pp.4597-4603.
- DELORON, P., DUBOIS, B., LE HESRAN, J. Y., RICHE, D., FIEVET, N., CORNET, M., RINGWALD, P. and COT, M. (1997) Isotypic analysis of maternally transmitted Plasmodium falciparum-specific antibodies in Cameroon, and relationship with risk of P. falciparum infection. *Clinical and Experimental Immunology*. 110. pp.212-218.
- DENT, A. E., BERGMANN-LEITNER, E. S., WILSON, D. W., TISCH, D. J., KIMMEL, R., VULULE, J., SUMBA, P. O., BEESON, J. G., ANGOV, E., MOORMANN, A. M. and KAZURA, J. W. (2008) Antibody-mediated growth inhibition of Plasmodium falciparum: relationship to age and protection from parasitemia in Kenyan children and adults. *PLoS ONE*. 3. e3557.

6. Referências Bibliográficas

- DOOLAN, D. L. and MARTINEZ-ALIER, N. (2006) Immune response to pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Current molecular medicine*. 6. pp.169-185.
- DUARTE, J., HERBERT, F., GUIYEDI, V., FRANETICH, J. F., ROLAND, J., CAZENAVE, P. A., MAZIER, D., KOMBILA, M., FESEL, C. and PIED, S. (2012) High levels of immunoglobulin E autoantibody to 14-3-3 epsilon protein correlate with protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 206. pp.1781-1789.
- ENGWERDA, C. R. and GOOD, M. F. (2005) Interactions between malaria parasites and the host immune system. *Curr Opin Immunol*. 17. pp.381-387.
- EPPING, R. J., GOLDSTONE, S. D., INGRAM, L. T., UPCROFT, J. A., RAMASAMY, R., COOPER, J. A., BUSHHELL, G. R. and GEYSEN, H. M. (1988) An epitope recognised by inhibitory monoclonal antibodies that react with a 51 kilodalton merozoite surface antigen in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 28(1). pp.1-10.
- ERDMAN, L. K., FINNEY, C. A., LILES, W. C. and KAIN, K. C. (2008) Inflammatory pathways in malaria infection: TLRs share the stage with other components of innate immunity. *Mol Biochem Parasitol*. 162. pp.105-111.
- FADDY, H. M., SEED, C. R., FADDY, M. J., FLOWER, R. L. and HARLEY, R. J. (2013) Malaria antibody persistence correlates with duration of exposure. *Vox Sanguinis*. 104. pp. 292-298.
- FERREIRA, ARL, 2013. *Pesquisa de anticorpos anti-Plasmodium spp em indivíduos com estadia em zona endêmica de Malária*. MSc. Lisboa: Universidade de Lisboa.
- FONSECA, A. G., DIAS, S. S., BAPTISTA, J. L. and TORGAL, J. 2014. The Burden of Imported Malaria in Portugal 2003 to 2012. *Journal of Travel Medicine*. 21. pp.354-356.
- FOWKES, F. J., MCGREADY, R., CROSS, N. J., HOMMEL, M., SIMPSON, J. A., ELLIOTT, S. R., RICHARDS, J. S., LACKOVIC, K., VILADPAI-NGUEN, J., NARUM, D., TSUBOI, T., ANDERS, R. F., NOSTEN, F. and BEESON, J. G. (2012) New insights into acquisition, boosting, and longevity of immunity to malaria in pregnant women. *J Infect Dis*. 206(10). pp. 1612-1621.
- GAN, S. D. and PATEL, K. R. (2013) Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol*, 133. pp. 1-3.
- GARRAUD, O., MAHANTY, S., and PERRAUT, R. (2003) Malaria-specific antibody subclasses in immune individuals: a key source of information for vaccine design. *TRENDS in Immunology*. 24(1). pp 30-35
- GIOVANNINI, D., SPATH, S., LACROIX, C., PERAZZI, A., BARGIERI, D., LAGAL, V., LEBUGLE, C., COMBE, A., THIBERGE, S., BALDACCI, P., TARDIEUX, I. and MENARD, R. (2011) Independent roles of apical membrane

6. Referências Bibliográficas

antigen 1 and rhoptry neck proteins during host cell invasion by apicomplexa. *Cell Host Microbe*. 10. pp.591-602.

GROUX, H. and GYSIN, J. (1990) Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. *Res Immunol*. 141. pp.529–542.

HANSEN, D. S., D'OMBRAIN, M. C. and SCHOFIELD, L. (2007) The role of leukocytes bearing natural killer complex receptors and killer immunoglobulin-like receptors in the immunology of malaria. *Curr. Opin. Immunol*. 19. pp.416-423.

HAY, S. I., SMITH, D. L. and SNOW, R. W. (2008) Measuring malaria endemicity from intense to interrupted transmission. *Lancet Infect Dis*. 8. pp.369-378.

HONDA, T., MIYACHI, Y. and KABASHIMA, K. (2011) Regulatory T cells in cutaneous immune responses. *F. Dermatol Sci*. 63. pp.75-82

HOROWITZ, A., NEWMAN, K. C., EVANS, J. H., KORBEL, D. S., DAVIS, D. M. and RILEY, E. M. (2010) Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to *Plasmodium falciparum*- infected erythrocytes. *F. Immunol*. 184. 6043-6052.

KAIN, K. C., KEYSTONE, J., FRANKE, E. D. and LANAR, D. E. (1991) Global distribution of a variant of the circumsporozoite gene of *Plasmodium vivax*. *Journal of Infectious Diseases*. 164. pp.208-210

KURTZHALS, J. A., ADABAYERI, V., GOKA, B. Q., AKANMORI, B. D., OLIVER-COMMEY, J. O., NKRUMAH, F. K., BEHR, C. and HVIID, L. (1998) Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet*. 351. pp.1768-1772

KWIATKOWSKI, D. P. (2005) How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am. F. Hum. Genet*. 77. pp.171-192.

LEORATTI, F. M. *et al.* (2008) Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Malaria Journal*. 7(186). pp.1-11.

LEORATTI, F. M. S. (2004) *Resposta imune humoral na malária humana: quantidade e qualidade de anticorpos anti-Plasmodium falciparum*. MSc. São Paulo: Universidade de São Paulo.

MACDONALD, G. (1952) The analysis of equilibrium in malaria. *Trop Dis Bull*. 49. pp.813-829.

