

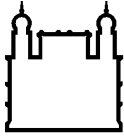
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**MALÁRIA E PARASIToses INTESTINAIS: INFLUÊNCIA DA COINFECÇÃO NA  
RESPOSTA IMUNE À MALÁRIA EM POPULAÇÕES DE ASSENTAMENTO NO  
ESTADO DE RONDÔNIA, BRASIL.**

**JUAN CAMILO SÁNCHEZ ARCILA**

Rio de Janeiro  
Agosto de 2015



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

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

***JUAN CAMILO SÁNCHEZ ARCILA***

Malária e parasitoses intestinais: influência da coinfeção na resposta imune à malária em populações de assentamento no estado de Rondônia, Brasil

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Ciências

**Orientadora:** Dra. Joseli de Oliveira Ferreira

**RIO DE JANEIRO**  
Agosto de 2015

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

S211 Sánchez Arcila, Juan Camilo

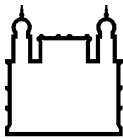
Malária e parasitoses intestinais: influência da coinfeção na resposta imune à malária em populações de assentamento no Estado de Rondônia, Brasil / Juan Camilo Sánchez Arcila. – Rio de Janeiro, 2015.  
xxii, 95 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.  
Bibliografia: f. 69-86

1. Malária. 2. Coinfeção. 3. Parasitoses intestinais. 4. Resposta imune. 5. Citocinas. 6. Anticorpo. 7. Humano. I. Título.

CDD 616.9362

---



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

**AUTOR: JUAN CAMILO SÁNCHEZ ARCILA**

**MALÁRIA E PARASIToses INTESTINAIS: INFLUÊNCIA DA COINFECÇÃO NA  
RESPOSTA IMUNE À MALÁRIA EM POPULAÇÕES DE ASSENTAMENTO NO  
ESTADO DE RONDÔNIA, BRASIL**

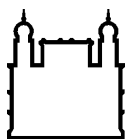
**ORIENTADORA: Dra. Joseli de Oliveira Ferreira**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

<b>Profa. Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida</b>	(FIOCRUZ-INI)	
<b>Prof. Dr. Leonardo Moura Carvalho</b>	(FIOCRUZ-IOC)	
<b>Prof. Dr. Luis Cristóvão de Moraes Sobrinho Porto</b>	(Laboratório	de
Criopreservação - UERJ)		
<b>Prof. Dr. Juliana Cardoso de Oliveira</b>	(Laboratório	de
Criopreservação - UERJ)		
<b>Prof. Dr. Paulo Renato Rivas Totino</b>	(FIOCRUZ-IOC)	

Rio de Janeiro, Agosto de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

**Para mi mamá, porque talvez todo  
comenzó gracias a ella, entre  
microscópios, pipetas, tinciones y  
parásitos**

## **AGRADECIMENTOS**

Esta tese, como qualquer processo científico, nasce a partir das contribuições significativas de um grupo enorme de pessoas. Por este motivo agradeço à equipe que de alguma forma contribuiu para a realização destes estudos. Certamente sem a colaboração deles não teria sido possível a realização deste trabalho.

Agradeço aos participantes do projeto e pelo material biológico que foi cedido tão gentilmente. Este trabalho é por vocês e para vocês.

Peço desculpas e agradeço antecipadamente às pessoas que de alguma forma contribuíram ao desenvolvimento desta tese e que por algum motivo os nomes não aparecem nestes agradecimentos.

Ao Brasil/Rio de Janeiro por nos acolher e por ser a nossa casa

Agradeço à FIOCRUZ-IOC e ao programa de pós-graduação em Biologia Parasitária pela concessão da bolsa de estudos durante estes quatro anos.

Um agradecimento muito especial acompanhado com um sentimento enorme de admiração a Lila, pela dedicação na orientação neste longo caminho, por nos ensinar a que o produto de nosso trabalho vai além das publicações, e que ele pode e deve mudar as condições de vida das pessoas que moram nas áreas de estudo.

Um agradecimento especial para Virginia Araújo Pereira, pela amizade e companhia constante durante estes anos de doutorado e pelo apoio constante na execução dos experimentos. As longas caminhadas são menos difíceis quando temos por perto pessoas como você.

Agradeço antecipadamente aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite para avaliar esta tese.

À Dra. Paula de Luca e o Dr. Josué da Costa Lima Junior pelos conselhos e pelo apoio nos momentos bons e nos difíceis.

Agradeço a Raquel Ferraz e a Clarissa Cunha pela amizade em todos estes anos, pelos altos papos sobre a vida ou sobre a ciência, em qualquer momento e lugar.

Ao Rodrigo Nunes e Danielly Sequeira pela companhia e amizade.

A Luciana Almeida e Juliana Pereira pela colaboração com os experimentos.

A Aline Renzetti, pela gentileza e disposição para nos ajudar em todo momento no laboratório.

À Dra. Dalma Banic pela colaboração no projeto.

À Dra. Fátima Santos pela ajuda e colaboração no planejamento do trabalho de campo.

À Dra. Mariana Vasconcellos pela amizade desde o primeiro trabalho de campo.

A Daiana Perce pela companhia e ajuda inestimável nos dois trabalhos de campo.

Agradeço a Carolina Rosadas pela participação no trabalho de campo.

Ao Dr. Sergio Mendonça, quem foi meu orientador de mestrado, por permitir dar o primeiro passo para nossa vinda ao Brasil.

À Dra. Nubia Camacho pela ajuda procurando as informações para a realização do mestrado.

Aos integrantes do Laboratório de Imunoparasitologia: Profa. Dra. Fátima C. Silva, Dr. Álvaro Bertho, Dra. Léa Cisne, Alessandro Marins, Rosângela Leite Pellegrino, Rafaela Veiga, Amanda Ribeiro, Roselene Oliveira de Souza e Vera Lucia Toledo de Araujo.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Maurício Martins Rodrigues, conversei pouquíssimas vezes com ele, porém seus trabalhos e as manifestações de carinho dos colegas e alunos quando soubemos a notícia da morte, me mostrou o impacto que um professor-pesquisador pode ter a vida de outras pessoas.

À Profa. Dra. Irene Soares pela produção da proteína recombinante PvAMA-1.

Ao Dr. Antônio Teva e Dr. Cesarino Aprígio, Fábio Luis Storer e a Dra. Cleoni Mendes de Lima, pelo apoio no trabalho de campo.

À plataforma de ELISPOT Programa para o Desenvolvimento Técnico em Ferramentas para a Saúde-PDTIS/FIOCRUZ e ao Dr. Josué da Costa Lima-Júnior.

À plataforma de Citometria de Fluxo e ao Dr. Álvaro Bertho e em especial à Dra. Andrea Pons pelo apoio constante e pelos conselhos.

Agradeço à equipe do LATED e em especial a Bruna Fonseca pela colaboração com a leitura do Limunex.

Agradeço a minhas professoras de português, em especial a Esther Vieira quem fez mais agradável o aprendizado de uma nova língua.

Um agradecimento especial a Andrea Sánchez, o Dr. Márcio Pavan pela leitura e sugestões para melhorar a tese.

Aos meus amigos: Cecília Stahl, Jerônimo Sansevero, Márcia Baldisserotto, Gentil Vasconcellos, Ghennie Rodríguez, Camila Rezende e Claudia Mora, pela amizade e companhia constante nestes anos no Brasil.

*En español:*

A Andre, mi mejor amiga, a quien admiro profundamente por su humildad e inteligencia, quien crea y por la que vivimos todos los días en el planeta del amor.



A mi mamá quien a pesar de las dificultades siempre garantizó el amor y la educación por encima de todo.

A mi Hermano Diego, porque a pesar de la distancia, cuando piendo en él siempre está cerca.

A mi papá

A mi familia: A los abuelitos (José, Julia y Rebeca), los tíos y tías (Carlos Arcila, Germán Arcila, Doris Rodríguez, Helmer Sánchez, Marina Rodríguez, Patricia Arcila, Alejandro Arcila, Manuel Arcila, María Eugenia Arcila, Miguel Sánchez\*), a los primos.

A mi otra familia: A Marta Tapia, Margarita Meissner, Fernando Sánchez, Laura Sánchez, Ximena Restrepo, Amparo Caicedo de Tapia, Carlos Tapia y a los chinos.

A Juana Camacho y su inmensa ayuda, consejos y apoyo.

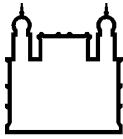
A mi profesora de biología Mara Benavides, por entender e incentivar mis estudios en biología.

**A Pachamama**

***Larga vida al CAM***

**“Indulge your passion for science, says she [nature], but let your science be human, and as such *have a direct reference to action and society.*”**

David Hume



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

# MALÁRIA E PARASIToses INTESTINAIS: INFLUÊNCIA DA COINFEÇÃO NA RESPOSTA IMUNE À MALÁRIA EM POPULAÇÕES DE ASSENTAMENTO NO ESTADO DE RONDÔNIA, BRASIL

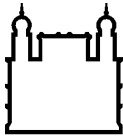
## RESUMO

### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Juan Camilo Sánchez-Arcila**

As doenças tropicais não ocorrem de forma isolada devido a sua prevalência e distribuição. A malária e parasitoses intestinais são infecções endêmicas em várias regiões do planeta, incluindo a região amazônica. Evidência experimental mostra que infecções parasitárias concomitantes podem induzir modificações na resposta imune específica a antígenos de cada patógeno e nas manifestações clínicas causadas por essas infecções. Atualmente no Brasil são escassas informações sobre a prevalência de coinfeções malária-parasitoses intestinais em humanos, ou dados descrevendo alterações na resposta imune a estes patógenos quando elas se encontram associadas. Este fato nos levou a estudar tanto a prevalência quanto as alterações nas variáveis clínicas e imunológicas associadas à coinfeção malária-parasitoses intestinais em indivíduos moradores de assentamentos na Amazônia legal, localizados no Estado de Rondônia, Brasil. A partir do diagnóstico coparassitológico e parasitológico e molecular de *Plasmodium*, os indivíduos participantes do estudo foram agrupados em quatro grupos: Infectados somente por *Plasmodium* (**M**), indivíduos coinfectados *Plasmodium*-parasitoses intestinais (**CI**), infectados unicamente com parasitoses intestinais (**IP**) e indivíduos sem infecções por *Plasmodium* e/ou parasitoses intestinais (**UN**). Observamos uma frequência importante de indivíduos coinfectados com malária-parasitoses intestinais (18%). Também foi visto que os protozoários são o principal grupo de parasitoses intestinais infectando esta população. O protozoário observado com maior frequência foi *Giardia intestinalis* enquanto *Strongyloides stercoralis* foi o helminto mais frequente. Não observamos alterações de variáveis hematológicas nos indivíduos coinfectados comparados com os indivíduos com malária. Em relação à avaliação dos níveis de citocinas, não observamos diferenças entre os indivíduos dos grupos **CI** e **M**. Os indivíduos infectados com *Plasmodium* apresentaram altos níveis de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e CRP, junto com baixos níveis de IL-17A. Em contraste, foram observados altos

níveis de IL-17A em indivíduos do grupo **IP**. Posteriormente foi avaliada a alteração da resposta humoral a proteínas plasmodiais em resposta à coinfeção. Não observamos alterações da produção de anticorpos contra as proteínas PvAMA-1 e PvMSP-1<sub>19</sub> associada à coinfeção, porém, o grupo PI apresentou menor frequência de resposta e menores índices de reatividade de IgG para as duas proteínas. Contudo, não foram observadas alterações na frequência de respondedores e índices de reatividade nas subclasses de IgG contra as duas proteínas recombinantes nos indivíduos do grupo CI. Em conjunto, estes resultados mostram que as infecções por parasitos intestinais são frequentes na população estudada, além de existir uma grande riqueza de algumas espécies de protozoários. Entretanto, apesar da prevalência destas infecções na população, elas parecem não influenciar as variáveis hematológicas, níveis de citocinas e anticorpos contra antígenos de *P. vivax* nos indivíduos coinfectados.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

# MALARIA Y PARASITOSIS INTESTINALES: INFLUENCIA DE LA COINFECCIÓN EN LA RESPUESTA INMUNE A LA MALARIA EN POBLACIONES DE ASENTAMIENTO EN EL ESTADO DE RONDÔNIA, BRASIL

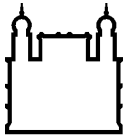
## RESUMEN

### TESIS DE DOCTORADO EN PARASITOLOGÍA

**Juan Camilo Sánchez-Arcila**

Las enfermedades tropicales no ocurren de forma aislada debido a su prevalencia y distribución. La malaria y las parasitosis intestinales son infecciones endémicas en varias regiones del planeta, incluyendo la región amazónica. Evidencia experimental muestra que las infecciones parasitarias concomitantes pueden inducir cambios tanto en la respuesta inmune específica a antígenos de cada patógeno como en las manifestaciones clínicas causadas por ellos. Actualmente en el Brasil son escasas las informaciones sobre la prevalencia de las coinfecciones entre malaria y parasitosis intestinales en poblaciones humanas, o datos describiendo alteraciones de la respuesta inmune a los patógenos cuando estas dos infecciones se encuentran asociadas. Esta falta de información nos llevó a estudiar tanto la prevalencia como las alteraciones en las variables clínicas e inmunológicas asociadas a las coinfecciones malaria-parasitosis intestinales en individuos residentes en asentamientos localizados en la región amazónica, en el Estado de Rondônia, Brasil. De esta forma mostramos en dos artículos los resultados de la investigación realizada en la población descrita. A partir del diagnóstico coparásitológico, parasitológico y molecular de *Plasmodium*, los individuos participantes del estudio fueron agrupados en cuatro grupos: Infectados solamente por *Plasmodium* (**M**), individuos coinfectados *Plasmodium*-parasitosis intestinales (**CI**), infectados únicamente con parasitosis intestinales (**IP**) e individuos sin infecciones con *Plasmodium* y/o parasitosis intestinales (**UN**). En el primer trabajo observamos una frecuencia importante de individuos coinfectados con malaria-parasitosis intestinales (18%). También observamos que los protozoos fueron el grupo principal de parásitos intestinales infectando la población estudiada. La especie de protozoo observada con mayor frecuencia fue *Giardia intestinalis* y la especie de helminto más frecuente fue *Strongyloides stercoralis*. No observamos alteraciones de las variables

hematológicas entre los individuos de los grupos **M** e **CI**. En relación a los niveles de citocinas, no hubo diferencias entre los individuos coinfectados e individuos sólo con malaria. Los individuos infectados con *Plasmodium* se caracterizaron por presentar niveles altos de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 y CRP, y niveles bajos de IL-17A. Por otro lado, IL-17A estaba aumentado en individuos del grupo **IP**. En el segundo trabajo no observamos alteración en los niveles de anticuerpos contra las proteínas PvAMA-1 y PvMSP-1<sub>19</sub> asociados a las coinfecciones, sin embargo, los individuos infectados con parásitos intestinales presentaron menor frecuencia de respuesta junto con menores índices de reactividad de IgG a las dos proteínas. Sin embargo, no se observaron alteraciones en la frecuencia e índice de reactividad de las subclases de IgG contra ambas proteínas recombinantes. En conjunto estos resultados muestran que en la población estudiada las infecciones por parásitos intestinales se presentan con frecuencia y con gran riqueza de protozoos. Sin embargo, a pesar de la prevalencia de estas infecciones en la población estudiada, éstas parecen no afectar las variables hematológicas, niveles de citocinas y anticuerpos contra antígenos de *P. vivax* en los individuos coinfectados.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

# MALARIA AND INTESTINAL PARASITOSIS: INFLUENCE OF COINFECTION IN THE IMMUNE RESPONSE TO MALARIA IN SETTLEMENT POPULATIONS IN RONDÔNIA, BRAZIL

## ABSTRACT

### PhD THESIS IN PARASITOLOGY

**Juan Camilo Sánchez-Arcila**

Tropical diseases do not occur isolated due to their prevalence and distribution. Malaria and intestinal parasites are endemic infections in several regions of the planet including amazonic regions. Experimental evidence has shown that concomitant parasitic infections could induce changes in both immune response to pathogen antigens and clinical manifestations caused by them. Nowadays there are few studies of prevalence of malaria-intestinal parasite coinfections in human populations, or data describing alterations caused in immune response to these pathogens when both infections coexist simultaneously. This lack of information led us to study the prevalence and changes of hematologic and immunological variables associated to coinfections in a population from a settlement located in the Amazon region in Brazil. Here we show in two articles the results of the investigation conducted in the described population. From stool samples diagnosis and parasitological and molecular diagnosis of *Plasmodium*, the studied individuals were grouped in: Individuals single-infected with *Plasmodium* (**M**), *Plasmodium*-intestinal parasites coinfecting individuals (**CI**), Individuals single-infected with intestinal parasites (**IP**) and individuals without *Plasmodium* and/or intestinal parasite infections (**UN**). In the first paper a high frequency of coinfecting individuals was observed (18%). We also observed that protozoans were the main intestinal parasite group infecting the studied population. Among protozoans the most prevalent species was *Giardia intestinalis* and the most prevalent helminth species was *Strongyloides stercoralis*. There were no changes in hematologic variables or cytokines comparing individuals from **M** and **CI** groups. Individuals infected with *Plasmodium* (groups M and CI) presented increased levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 and CRP, and low levels of IL-17A. On the other hand, individuals from IP group had increased levels of IL-17A. In the second paper we did not find changes in the antibody levels directed to PvAMA-1 and PvMSP-1<sub>19</sub> associated to coinfections. Nevertheless, the group of individuals with intestinal parasites presented a reduced frequency of responders and lower reactivity Indexes of IgG to both proteins. In spite of these responses, there were no changes of IgG subclasses frequencies and reactivity indexes among the groups studied. Together these results show that in the studied population there exists an important prevalence and intestinal parasites, mainly of protozoans.

However, in spite of the important values of intestinal parasites prevalences in the population; hematological variables, cytokines and antibody production directed to *P. vivax* antigens are not affected in coinfecting individuals.