MALAGUARNERA, L. and MUSUMECI, S. (2002) The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis*. 2. pp.472-478.

MAMO, H., IRIEMENAM, N. C., BERZINS, K. and PETROS B (2013) Antibodies by Non-Febrile, Smear-Negative Individuals from a Malaria Epidemic-Prone Setting in

6. Referências Bibliográficas

Ethiopia are Strongly Reactive to Plasmodium falciparum Blood-Stage Vaccine Candidate Antigens. *J Vaccines Vaccin.* 4. pp.200.

MARSH, K. and KINYANJUI, S. (2006) Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* 28. pp.51-60.

MCGREGOR, I. A., CARRINGTON, S. P. and COHEN, S. (1963). Treatment of East African P. falciparum malaria with West African human γ -globulin. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 57. pp.170-175.

MEDEIROS, M. M., FOTORAN, W. L., MARTHA, R. C. D., KATSURAGAWA, T. H., SILVA, L. H. P. and WUNDERLICH, G. (2013) Natural antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens MSP5, MSP9 and EBA175 is associated to clinical protection in the Brazilian Amazon. *BMC Infectious Diseases.* 13. p.608

MOODY, A. (2002) Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev.* 15. pp.66-78.

MURTEIRA, B. J. F. (1993) *Análise exploratória de dados - Estatística descritiva.* Portugal: McGraw-Hill.

NARUM, D. L. and THOMAS, A. W. (1994) Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 67(1). pp. 59-68.

NHABOMBA, A. J., GUINOVAR, C., JIMENEZ, A., MANACA, M. N., QUINTO, L., CISTERO, P., AGUILAR, R., BARBOSA, A., RODRIGUEZ, M. H., BASSAT, Q., APONTE, J. J., MAYOR, A., CHITNIS, C. E., ALONSO, P. L. and DOBANO, C. (2014) Impact of age of first exposure to *Plasmodium falciparum* on antibody responses to malaria in children: a randomized, controlled trial in Mozambique. *Malar J.* 13. p.121.

NICOLL, W., SACCI, J., RODOLFO, C., DI GIACOMO, G., PIACENTINI, M., HOLLAND, Z., DOERIG, C., HOLLINGDALE, M. and LANAR, D. (2011) *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1 is cross-linked by tissue transglutaminase. *Malaria Journal.* 10. p.14.

NUSSENZWEIG, R. S., VANDERBERG, J., MOST, H. and ORTON, C. (1967) Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *plasmodium berghei*. *Nature.* 216. pp.160-162.

OEUVRAY, C., BOUHAROUN-TAYOUN, H., GRAS-MASSE, H., BOTTIUS, E., KAIDOH, T., AIKAWA, M., FILGUEIRA, M. C., TARTAR, A. and DRUILHE, P. 1994. Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood.* 84. pp.1594-1602.

O'GARRA, A. and ARAI, N. (2000) The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* 10. pp.542-550

6. Referências Bibliográficas

- OLOTU, A., FEGAN, G., WAMBUA, J., NYANGWESO, G., AWUONDO, K. O., LEACH, A., LIEVENS, M., LEBoulLEUX, D., NJUGUNA, P., PESHU, N., MARSH, K. and BEJON, P. (2013) Four-Year Efficacy of RTS,S/AS01E and Its Interaction with Malaria Exposure. *New England Journal of Medicine*. 368. pp.1111-1120.
- ORTH, H., JENSEN, B., HOLTFRETER, M., KOCHERIL, S., MALLACH, S., MACKENZIE, C., MULLER-STOVER, I., HENRICH, B., IMWONG, M., WHITE, N., HAUSSINGER, D. and RICHTER, J. (2013) Plasmodium knowlesi infection imported to Germany. *Euro Surveill*, 18. p.20603.
- OSIER, F. H., FEGAN, G., POLLEY, S. D., MURUNGI, L., VERRA, F., TETTEH, K. K., LOWE, B., MWANGI, T., BULL, P. C., THOMAS, A. W., CAVANAGH, D. R., MCBRIDE, J. S., LANAR, D. E., MACKINNON, M. J., CONWAY, D. J. and MARSH, K. (2008) Breadth and magnitude of antibody responses to multiple Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun*. 76. pp.2240-2248.
- OTHORO, C., LAL, A. A., NAHLEN, B., KOECH, D., ORAGO, A.S. and UDHAYAKUMAR. V. (1999) A low IL-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*. 179. pp.279-282
- OWUSU-OFORI, A. K., PARRY, C. and BATES, I. (2010) Transfusion-transmitted malaria in countries where malaria is endemic: a review of the literature from sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis*. 51. pp.1192-1198.
- PASVOL, G. (2005) Malaria. *Medicine*. 33. pp.39-43.
- PAVLI, A. and MALTEZOU, H. C. (2010) Malaria and travellers visiting friends and relatives. *Travel Med Infect Dis*. 8. pp.161-168.
- PERLMANN, H., HELMBY, H., HAGSTEDT, M., CARLSON, J., LARSSON, P. H., TROYE-BLOMBERG, M. and PERLMANN, P. (1994) IgE elevation and IgE anti-malarial antibodies in Plasmodium falciparum malaria; association of high IgE levels with cerebral malaria. *Clinical and Experimental Immunology*. 97. pp.284-292.
- PINHEIRO, L., ROSARIO, V., THAITHONG, S. and BROWNA, K. N. (1993) High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 61. pp.315-320.
- PINTO, A. Y. N., VENTURA, A. M. and SOUZA, J. M. (2001) Resposta de anticorpos IgG anti-Plasmodium vivax em crianças expostas à malária, antes e após tratamento específico. *Jornal de Pediatria*. 77 (Nº4).
- PORTUGAL, S., PIERCE, S.K. and CROMPTON, P. D. (2013) Young lives lost as B cells falter: what we are learning about antibody responses in malaria. *F. Immunol*. 190. pp.3039-3046.

6. Referências Bibliográficas

- PORTUGAL. DIRECÇÃO GERAL DA SAÚDE. (2014a) *Despacho n.º 5855/2014*. Lisboa: Diário da República. (2ª série – n.º 85)
- PORTUGAL. DIRECÇÃO GERAL DA SAÚDE. (2014b) *Doenças de Declaração Obrigatória 2009-2012*. Lisboa: Direção-Geral da Saúde. (II)
- PORTUGAL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2007) *Decreto-Lei n.º 267/2007*. Lisboa: Diário da República. (1ª série – n.º 141).
- PRATT-RICCIO, L. R., LIMA-JUNIOR, J. C., CARVALHO, L.J., THEISEN, M., ESPÍNDOLA-MENDES, E. C., SANTOS, F., OLIVEIRA-FERREIRA, J., GOLDBERG, A. C., DANIEL-RIBEIRO, C. T. and BANIC, D. M. (2005) 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.* 73. pp.1096-1103.
- RAMASAMY, R., RAMASAMY, M. and YASAWARDENA, S. (2001) Antibodies and *Plasmodium falciparum* merozoites. *Trends Parasitol.* 17. pp.194-197.
- RAMASAMY, R., JONES, G. and LORD, R. (1990) Characterisation of an inhibitory monoclonal antibody-defined epitope on a malaria vaccine candidate antigen. *Immunol Lett.* 23(4). pp. 305-9.
- REYES-SANDOVAL, A., BERTHOUD, T., ALDER, N., SIANI, L., GILBERT, S. C., NICOSIA, A., COLLOCA, S., CORTESE, R. and HILL, A. V. S. (2010) Prime-Boost Immunization with Adenoviral and Modified Vaccinia Virus Ankara Vectors Enhances the Durability and Polyfunctionality of Protective Malaria CD8+ T-Cell Responses. *Infection and Immunity.* 78. pp.145-153.
- RILEY, E. M. (1999) Is T cell priming required for initiation of pathology in malaria infections? *Immunol Today.* 20. pp. 228-233.
- SEILMAIER, M., HARTMANN, W., BEISSNER, M., FENZL, T., HALLER, C., GUGGEMOS, W., HESSE, J., HARLE, A., BRETZEL, G., SACK, S., WENDTNER, C., LOSCHER, T. and BERENS-RIHA, N. (2014) Severe *Plasmodium knowlesi* infection with multi-organ failure imported to Germany from Thailand/Myanmar. *Malaria Journal.* 13. p.422.
- SEIXAS, J. and ATOUGUIA, J. (2006) *Malária*. Lisboa: Universidade Aberta.
- SHI, Y. P., SAYED, U., QARI, S. H., ROBERTS, J. M., UDHAYAKUMAR, V., OLOO, A. J., HAWLEY, W. A., KASLOW, D. C., NAHLEN, B. L. and LAL, A. A. (1996) Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Infect Immun.* 64. pp.2716-2723.
- SIEGEL S. and CASTELLAN N. J. Jr. (1988) *Nonparametric statistics for the behavioural sciences*. 2nd edition. Nova Iorque: McGraw-Hill.

6. Referências Bibliográficas

SILVIE, O., MOTA, M. M., MATUSCHEWSKI, K. and PRUDÊNCIO, M. (2008) Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Curr Opin Microbiol.* 11. pp.352–359.

SINGH, S., SOE, S., WEISMAN, S., BARNWELL, J. W., PÉRIGNON, J. L. and DRUILHE, P. (2009) A Conserved Multi-Gene Family Induces Cross-Reactive Antibodies Effective in Defense against *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE* 4(4): e5410.

SNAPPER, C. M., WAEGELL, W., BEERNINK, H. and DASCH, J. R. (1993) Transforming growth factor-beta 1 is required for secretion of IgG of all subclasses by LPS-activated murine B cells in vitro. *J Immunol.* 151. pp.4625-4636.

SNOUNOU, G., VIRIYAKOSOLA, S., ZHUA, X. P., JARRAA, W., SNOW, R. W., GUERRA, C. A., MUTHEU, J. J. and HAY, S. I. (2008) International funding for malaria control in relation to populations at risk of stable *Plasmodium falciparum* transmission. *PLoS Med.* 5. e142.

SNOW, R. W., GUERRA, C. A., MUTHEU, J. J., and HAY, S. I. (2008) International Funding for Malaria Control in Relation to Populations at Risk of Stable *Plasmodium falciparum* Transmission. *PLoS Med.* 5(7). e142.

STAVNEZER, J. (1995) Regulation of antibody production and class switching by TGF-beta. *J Immunol.* 155. pp.1647-1651.

STEPHENS, R. and LANGHORNE, J. (2006) Priming of CD4+ T cells and development of CD4+ T cell memory; lessons for malaria. *Parasite Immunology.* 28. pp.25-30.

SUIÇA. WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2010) *Guidelines for the treatment of malaria*. Genève: World Health Organization. (2nd edition)

SUIÇA. WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2012) *Management of Severe Malaria*. Genève: World Health Organization.

SUIÇA. WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2013) *World Malaria Report*. Genève: World Health Organization.

SUIÇA. WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2014) *World Malaria Report*. Genève: World Health Organization. (3rd edition)

TANGPUKDEE, N., DUANGDEE, C., WILAIRATANA, P. and KRUDSOOD, S. (2009) Malaria Diagnosis: A Brief Review. *The Korean Journal of Parasitology.* 47. pp.93-102.

TANGTEERAWATANA, P., MONTGOMERY, S. M., PERLMANN, H., LOOAREESUWAN, S., TROYE-BLOMBERG, M. and KHUSMITH, S. (2007) Differential regulation of IgG subclasses and IgE antimalarial antibody responses in complicated and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasite Immunology.* 29. pp.475-483.