## ÍNDICE

Prof. Dr. Paulo Renato Rivas Totino (FIOCRUZ-IOC) .....	iii
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>vi</b>
<b>Índice</b> .....	<b>xvi</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>xviii</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>xix</b>
<b>Lista de Siglas e Abreviaturas</b> .....	<b>xx</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
2.1 A malária .....	5
2.2 Ciclo de vida de organismos do gênero <i>Plasmodium</i> .....	5
2.3 Situação da malária no Brasil.....	9
2.4 A malária no Estado de Rondônia .....	13
2.5 Aspectos clínicos e patogênese da Malária.....	15
2.6 As coinfeções .....	24
2.6.1 Coinfeção entre malária e parasitoses intestinais .....	25
2.6.2 Coinfeções malária e vírus .....	27
2.6.3 Coinfeção malária e outros parasitos.....	29
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
3.1 Objetivo Geral .....	33
3.2 Objetivos Específicos .....	33
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
4.1 Área de estudo.....	34
4.2 Casuística .....	37
4.3 Coleta de sangue.....	39
4.4 Diagnóstico parasitológico de malária.....	39
4.5 Diagnóstico Molecular de <i>Plasmodium</i> .....	39
4.5.1 Extração de DNA a partir de sangue total .....	39
4.5.2 PCR para diagnóstico Molecular de <i>Plasmodium</i> .....	40
4.6 Exame parasitológico de fezes .....	41
4.7 Cálculo amostral.....	41

4.8	Formação dos grupos de estudo em relação ao diagnóstico parasitológico.....	42
4.9	Exames hematológicos.....	42
4.10	Proteínas Recombinantes .....	42
4.10.1	PvMSP-1 .....	42
4.10.2	PvAMA-1.....	43
4.11	Análise da resposta imune humoral.....	43
4.11.1	ELISA para a detecção de IgG contra PvAMA-1 e PvMSP-1 <sub>19</sub> .....	44
4.11.2	ELISA para a detecção de subclasses de IgG .....	44
4.12	Armazenamento dos dados e análise estatística .....	46
4.12.1	Teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) .....	46
4.12.2	Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney rank sum test.....	46
4.12.3	Pairwise Test for Multiple Comparisons of Mean Rank Sums (Nemenyi-Tests).....	46
5	<b>RESULTADOS</b>	47
5.1	Trabalho 1 (Artigo Publicado): .....	47
5.2	Trabalho 2: .....	48
5.3	Prevalência de Malária e parasitoses intestinais.....	48
5.4	Características dos indivíduos estudados.....	49
5.5	Níveis de subclasses de IgG para as proteínas de <i>P. vivax</i> AMA-1 e MSP-1 <sub>19</sub> .....	54
6	<b>DISCUSSÃO</b>	57
7	<b>CONCLUSÕES</b>	67
8	<b>PERSPECTIVAS</b>	68
9	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	69
10	<b>APÊNDICES</b>	88
A.	Aprovação do projeto pelo comité de ética em pesquisa .....	88
B.	Termo de consentimento livre e esclarecido de participação no projeto de pesquisa.....	88
C.	Questionário epidemiológico .....	93
11	<b>ANEXO: TRABALHO 2 (PUBLICADO)</b>	95

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1 Ciclo evolutivo de <i>Plasmodium</i> . .....	8
Figura 2-2 Países com transmissão ativa de malária em 2013.....	9
Figura 2-3 Número de casos registrados de malária no Brasil por espécie plasmodial (1961-2014). .....	11
Figura 2-4 Número de casos de malária nos Estados Brasileiros com maior transmissão (2011-2014).....	12
Figura 2-5 Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2013...	13
Figura 2-6 Número de casos de malária registrados no Estado de Rondônia (2004-2014).....	15
Figura 4-1 Configuração espacial do assentamento Joana D'Arc, Porto Velho, Rondônia.....	35
Figura 4-2 Policlínica Ana Adelaide, localizado em Porto Velho, Rondônia.....	36
Figura 4-3. Joana D'Arc, local de residência dos voluntários participantes do estudo. ....	37
Figura 4-4. Esquema da configuração da proteína de <i>P. vivax</i> MSP-1. ....	43
Figura 4-5. Esquema da configuração da proteína recombinante de <i>P. vivax</i> AMA-1 utilizada nos experimentos. ....	43
Figura 5-1 Distribuição e número de indivíduos entre os grupos de acordo com diagnóstico de malária de parasitoses intestinais.....	48
Figura 5-2 Prevalência de parasitoses intestinais em indivíduos coinfectados com <i>Plasmodium</i> -parasitos intestinais (CI) e só com parasitoses intestinais (IP). ....	49
Figura 5-3. Frequência de anticorpos específicos a PvAMA-1 ou PvMSP-1 <sub>19</sub> em indivíduos de área endêmica de malária, determinada por ELISA. ....	52
Figura 5-4. Soroprevalência de IgG e Índice de Reatividade a PvAMA-1 e PvMSP-1 <sub>19</sub> : .....	53
Figura 5-5. Seroprevalência de IgG para PvAMA-1 e PvMSP-1 <sub>19</sub> : .....	55
Figura 5-6. Índice de Reatividade a PvAMA-1 e PvMSP-1 <sub>19</sub> : .....	56

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 2-1 Citocinas pró-inflamatórias: Características biológicas e o papel na reposta imune à malária .....</b>	<b>20</b>
<b>Tabela 2-2 Citocinas anti-inflamatórias e reguladoras na malária.....</b>	<b>22</b>
<b>Tabela 2-3 Fatores de crescimento: função biológica e papel na malária .....</b>	<b>22</b>
<b>Tabela 2-4 Quimiocinas: função biológica e papel na malária.....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 3-1 Estudos relacionados às coinfeções no Brasil e no mundo.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabela 5-1 Características da população estudada.....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC	Acre
AM	Amazonas
AMA-1	<i>Apical Membrane Antigen 1</i> (Antígeno Apical de Membrana 1)
BCG	Bacilo Calmet-Guérin
CD4	<i>Cluster Differentiation 4</i> (Grupamento de Diferenciação 4)
CD8	<i>Cluster Differentiation 8</i> (Grupamento de Diferenciação 8)
CRP	<i>C reactive protein</i> (Proteína C reativa)
GCSF	<i>Granulocyte Colony-stimulating Factor</i> (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos)
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor</i> (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)
CS	Circumsporozoíta
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i> (Vírus Eptein-Barr)
GLURP	<i>Glutamate-Rich Protein</i> (proteína Rica em Glutamato)
Grupo CI	Grupo Coinfectado
Grupo M	Grupo Malária
Grupo IP	Grupo <i>intestinal parasites</i> (parasitos intestinais)
Grupo UN	Grupo <i>uninfected</i> (não infectado)
Hab.	Habitantes
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i> (Vírus da Hepatite B)
HHV-4	<i>Human herpes Virus 4</i> (Herpes Virus Humano 4)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G 1
IgG2	Imunoglobulina G 2
IgG3	Imunoglobulina G 3
IgG4	Imunoglobulina G 4
IFN- $\gamma$	<i>Interferon gamma</i> (Interferon gama)
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2

IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12 p 70
IL-13	Interleucina 13
IL-17A	Interleucina 17A
IL-17F	Interleucina 17F
IL-23	Interleucina 23
IPA	Índice Parasitário Anual
km	Kilômetro
Km <sup>2</sup>	Kilômetros Quadrados
LPS	Lipoporissacarídeo
MHCI	<i>Major Histocompatibility Complex class I</i> (Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe I)
MHCII	<i>Major Histocompatibility Complex class II</i> (Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II)
MCP1	<i>Monocyte Chemotactic Protein – 1</i> (Proteína de Quimioatração de Monócitos – 1)
MIP-1 $\beta$	Macrophage Inflammatory Protein –1 beta (Proteína Inflamatória de Macrófagos – 1 beta)
MS	Ministério da Saúde
MSP-1	<i>Merozoite Surface Protein 1</i> (Proteína de Superfície de Merozoíto – 1)
MSP-3	<i>Merozoite Surface Protein 3</i> (Proteína de Superfície de Merozoíto – 3)
MSP-9	<i>Merozoite Surface Protein 9</i> (Proteína de Superfície de Merozoíto – 9)
NK	<i>Natural Killer</i> (Exterminadoras Naturais)
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido Nítrico)
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
RI	<i>Reactivity Index</i> (Índice de Reatividade)
RO	Rondônia

RTS,S/AS01	Candidato vacinal (Sequências da proteína Circumsporozoíta e do vírus da hepatite B + o adjuvante AS01)
SIVEP	Sistema de Vigilância Epidemiológica
SVS	Sistema de Vigilância em Saúde
TB	Tuberculose
Th1	<i>T helper 1</i> (T auxiliador 1)
Th2	<i>T helper 2</i> (T auxiliador 2)
T $\gamma\delta$	Linfócitos T gama delta
TGF- $\beta$	<i>Transforming Grow Factor – beta</i> (Fator de Crescimento Transformador – beta)
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor – alpha</i> (fator de Necrosis Tumoral – alpha)
Tregs	<i>Regulator T cells</i> (Células T reguladoras)
VCAM1	<i>Vascular Cell Adhesion Protein 1</i> (Molécula de Adesão Celular Vascular 1)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

## 1 INTRODUÇÃO

A malária ocorre em mais de 100 países e 40% da população mundial vive em áreas de risco de adquirir a doença. A cada ano 500 milhões de pessoas são infectadas e um milhão morre, principalmente crianças com idade inferior a cinco anos e mulheres grávidas, na África Subsaariana (WHO 2014a). No Brasil, foram registrados 134.907 casos em 2014, 99% destes casos na região da Amazônia legal (SIVEP-Malária Ministério da Saúde 2015).

A transmissão da malária na região amazônica está relacionada à população suscetível, ao agente etiológico e ao vetor, além das condições ecológicas, geográficas, econômicas, sociais e culturais. Devido à ampla incidência e aos efeitos debilitantes, a malária é a doença que mais contribui para reduzir a capacidade produtiva das pessoas para desenvolver seus recursos econômicos. Os projetos de colonização implantados na região Amazônica a partir da década de 70, principalmente no Estado de Rondônia, promoveram grandes investimentos, estimulando o deslocamento de grandes contingentes populacionais, sem contato prévio com a malária, para as áreas endêmicas. Os projetos de assentamentos, atividade agropecuária, construção de hidroelétricas e de extrativismo vegetal e mineral têm provocado desmatamento de áreas extensas, agressões ambientais, desorganização espacial e concentração de indivíduos em condições sanitárias inadequadas propiciam e facilitam a transmissão de doenças, incluindo a malária (Hahn et al. 2014).

Apesar da redução do número de casos de malária no Brasil nos últimos anos, a meta de erradicar esta doença está longe de ser atingida. Portanto o desenvolvimento de uma vacina ainda é considerado uma das melhores estratégias para controlar a doença. Na malária, as formas assexuadas do parasita são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Portanto, uma vacina contra esse estágio preveniria ou reduziria a morbidade e mortalidade dessa endemia através da eliminação ou redução da carga parasitária.

Trabalhos pioneiros demonstraram que uma imunidade protetora contra a malária pode ser induzida em camundongos pela inoculação de esporozoítos irradiados (Nussenzweig et al. 1967) e em humanos também pela inoculação com esporozoítos irradiados (Hoffman et al. 2002), esporozoítos não atenuados, porém sob um esquema de tratamento profilático com cloroquina (Belnoue et al. 2004), ou pela inoculação de baixas doses de hemácias parasitadas (Pombo et al. 2002).



Vale ressaltar que a efetividade real de uma vacina para malária será determinada em ensaios no campo em condições naturais de exposição aos plasmódios (e a outros parasitos). Portanto uma investigação detalhada sobre o tipo de resposta imune induzida em populações expostas naturalmente à malária é importante para fornecer informações sobre o potencial antigênico e imunogênico de candidatos potenciais a uma vacina.

Uma das características das regiões endêmicas de malária, incluindo a Amazônia brasileira, é a sobreposição da distribuição geográfica dos plasmódios com outros tipos de parasitos. A maioria dos estudos de coinfeções é focada principalmente em *Plasmodium falciparum*, e apesar de que o multiparasitismo é uma realidade nas áreas endêmicas de malária no Brasil, poucos trabalhos têm abordado a influência das coinfeções com *P. vivax*, principal espécie responsável pelos casos de malária no Brasil.

Dentre as infecções parasitárias mais frequentes, a presença de helmintíases intestinais é a mais comum, com mais de dois bilhões de pessoas infectadas no mundo. Os helmintos são um dos grupos de organismos mais estudados não só pela sua ampla distribuição e prevalência, notadamente aumentada nas populações mais pobres, como também pelo estímulo de respostas imunes que podem interagir negativamente na aquisição de proteção imune contra várias infecções como a malária (Druilhe et al. 2005; Troye-Blomberg and Berzins 2008). Os principais helmintos intestinais que infectam a população são *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma doudenale* e *Trichuris trichiura*. Estes parasitas infectam atualmente 1,3; 1,4 e 1 bilhão de pessoas respectivamente em todo o mundo (Haque 2007). No Brasil as geo-helmintíases têm uma alta prevalência, também incluindo populações da região Amazônica (Coura et al. 1994; Boia et al. 1999; Araujo and Fernández 2005; Harhay et al. 2010).

Infecções helmínticas estão associadas com resposta imune predominantemente do tipo Th2, marcada pela expansão de células como eosinófilos, mastócitos e basófilos; pela produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e pela resposta aumentada de anticorpos IgG4 e IgE (Maizels et al. 1993).

Infecções parasitárias concomitantes podem induzir modificações na resposta imune específica a antígenos de cada patógeno, produzindo assim modificações nas manifestações clínicas das doenças causadas por eles. No caso específico das coinfeções com helmintos, tem-se hipotetizado que a resposta anti-inflamatória induzida por eles seria capaz de alterar a resposta imune aos plasmódios.

Contudo, as informações experimentais e em populações humanas são muito variadas e podemos encontrar trabalhos que descrevem desde efeitos negativos (Tshikuka et al. 1996; Nacher et al. 2002; Spiegel et al. 2003), benéficos (Murray et al. 1977; Briand et al. 2005; Lyke et al. 2005) ou ainda mencionando a falta de efeito das coinfeções na malária (Shapiro et al. 2005; Bejon et al. 2008). Estes resultados contraditórios podem ser atribuídos às diferentes espécies de helmintos encontrados, à diversidade de manifestações clínicas e às populações expostas a diferentes níveis de transmissão das infecções.

Até o começo desta tese havia poucas informações sobre a prevalência e/ou efeito das coinfeções malária-parasitoses intestinais no Brasil. Um único estudo avaliou o efeito da coinfeção malária-helmintíases em populações humanas, sendo descrito efeito protetor das infecções por helmintos na anemia causada por *P. vivax*, em uma população de crianças na região Amazônica (Melo et al. 2010).

Escolhemos como área de estudo o Estado de Rondônia, localizado na Amazônia legal, área na qual o nosso grupo vem trabalhando há mais de 20 anos e onde as populações expostas à malária estão bem caracterizadas. Nesta área foram incluídos indivíduos moradores do assentamento Joana D'Arc, região com transmissão estável de malária e condições sanitárias que favorecem a transmissão de parasitoses intestinais. Foram obtidas amostras de sangue para análises dos parâmetros imunológicos e de fezes para o diagnóstico de parasitoses intestinais, bem como informações clínicas e epidemiológicas para estudar possíveis correlações, com as variáveis imunológicas. As variáveis imunológicas escolhidas para os testes foram, por um lado, os níveis de citocinas circulantes, de radicais de óxido nítrico (NO) e proteína C reativa (CRP). Por outro lado, investigamos a resposta de anticorpos específicos às proteínas recombinantes de *Plasmodium vivax* MSP-1<sub>19</sub> e AMA-1.

Nossos objetivos foram avaliar a frequência das coinfeções na população estudada e verificar possíveis alterações de parâmetros clínicos e imunológicos associados às coinfeções malária-parasitos intestinais.

No primeiro artigo apresentado, observamos que na população estudada 6% dos indivíduos estavam infectados só com malária (grupo M), 18% coinfectados com malária e parasitoses intestinais (grupo CI), 37% infectados só com parasitoses intestinais (grupo IP) e 39% não infectados (UN). Da mesma forma, as parasitoses intestinais mais frequentes na população estudada foram *Giardia intestinalis* e *Strongyloides stercoralis*. Na avaliação dos níveis de citocinas, não observamos

diferenças entre os indivíduos dos grupos **CI** e **M**. Os indivíduos com malária apresentaram incremento de Interleucina 6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-10 e Proteína C-Reativa (CRP), e níveis baixos de IL-17A. Em contraste, foram observados altos níveis de IL-17A em indivíduos do grupo **IP**. Os dados obtidos neste trabalho apontaram que as coinfeções não influenciam as variáveis hematológicas nem os níveis de citocina dos indivíduos coinfectados. No entanto, estas variáveis estavam altamente influenciadas pelas infecções com *Plasmodium*.

No artigo 2 foi apresentado um estudo descrevendo as alterações nos níveis de anticorpos contra as proteínas PvMSP-1<sub>19</sub> e PvAMA-1 associadas às coinfeções. Neste trabalho encontramos alterações na frequência e índice de reatividade de IgG em indivíduos do grupo IP, porém os níveis de subclasses não estavam alterados, indicando que a infecção por *Plasmodium* ainda é o fator principal que governa as mudanças nos níveis de anticorpos contra as proteínas recombinantes estudadas.

Em conjunto estes resultados mostram que na população estudada as infecções por parasitos intestinais são frequentes além de existir uma grande riqueza de algumas espécies de protozoários. Contudo, apesar da prevalência destas infecções na população, estas infecções não parecem influenciar os níveis de citocinas e anticorpos nos indivíduos coinfectados com malária-parasitos intestinais. Ainda assim é evidente a necessidade de estudos que indiquem se as mudanças observadas nos indivíduos com parasitos intestinais, neste caso os protozoários, constituem um risco para a infecção à malária.