6. Referências Bibliográficas

- TANNER, M., and DE SAVIGNY, D. (2008) Malaria eradication back on the table. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(2). p.82.
- TARLINTON, D. and GOOD-JACOBSON, K. (2013) Diversity among memory B cells: origin, consequences, and utility. *Science*. 341. pp.1205-1211.
- TEXIER, G., MACHAULT, V., BARRAGTI, M., BOUTIN, J.-P. and ROGIER, C. (2013) Environmental determinant of malaria cases among travellers. *Malaria Journal*. 12. p.87.
- TSUNAWAKI, S., SPORN, M., DING, A. and NATHAN, C. (1988) Deactivation of macrophages. *Nature*. 334. pp.260-262.
- UNWTO. (2014) *UNWTO Tourism Highlights, 2014 Edition*. [Online] Disponível em: <http://mkt.unwto.org/publication/unwto-tourism-highlights-2014-edition>. [Acedido: 04 de Outubro de 2014]
- VAUGHAN, A. M. and KAPPE, S. H. (2012) Malaria vaccine development: persistent challenges. *Curr Opin Immunol*. 24. pp.324-331.
- WAISBERG, M., TARASENKO, T., VICKERS, B. K., SCOTT, B. L. and WILLCOCKS, L. C. et al. (2011) Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus protects against cerebral malaria in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 108. pp.1122-1127.
- WERNSDORFER, W. H. (2012) Global challenges of changing epidemiological patterns of malaria. *Acta Trop*. 121. pp.158-165.
- WHITE, N. J. (2009) Malaria. In COOK, G. C. and ZUMLA, A. I. *Manson's Tropical Diseases*. 22nd edition. London: Saunders.
- WHITE, N. J., PUKRITTAYAKAMEE, S., HIEN, T. T., FAIZ, M. A., MOKUOLU, O. A. and DONDORP, A. M. (2013) Malaria. *The Lancet*. 383. pp.723-735.
- WHO. (2014a) *Blood Safety and Availability*. [Online] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/>. [Acedido: 23 de Setembro de 2014]
- WHO. (2014b) Malaria. [Online] Disponível em: http://www.who.int/ith/ITH_chapter_7.pdf?ua=1. [Acedido: 04 de Outubro de 2014]
- WHO-CISID. (2014) *Malaria*. [Online] Disponível em: <http://data.euro.who.int/cisid/?TabID=359630>. [Acedido: 06 de Dezembro de 2014].
- WILSON, M. L. (2013) Laboratory Diagnosis of Malaria: Conventional and Rapid Diagnostic Methods. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 137. pp.805-811.
- WINKLER, S., WILLHEIM, M., BAIER, K., SCHMID, D., AICHELBURG, A., GRANINGER, W. and KREMSNER, P. G. (1999) Frequency of cytokine-

6. Referências Bibliográficas

producing T cells in patients of different age groups with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 179. pp.209-216.

WONGSRICHANALAI, C., BARCUS, M. J., MUTH, S., SUTAMIHARDJA, A. and WERNSDORFER, W. H. (2007) A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 77. pp.119-127.

YAMAUCHI, L. M., COPPI, A., SNOUNOU, G. AND SINNIS, P. (2007) *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cellular Microbiology.* 9. pp. 1215–1222.

7. ANEXOS

ANEXO A – Consentimento Informado



CONSENTIMENTO INFORMADO

IMUNIDADE EM MALÁRIA: CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DE ANTICORPOS EM INDIVÍDUOS COM ESTADIA EM ZONA ENDÉMICA

Entidade Promotora: Instituto de Higiene e Medicina Tropical/UEI de Clínica Tropical

Investigador(a) Principal: Dr.ª Daniela Calisto

Orientadores: Professora Doutora Rosa Teodósio e Investigador Doutor Marcelo Silva

Contacto telefónico: 963447839

Endereço de e-mail: daniela.calisto@ihmt.unl.pt

1. Introdução

A malária ou paludismo é uma doença transmitida por um parasita (*Plasmodium*), através da picada de um mosquito infectado. Após a infecção, o nosso sistema imunitário produz anticorpos contra o parasita que se mantêm em circulação durante alguns meses, podendo ir até 14 anos. No entanto, alguns estudos revelaram uma maior permanência desses anticorpos, sem, no entanto, se saber a causa. Assim, o objectivo deste estudo é fazer a caracterização desses anticorpos, para percebermos o que são e qual a sua função, porque são produzidos durante tanto tempo e conhecer a idade, o local de nascimento e as características de viagens a regiões tropicais dos participantes do estudo.

2. Procedimento do estudo

Se concordar em participar no estudo, deve assinar este consentimento informado e responder a um breve questionário (cerca de 3 minutos) sobre as suas viagens a países de zonas tropicais. Precisaremos ainda de uma pequena quantidade do seu sangue para fazermos análises de forma a conhecermos os anticorpos referidos no ponto anterior. Estas análises serão gratuitas.

3. Riscos

Potencialmente, não existem riscos pela participação no estudo.

4. Benefícios

Não existe benefício directo por participar neste estudo. No entanto, se no decorrer do estudo for encontrado o parasita no seu sangue, será assistido por um médico do IHMT sem custos adicionais. Ao participar neste estudo está a ajudar os investigadores a compreenderem melhor a doença que atinge ainda tanta gente.

5. Participação Voluntária

A participação no estudo é voluntária e poderá desistir a qualquer momento.

6. Confidencialidade

As suas informações são confidenciais. Na colheita, a sua identidade só será conhecida pelo Investigador Principal e pelo técnico que colhe a amostra de sangue. Serão gerados códigos de identificação e é com eles que iremos trabalhar. Só a análise estatística dos resultados será divulgada.

7. Compensação

Não lhe será dado nenhum tipo de compensação nem terá que pagar qualquer quantia pela participação no estudo.

8. Contactos

Poderá contactar o Investigador a qualquer momento, através do contacto acima disponibilizado. No caso de existir alguma dúvida nas informações do questionário, por favor autorize o Investigador a contactá-lo.

ANEXO B – Declaração do Participante



Número de identificação do participante
(a preencher pelo Técnico)

IMUNIDADE EM MALÁRIA: CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DE ANTICORPOS EM INDIVÍDUOS COM ESTADIA EM ZONA ENDÉMICA

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Fui convidado a participar no estudo “Imunidade em Malária: Contribuição para o Estudo de Anticorpos em Indivíduos com Estadia em Zona Endémica”, para o qual é preciso uma amostra do meu sangue e o preenchimento de um questionário.

Compreendi que é um estudo voluntário, sem custos para mim e que posso desistir a qualquer momento. Sei também que a minha identificação é confidencial e só será conhecida pelo Investigador Principal e pelo Técnico que efectuar a colheita de sangue. Sei também que serei assistido por um médico caso me encontrem o parasita da malária no sangue.

Foi-me fornecido o contacto do Investigador com o qual poderei conversar sobre alguma questão ou esclarecimento que precise.

Deste modo, aceito, de forma voluntária, participar neste estudo.