Esperamos que esta tese contribua fornecendo dados não só sobre a prevalência das coinfeções malária-parasitoses intestinais em populações de assentamentos na Amazônia legal, mas apresente novos dados sobre o impacto das parasitoses intestinais nestas populações. Esperamos que estes dados possam impulsionar estudos semelhantes em outras regiões endêmicas de malária que apresentem prevalências e espécies diferentes de parasitos intestinais, para conhecermos se existem variações de respostas associadas às coinfeções em áreas com alta prevalência de *P. vivax*. Por outro lado, esperamos que este trabalho seja uma primeira contribuição para conhecer os efeitos das coinfeções na reposta imune a proteínas candidatas a vacinas *P. vivax*, em áreas endêmicas de malária vivax, incluindo o Brasil.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A malária

A malária, conhecida popularmente como febre palúdica, sezão, febre terça ou quartã, é uma doença parasitária de caráter agudo ou crônico, amplamente distribuída nas regiões tropicais do planeta.

O agente etiológico da malária são protozoários do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. O ciclo de vida destes parasitos compreende dois hospedeiros: um vertebrado (répteis, aves ou mamíferos, incluindo o homem) e outro invertebrado, insetos fêmeas do gênero *Anopheles*. A via de infecção natural dos plasmódios começa pela picada e inoculação de parasitos no hospedeiro vertebrado. No entanto outras vias de transmissão têm sido descritas, como através da placenta (transmissão congênita), por transfusão de sangue e por uso compartilhado de seringas e agulhas contaminadas.

Até o momento foram identificadas aproximadamente 100 espécies de plasmódios, 22 das quais infectam macacos e 50 parasitam aves ou répteis. Atualmente são reconhecidas cinco espécies de *Plasmodium* capazes de infectar e causar doença no homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* - *P. ovale curtisi* e outra variante não recombinante *P. ovale wallikeri* - (Sutherland et al. 2010; Calderaro et al. 2013) e *P. knowlesi*. A transmissão ocorre pela picada de mosquitos infectados pertencentes à ordem Diptera, infraordem Culicomorpha, família Culicidae, Subfamília Anophelinae, gênero *Anopheles* (Rey 2001a; Eiras 2011). Dentre as 465 espécies de *Anopheles* formalmente reconhecidas, cerca de 65 delas ocorrem no Brasil, entretanto apenas 15 espécies de importância epidemiológica e que transmitem a malária foram registradas, algumas das quais fazem parte de complexos de espécies crípticas (Consoli and Oliveira 1994).

### 2.2 Ciclo de vida de organismos do gênero *Plasmodium*

Os plasmódios são parasitos obrigatoriamente intracelulares que possuem a capacidade de invadir e se multiplicar em vários tipos celulares, sendo os principais os hepatócitos e as hemácias.

O ciclo de vida dos plasmódios no hospedeiro vertebrado começa pela inoculação dos esporozoítos, que são as formas infectantes dos plasmódios, na pele do hospedeiro. Estima-se que uma entre 15 a 123 esporozoítos são inoculados

durante o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* (Rosenberg et al. 1990). Estudos no modelo experimental murino, utilizando microscopia intravital, mostraram que a maioria dos esporozoítos é inoculada diretamente na pele e podem permanecer neste local por várias horas antes de encontrar um vaso sanguíneo (Vanderberg and Frevert 2004). Dos esporozoítos inoculados, 15-25% migram para os vasos sanguíneos ou linfáticos, enquanto cerca de 60% permanecem no lugar da inoculação (Amino et al. 2006). Os esporozoítos que seguem os vasos linfáticos atingem os linfonodos, podendo ser degradados pelas células dendríticas ou se diferenciarem em formas exoeritrocíticas (Amino et al. 2006). Mesmo 24 horas após a inoculação, alguns parasitas têm sido encontrados em desenvolvimento na derme e epiderme, assim como em regiões adjacentes aos folículos pilosos, onde podem sobreviver por várias semanas (Amino et al. 2006; Yamauchi et al. 2007; Gueirard et al. 2010).

Os esporozoítos que atingem a circulação sanguínea são capazes de dar continuidade ao ciclo biológico, migrando para o fígado e infectando o hepatócito (Figura 2-1). Esse processo é complexo e depende de várias interações e da migração dos parasitos por várias células hospedeiras. Os esporozoítos que chegam ao fígado conseguem se movimentar utilizando o processo de *gliding* e atravessam a barreira sinusoidal, provavelmente via células de Küpffer (Vanderberg 1974; Frevert et al. 2006). Uma vez no parênquima hepático, os esporozoítos migram através de vários hepatócitos antes de se desenvolverem em um hepatócito específico, onde será formado um vacúolo parasitóforo (Mota et al. 2001, 2002). Os fatores que determinam a escolha do hepatócito adequado para o desenvolvimento do esporozoíto ainda são desconhecidos.

Uma vez dentro dos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que, após sofrerem várias divisões por esquizogonia, formam os esquizontes (Figura 2-1). Esta fase do ciclo de vida é denominada de ciclo exoeritrocítico e durante esta etapa a infecção é assintomática e seu tempo de duração varia de acordo com a espécie plasmoidal. Para *P. falciparum* o tempo estimado é de 8-11 dias, *P. vivax* 8-17 dias, *P. malariae* 18-40 dias, *P. ovale* 10-17 dias e *P. knowlesi* 9-12 dias (Mehlhorn and Aspöck 2008).

Uma das características biológicas que distinguem *P. vivax* e *P. ovale* de outras espécies que causam a malária humana é que algumas populações de esporozoítos inicia um ciclo esquizogônico após o estabelecimento nos hepatócitos e outras ficam em estado de latência, os hipnozoítas, podendo se diferenciar muito

tempo após a infecção inicial. Estas formas hipnozoítas são as responsáveis pelas recaídas observadas em pacientes infectados por estas espécies plasmodiais (Krotoski et al. 1980; White 2011).

Após a esquizogonia, os esquizontes maduros liberam os merozoítos teciduais através de brotamento de vesículas (merossomos) ou por ruptura do esquizonte no hepatócito (Figura 2-1). Os merossomos possuem a capacidade de não serem reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro. (Sturm et al. 2006; Baer et al. 2007). Após serem liberados, os merozoítos invadem as hemácias, envolvendo uma série de interações específicas entre o parasita e a célula hospedeira. Provavelmente a primeira interação merozoíto-hemácia ocorre por uma colisão casual, dando lugar à aderência de baixa afinidade e reorientação do parasita para que seu complexo apical entre em contato com a membrana do eritrócito e formando uma junção irreversível que permite a entrada do parasito no interior do eritrócito através da formação do vacúolo parasitóforo (Cowman and Crabb 2006; Haldar et al. 2007).

Os merozoítos sofrem uma segunda esquizogonia onde são gerados novos merozoítos, os quais serão liberados na corrente sanguínea após a ruptura das hemácias. Após várias gerações de merozoítos sanguíneos, alguns se diferenciam dando origem às formas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos, que amadurecem sem sofrer divisão celular. Estas formas ficarão circulando no sangue até o momento de serem ingeridos com as hemácias por fêmeas dos mosquitos *Anopheles* durante o repasto sanguíneo.

Os gametócitos ingeridos são encaminhados para o estômago do inseto e devido à diferença de temperatura, pH, e ação enzimática, a membrana das hemácias é rompida e os gametócitos são liberados no estomago do mosquito. Dentro do estômago do mosquito ocorre a fecundação, os microgametócitos liberam microgametas (exflagelação) que penetram nos macrogametócitos dando origem à formação do ovo ou zigoto. O zigoto se diferencia em uma forma móvel (ocineto) que penetra na membrana peritrófica do intestino médio do anofelino transformando-se em oocisto. Nessa fase inicia-se o processo de multiplicação celular que resulta na formação de diversos esporozoítos. Parte dos esporozoítos liberados na hemocele migra para as glândulas salivares do mosquito (Prudêncio et al. 2006). A fêmea do anofelino, ao realizar o repasto sanguíneo, inoculará essas formas no homem reiniciando e perpetuando a espécie, conforme mostrado na Figura 2-1.

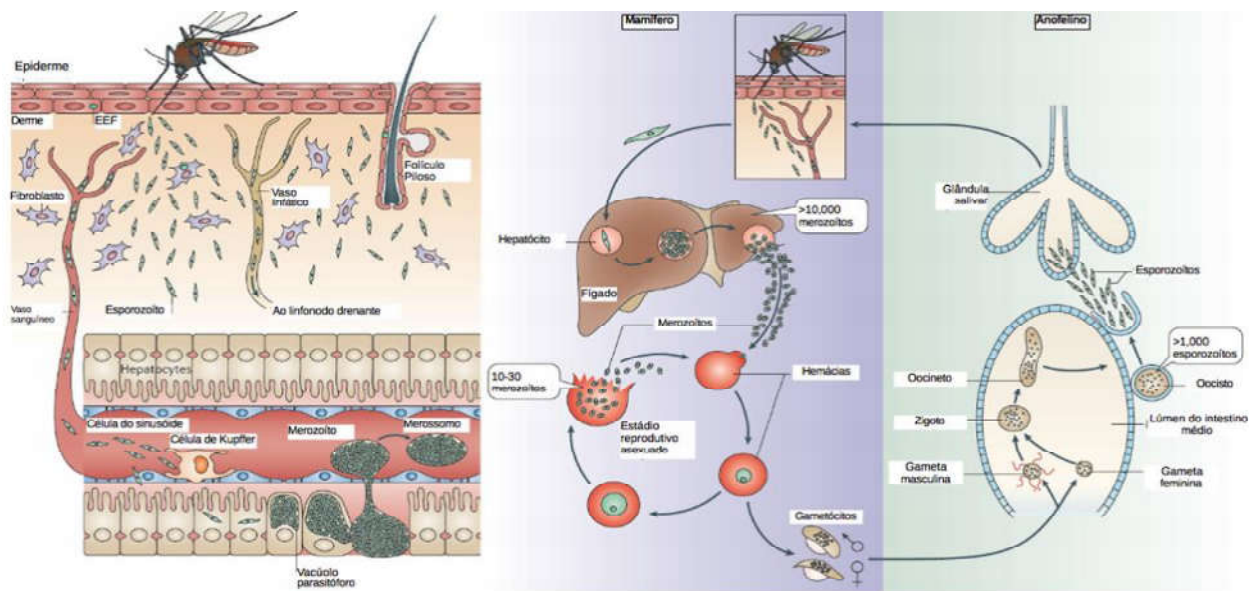


Figura 2-1 Ciclo evolutivo de *Plasmodium*. Adaptado de Ménard et al. 2013.

A malária é uma das doenças parasitárias mais importantes do mundo, de grande impacto no desenvolvimento econômico das populações humanas nas regiões tropicais e subtropicais. Mais da metade da população mundial está exposta à malária e sua transmissão foi até hoje documentada em 106 países, dos quais 43 na África e 63 em outras regiões, sendo assim um grave problema mundial de saúde pública (Figura 2-2).

Nos últimos 10 anos a expansão na implementação de intervenções para combater a malária ajudou a reduzir a incidência dos casos em 30% no mundo e 34% na África. No mesmo período a mortalidade diminuiu 47% no mundo e 54% na África (WHO 2014b).

Em 2013, quase metade da população exposta ao risco de infecção na África teve acesso a mosquiteiros impregnados com inseticidas de longa duração e 124 milhões de pessoas tiveram acesso a pulverização residual de inseticida na parte interna das casas. Apesar disso, em 2013 foram estimados 198 milhões de casos e 584.000 mortes e estimou-se que 3,3 bilhões de pessoas em 97 países e territórios ainda estão expostos ao risco de contrair a doença (WHO 2014a). O continente Africano é responsável por aproximadamente 90% de todas as mortes por malária, causadas em sua maioria por *P. falciparum*. As crianças com idade inferior a 5 anos e as mulheres grávidas são as populações mais afetadas, correspondendo ao 78% dos óbitos por esta doença (WHO 2014a). Fora da África, a malária acomete populações de mais 51 países com cerca de 40 milhões de casos e 62 mil mortes

por ano (Roll Back Malaria Partnership 2013). Dentre esses 51 países, 21 pertencem às Américas e 30 pertencem à Europa, Ásia e ao Pacífico. As espécies *P. vivax* e *P. falciparum* ocorrem em alta frequência nessas regiões fora da África. Porém, nas Américas *P. vivax* é responsável por quase 80% dos casos (exceto no Haiti e na República Dominicana).

Os dados atuais dos índices de malária demonstram que os esforços mundiais para a redução dos óbitos e dos casos de malária vêm obtendo êxito e a meta de eliminar a malária no mundo vem tendo também o suporte de modelos matemáticos que sugerem ser possível a erradicação em momentos e locais específicos de atuação (Águas et al. 2008). Apesar do otimismo, combater a malária necessita de um fluxo contínuo de recursos. No ano de 2013 foram gastos US\$ 2.7 bilhões para controlar e eliminar a malária, um aumento de 3 vezes o valor gasto em 2005, porém quantidade inferior dos US\$ 5.1 bilhões necessários para alcançarmos as metas de controle e eliminação da malária no mundo (WHO 2014b). Além disso, a disseminação de anofelinos resistentes aos inseticidas em uso e a resistência do plasmódio aos medicamentos antimaláricos surgem como importantes ameaças no combate à malária.

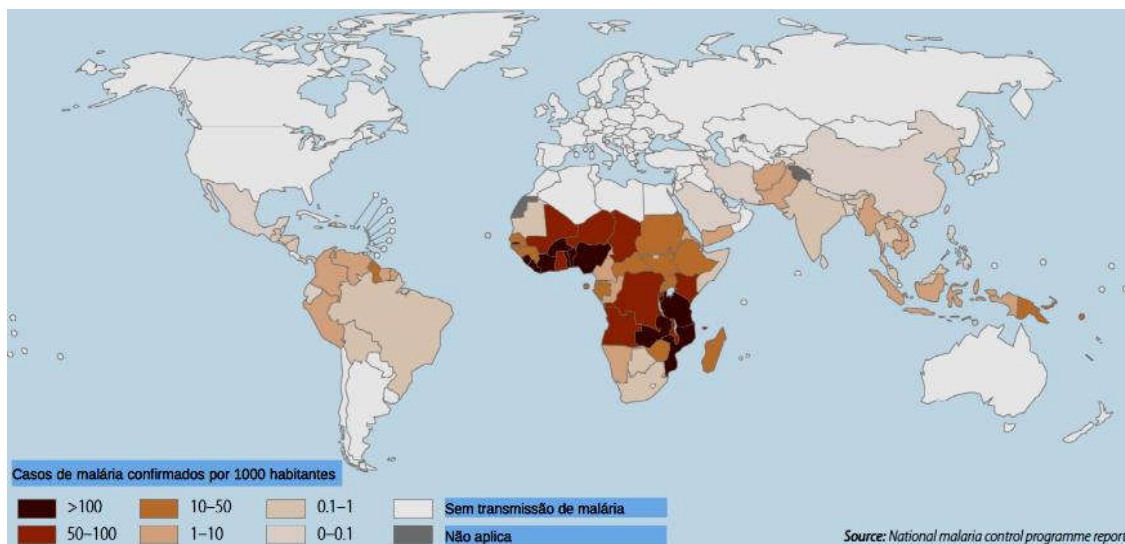


Figura 2-2 Países com transmissão ativa de malária em 2013. Adaptado de WHO malaria report 2014.

### 2.3 Situação da malária no Brasil

No Brasil, a malária permanece como uma das principais endemias e constitui um importante problema de saúde pública. Embora o programa de erradicação da



malária do Ministério da Saúde no Brasil tenha sido um sucesso, no final dos anos 70 foi impossível conter a rápida propagação da doença na bacia amazônica.

Após a década de 1970, a região amazônica testemunhou uma enorme transformação. Programas de colonização, patrocinados pelo governo, exploração de minérios, migração maciça e a construção de estradas e barragens trouxeram uma nova realidade para a qual a área não estava preparada. Isso contribuiu para o recrudescimento da malária e o surgimento de epidemias, principalmente nas zonas de garimpo, em áreas habitacionais dos projetos de colonização e em canteiro de obras.

Em meados da década de 90 a incidência anual de malária era 10 vezes maior que em 1970, em torno de 500 mil casos anuais, dos quais mais de 99% provenientes dos Estados da Amazônia: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Oliveira-Ferreira et al. 2010; Pina-Costa et al. 2014).

O empenho na erradicação mundial da malária, apoiada pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) até 1992, concentrou-se no combate aos mosquitos. No Brasil diversas estratégias foram adotadas pelos órgãos do governo envolvidos no combate à malária: a Estratificação Epidemiológica (1980), a Operação Impacto (1986) e o Projeto de Controle da Malária na Bacia Amazônica (1989). A partir de 1992, a estratégia de erradicação foi substituída pelo Programa de Controle Integrado da Malária (1992) e o Plano de Intensificações de Controle da Malária nas áreas de Alto Risco da Amazônia Legal (1996), formulados para implementar diagnóstico precoce e tratamento imediato dos casos, ajustados às características particulares da transmissão existentes em cada localidade.

As novas medidas adotadas, apesar de terem apresentado algum efeito sobre a incidência da malária em alguns Estados, não foram suficientes para conter o avanço da doença no país e a incidência da malária voltou a crescer registrando 635.644 casos em 1999 e o surgimento de resistência do agente etiológico aos esquemas terapêuticos utilizados (Figura 2-3). Em 2000, o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal foi implementado, tendo como meta a redução da incidência de malária em 50% até o final de 2001, em função do elevadíssimo número de casos. Em sequência, o governo brasileiro criou o Programa Nacional de Controle da Malária e essa iniciativa melhorou tanto a estrutura das unidades de saúde quanto o controle dos riscos de transmissão da doença na Região.

No ano de 2014 foram notificados 134.907 casos de malária no Brasil, sendo o *P. vivax* a espécie mais prevalente (83,27%) seguida por *P. falciparum* (15,53%) e *P. malariae* (0,016%) (SIVEP-Malária Ministério da Saúde 2015). Até o final da década de 80 as infecções por *P. falciparum* e *P. vivax* eram igualmente prevalentes, mas a partir de 1996 o *P. vivax* passou a ser responsável por mais de 70% dos casos notificados, mantendo-se nesta posição até os dias atuais (Figura 2-3).

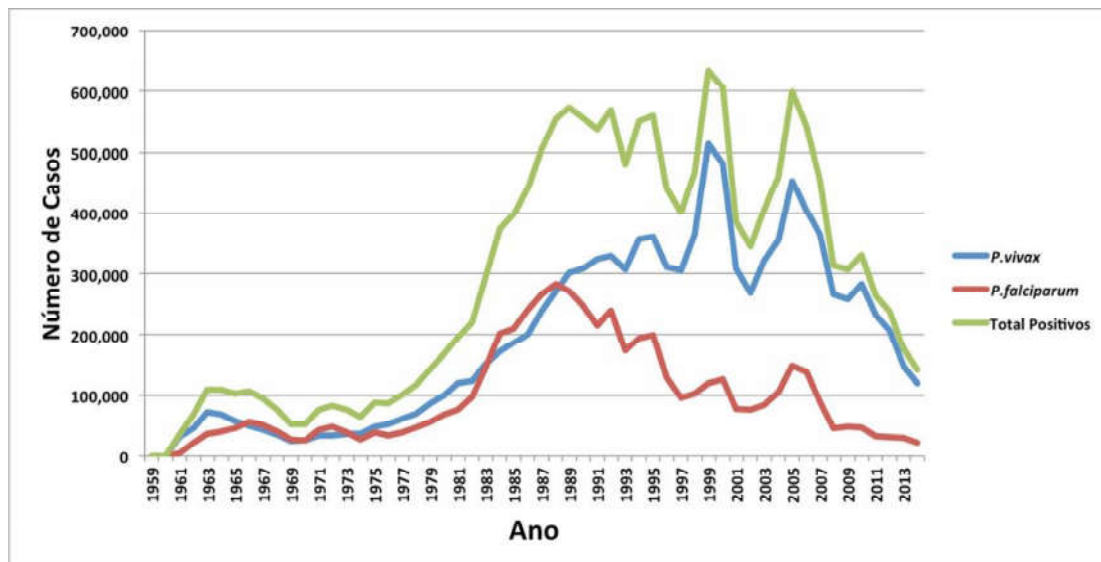
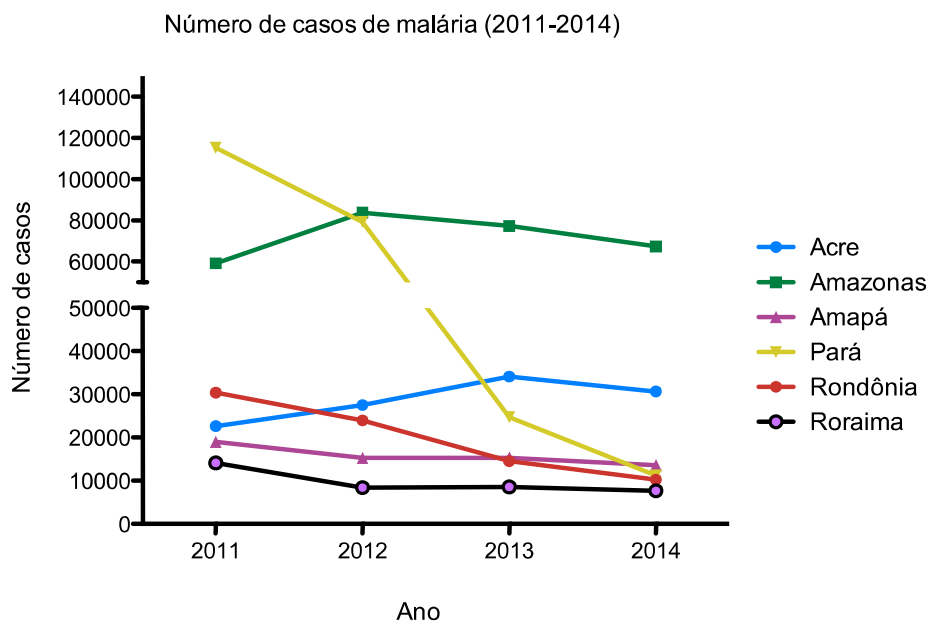


Figura 2-3 Número de casos registrados de malária no Brasil por espécie plasmodial (1961-2014). Fonte: Datasus-SIVEP-malária.

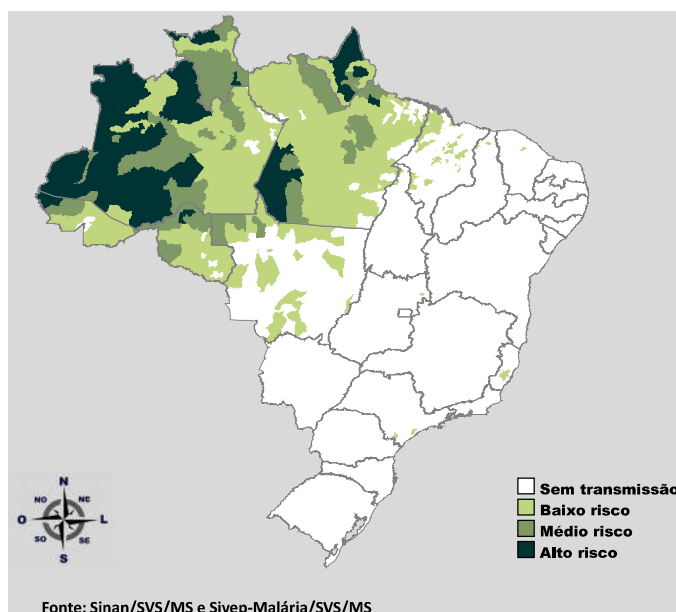
Atualmente, os Estados do Acre (AC), Rondônia (RO), Amazonas (AM) e Pará (PA) são responsáveis pelo maior número de casos da região Amazônica com variação do número e do índice parasitário anual (IPA) entre os estados (Figura 2-4).



**Figura 2-4** Número de casos de malária nos Estados Brasileiros com maior transmissão (2011-2014).  
Fonte: SIVEP-malária.

Dentre os 808 municípios pertencentes à região Amazônica, 37 são responsáveis por 80,37% dos casos notificados de malária e cinco por 21,48%: Cruzeiro do Sul (AC), Porto Velho (RO), Itaituba (PA), Eirunepé (AM) e Manaus (AM) Figura 2-5.

Na região extra-amazônica a malária notificada é, em sua maioria, importada das áreas endêmicas do Brasil ou de outros países. A malária autóctone, embora em baixa prevalência, ocorre em todos os Estados da região sudeste e em alguns Estados da região sul cobertos pela Mata Atlântica (Wanderley et al. 1994; Oliveira-Ferreira et al. 2010; Pina-Costa et al. 2014) A infecção costuma ser descrita como assintomática, com baixa parasitemia e com a predominância da espécie *P. vivax* (Couto et al. 2010). Não se conhecem ainda os fatores que determinam este comportamento da doença nessa área. Os vetores responsáveis pela transmissão da malária na região extra-amazônica pertencem a dois subgêneros: *Nyssorhynchus* (*An. albirtasis*, *An. darlingi* e *An. aquasalis*) e *Kertessia* (*An. cruzii* e *An. bellator*).



**Figura 2-5** Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2013. Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS.

## 2.4 A malária no Estado de Rondônia

Historicamente, o Estado de Rondônia sempre ocupou uma posição de destaque quanto ao número de casos de malária reportados a nível nacional se refere, ocupando no ano de 2009 o terceiro lugar no número de casos, apesar de ocupar só 4.7% da região da Amazônia Legal. Muitas epidemias de malária ocorreram no Estado a partir dos primeiros exploradores que navegaram pelos rios Madeira e Mamoré, nordestinos que vieram para trabalhar na extração da borracha, a construção da Estrada de Ferro Madeira-Mamoré, as expedições da comissão Rondon e o projeto de construção da BR-364.

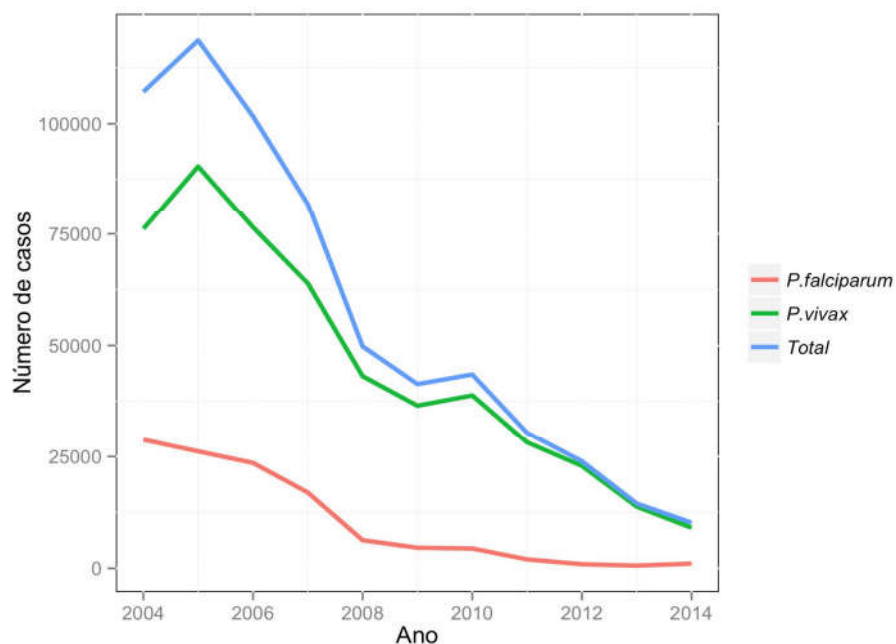
Nas décadas de 1970 e 1980 o Estado de Rondônia foi alvo de um intenso fluxo migratório devido aos programas governamentais de colonização e à construção da Estrada BR-364, que liga Cuiabá a Porto Velho. O número de casos de malária em Rondônia aumentou de alguns milhares para mais de 300 mil ao ano no final da década de 1980, para uma população que havia crescido explosivamente de quase 100 mil para 1.300.000 habitantes. Naquela época o Estado recebeu o título de capital mundial da malária.

Essa crise levou o governo federal a intensificar as campanhas de controle, criando centenas de unidades para diagnóstico, tratamento e combate ao vetor. O resultado foi positivo com uma queda progressiva de incidência para 50 mil casos em 1996. Entretanto, a queda na qualidade das ações de controle fez com que os

números de casos notificados ultrapassem 100 mil casos em 2004, mostrando a importância da continuidade das medidas de controle.

Atualmente Rondônia é o quinto Estado com maior número de casos de malária (10.207 casos em 2014) registrados no Brasil. A capital, Porto Velho está localizada ao norte do Estado (08°47'01"S, 63°55'56"O), compreende uma área de 237.590,543 Km<sup>2</sup> e população estimada de 1.748.531 habitantes no ano de 2014 (IBGE 2015). Dentro de Porto Velho a distribuição de malária é heterogênea como em todo o Estado, sendo as regiões urbanizadas praticamente livres de malária, enquanto a população moradora da área rural, espalhada tanto nos assentamentos quanto nas margens ribeirinhas do Rio Madeira e afluentes, é responsável pelos maiores índices de malária no município.

Esta região está caracterizada por ter populações variadas estando compostas tanto por indivíduos nascidos em área endêmica quanto por indivíduos migrantes, que viajaram a estas regiões na procura de terras, incentivo dos governos militares desde a década de 1970 (Katsuragawa et al. 2008). Atualmente, devido à implementação de estratégias como o Projeto para Prevenção e Controle da Malária na Amazônia Brasileira, com investimento de R\$ 100 milhões em 47 municípios de seis Estados (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Roraima), o número de casos de malária continua diminuindo a cada ano na maioria dos Estados da Amazônia legal. As ações de controle têm sido efetivas no Estado de Rondônia, pois a diferença do que acontecia em décadas passadas, este Estado apresenta números de casos de malária com tendência à queda, passando de 30.412 casos no ano de 2011 a 10.206 no ano de 2014 (Figura 2-6).



**Figura 2-6 Número de casos de malária registrados no Estado de Rondônia (2004-2014).** Fonte: SIVEP-Malária: Ministério da Saúde.

Apesar do cenário positivo, atualmente existe uma grande preocupação com o aumento do desmatamento na região amazônica somado à construção de usinas hidrelétricas, fatores que podem influenciar no aumento de casos de malária na região (Katsuragawa et al. 2009).

## 2.5 Aspectos clínicos e patogênese da Malária

A malária é uma doença infecciosa sistêmica aguda ou crônica que causa alterações em vários órgãos. A dinâmica da transmissão, a idade do hospedeiro, assim como o perfil genético e imunológico são determinantes importantes da doença, variando desde as formas benignas até as formas graves e fatais (Druilhe and Pérignon 1997, 1998). O quadro clínico da malária pode ser leve, moderado ou grave, na dependência da espécie do parasito, da quantidade de parasitos circulantes, do tempo de doença e do nível de imunidade adquirida pelo paciente. As gestantes, as crianças e os indivíduos primo-infectados estão sujeitos a maior gravidade, principalmente por infecções por *P. falciparum*, que podem ser letais. Os indivíduos infectados podem ter desde ausência de sintomas ou sintomas leves como febre e dor de cabeça até a forma severa da doença (anemia grave, coma)

que pode provocar a morte. O diagnóstico precoce e o tratamento correto e oportuno são os meios mais adequados para reduzir a gravidade e a letalidade por malária.

A fase aguda da malária está caracterizada por apresentar alterações hematológicas características associadas à infecção. Dentre as alterações mais frequentes encontram-se a redução nos valores do hematócrito, da quantidade de hemoglobina e do número de hemácias, plaquetopenia e leucopenia (Hänscheid et al. 2008).

A anemia é observada principalmente em pacientes primo-infectados com malária, gestantes e crianças, no entanto, sua intensidade é gradativa. A invasão das hemácias e posterior rompimento pelos parasitos não explica por si só os níveis detectados de anemia, uma vez que esta pode surgir após a eliminação dos parasitos. Esta observação sugere que a anemia é um processo multifatorial que pode envolver outras variáveis como: sequestração das hemácias, alteração da eritropoiese, utilização do ferro no metabolismo do parasita, além de fatores imunológicos associados à resposta imune contra o parasita como a produção exacerbada de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  entre outras (Ghosh and Ghosh 2007; Fernandes et al. 2008).

Vários mecanismos têm sido implicados na plaquetopenia associada à malária. Tem sido proposto que a diminuição na contagem de plaquetas está associada sua ativação ou apoptose (Lee et al. 1997; Pigué et al. 2002). Outros trabalhos sugerem que imunocomplexos gerados por antígenos plasmodiais induzem sequestração e fagocitose das plaquetas ativadas por macrófagos no baço (S et al. 1992; Yamaguchi et al. 1997). Recentemente foi demonstrado que a fagocitose de plaquetas está relacionada a plaquetopenia observada em indivíduos infectados com *P. vivax* (Coelho et al. 2013)

Contagens de leucócitos baixas a normais têm sido reportadas na malária. Contudo, essas observações podem ser subestimadas devido à migração dos leucócitos circulantes ao baço ou linfonodos devido à ativação da resposta imune (McKenzie et al. 2005). Esta diminuição tem sido observada tanto na malária vivax quanto na falciparum, esta última apresentando valores geralmente menores (Tangpukdee et al. 2008). Além das alterações comuns observadas na malária, recentemente foi descrito um aumento de neutrófilos jovens (bastões) associado à malária aguda. Este aumento foi relacionado à alta atividade inflamatória onde a reposição de neutrófilos é necessária para compensar a perda natural gerada do processo inflamatório (Lima-Junior et al. 2012).

A malária grave não é causada exclusivamente pelo *P. falciparum*, porém a maior quantidade de casos de malária grave reportados é devido às infecções por esta espécie plasmodial. Algumas propriedades do ciclo biológico do *P. falciparum*, como a capacidade de invadir hemácias de qualquer idade, a maior produção de merozoítas por esquizonte além do tempo curto de esquizogonia; facilitam o desenvolvimento de altas parasitemias e contribuem na evolução a quadro clínicos mais graves quando comparado com outras espécies (Sinha 2005). Na malária grave é observada a citoaderência das hemácias às células endoteliais de vasos capilares e vênulas (Francischetti et al. 2008). Este efeito é causado principalmente por dois eventos: no primeiro os plasmódios induzem alterações na membrana das hemácias; estas protrusões, conhecidas como “knobs”, facilitam sua citoaderência. A citoaderência explica o fato de só os trofozoítos jovens e não formas maduras de *P. falciparum* serem observados no sangue periférico, visto que estes são sequestrados na microcirculação. O segundo evento é a formação de “rosetas”, onde hemácias infectadas de aderem a hemácias não-infectadas. Estes dados indicam que a citoadesão às células endoteliais é mediada por moléculas de adesão e sua expressão pode depender dos níveis de citocinas circulantes, como o TNF- $\alpha$  (Wassmer et al. 2004). Por este motivo, a anóxia decorrente da destruição ou sequestro de hemácias, que reduz a capacidade de transporte de oxigênio no sangue, é considerada o primeiro mecanismo de ação patogênica exercido pelos plasmódios (Rey 2001b).

Apesar de a fisiopatologia da malária cerebral ser amplamente investigada, os mecanismos celulares e moleculares responsáveis por sua patogênese não estão completamente elucidados (McKenzie et al. 2005; Medana and Turner 2006). As alterações metabólicas causadas pelo bloqueio do fluxo sanguíneo cerebral decorrente do sequestro de eritrócitos parasitados, leucócitos e plaquetas na microvasculatura e a ativação do sistema imune em resposta à infecção, com consequente secreção de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) pelo hospedeiro, têm sido descritos como os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da malária cerebral (van der Heyde et al. 2006; Lacerda-Queiroz et al. 2008; Pamplona et al. 2009).

Os mecanismos que participam no controle da malária são complexos, uma vez que várias estratégias são utilizadas pelo sistema imune para controlar as infecções. Durante a infecção malárica as citocinas têm um papel importante no



controle dos parasitos, motivo pelo qual elas têm sido reportadas como um importante marcador molecular da resposta celular. Entretanto, uma associação entre gravidade da malária, produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias e baixa produção de citocinas reguladoras também tem sido observada, mostrando que o equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias parece ser crucial para o aparecimento dos sintomas clínicos da doença (Doodoo et al. 2002; Gonçalves et al. 2012).