Número de telefone para contacto _____

E-mail _____

Assinatura (ou cruz. Neste caso o Técnico deve assinar como testemunha)

Data ____/____/____
(Dia) (Mês) (Ano)

ANEXO C – Questionário aplicado aos Participantes do Estudo

SE ESTEVE EM ALGUM DOS PAÍSES DAS TABELAS ABAIXO, POR FAVOR, PREENCHA O SEGUINTE QUESTIONÁRIO

LISTA DE PAÍSES OU REGIÕES TROPICAIS COM RISCO DE TRANSMISSÃO DE MALÁRIA (OU PALUDISMO)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	L
Afeganistão	Bangladesh	Cabo Verde	Djibuti	El Salvador	Filipinas	Gabão	Haiti	Iémen	Laos
África do Sul	Belize	Camarões		Equador		Gambia	Honduras	Ilhas Salomão	Libéria
Angola	Benim	Cambodja		Eritreia		Gana		Índia	
Argentina	Bolívia	Chade		Etiópia		Guatemala		Indonésia	
Azerbaijão	Botswana	Colômbia				Guiana		Irão	
Arábia Saúdita	Brasil	Comores				Guiana Francesa			
	Burkina Faso	Congo (Congo-Kinshasa)				Guiné			
	Burundi	Coreia do Norte				Guiné-Bissau			
	Butão	Coreia do Sul				Guiné-Equatorial			
		Costa do Marfim							
		Costa Rica							

M	N	P	Q	R	S	T	U	V	Z
Madagáscar	Namíbia	Paquistão	Quênia	República Dominicana	São Tomé e Príncipe	Tailândia	Uganda	Vanuatu	Zâmbia
Malásia	Nepal	Panamá		República Centro-Africana	Senegal	Tajiquistão		Venezuela	Zimbabué
Malawi	Nicarágua	Papua Nova Guiné		República do Congo (Congo-Brazzaville)	Serra Leoa	Tanzânia		Vietname	
Mali	Níger	Paraguai		Ruanda	Somália	Timor-Leste			
Mauritânia	Nigéria	Peru			Sri Lanka	Togo			
México					Suazilândia	Turquia			
Moçambique					Sudão				
Myanmar					Suriname				

7. Indique na tabela abaixo os países e regiões com malária (ou paludismo) onde esteve, mesmo que não tenha tido a doença. Responda às perguntas com um X no espaço de resposta. Cada coluna corresponde a uma estadia.

	EXEMPLO:	Descrição da 1ª vez que esteve num país onde existe malária	Descrição da última vez que esteve num país onde existe malária
País e Região onde esteve	Angola, Cuanza Sul		
Ano de Entrada no país	1983		
Ano de Saída do país	1984		
Duração da Estadia	<input type="checkbox"/> menos de 6 meses <input checked="" type="checkbox"/> 6 meses - 1 ano <input type="checkbox"/> 1 - 5 anos <input type="checkbox"/> 5 - 10 anos <input type="checkbox"/> 10 - 15 anos <input type="checkbox"/> 15 - 20 anos <input type="checkbox"/> mais de 20 anos	<input type="checkbox"/> menos de 6 meses <input type="checkbox"/> 6 meses - 1 ano <input type="checkbox"/> 1 - 5 anos <input type="checkbox"/> 5 - 10 anos <input type="checkbox"/> 10 - 15 anos <input type="checkbox"/> 15 - 20 anos <input type="checkbox"/> mais de 20 anos	<input type="checkbox"/> menos de 6 meses <input type="checkbox"/> 6 meses - 1 ano <input type="checkbox"/> 1 - 5 anos <input type="checkbox"/> 5 - 10 anos <input type="checkbox"/> 10 - 15 anos <input type="checkbox"/> 15 - 20 anos <input type="checkbox"/> mais de 20 anos
Motivo da Estadia	<input type="checkbox"/> Nascimento <input checked="" type="checkbox"/> Residência/Trabalho <input type="checkbox"/> Serviço Militar <input type="checkbox"/> Visita/Férias <input type="checkbox"/> Estudos <input type="checkbox"/> Voluntariado <input type="checkbox"/> Outro. Qual? _____	<input type="checkbox"/> Nascimento <input type="checkbox"/> Residência/Trabalho <input type="checkbox"/> Serviço Militar <input type="checkbox"/> Visita/Férias <input type="checkbox"/> Estudos <input type="checkbox"/> Voluntariado <input type="checkbox"/> Outro. Qual? _____	<input type="checkbox"/> Nascimento <input type="checkbox"/> Residência/Trabalho <input type="checkbox"/> Serviço Militar <input type="checkbox"/> Visita/Férias <input type="checkbox"/> Estudos <input type="checkbox"/> Voluntariado <input type="checkbox"/> Outro. Qual? _____
Teve malária (ou paludismo)?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/Não se recorda	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/Não se recorda	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/Não se recorda
Quem lhe disse que teve ou não teve malária (ou paludismo)?	<input type="checkbox"/> Médico <input type="checkbox"/> Curandeiro <input type="checkbox"/> Amigos/Familiares/Vizinhos <input checked="" type="checkbox"/> Eu próprio sabia <input type="checkbox"/> Outro. Quem? _____ <input type="checkbox"/> Não fiquei doente <input type="checkbox"/> Não sabe/Não responde	<input type="checkbox"/> Médico <input type="checkbox"/> Curandeiro <input type="checkbox"/> Amigos/Familiares/Vizinhos <input type="checkbox"/> Eu próprio sabia <input type="checkbox"/> Outro. Quem? _____ <input type="checkbox"/> Não fiquei doente <input type="checkbox"/> Não sabe/Não responde	<input type="checkbox"/> Médico <input type="checkbox"/> Curandeiro <input type="checkbox"/> Amigos/Familiares/Vizinhos <input type="checkbox"/> Eu próprio sabia <input type="checkbox"/> Outro. Quem? _____ <input type="checkbox"/> Não fiquei doente <input type="checkbox"/> Não sabe/Não responde
Fez análises de sangue?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/Não se recorda	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/Não se recorda	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/Não se recorda

Se teve malária (ou paludismo) relacionada com outra viagem, por favor preencha a tabela da página seguinte.