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas secretadas por uma ampla gama de células (células gliais, linfócitos, fagócitos, células endoteliais, etc.) e com características pleiotrópicas, podendo agir simultaneamente em células do sistema imune e participando de respostas inflamatórias durante a resposta imune inata ou adaptativa. Entre as atividades mais importantes encontram-se as de ativação, proliferação, diferenciação e maturação celular; além de intervir na comunicação celular orquestrando processos tão importantes como a inflamação (Thomson and Lotze 2003; Dembic Zlatko 2015). Informações mais detalhadas descrevendo tanto o papel biológico destas citocinas quanto o papel biológico na imunologia e patogenia da malária podem ser encontradas nas Tabelas 2.1 a 2.4.

De forma resumida, o perfil pró-inflamatório caracteriza a resposta imune à malária, com alta produção de citocinas como o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-12 entre outras (Artavanis-Tsakonas et al. 2003; Riley et al. 2006).

A produção destas citocinas é crítica para a resolução das infecções e no controle da parasitemia, especialmente durante os primeiros estádios da infecção (Su et al. 2005; Doolan et al. 2009) (Tabela 2-1). Esta resposta pró-inflamatória pode ser bastante agressiva e a ausência de mecanismos de regulação pode levar a processos imunopatológicos, que contribuem às formas graves da doença (Day et al. 1999; Doodoo et al. 2002). Por este motivo as citocinas reguladoras IL-10 e o Fator de Crescimento Transformador beta (TGF- $\beta$ ), além das citocinas antiinflamatórias (Tabela 2-2), são consideradas um fator determinante para neutralizar o excessivo poder da resposta pró-inflamatória, estando associadas à prevenção das formas graves da malária em *P. falciparum* (Day et al. 1999).

A IL-7, o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) pertencem ao grupo de citocinas estimuladoras da hematopoiese (Tabela 2-3), e são importantes para o regular funcionamento da medula óssea para restituir a perda de leucócitos devido a infecções por microrganismos (Lundström et al. 2012; Hamilton and Achuthan 2013).

Há poucas informações sobre o papel destes fatores na malária, porém alguns trabalhos indicam a associação de altos níveis destas moléculas com proteção contra as infecções (Xu et al. 2013; Megnekou et al. 2015)

As quimiocinas cumprem um papel fundamental na atração quimiotática de leucócitos às regiões da inflamação. Este tipo de molécula é diverso e compreende mais de cinquenta proteínas incluindo a IL-8, a proteína de quimioatração de monócitos (MCP1) e a proteína inflamatória de macrófagos 1 beta (MIP-1 $\beta$ ) (Griffith et al. 2014). Em relação à malária as quimiocinas parecem estar envolvidas na malária grave e principalmente, na malária cerebral e na malária placentária (Tabela 2-4).

**Tabela 2-1 Citocinas pró-inflamatórias: Características biológicas e o papel na reposta imune à malária**

Citocina	Ação biológica	Papel na malária
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Produzida principalmente por linfócitos Th1, linfócitos citotóxicos e células NK</li> <li>* Induz expressão de MHC I e II</li> <li>* Maior capacidade de apresentação de antígenos estranhos → maior reconhecimento por linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL).</li> <li>* Ativação de células NK ao trabalhar sinergicamente com IL-12 e TNF para eliminação seletiva de células infectadas.</li> <li>* Ativação de macrófagos, promovendo a eliminação dos parasitas (Abbas et al. 2014)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Associada à resistência à reinfeção por <i>P. falciparum</i> (Dodo et al. 2002).</li> <li>* Marcador de proteção contra a malária em fases iniciais da infecção (Ombrai et al. 2008)</li> <li>* Efeito inibitório da infecção de hepatócitos por esporozoítos <i>P. berghei</i> (Schofield et al. 1987a, 1987b), <i>P. yoelii</i> (Nussler et al. 1993), e de <i>P. vivax</i> em primatas não humanos (Ferreira et al. 1986)</li> <li>* IFN-<math>\gamma</math> induzida pela infecção por <i>P. yoelii</i> é um mecanismo chave no controle das formas hepáticas diante uma segunda infecção (Miller et al. 2014)</li> </ul>
<b>TNF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Mediador potente da inflamação em resposta à infecção por patógenos</li> <li>* Estimula o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os lugares da infecção estimulando → eliminação dos micro-organismos.</li> <li>* Indução de células endoteliais a expressar moléculas de adesão e quimiocinas aumentando a afinidade de integrinas a seus ligantes, direcionando as células aos lugares da infecção (Clark et al. 1987; Grau et al. 1989)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Um dos marcadores principais na malária, encontrando-se aumentado em infecções por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> (Prakash et al. 2006; Andrade et al. 2010; Gonçalves et al. 2012; Rodrigues-da-Silva et al. 2014)</li> <li>* Quando produzido em excesso na resposta inflamatória, participar da ação pirogênica, indução da secreção de proteínas de fase aguda no fígado, podendo levar a complicações sistêmicas, como observado nas infecções por <i>Plasmodium</i> (Lyke et al. 2004; Hansen 2012)</li> </ul>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Envolvida na resposta imune inata, é importante na intermediação da atividade contra patógenos, caracterizada por apresentar atividade semelhante ao TNF-<math>\alpha</math></li> <li>* Principal produtor são os fagócitos mononucleares (Dinarello 2009; Abbas et al. 2014).</li> <li>* Ação indireta na função, diferenciação e expansão dos linfócitos</li> <li>* Capacidade de aumentar a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (Dinarello 2009)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Níveis aumentados de IL-1<math>\beta</math> observados em pacientes com malária cerebral ou malária grave (Kwiatkowski et al. 1990; Prakash et al. 2006).</li> <li>* Capaz de induzir, <i>in vivo</i>, moléculas de espécies reativas de oxigênio, relacionadas tanto ao controle da parasitemia quanto a complicações do quadro clínico da malária (Rockett et al. 1994; Ntrevanian and Dascombe 2003)</li> </ul>
<b>IL-2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Citocina pró-inflamatória que age como fator de crescimento em linfócitos ativados pelo antígeno</li> <li>* Envolvida na expansão clonal depois do reconhecimento pelo antígeno.</li> <li>* Estimulo da proliferação, diferenciação e ativação das propriedades citotóxicas dos linfócitos CD8<sup>+</sup> e células NK (Abbas et al. 2014).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Envolvida na manutenção do equilíbrio de respostas entre os linfócitos Tregs (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e linfócitos CD4<sup>+</sup> efetores, importantes no controle de <i>P. chabaudi</i> na fase eritrocítica (Berretta et al. 2011).</li> <li>* Tratamento com IL-2 de camundongos infectados com <i>P. yoelii</i> resultou no acúmulo de linfócitos T<math>\gamma\delta</math> no cérebro e no aumento de IFN-<math>\gamma</math> e óxido nítrico, tornando-os suscetíveis à malária cerebral (Haque et al. 2001)</li> <li>* Em crianças da Tanzânia foi encontrado um aumento da produção de IL-2 antígeno-específico por células NK associado à imunização com vacina RTS,S/AS01 (Horowitz et al. 2012).</li> <li>* Pouca produção de IL-2 na malária aguda por PBMCs em resposta a antígenos plasmidiais e a antígenos de <i>Sireptococcus</i>. → ausência de IL-2, por inibição da produção ou da sua atividade, poderia ser a base da falta de resposta a antígenos de <i>P. falciparum</i> (Ho et al. 1988).</li> </ul>
<b>IL-6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Com características pleiotrópicas, atividade tanto pró-inflamatória quanto anti-inflamatória</li> <li>* Expressada por vários tipos celulares incluindo monócitos/macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e linfócitos T (Thomson and Loize 2003; Scheller et al. 2011).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Inibe a infecção <i>in vitro</i> de hepatócitos mediante um mecanismo associado à produção de moléculas reativas de oxigênio (Pied et al. 1991)</li> <li>* Participa, em conjunto com IFN-<math>\gamma</math>, do estímulo da produção de anticorpos citotóxicos suprimindo a proliferação de formas sanguíneas de <i>P. chabaudi</i> (Akanmori et al. 1996)</li> <li>* Responsável pelo controle da secreção da proteína C reativa e participa na ativação dos linfócitos T e B (Thomson and Loize 2003).</li> <li>* Participa ativamente na patofisiologia da malária (Kern et al. 1989), e já foi observada em altas quantidades em indivíduos com malária aguda infectando tanto por <i>P. vivax</i> quanto por <i>P. falciparum</i> (Rodrigues-da-Silva et al. 2014)</li> </ul>

IL-12	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Principal mediadora da resposta inata em suas fases iniciais em resposta às infecções por microrganismos, participando também como indutor da resposta celular. Sua produção está restrita às células apresentadoras de antígeno (APC) após reconhecimento de antígenos microbianos -lipopolissacarídeos (LPS)-, infecções por bactérias intracelulares e infecções por vírus.</li> <li>* Pertence a uma família de 6 proteínas relacionadas (IL-17A-IL-17F).</li> <li>* Envolvida em processos pró-inflamatórios mas seu mecanismo de ação é variável, dependendo do tipo e lugar da inflamação (Jin and Dong 2013).</li> <li>* No modelo murino foi descrito que, nas infecções por <i>P. berghei</i>, a IL-23 tem um papel protetor, porém que é parcialmente dependente da IL-17A produzida por macrófagos (Ishida et al. 2013).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Tem sido observado que a IL-12 é crítica para disparar respostas de ativação envolvendo macrófagos, células NK e linfócitos T a través da estimulação da produção de IFN-<math>\gamma</math>, portanto associada negativamente com a parasitemia (Rhee et al. 2001; Dodo et al. 2002). Adicionalmente a IL-12 participa tanto da polarização dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> para o perfil Th1 quanto no aumento das propriedades citotóxicas dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e células NK, propriedades benéficas para o controle dos plasmódios na fase hepática e eritrocítica (Doolan and Hoffman 1999; Abbas et al. 2014).</li> <li>* Há pouca informação encontrada em relação à ação desta citocina na malária. Necessidade da realização de mais estudos para verificar seu mecanismo de ação.</li> </ul>
IL-17A	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Esta molécula atua como mensageiro no cérebro e está envolvida a aderência leucocitária, agregação plaquetária e resposta a patógenos (Thomson and Lotze 2003; Abbas et al. 2014).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Papel controverso pois parece estar envolvido com proteção (Chiwakata et al. 2000) ou suscetibilidade à malária (Nahrevanian 2006).</li> <li>* Proposta como um marcador de tolerância à infecção em regiões endêmicas de malária pois crianças assintomáticas de malária apresentavam maiores níveis de NO quando comparadas com crianças com malária cerebral (Clark et al. 1996).</li> </ul>
NO	<ul style="list-style-type: none"> <li>* No modelo murino, altos níveis de NO foram associados à proteção contra a malária cerebral, devido a uma melhora na microcirculação e menor patologia vascular (Cabrales et al. 2011).</li> <li>* Altos níveis de NO plasmático têm sido correlacionados à redução da parasitemia e cura clínica em infecções por <i>P. falciparum</i>, porém associado a casos graves de malária (Kremsner et al. 1996).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Utilizada como marcador de gravidade nas infecções por malária. Estudos na África observaram que os níveis séricos de CRP estão correlacionados com o nível de parasitemia e complicações na malária falciparum (Paul et al. 2012).</li> <li>* Estudos avaliando os níveis de CRP em populações da Amazônia brasileira mostraram altos níveis de CRP em indivíduos com malária vivax quando comparados com indivíduos com malária falciparum (Lima-Junior et al. 2012).</li> <li>* Relação entre altos níveis de CRP com formas graves de malária por <i>P. vivax</i> (Andrade et al. 2010).</li> </ul>
CRP	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Pertence à família das Pentraxinas e é uma das principais proteínas de fase aguda.</li> <li>* Mecanismo de ação principal é através do funcionamento como opsonina ligando-se à fração C1q do sistema do complemento e interagindo com receptores do C1q dos fagócitos. Alternativamente, pode se ligar diretamente aos receptores Fc<math>\gamma</math>.</li> <li>* Contribuir à ativação da via clássica do complemento pela ligação com a subunidade C1q (Abbas et al. 2014)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Estudos na África observaram que os níveis séricos de CRP estão correlacionados com o nível de parasitemia e complicações na malária falciparum (Paul et al. 2012).</li> <li>* Estudos avaliando os níveis de CRP em populações da Amazônia brasileira mostraram altos níveis de CRP em indivíduos com malária vivax quando comparados com indivíduos com malária falciparum (Lima-Junior et al. 2012).</li> <li>* Relação entre altos níveis de CRP com formas graves de malária por <i>P. vivax</i> (Andrade et al. 2010).</li> </ul>

**Tabela 2-2 Citocinas anti-inflamatórias e reguladoras na malária**

Citocina	Ação biológica	Papel na malária
<b>IL-4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Principal citocina do perfil anti-inflamatório relacionada à supressão da resposta inflamatória e à ativação da resposta imune humoral</li> <li>* Associação com a polarização de linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares (T helper) ao perfil Th2 (impedindo o desenvolvimento do perfil Th1) além de reduzir a produção de IFN-<math>\gamma</math> (Zhu et al. 2006)</li> </ul>	<p><b>Papel na malária</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Inibição da produção de IFN-<math>\gamma</math> alterando o <i>switch</i> de classe para IgG1 e IgG3,</li> <li>* Inibição da expressão de receptores Fc nos fagócitos, reduzindo a imunidade contra os plasmódios do estágio eritrocítico (Velde et al. 1990; Kumaratilake and Ferrante 1992). O papel benéfico ou prejudicial ainda está longe de ser determinado.</li> <li>* Aumentada em crianças com malária grave e cerebral quando comparadas com crianças com malária não grave. Por outro lado mostrou que altos níveis de IL-4 estavam associados com a anemia (Perkman et al. 2005; Cabantous et al. 2009).</li> <li>* Correlação entre a ação sinérgica da IL-4 com TNF-<math>\alpha</math>, que incrementava a expressão da proteína de adesão celular-1 (VCAM-1) em células endoteliais, com quantidade de hemácias parasitadas e contribuindo a patofisiologia da malária cerebral (Ockenhouse et al. 1992).</li> <li>* Necessária para o desenvolvimento dos linfócitos CD8<sup>+</sup> em camundongos infectados com <i>P. yoelii</i> (Carvalho et al. 2002), e na aquisição de memória contra os parasitos da fase hepática (Morrot et al. 2005).</li> <li>* Produção de IL-4 por linfócitos T estimulados <i>in vitro</i> com peptídeos da proteína Pf155/RESA estava associada com os elevados níveis séricos de anticorpos produzidos pelo mesmo estímulo <i>in vivo</i>.</li> <li>* No Brasil, indivíduos com malária não grave por <i>P. vivax</i> apresentavam altos nível de IL-4 em comparação com indivíduos com malária grave, sugerindo o poder anti-inflamatório desta citocina (Mendonça et al. 2013).</li> </ul>
<b>IL-10</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Produzida por vários tipos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Th2, Th1, Tregs), células B, tímocitos e mastócitos.</li> <li>* Devido a sua capacidade reguladora é capaz de bloquear a ativação da síntese de citocinas associadas ao perfil de resposta imunológica Th1 (proinflamatórias IFN-<math>\gamma</math>, TNF, IL-2, etc), monócitos ativados e células NK, o que mostra a capacidade pleiotrópica na imunoregulação e inflamação.</li> <li>* Importante inibidor de macrófagos ativados. Pode inibir a expressão de moléculas co-estimuladoras além de inibir a expressão MHC de classe I e II.</li> <li>* Estimular da proliferação de células B, tímocitos e mastócitos.</li> <li>* Ação sinérgica com o TGF-<math>\beta</math> para produção de IgA por células B</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Junto com a IL-4 a IL-10 é uma das principais citocinas com efeitos anti-inflamatórios estudadas na malária. Nível elevados desta citocina têm sido observados no plasma de indivíduos com malária aguda em infecções por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> (Peyron et al. 1994; Wenisch et al. 1995; Lyke et al. 2004; Andrade et al. 2010; Gonçalves et al. 2012).</li> <li>* Enquanto alguns estudos mostram que altas concentrações desta citocina estão associadas com a malária grave, outros indicam o efeito benéfico evitando o desenvolvimento da forma grave desta doença (Peyron et al. 1994; Ho et al. 1998).</li> <li>* Equilíbrio da produção entre as citocinas pró-inflamatórias IFN-<math>\gamma</math> e TNF-<math>\alpha</math> com IL-10 é um fator determinante para controlar os parasitos sem evitar a exacerbação dos sintomas clínicos (Gonçalves et al. 2014).</li> </ul>

**Tabela 2-3 Fatores de crescimento: função biológica e papel na malária**

Citocina	Ação biológica	Papel na malária
<b>IL-7</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Produzida pelas células estromais da medula, sendo importante na maturação de linfócitos T e B (Lundström et al. 2012)</li> <li>* Envolvida na manutenção da memória imunológica nos linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Seder and Ahmed 2003)</li> </ul>	<p><b>Papel na malária</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Redução em infecções por <i>P. yoelii</i> (Xu et al. 2013)</li> <li>* Proteção contra complicações devidas à malária placentar (Megnekou et al. 2015)</li> </ul>
<b>G-CSF / GM-CSF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* produzidas por linfócitos T ativados, macrófagos, células endoteliais e células estromais na medula,</li> <li>* Influenciam a produção de citocinas pró-inflamatórias (Hamilton and Achuthan 2013)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Na malária foi visto que a infecção por <i>P. yoelii</i> diminui drasticamente com aumento de G-CSF e GM-CSF (Xu et al. 2013)</li> <li>* GM-CSF contribui à resistência à infecção por <i>P. chabaudi</i> e está associada ao desenvolvimento de esplenomegalia, leucocitose e hematopiose de granulócitos e macrófagos (Rioped et al. 2001). * G-CSF, junto com a IL-10 esteve associada com casos de malária assintomática em mulheres grávidas infectadas com <i>P. falciparum</i> (Wilson et al. 2010)</li> </ul>

**Tabela 2-4 Quimiocinas: função biológica e papel na malária**

Citocina	Ação biológica	Papel na malária
<b>IL-8</b>	* Envolvidos na migração e posicionamento dos leucócitos dentro dos órgãos linfóides e tecidos periféricos (Griffith et al. 2014)	* Associação entre altos valores de IL-8 e a gravidade da doença em indivíduos infectados por <i>P. falciparum</i> (Berg et al. 2014), ou associada à densidade parasitária (Ayimba et al. 2011)
<b>MCP1</b>	* Regulam a adesão dos leucócitos em migração ao endotélio vascular, seguido pelo extravasamento dos vasos aos lugares da inflamação (Ioannidis et al. 2014).	* Adicionalmente, estudos <i>in vitro</i> demonstraram que hemácias infectadas por <i>P. falciparum</i> são capazes de induzir MCP1 e IL-8 em células endoteliais (Chakravorty et al. 2007)
<b>MIP1-β</b>		* Níveis aumentados de MIP-1β em mulheres grávidas com malária, sugerindo que possa estar envolvida no recrutamento de macrófagos e monócitos, processo inflamatório característico da malária placentária (Chaisavaneeyakorn et al. 2003)

## 2.6 As coinfeções

O parasitismo é considerado uma forma de predação na qual o predador (o parasita) apresenta uma associação íntima e duradoura com um ou vários organismos hospedeiros, além de uma dependência metabólica de grau variável. Dados estimados indicam que mais de 50% das espécies do planeta são parasitos (Rey 2001c; Begon et al. 2009).