8. Se teve malária (ou paludismo) relacionada com outra viagem, por favor preencha a tabela da página seguinte.

	Outra viagem em que teve malária (ou paludismo)	Outra viagem em que teve malária (ou paludismo)	Outra viagem em que teve malária (ou paludismo)
País e Região onde esteve			
Ano de Entrada no país			
Ano de Saída do país			
Duração da Estadia	<input type="checkbox"/> menos de 6 meses <input type="checkbox"/> 6 meses - 1 ano <input type="checkbox"/> 1 - 5 anos <input type="checkbox"/> 5 - 10 anos <input type="checkbox"/> 10 - 15 anos <input type="checkbox"/> 15 - 20 anos <input type="checkbox"/> mais de 20 anos	<input type="checkbox"/> menos de 6 meses <input type="checkbox"/> 6 meses - 1 ano <input type="checkbox"/> 1 - 5 anos <input type="checkbox"/> 5 - 10 anos <input type="checkbox"/> 10 - 15 anos <input type="checkbox"/> 15 - 20 anos <input type="checkbox"/> mais de 20 anos	<input type="checkbox"/> menos de 6 meses <input type="checkbox"/> 6 meses - 1 ano <input type="checkbox"/> 1 - 5 anos <input type="checkbox"/> 5 - 10 anos <input type="checkbox"/> 10 - 15 anos <input type="checkbox"/> 15 - 20 anos <input type="checkbox"/> mais de 20 anos
Motivo da Estadia	<input type="checkbox"/> Nascimento <input type="checkbox"/> Residência/Trabalho <input type="checkbox"/> Serviço Militar <input type="checkbox"/> Visita/Férias <input type="checkbox"/> Estudos <input type="checkbox"/> Voluntariado <input type="checkbox"/> Outro. Qual? _____	<input type="checkbox"/> Nascimento <input type="checkbox"/> Residência/Trabalho <input type="checkbox"/> Serviço Militar <input type="checkbox"/> Visita/Férias <input type="checkbox"/> Estudos <input type="checkbox"/> Voluntariado <input type="checkbox"/> Outro. Qual? _____	<input type="checkbox"/> Nascimento <input type="checkbox"/> Residência/Trabalho <input type="checkbox"/> Serviço Militar <input type="checkbox"/> Visita/Férias <input type="checkbox"/> Estudos <input type="checkbox"/> Voluntariado <input type="checkbox"/> Outro. Qual? _____
Quem lhe disse que teve malária (ou paludismo)?	<input type="checkbox"/> Médico <input type="checkbox"/> Curandeiro <input type="checkbox"/> Amigos/Familiares/Vizinhos <input type="checkbox"/> Eu próprio sabia <input type="checkbox"/> Outro. Quem? _____ <input type="checkbox"/> Não sabe/Não responde	<input type="checkbox"/> Médico <input type="checkbox"/> Curandeiro <input type="checkbox"/> Amigos/Familiares/Vizinhos <input type="checkbox"/> Eu próprio sabia <input type="checkbox"/> Outro. Quem? _____ <input type="checkbox"/> Não sabe/Não responde	<input type="checkbox"/> Médico <input type="checkbox"/> Curandeiro <input type="checkbox"/> Amigos/Familiares/Vizinhos <input type="checkbox"/> Eu próprio sabia <input type="checkbox"/> Outro. Quem? _____ <input type="checkbox"/> Não sabe/Não responde
Fez análises de sangue?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/Não se recorda	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/Não se recorda	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe/Não se recorda

NOTA: SE TEVE MAIS EPISÓDIOS DE MALÁRIA PEÇA NOVO QUESTIONÁRIO E PREENCHA APENAS OS ESPAÇOS NO QUADRO.

ANEXO D – Parecer do Conselho de Ética do IHMT



Conselho de Ética
Instituto de Higiene e Medicina Tropical
Universidade Nova de Lisboa

Presidente: Prof. Doutor Gilles Dussault

Parecer nº 03-2014-TM

Título do Estudo: Imunidade em Malária: Contribuição para o Estudo de Anticorpos em Indivíduos com Estadia em Zona Endémica

Nome do investigador principal: Dr.ª Daniela Calisto

Orientadores: Professora Doutora Rosa Teodósio e Investigador Doutor Marcelo Silva

Entidade promotora: Instituto de Higiene e Medicina Tropical, UEI de Clínica Tropical

Objectivos do estudo: O estudo pretende determinar a prevalência e relevância biológica de anticorpos anti-plasmódio produzidos após o regresso de zona endémica de malária, bem como caracterizá-los por métodos imunológicos. Pretende-se ainda caracterizar epidemiologicamente a população de indivíduos portadores destes anticorpos, relacionando estes dados com os laboratoriais.

Justificativa e desenho do estudo: O estudo proposto é relevante e importante posto que pretende responder a uma questão científica e médica para a qual não há dados consistentes disponíveis e que pode ter um impacto significativo na compreensão da resposta imune face à infecção por *Plasmodium*. O desenho do estudo parece-nos correcto e adequado aos objectivos; não fica no entanto claro qual é o tamanho da amostra pretendida nem em quantos centros se pretende recrutar os participantes, o que poderá ter influência na obtenção de resultados.

Conflito de interesses: Não há conflitos de interesse evidentes.



Conselho de Ética
Instituto de Higiene e Medicina Tropical
Universidade Nova de Lisboa

Presidente: Prof. Doutor Gilles Dussault

Consentimento informado / informação para o participante: O Consentimento informado está elaborado em linguagem adequada à faixa etária dos participantes; os contactos da investigadora principal são fornecidos.

Conclusão:

O presente protocolo de estudo é considerado eticamente válido e aprovado pelo CEIHMT.

Lisboa, 25 de Fevereiro de 2014

Prof. Doutor Jorge Seixas

Prof.ª Doutora Aida Esteves Simões

GILLES DUSSAULT
Presidente do Conselho de Ética

ANEXO E – Resultados de PCR para *P. falciparum*

M: Marcador de peso molecular 100bp (Bioline, UK).