Esta relação ecológica é considerada uma das mais importantes forças evolutivas, pois é responsável por processos de adaptação e inclusive coevolução entre organismos. As infecções por parasitos do gênero *Plasmodium* têm de fato sido descritas como uma das maiores forças evolutivas exercidas sob as populações humanas (Nacher 2011).

Considerando a grande diversidade de parasitos e a plasticidade que estes organismos possuem, não é surpreendente que alguns deles estejam amplamente distribuídos no planeta. Ao mesmo tempo, as populações humanas vêm se expandindo pelo planeta e aumentando a chance de entrar em contato com uma ou mais populações de parasitos. Em algumas áreas do planeta há populações humanas expostas a múltiplas espécies de parasitos, o que permite pensar que uma visão linear de uma espécie de parasito infectando um hospedeiro não seja a regra mais sim uma exceção.

Infecções concomitantes, ou coinfeções refere-se à situação em que um ou mais agentes parasitários infectam o mesmo hospedeiro. Devido à complexidade da relação parasito-hospedeiro podemos imaginar que em uma situação de infecções concomitantes, inúmeras relações entre os parasitas (competição, simbiose), junto aos tipos de resposta mostadas pelo organismo hospedeiro para combater as infecções, podem manifestar-se complicando a análise de relações entre aqueles organismos. Infecções parasitárias concomitantes podem induzir modificações na resposta imune específica induzida por cada patógeno isolado, influenciando diretamente tanto nas manifestações clínicas quanto no desfecho clínico das doenças causadas por eles. Por outro lado, a interação entre parasitos pode ter, inclusive, um impacto mais abrangente sobre características do hospedeiro como seu *fitness*, imunidade e população demográfica (Susi et al. 2015).

Devido à alta prevalência de algumas infecções no mundo, a probabilidade de encontrarmos estas infecções associadas é alta, principalmente nas regiões tropicais do planeta. Apesar destas observações, ainda hoje existe um intenso debate sobre o papel das coinfeções na transmissão, suscetibilidade a adquirir a mesma ou outras infecções e curso da patologia das doenças infecciosas, tendo as coinfeções com *Plasmodium* um grande destaque.

Especificamente em humanos têm sido descritas coinfeções de *Plasmodium* com vários tipos de organismos que compreendem vírus, bactérias, protozoários e helmintos. É importante mencionar neste ponto que grande parte dos estudos de coinfeções, principalmente em populações humanas, é de carácter epidemiológico. A avaliação dos mecanismos que governam estas interações e explicam os seus efeitos no desfecho das doenças as coinfeções são menos comuns.

### **2.6.1 Coinfecção entre malária e parasitoses intestinais**

As infecções por parasitoses intestinais são prevalentes em todas as regiões tropicais do planeta, incluindo a Amazônia Brasileira, onde os parasitas da malária também são transmitidos (Coura et al. 1994; Boia et al. 1999; Araujo and Fernández 2005; Harhay et al. 2010; WHO 2014b). Esta sobreposição de distribuição resulta em uma alta taxa de indivíduos coinfectados com plasmódio e helmintos em várias regiões do mundo (Mwangi et al. 2006).

Os principais helmintos intestinais que infectam a população são *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale* e *Trichuris trichiura*. Estes parasitas infectam respectivamente 1,3, 1,4 e 1 bilhão de pessoas em todo o mundo (Hotez et al. 2004; Strunz et al. 2014; Wammes et al. 2014).

O primeiro estudo que abordou a coinfeção malária-helmintos foi publicado em 1977 mostrando que em populações extremamente malnutridas pacientes infectados com alta carga parasitária de *A. lumbricoides* estavam livres de malária e que o tratamento destes pacientes para diminuir a carga de helmintos era acompanhado de um aumento de ataques de malária (Murray et al. 1977, 1978).

Alguns estudos epidemiológicos mostraram um efeito protetor da infecção helmíntica sobre a densidade parasitária na infecção por *P. falciparum* ou sobre as manifestações clínicas da doença (Shapiro et al. 2005), enquanto outros demonstraram



um risco aumentado de infecção por *Plasmodium* nos indivíduos coinfectados com helmintos (Spiegel et al. 2003; Le Hesran et al. 2004). Estes resultados contraditórios podem ser atribuídos às diferentes espécies de helmintos, à diversidade das populações expostas e aos diferentes níveis de exposição e transmissão das infecções.

Como a anemia é uma característica hematológica também fortemente associada à malária, diversos trabalhos avaliaram o impacto da coinfecção malária-helminto sobre a anemia nos indivíduos portadores dos dois tipos de parasitos, e alguns destes trabalhos encontraram resultados contrastantes.

Estudos em crianças coinfectadas com *P. falciparum* e helmintos observaram um aumento nos níveis de anemia no Zimbábue e no Congo (Midzi et al. 2010; Matangila et al. 2014). O mesmo foi observado em mulheres grávidas na Etiópia, indicando a necessidade de se criar estratégias que contribuam para a eliminação dos vermes e melhorem as estratégias de diagnóstico da malária (Getachew et al. 2012).

No Brasil, um efeito protetor contra a anemia foi observado em populações de crianças da região amazônica coinfectadas com *P. vivax* e helmintos (Melo et al. 2010) e em crianças coinfectadas com *P. falciparum* e helmintos na Costa do Marfim (Righetti et al. 2012). Também existem relatos de casos em que não foram observados efeitos da coinfecção nos níveis de anemia em crianças em idade pré-escolar (6-59 meses) coinfectadas com malária e *Ascaris* (Abanyie et al. 2013). Os resultados da interação *Plasmodium* e helmintos são variados com desfechos muito complexos, indicando que ainda não há suficiente informação que permita estabelecer a natureza dos efeitos no curso da infecção e nos níveis de anemia (Naing et al. 2013).

As infecções por helmintos têm sido associadas com uma resposta imune caracterizada pelo incremento de IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-21, pela expansão de populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com perfil Th2, células plasmáticas secretando IgE, eosinófilos e basófilos (Anthony et al. 2007). Em alguns estudos a coinfecção malária-helminto parece alterar a resposta imune específica contra o *Plasmodium*. Os níveis de anticorpos citofílicos antimaláricos direcionados contra extrato total de *P. falciparum* diminuíram proporcionalmente ao aumento da infecção por esquistossomos (Mutapi et al. 2007). No Senegal, os níveis de anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 específicos para antígeno e merozoíta de *P. falciparum*, candidato a uma vacina antimalárica, estavam diminuídos, enquanto os de IgG4 não-citofílicos específico para MSP3 encontravam-se aumentados em portadores de helmintos (Roussillon et al. 2010). Indivíduos infectados

com *S. haematobium* apresentaram menor nível de anticorpos IgG1 específicos aos antígenos MSP1 e GLURP de *P. falciparum* quando comparados a indivíduos não infectados por este helminto (Courtin et al. 2011).

Recentemente, uma forte correlação entre resposta IgG3 específica para malária e *Schistosoma* em indivíduos do Quênia, Uganda e Sudão foi descrita, sugerindo que uma reatividade cruzada de anticorpos entre helmintos e plasmódio pode conferir uma proteção a malária nos indivíduos infectados com esquistossoma (Naus et al. 2003; Diallo et al. 2010).

### **2.6.2 Coinfecções malária e vírus**

Entre as coinfecções de *Plasmodium* com vírus, as mais estudadas são as do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e hepatites. A coinfecção HIV-malária tem sido amplamente estudada devido ao efeito profundo que cada uma destas infecções tem nas populações humanas, além da alta prevalência e sobreposição geográfica destas doenças, principalmente na África subsaariana e na porção leste e sudeste do continente Asiático (Harms and Feldmeier 2002; Cuadros et al. 2011). Os primeiros estudos de carácter epidemiológico não encontraram evidência de interações do HIV e a malária, com exceção da interação entre a malária placentária e a infecção por HIV (Chandramohan and Greenwood 1998).

Estudos posteriores mostraram que a ausência de evidência de interação devia-se, em realidade, a tamanhos amostrais insuficientes e que estudos mais elaborados controlando variáveis como gênero, idade, exposição aos parasitos, duração da infecção entre outros indicaram a existência de interações entre HIV e malária sugerindo que o grau de imunidade à malária e o tempo em que ocorre a coinfecção são fatores determinantes na interação. Estudos mais recentes mostraram que a infecção com HIV é um fator de risco para a malária clínica ou grave e a infecção por *P. falciparum* é um fator de risco para o aumento da carga viral do HIV e a diminuição das células T CD4<sup>+</sup> (Cohen et al. 2005). HIV e malária interagem com o sistema imune do hospedeiro, resultando em uma complexa ativação das células do sistema imune e na desregulação na produção de citocinas e anticorpos (Douek et al. 2003). Além disso, a coinfecção malária-HIV tem contribuído para propagar as duas doenças na África Subsaariana e tem levantado questões sobre a eficácia do tratamento de pacientes

coinfectados devido à falta de conhecimento sobre as interações medicamentosas entre as drogas (Harms and Feldmeier 2002; Cuadros et al. 2011). No Brasil, estudos avaliando o efeito da coinfeção *Plasmodium*-HIV se restringem a levantamentos epidemiológicos realizados em usuários de drogas injetáveis mostrando que o aumento de uso de drogas pode possibilitar o aparecimento de um número maior de casos de malária induzida, simultaneamente à infecção por HIV, ou à concomitância desta com outras infecções (Bastos et al. 1999).

No caso das hepatites virais há estudos que indicam que a coinfeção HBV-*P. falciparum* contribui para a ocorrência de hepatites agudas (Rai and Jain 2009). No Brasil poucos estudos têm sido realizados para avaliar o impacto da coinfeção *Plasmodium*-HBV. Um deles, realizado na região amazônica, mostrou que indivíduos respondedores a antígenos do HBV apresentaram baixas parasitemias e índices de reatividade elevados contra antígenos de formas sanguíneas de *P. falciparum* e *P. vivax* sugerindo que pode existir um efeito da infecção pelo HBV na malária (Braga et al. 2006). A coinfeção com HBV também foi associada com quadros de malária grave (Braga et al. 2004). Em contraposição, outros estudos sugerem que a coinfeção pelo vírus da hepatite B não influencia o quadro clínico da malária (Andrade et al. 2011).

O vírus Epstein-Barr (EBV) ou herpes vírus humano 4 (HHV-4), agente causador do linfoma de Burkitt, está amplamente distribuído e sugere-se que infecta mais de 90% da população humana e é frequente nas coinfeções com malária. Alguns estudos mostraram que indivíduos infectados com *P. falciparum* apresentam *in vitro* uma expansão atípica de linfoblastos, atribuída a células infectadas pelo EBV. Nos indivíduos com malária aguda observou-se uma associação com o aumento no número de células carreadoras de EBV na circulação quando comparados com indivíduos curados da malária ou sadios (Lam et al. 1991). Por outro lado, dados recentes em modelos murinos indicam que a infecção aguda do EBV é capaz de suprimir a imunidade humoral antiparasitária para *P. falciparum* devido a uma falta de manutenção dos centros germinais dos linfócitos B e os linfócitos T foliculares no baço (Matar et al. 2015).

Dois hipóteses tentam explicar a relação entre o EBV e a malária por *P. falciparum* no desenvolvimento do linfoma de Burkitt: A primeira sugere que a infecção por *P. falciparum* induz uma expansão policlonal de linfócitos B, reativando o EBV, e levando à expansão de linfócitos B infectados e aumentando a probabilidade de ocorrer

a translocação do gene oncogênico *c-myc*, peça fundamental do desenvolvimento dos tumores associados ao linfoma de Burkitt. A outra hipótese sugere que a imunidade de células T específica para o EBV é atenuada na coinfeção com *P. falciparum*, o que gera o aumento na replicação do EBV (Rochford et al. 2005).

A dengue e a malária são as doenças infecciosas mais comumente transmitidas por insetos. O vírus da dengue possui características de transmissão que favorecem sua expansão. Nos últimos anos a dengue tem aparecido como uma doença emergente com o potencial de ocasionar pandemias se não for controlada. Embora a dengue floresça em regiões principalmente urbanas e suburbanas, registros indicam o aparecimento de alguns casos de coinfeção com malária. Tanto no exterior quanto no Brasil esta situação propõe um novo cenário onde o impacto destas duas doenças deve ser avaliado. Estudos indicam que a coinfeção dengue-malária parece ser mais severa do que as infecções separadas. Este achado supões um maior risco, dos indivíduos coinfectados, apresentarem maiores níveis de trombocitopenia e anemia (Carne et al. 2009; Epelboin et al. 2012). No Brasil, alguns trabalhos investigaram o perfil clínico na coinfeção dengue-malária confirmando que a coinfeção pode agravar a patologia das duas doenças (Magalhães et al. 2012, 2014).

### **2.6.3 Coinfeção malária e outros parasitos**

Dados da OMS indicam que aproximadamente um terço da população mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, porém só uma pequena fração desses indivíduos manifestará os sintomas clínicos da tuberculose (TB). Hoje em dia, a tuberculose, o HIV/AIDS e a malária são as infecções que mais morte causa a nível mundial (WHO 2015). A malária e a tuberculose são endêmicas em várias regiões do planeta aumentando as chances de se apresentarem coinfeções entre estes dois microrganismos. No modelo murino, há evidências de que animais infectados concomitantemente com malária e TB apresentam uma mudança significativa no curso da tuberculose com aumento na morbidade (Matsumoto et al. 2000). Em contraste a vacinação dos animais com o Bacillus Calmette-Guérin (BCG) de *M. bovis* protege camundongos contra a infecção com *P. vinkei*, *P. yoelii*, *P. berghei* e *P. chabaudi* (Clark et al. 1976; Matsumoto et al. 2000). Também foi demonstrado em primatas não

humanos que a infecção com *M. tuberculosis* protege contra o *P. knowlesi*, *P. cynolmogi* e *P. inui* (Singh et al. 1956; Bazaz-Malik 1973).

Estudos de coinfeções de *Plasmodium* e protozoários não são tão comuns quanto aos mencionados anteriormente, e focam, principalmente em, *Trypanosoma* sp. (Egima et al. 2007), *Leishmania* sp. (Coleman et al. 1988; Marques et al. 2005)(Coleman et al. 1988; Marques et al. 2005) e ainda com menor frequência com protozoários intestinais como *Giardia intestinalis*, onde foi demonstrado que não interferia na resposta imune à malária (Boef et al. 2012).

### 3 JUSTIFICATIVA

A ampla distribuição dos agentes infecciosos facilita que múltiplas espécies de patógenos infectem um mesmo hospedeiro. A coinfeção por múltiplas espécies de parasitos na natureza é comumente observada em humanos. Estudos ecológicos e epidemiológicos indicam que essa interação representa um desafio para compreender a ecologia dos parasitos e para criar e implementar estratégias de intervenção e controle benéficas à saúde humana.

Contudo, estudos avaliando a interação de infecções por *Plasmodium* com vírus, bactérias e protozoários tanto em modelos murinos quanto em humanos não conseguiram caracterizar até o momento um modelo que permita compreender a biologia das coinfeções e seu papel no desenvolvimento de uma imunidade contra a malária. Adicionalmente, informações contraditórias em relação ao efeito benéfico ou deletério alertam sobre possíveis efeitos das coinfeções no desenvolvimento de uma vacina contra a malária. Especificamente, no caso de organismos altamente patogênicos como HIV e *M. tuberculosis*, ou amplamente distribuídos como as parasitoses intestinais, as coinfeções seriam uma barreira importante para o teste e validação de vacinas antimaláricas em populações que apresentam altas taxas de coinfeção com estes microrganismos, como é o caso da África subsaariana e a região Amazônica.

Devido ao alto número de óbitos e agravos por *P. falciparum*, a maior parte das pesquisas sobre o efeito das coinfeções tem sido direcionada à malária falciparum. As pesquisas sobre o efeito das coinfeções com *P. vivax* são raras, apesar de que o Brasil representa uma parte importante dos casos de malária na América Latina, e de que a maioria desses casos são devidos a infecções por *P. vivax* (Tabela 3-1). É justamente por esse motivo que pesquisas estudando a influência das coinfeções em áreas edêmicas de *P. vivax* são de extrema importância visando o desenvolvimento de uma vacina antimalárica no Brasil.

**Tabela 3-1 Estudos relacionados às coinfeções no Brasil e no mundo**

<b>Tipo de Estudo</b>	<b># Estudos em PubMed (18/10/2013)</b>
Coinfeções Humanos	28.184
Coinfeções Humanos sem HIV ou TB	16.989
Coinfeções Humanos TB no Brasil	849
Coinfeções Humanos sem HIV ou TB no Brasil	378
Coinfeções Humanos no Brasil + <i>Plasmodium</i>	21
Coinfeções Humanos no Brasil sem HIV ou TB + <i>Plasmodium</i>	16
Coinfeções Humanos no Brasil sem HIV ou TB + <i>Plasmodium</i> + Parasitoses intestinais	2

Devido às diferenças entre a biologia de *P. falciparum* e *P. vivax*, existe a possibilidade de que os mecanismos biológicos-imunológicos que governam as interações sejam distintos, apontando efeitos diferentes e portanto estratégias de controle diferenciadas para estas espécies de malária. Este fato seria crucial principalmente no desenvolvimento de uma vacina contra *P. vivax* uma vez que indivíduos coinfectados poderiam apresentar alterações na resposta imune específica em resposta às imunizações devido à coinfeção. Esta situação torna os estudos de coinfeção entre os dois parasitos de grande importância no planejamento de ações antimaláricas em áreas endêmicas de *P. vivax*.

Apesar da incidência das parasitoses intestinais na Amazônia brasileira, poucos estudos foram publicados reportando a situação real destas parasitoses no Estado de Rondônia. Isto é compreensível, pois o Estado de Rondônia apresenta taxas importantes de malária, e a maior parte da atenção em saúde é corretamente voltada para a detecção, tratamento e controle esta doença.

Contudo, não é possível esquecer que a população, devido às características de habitação e ocupação do solo, está sob risco não só de contrair malária, mas também outras infecções como as parasitoses intestinais, devido às aglomerações e às baixas condições sanitárias.

Considerando que o Estado de Rondônia é uma área endêmica de malária e que a população está exposta simultaneamente às parasitoses intestinais, quisemos estudar a prevalência da coinfeção desses grupos de parasitos. Levando em conta a prevalência da malária no Estado de Rondônia e das parasitoses intestinais na Amazônia brasileira, um dos nossos objetivos era verificar a frequência da coinfeção de malária-parasitoses intestinais existe no assentamento Joana D'Arc. Por outro lado

em quisemos estudar se a interação produto da coinfeção causa alterações no equilíbrio entre a resposta imune e a evolução clínica do hospedeiro infectado.

### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a ocorrência de alterações no perfil hematológico e imunológico em indivíduos coinfectados com *Plasmodium* e parasitoses intestinais, em populações naturalmente expostas à infecção malárica no Estado de Rondônia, Brasil.

### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Avaliar a frequência de coinfeção malária-parasitoses intestinais e alterações hematológicas, de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento associadas à coinfeção;
2. Avaliar a produção de anticorpos específicos às proteínas PvAMA-1 e PvMSP-1<sub>19</sub> e as possíveis alterações associadas as coinfeções malária-parasitoses intestinais.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

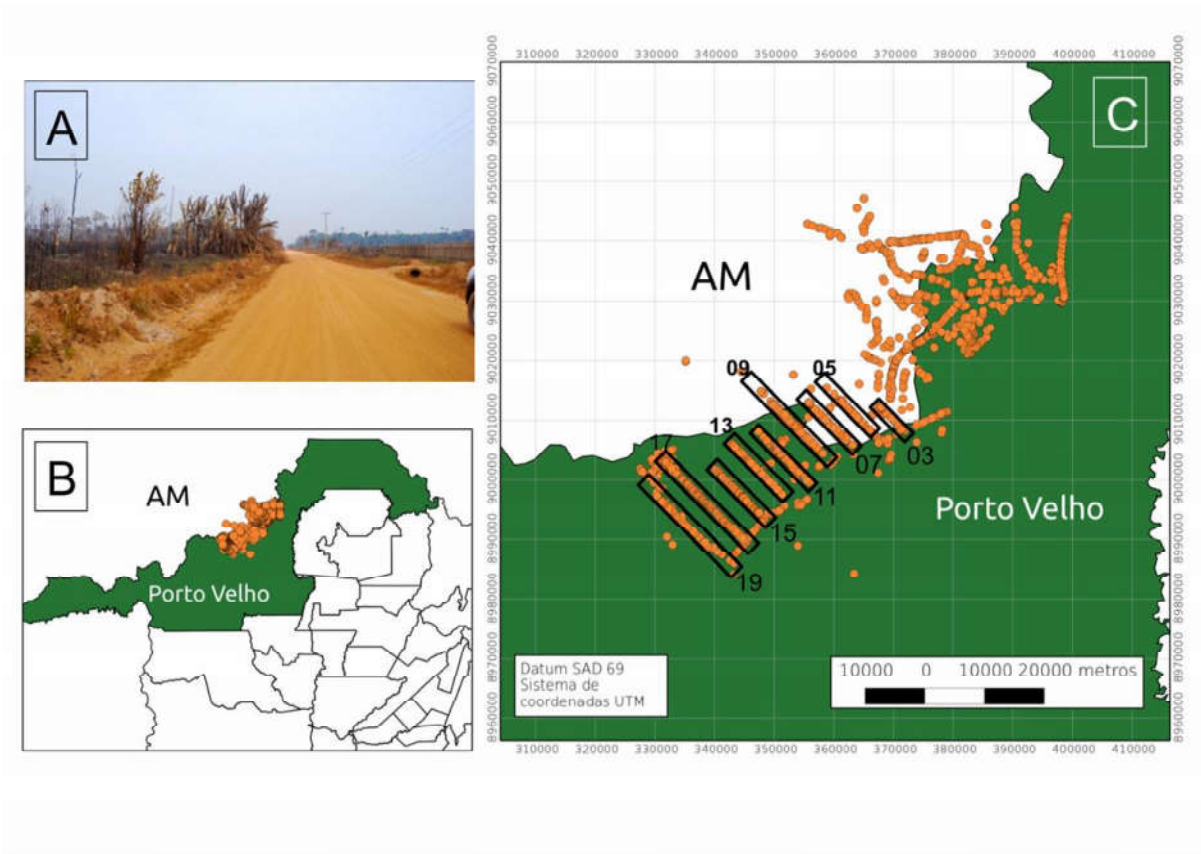
A tese gerou duas publicações, sendo uma publicada no Journal *Mediators of Inflammation* e a outra submetida no dia 13 de Abril de 2015 no *Malária Journal*. A continuação descreveremos os materiais e métodos referentes ao artigo submetido “The influence of intestinal parasites on *Plasmodium vivax* specific antibody responses to MSP-1<sub>19</sub> and AMA-1 in rural populations of the Brazilian Amazon” (anexo no ítem 11, página 95 da presente tese).

### 4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no Assentamento Joana D’Arc, localizado na área rural cerca de 100 km do município de Porto Velho (RO) (Figura 4-1 a 4-3). Apesar de ser um local, onde a população (1400 famílias) reside há mais de 10 anos, não há infraestrutura para conter os problemas de saúde local. A fonte de renda dos moradores provém da agricultura e pequena pecuária para fabricação de queijo. O assentamento possui apenas um posto de atenção básica e um laboratório para atendimento de malária.

A presença de todos os fatores determinantes como clima e a presença de criadouros de mosquitos do gênero *Anopheles* condicionam a presença da malária na área. Como agravante, as casas ficam muito próximas da floresta e de coleções de água e muitas delas apresentam estrutura aberta proporcionando um contato intenso dos moradores com os anofelinos presentes no local. Não há saneamento básico no assentamento e as casas não possuem nem mesmo banheiro, o que aumenta a possibilidade dos habitantes contraírem parasitoses intestinais **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

A transmissão de malária é de grande relevância no local, com IPA’s que variam entre 66,7 e 691,5/1000 hab., o que torna a área de alto risco.



**Figura 4-1 Configuração espacial do assentamento Joana D'Arc, Porto Velho, Rondônia.** A. Estado das estradas da região, mostrando a dificuldade de acesso na área. B. Localização do assentamento no Estado de Rondônia. C. Disposição espacial de espinha de peixe típica dos assentamentos. Nas caixas pretas encontram-se identificadas as linhas onde foram incluídos os voluntários da pesquisa.

Foram realizados três trabalhos de campo em diferentes épocas: o primeiro entre julho e setembro de 2007, constituindo uma coleta passiva, onde os indivíduos buscavam atendimento no posto de diagnóstico de malária da Policlínica Ana Adelaide, unidade da Secretaria Estadual de Saúde de Rondônia (Figura 4-2); e os outros dois trabalhos de campo realizados entre junho e julho de 2010 e maio e junho de 2011, caracterizados por uma busca ativa de casos nas residências do assentamento Joana D'Arc (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). O assentamento Joana D'Arc está caracterizado por apresentar uma configuração espacial semelhante a uma “espinha de peixe”, característico dos projetos de assentamentos implementados pelo Governo Brasileiro na década de 1970.



**Figura 4-2 Policlínica Ana Adelaide, localizado em Porto Velho, Rondônia.** Neste local foi realizada a primeira coleta de material biológico em 2007.



**Figura 4-3. Joana D'Arc, local de residência dos voluntários participantes do estudo.** **A.** Infraestrutura típica das casas com proximidade à floresta e sem proteção em janelas ou portas. **B.** Local de trabalho de vários moradores. É um local aberto o que facilita o contato com os anofelinos. **C.** Despejo de esgoto em proximidades às residências facilitando o contato com parasitos encontrados nas fezes. **D.** Entrevistas realizadas para coleta de dados epidemiológicos. **E.** Campanha de atendimento médico à comunidade. **F.** Visita a uma das casas integrantes do Plano de manejo Florestal Sustentável, Linha 17.

## 4.2 Casuística

Foram considerados elegíveis para o nosso estudo pessoas maiores de 10 anos

de idade, moradores da região de Porto Velho com exceção de indivíduos pertencentes a populações indígenas, deficientes intelectuais, mulheres grávidas e parturientes. Foram incluídos 279 indivíduos. Na Policlínica Ana Adelaide, participaram do estudo 46 indivíduos com diagnóstico positivo de malária. A maioria destes indivíduos eram moradores do Assentamento Joana D'Arc, motivo pelo qual as duas coletas seguintes se realizaram nesse assentamento. No Assentamento Joana D'Arc foram incluídos 233 indivíduos e que aceitaram participar de nosso estudo.

Os indivíduos que com diagnóstico parasitológico positivo para malária ou para parasitoses intestinais receberam tratamento terapêutico específico, seguindo as recomendações do Ministério da Saúde (cloroquina associada à primaquina para infecções por *Plasmodium vivax* e artemeter com lumefantrina - COARTEM® para os indivíduos com *Plasmodium falciparum*) e acompanhados para verificação de cura, 15 dias após tratamento. Durante todo período do trabalho de campo, após as visitas para entrevistar os voluntários, foi realizada semanalmente uma brigada de saúde para oferecer consultas médicas a todas as pessoas interessadas da comunidade (incluindo os participantes do estudo). Nesse dia eram entregues os resultados dos exames hematológicos, do diagnóstico parasitológico de fezes e de malária. Simultaneamente eram examinados outros acometimentos não associadas ao projeto, além de serem distribuídos medicamentos requeridos pela população. No caso de tratamento de parasitoses intestinais o tratamento era fornecido também a todos os integrantes da família do voluntário e as famílias interessadas em tomar o tratamento.

Antes de começar as entrevistas, os voluntários do estudo foram informados sobre como ocorre à transmissão de malária, os seus métodos profiláticos e o projeto de pesquisa em desenvolvimento, leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido que formaliza a participação do indivíduo na presente pesquisa em realização (TCLE, Apêndice B página 88). O TCLE dos voluntários menores de idade foram assinados pelos responsáveis legais. Após a confirmação da participação no estudo, os indivíduos foram entrevistados para a coleta de dados de caráter epidemiológico, como tempo de residência em área endêmica de malária, tempo desde a última malária, número de malárias anteriores, além de serem registrados dados sobre a temperatura corporal e sintomatologia associada à malária (Apêndice C página 93). Este estudo obteve duas aprovações no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FIOCRUZ) sob os números 354/2006 e 492/2008.

### **4.3 Coleta de sangue**

Após a assinatura do TCLE, foram coletadas amostras de sangue por punção endovenosa com o sistema a vácuo de coleta, utilizando tubos *Vacutainer*® (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) com heparina (2 tubos de 10 mL de sangue) para a obtenção do plasma. Tubos *Vacutainer*® com EDTA (10 mL de sangue) foram utilizados para obtenção de sangue total para realização do hemograma e extração de DNA para o diagnóstico molecular de *Plasmodium*. Simultaneamente eram montadas as lâminas para distensão sanguínea e gota espessa para diagnóstico microscópico de *Plasmodium*. Em Porto Velho, as amostras de sangue foram processadas e os plasmas separados para a quantificação posterior dos níveis de citocinas e anticorpos. Os dois foram criopreservados em nitrogênio líquido (-196°C) e posteriormente transportados para o Laboratório de Imunoparasitologia, IOC, FIOCRUZ, no Rio de Janeiro.

### **4.4 Diagnóstico parasitológico de malária**

O diagnóstico parasitológico de malária foi realizado através de lâminas de distensão sanguínea e gota espessa coradas com *Giemsa* (Sigma Chemical CO, St Louis, USA) e analisadas por microscopistas experientes. Este diagnóstico foi oferecido a todos os indivíduos independente de aceitarem participar do estudo. A parasitemia foi calculada através do método da gota espessa a partir da contagem do número de parasitos (considerando todas as espécies e estágios presentes) em 500 leucócitos, posteriormente ajustando para um valor final de parasitemia que leva em conta que o número médio de leucócitos é igual a 6000 (Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde 2009).

### **4.5 Diagnóstico Molecular de *Plasmodium***

#### **4.5.1 Extração de DNA a partir de sangue total**

O DNA do parasito foi extraído do sangue total coletado em tubo de EDTA através do kit QIAGEN (PUREGENE®, Gentra Systems, Minneapolis, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, foi feita lise de 1ml com 3ml de solução de lise de hemácias em tubos de polipropileno 15ml (Falcon). Após 10 minutos, o material foi

centrifugado 2000xg por 10 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 1ml de solução de lise celular. Em seguida, foram adicionados 300µl de solução de precipitação de proteína, sendo o material submetido a agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugação a 2000xg por 10 minutos temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o DNA solúvel foi colocado em tubos com 1ml de isopropanol P.A gelado (Merck) para precipitação. Posteriormente, o DNA foi centrifugado a 2000xg por 3 minutos a temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado. Adicionou-se, então, 1ml de etanol 70% para lavagem do DNA seguido de centrifugação a 2000xg por 1 minuto, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado e, após completa evaporação do etanol (aproximadamente 20min), o DNA foi hidratado com 330µl de solução de hidratação (Tris-hidrometil aminometano, EDTA), sendo por fim incubado por 1 hora a 65°C. As amostras foram mantidas a -20°C até o uso

#### 4.5.2 PCR para diagnóstico Molecular de Plasmodium

As amostras foram submetidas também a uma *nested*-PCR, estabelecida por Snounou et al. (1993), utilizando-se os iniciadores rPLU5 e rPLU6 para a reação gênero-específica (referente à *Plasmodium*) e posteriormente pares específicos foram utilizados para as reações espécie-específicas (referentes à *P. falciparum*, *P. vivax* respectivamente):

<b><i>P. falciparum</i> rFAL1</b>	(5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT <sup>3'</sup> )
<b><i>P. falciparum</i> rFAL2</b>	(5'ACACAATGAACTTCAATCATGACTACCCGTC <sup>3'</sup> )
<b><i>P. vivax</i> rVIV1</b>	(5'CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATA <sup>3'</sup> )
<b><i>P. vivax</i> rVIV2</b>	(5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT <sup>3'</sup> ).

As condições de volume e concentração dos reagentes utilizados foram: 0,25µM de cada iniciador (IDT), 10µl de PCR Master Mix (Promega - 0,3U de Taq DNA Polimerase, 200µM de cada um dos dNTPs e 1,5mM MgCl<sub>2</sub>) e 0,8µl de amostra de DNA, em um total de 20µl por reação. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100TM, versão 7.0 (MJ Research). As condições da PCR para a primeira reação consistiram em desnaturação e extensão inicial a 95°C por 5 minutos, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, seguida por amplificação com 24 ciclos de

94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos. Ainda uma extensão final consistiu de 58°C por 2 minutos e 72°C por 5 minutos. Para a segunda reação, as condições de amplificação foram as mesmas da primeira, diferindo apenas no número de ciclos, que foram 29. Os fragmentos obtidos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% (Agargen), sendo esta dissolvida em tampão TAE 1x (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA), com adição de solução de 10mg/ml de brometo de etídio (Invitrogen). As amostras foram misturadas em tampão de amostra Orange 5x (Alaranjado G VETEC e Ficoll SIGMA) e a corrida eletroforética foi realizada em sistema horizontal (Bio-Rad) a 110V por aproximadamente 30 minutos. O gel foi posteriormente analisado em transluminador ultravioleta (UVP - Bio-Doc it System) e a imagem obtida foi arquivada em sistema digital. Todas as reações de PCR foram realizadas na presença de controles positivos e negativos, conforme descrito no item 4.7.2

#### **4.6 Exame parasitológico de fezes**

Uma amostra de fezes de cada um dos voluntários do estudo foi encaminhada para o Laboratório de Análises Clínicas São Lucas, localizado em Porto Velho, para a realização do exame parasitológico de fezes. Foi utilizado o método de sedimentação espontânea que consistiu na mistura das fezes com água, filtração em gaze cirúrgica e repouso do material por ao menos 2 horas para a sedimentação dos restos fecais; após esse período uma porção do sedimento foi colocada em lâmina de vidro, adicionado Lugol e coberto com lamínula e observado em microscópio. Esta técnica foi utilizada na identificação de ovos e larvas de helmintos e cistos e oocistos de protozoários intestinais.

#### **4.7 Cálculo amostral**

Como não dispúnhamos de dados sobre coinfeção na área estudada, o cálculo amostral foi baseado nas infecções a serem estudadas. Utilizamos o cálculo amostral para proporção para uma prevalência de 50%, significância de 5%, erro absoluto de 0,1% e 20% de perdas. O total de amostras necessária para o estudo foi de 274 indivíduos.