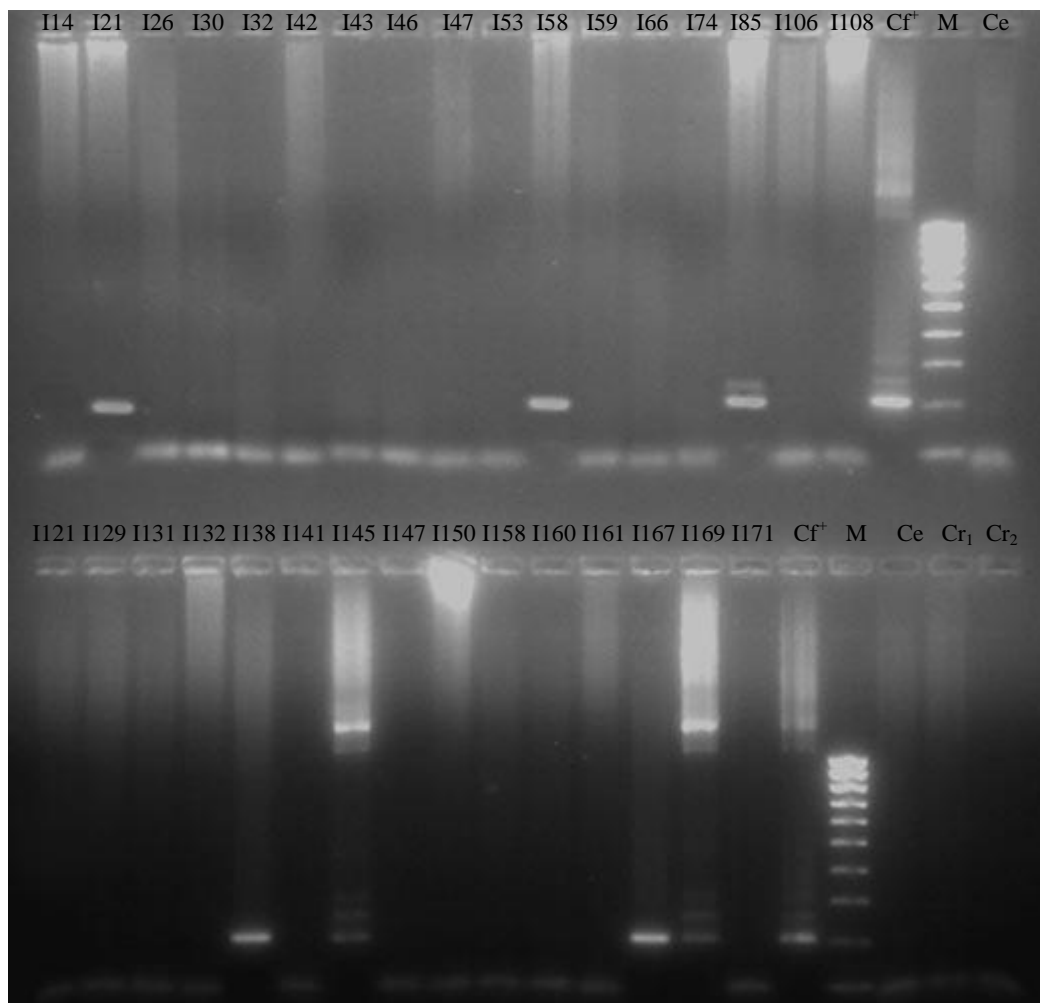
Cf⁺: Controlo positivo de *P. falciparum*;

Ce: Controlo negativo de extracção de DNA;

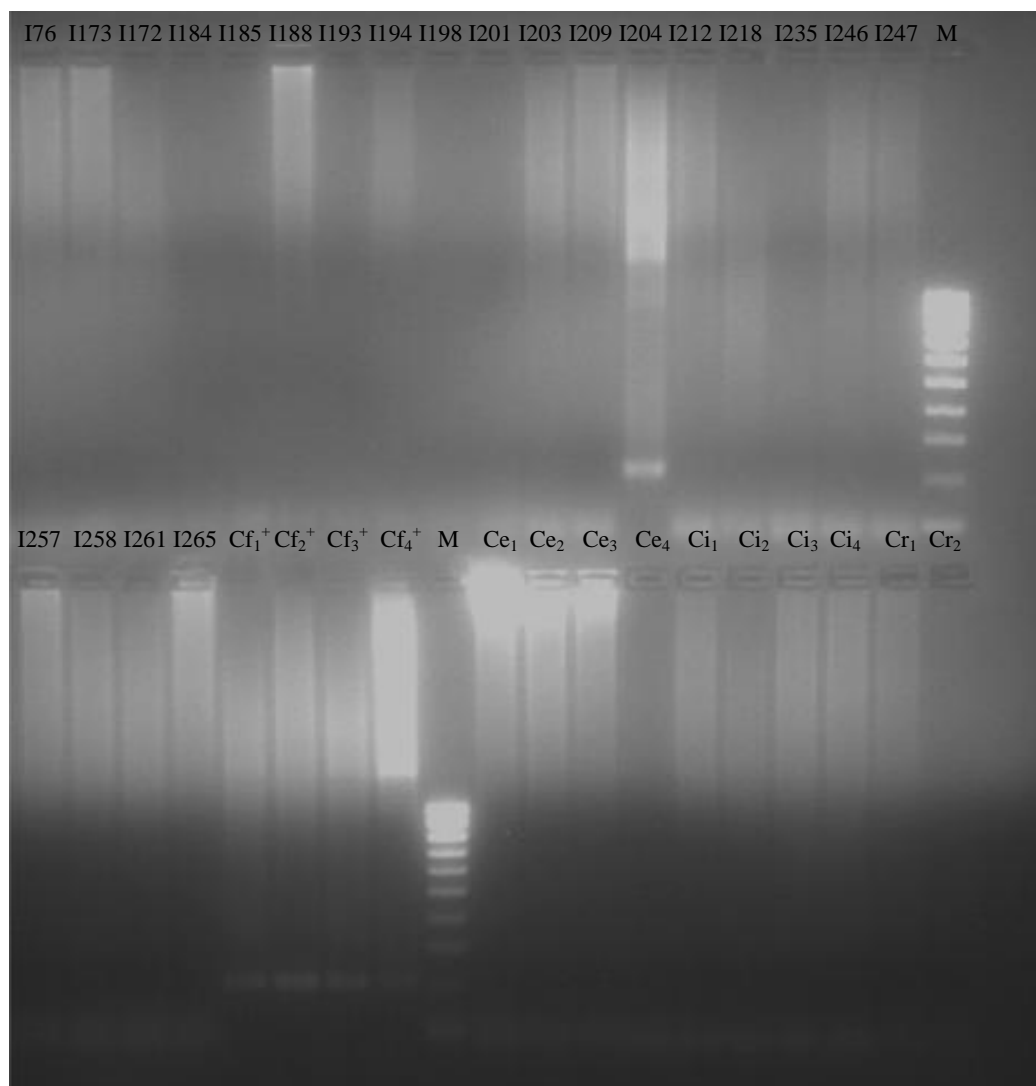
Ci: Controlo interno negativo (controla o não emparelhamento dos *primers* de *Plasmodium* spp. com constituintes do sangue de humano);

Cr₁: controlo negativo da 1^a reacção de PCR;

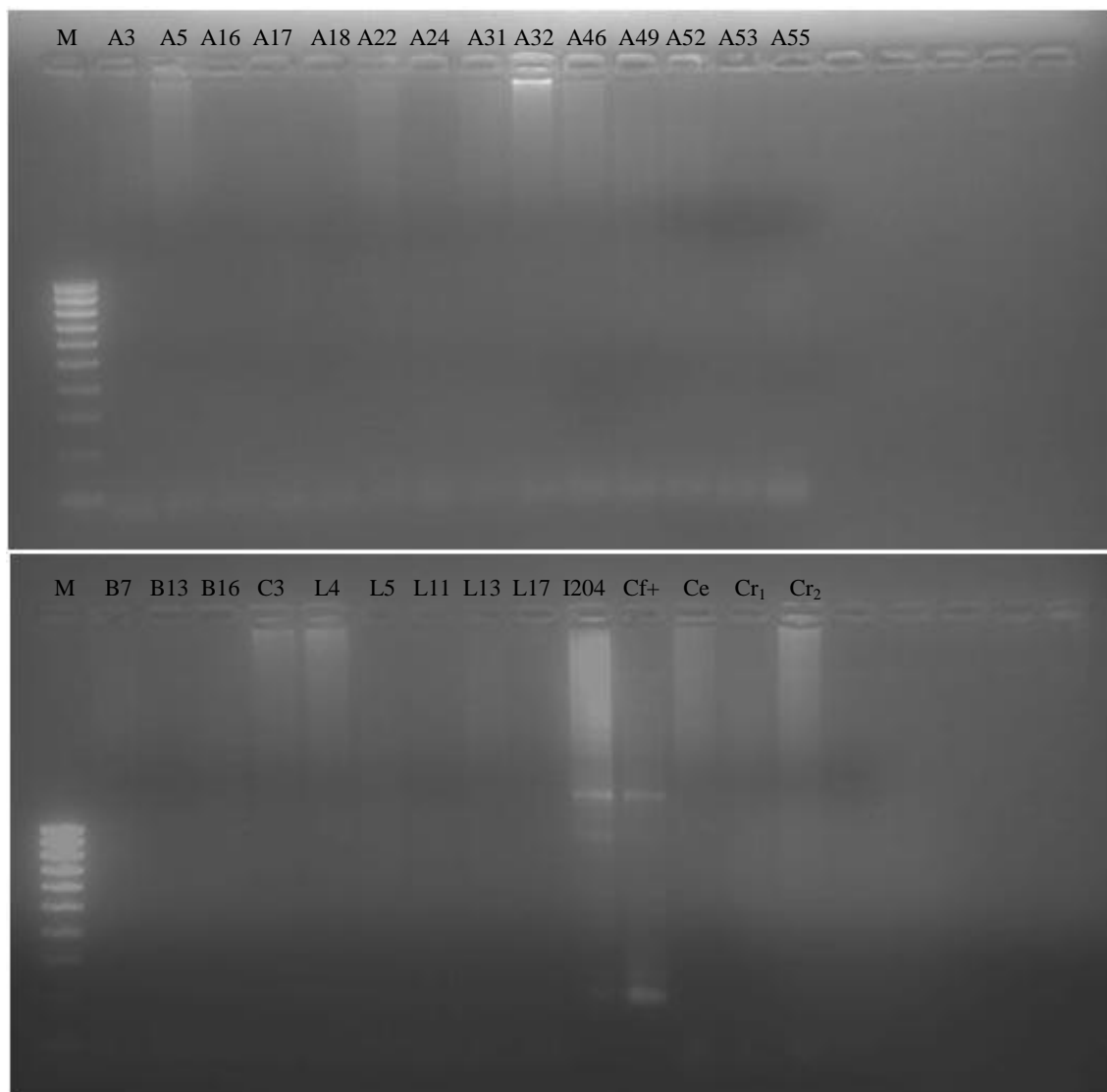
Cr₂: controlo negativo da 2^a reacção de PCR.



ANEXO E – Resultados de PCR para *P. falciparum*



ANEXO E – Resultados de PCR para *P. falciparum*



ANEXO F – Caracterização dos participantes com resultado de PCR positivo

ID	Naturalidade	Residência após nascimento	Tempo de corrido entre regresso zona endémica e participação no estudo	Número de estadias/viagens	Primeira estadia/viagem: País/Duração/Motivo	Única ou Última estadia/viagem: País/Duração/Motivo
I21	Portugal	-	< 6 meses	1	n.a.	Angola / <6 meses / Residência/Trabalho
I58	Portugal	27 anos	< 6 meses	2 – 9	Angola / 1-5 anos / Residência/Trabalho	Angola / 1 – 5 anos/ Residência/Trabalho
I85	Angola	72 anos	< 6 meses	1	n.a.	Angola / >20 anos / Nascimento
I138	Brasil	1 ano	< 6 meses	≥10	Angola / 1-5 anos / Residência/Trabalho	Angola / 1-5 anos / Residência/Trabalho
I145	Angola	27 anos	< 6 meses	-	n.a.	Angola / > 20 anos / Nascimento
I167	Angola	5 anos	< 6 meses	≥10	Angola / 1-5 anos / Nascimento	Angola / <6 meses / Residência/Trabalho
I169	Angola	42 anos	< 6 meses	-	-	Angola / - / -
I204	Portugal	-	< 6 meses	-	Angola / <6 meses / Residência/Trabalho	Angola / 1 – 5 anos / Residência/Trabalho

“n.a.”: não aplicável

“-“: sem informação