#### **4.8 Formação dos grupos de estudo em relação ao diagnóstico parasitológico**

A partir dos diagnósticos de malária e parasitoses intestinais foram formados os quatro grupos de estudo: **grupo Malária (M)**, formado por indivíduos com diagnóstico parasitológico e/ou molecular positivo somente para *Plasmodium*; **grupo Parasitoses Intestinais (IP)**, composto por indivíduos com diagnóstico positivo de parasitoses intestinais somente; **grupo Coinfectado (CI)**, formado por indivíduos com diagnóstico positivo (molecular e/ou parasitológico) tanto de malária quanto de parasitoses intestinais e **grupo não infectado (UN)**, composto por pessoas com diagnóstico negativo de malária e de parasitoses intestinais. As análises foram realizadas comparando-se as diferenças em cada um dos parâmetros a frente estudados.

#### **4.9 Exames hematológicos**

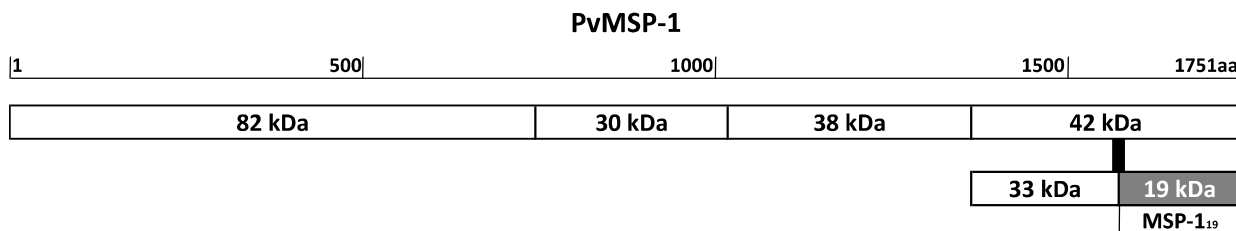
Uma amostra de sangue de cada participante do estudo, coletada através de punção venosa em tubo contendo anticoagulante com EDTA, foi enviada para o Laboratório de Análises Clínicas São Lucas, localizado em Porto Velho. Os tubos foram homogeneizados por pelo menos 5 minutos, após esse tempo uma alíquota de 20µL foi lida no analisador hematológico automatizado XS 1000i (Sysmex Corporation, IK), onde foram quantificados os seguintes parâmetros: concentração de hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume globular médio (VGM – dg/dL), hemoglobina globular média (HGM – pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM - %), índice de anisocitose (%), número de hemácias (milhões/mm<sup>3</sup>), plaquetas (mil/mm<sup>3</sup>), leucócitos, neutrófilos, metamielócitos, bastões, segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos típicos e atípicos, monócitos e reticulócitos (células/mm<sup>3</sup>). Após analisar o resultado, quando necessário foi realizada uma lâmina para confirmação da série vermelha ou branca.

#### **4.10 Proteínas Recombinantes**

##### **4.10.1 PvMSP-1**

As proteínas recombinantes representando o fragmento de 19 kDa da região C-terminal da Proteína 1 de Superfície de Merozoíta (aa 1616 – 1704) foram produzidas e

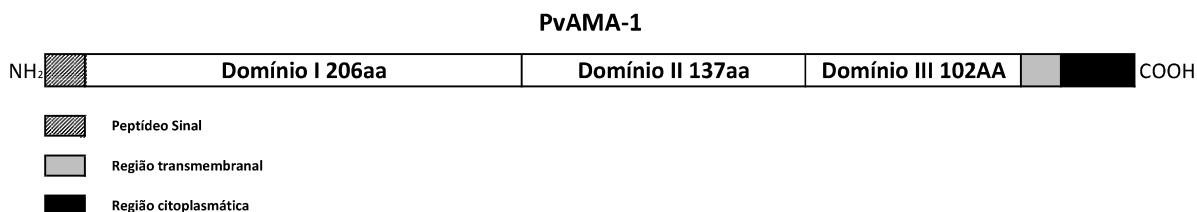
expressas em *Escherichia coli* no Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica (CINTERGEN) e gentilmente cedidas pelo Dr. Maurício Rodrigues (UNIFESP) (Figura 4-4).



**Figura 4-4. Esquema da configuração da proteína de *P. vivax* MSP-1.** Na região C-terminal mostra-se o fragmento de 19 kDa derivado do segundo processamento proteolítico da MSP-1 (MSP-119). Adaptado de del Portillo et al. (1991).

#### 4.10.2 PvAMA-1

As proteínas recombinantes, representando regiões codificadoras dos domínios I, II e III do Antígeno Apical de Membrana Pv-AMA-1 (aa 43–487), como representado na Figura 4-5, foram produzidas em *E. coli* a partir do vetor de expressão pET-22b no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo e gentilmente cedidas pela Dra. Irene Soares (USP).



**Figura 4-5. Esquema da configuração da proteína recombinante de *P. vivax* AMA-1 utilizada nos experimentos.** Adaptado de Múfalo et al. (2008).

#### 4.11 Análise da resposta imune humoral

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

#### 4.11.1 ELISA para a detecção de IgG contra PvAMA-1 e PvMSP-1<sub>19</sub>

Placas de 96 poços (*Nunc/Maxicorp*) em fundo chato foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com 100 µL (2µg/mL) da proteína recombinante (PvAMA-1 ou PvMSP-1<sub>19</sub>) diluídos em tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,2. Após esse período as placas foram lavadas 3x com PBS com 0,05% de Tween 20 (PBS-tween) e bloqueadas com 200 µL por poço de PBS-tween-5% de leite desnatado (PBS-TLD) por 1h. Em seguida, as placas foram lavadas 3x com PBS-tween e incubadas com o soro diluído com PBS-TLD 1:100 por 1h a 37°C, onde cada soro foi testado em duplicata. Após outras 3 lavagens com PBS-tween, as placas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-IgG conjugado a peroxidase (Sigma) diluído em PBS-TLD na proporção de 1:1000 por 1h a 37°C. Depois de mais um ciclo de lavagens foi feita a revelação das placas, a partir da incubação com solução reveladora contendo OPD (O-fenilenodiamina – Sigma), tampão citrato-fosfato (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH=5,0) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3 a 5 minutos a temperatura ambiente. A reação de revelação foi paralisada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e as leituras das densidades ópticas (DOs) foram realizadas a 492 nm no leitor de ELISA (Spectramax 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) no Laboratório de Imunoparasitologia.

Em cada placa foram colocados soros-padrões reativos (controle positivo do experimento) e soros-padrões não reativos de indivíduos nascidos no Estado do Rio de Janeiro, que nunca contraíram a doença e que e nunca visitaram áreas endêmicas de malária (controle negativo do experimento). Em cada experimento foi calculada a média das DOs dos controles negativos e três desvios-padrões foram somados a esta média, obtendo-se assim o valor do *cut-off*. As médias das DOs das duplicatas de cada soro foram divididas pelo *cut-off* do experimento e o valor desta razão foi chamado de **Índice de Reatividade (RI)**. Soros com índice de reatividade maior que 1 foram considerados positivos, ou seja, apresentavam resposta positiva de anticorpos IgG contra o antígeno testado. Os valores de *cutoff* para as proteínas recombinantes foram PvAMA-1=0,1881, PvMSP-1<sub>19</sub>=0,1915.

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

Placas de 96 poços fundo chato foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com 100µL (2µg/mL) da proteína recombinante (PvAMA-1 ou PvMSP-1<sub>19</sub>) diluídos em tampão

fosfato-salino (PBS). Após a sensibilização, as placas foram lavadas 3x com PBS-tween e bloqueadas com 200 µL por poço de PBS-TLD por 1h. Após o bloqueio as placas foram lavadas 3x com PBS-tween e incubadas com soro diluído em PBS-LTD na proporção de 1:100 por 1h a 37°C, onde o soro de cada voluntário foi testado em duplicata. Para a detecção das subclasses de IgG, após outras 3 lavagens com PBS-tween, as placas foram incubadas com cada um dos anticorpos monoclonais conjugados a peroxidase anti-IgG1 (clone HP-6001), anti-IgG2 (clone HP-6002), anti-IgG3 (clone HP-6050) e anti IgG4 (clone HP-6023) (Sigma, Dt. Louis, MO) diluídos em PBS-TLD na proporção de 1:1000 por 1h a 37°C. Depois de mais um ciclo de lavagens foi feita a revelação das placas, a partir da incubação com solução reveladora contendo OPD (O-fenilenodiamina – Sigma), tampão citrato-fosfato (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH=5,0) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3 a 5 minutos a temperatura ambiente. A reação de revelação foi paralisada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e as leituras das densidades ópticas (DOs) foram realizadas a 492 nm no leitor de ELISA (Spectramax 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) no Laboratório de Imunoparasitologia.

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

Os testes para detecção das subclasses de IgG para as proteínas PvAMA-1 e PvMSP-1 foram realizados nos indivíduos que apresentaram resposta IgG positiva para os antígenos. Os valores de *cutoff* para as proteínas recombinantes foram para PvAMA-1: IgG1=0,1910, IgG2=0,2401, IgG3=0,1558, IgG4=0,1828; para PvMSP-1<sub>19</sub>: IgG1=0,1885, IgG2=0,2718, IgG3=0,1579, IgG4=0,1462.

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

Os dados epidemiológicos, os resultados dos exames hematológicos e dos experimentos de resposta imune humoral (anticorpos específicos) de cada voluntário foram armazenados no banco de dados do programa Epi-info versão 3.2. A análise estatística dos dados foi realizada através da linguagem estatística R (R Core Team 2013). Todos os P valores foram ajustados utilizando a metodologia de *false discovery rate (fdr)* (R Core Team 2013). Foram consideradas como estatisticamente significativas alterações com  $P < 0,05$ .

### **4.12.1 Teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ )**

O teste do  $\chi^2$  é um método estatístico para  $n$  amostras independentes, cujas proporções observadas nas diversas modalidades estão dispostas em tabelas de contingência, sendo os valores esperados deduzidos matematicamente, e onde se procura determinar se as proporções observadas nas diferentes categorias são independentes ou estão associadas. Esse teste foi utilizado na avaliação de proporções e de frequências das variáveis entre os grupos estudados.

### **4.12.2 Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney rank sum test**

O teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney foi utilizado na comparação das medianas entre duas variáveis não pareadas, ou seja, variáveis independentes, com os mesmos tamanhos ou desiguais, utilizados aqui na avaliação dos IRs de IgG entre indivíduos do grupo M e CI.

### **4.12.3 Pairwise Test for Multiple Comparisons of Mean Rank Sums (Nemenyi-Tests)**

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado na avaliação estatística das diferenças existentes entre as variâncias de três ou mais grupos não homogêneos. Quando significativo, foi realizado o teste *post-hoc* PMCMR (*Pairwise Test for Multiple Comparisons of Mean Rank Sums*), pacote de R PMCMR (Pohlert 2014).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Trabalho 1 (Artigo Publicado):

Neste trabalho apresentamos dados sobre a prevalência das coinfeções malária-parasitoses intestinais assim como mostramos que não havia alterações do perfil de citocinas e mediadores inflamatórios associada às coinfeções em indivíduos de área endêmica de malária em Rondônia, Brasil.

**Título: Intestinal Parasites Coinfection Does Not Alter Plasma Cytokines Profile Elicited in Acute Malaria in Subjects from Endemic Area of Brazil.**

Hindawi Publishing Corporation

Mediators of Inflammation

□ Volume 2014, Article ID 857245, 12 pages

<http://dx.doi.org/10.1155/2014/857245>

## Research Article

# Intestinal Parasites Coinfection Does Not Alter Plasma Cytokines Profile Elicited in Acute Malaria in Subjects from Endemic Area of Brazil

Juan Camilo Sánchez-Arcila,<sup>1</sup> Daiana de Souza Perce-da-Silva,<sup>2</sup>  
Mariana Pinheiro Alves Vasconcelos,<sup>3</sup> Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva,<sup>1</sup>  
Virginia Araujo Pereira,<sup>1</sup> Cesarino Junior Lima Aprígio,<sup>4</sup>  
Cleoni Alves Mendes Lima,<sup>5</sup> Bruna de Paula Fonseca e Fonseca,<sup>6</sup> Dalma Maria Banic,<sup>2</sup>  
Josué da Costa Lima-Junior,<sup>1</sup> and Joseli Oliveira-Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Simulídeos e Oncocercose, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>3</sup> Instituto de Infectologia Emílio Ribas, 01246-900 São Paulo, SP, Brazil

<sup>4</sup> Agência de Vigilância em Saúde da Secretaria de Estado da Saúde (AGEVISA), 78900-000 Porto Velho, RO, Brazil

<sup>5</sup> Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia, Universidade Federal de Rondonia, 78900-000 Porto Velho, RO, Brazil

<sup>6</sup> Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Joseli Oliveira-Ferreira; [lila@ioc.fiocruz.br](mailto:lila@ioc.fiocruz.br)

Received 13 June 2014; Accepted 1 September 2014; Published 16 September 2014

Academic Editor: Mauricio Martins Rodrigues

Copyright © 2014 Juan Camilo Sánchez-Arcila et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In Brazil, malaria is prevalent in the Amazon region and these regions coincide with high prevalence of intestinal parasites but few studies explore the interaction between malaria and other parasites. Therefore, the present study evaluates changes in cytokine, chemokine, C-reactive protein, and nitric oxide (NO) concentrations in 264 individuals, comparing plasma from infected individuals with concurrent malaria and intestinal parasites to individuals with either malaria infection alone and uninfected. In the studied population 24% of the individuals were infected with *Plasmodium* and 18% coinfecting with intestinal parasites. Protozoan parasites comprised the bulk of the intestinal parasites infections and subjects infected with intestinal parasites were more likely to have malaria. The use of principal component analysis and cluster analysis associated increased levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, and CRP and low levels of IL-17A predominantly with individuals with malaria alone and coinfecting individuals. In contrast, low levels of almost all inflammatory mediators were associated predominantly with individuals uninfected while increased levels of IL-17A were associated predominantly with individuals with intestinal parasites only. In conclusion, our data suggest that, in our population, the infection with intestinal parasites (mainly protozoan) does not modify the pattern of cytokine production in individuals infected with *P. falciparum* and *P. vivax*.

## 1. Introduction

The geographic distribution of *Plasmodium* and intestinal parasites are overlapped over the world; therefore malaria coinfection with intestinal parasites is common in tropical

regions of the planet [1]. Although it is well known that polyparasitism is a common condition in human populations, its real impact on the immunopathology of other diseases, including malaria, has not been fully explored. In Brazil, malaria is endemic in the Amazon region and this

area coincides with high prevalence of other diseases. The prevalence of intestinal parasites has been largely reported in the Brazilian Amazon, mainly in studies involving indigenous populations or the impact of intestinal parasitism in nutritional status on Amazonian communities [2–9]. However, the interaction between malaria and other parasites has not been explored and to our knowledge only one work addressed malaria and helminthes coinfections in children infected with *P. vivax* in the Brazilian Amazon studying [10].

Studies from human populations conducted in Africa revealed that helminthic infection can have a negative effect on host response to malaria, including increased susceptibility to *Plasmodium* infection and increased severity of disease [11–14]. However, a protective effect, such as decreased risk of cerebral malaria and lower incidence of malaria, [15–17] and no effect in the susceptibility to malaria or in the pathologic effect of *Plasmodium* infections were also reported [18, 19]. The immunological interactions between helminthes and malarial parasites are unclear and there are little consensus on the effect of malaria and helminthes coinfection. During malaria infection, cytokines are reported to be important molecular markers of cell-mediated immune response and known to be critical players in the regulation of diseases. A T helper 1 (Th1) response predominantly characterizes human malaria infection and the production of proinflammatory cytokines such as interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-6, tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), and other inflammatory cytokines [20, 21]. These inflammatory cytokines are considered critical for the resolution of parasitemia and control of malaria infection, especially during the early stages of *P. falciparum* infection [22, 23]. Conversely, if these robust inflammatory responses are not regulated during chronic malaria infection, they can lead to immunopathology and severe forms of the disease response [24–26]. Regulatory cytokines, including interleukin (IL)-10 and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), were shown to have an important role as an immunoregulator of the infection caused by *P. falciparum* in neutralizing the effects of Th1 inflammatory responses associated with immune pathology and the more severe forms of *P. falciparum* infection [24]. There also a range of other mediators, such as IL-4 and nitric oxide, that have been linked to disease severity in malaria-infected individuals [27, 28].

On the other hand, helminths infections have a profound effect on the immune system, resulting in a strong immunoregulatory and Th2 response that can inhibit the ability of the host to mount a Th1 type immune response. Indeed, *Ascaris* sp. infection induces anti-inflammatory Th2 responses [29–31] and is also associated with an immunoregulatory immune response, defined by elevated levels of interleukin (IL)-10 and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [32, 33]. Therefore, it is expected that the influence of helminthic infection on the immune system could extend to the immune response against malaria due to the anti-inflammatory effect of cytokines induced by helminthes and thereby possibly affect the course of malaria infection [12, 34, 35].

Due to the recognized ability of some helminths to elicit anti-inflammatory cytokines and that many parasites

manipulate host cytokine pathways for their own benefit [36], we hypothesized that there may be a counterbalance between proinflammatory cytokines, associated to malaria, and anti-inflammatory cytokines, associated to helminths or protozoa intestinal parasites. Although cytokine responses have been extensively described in *P. falciparum* infection, few studies have looked at systemic cytokine concentration in coinfection of intestinal parasites and malaria. We believe that comprehensive profiling of serum levels of multiple inflammatory markers such as cytokines, chemokine, C-reactive protein, and nitric oxide (NO) would provide greater insight into their utility to differentiate infected individuals with concurrent malaria and intestinal parasites to individuals with either infection alone. In this regard, the ability to measure numerous molecules in a single sample and to visualize changes in inflammatory markers, including cytokine networks in single and malaria and intestinal parasites coinfecting individuals is critical to advance our understanding of the immune response to pathogens. Therefore, we applied both traditional univariate and multivariate analysis to the data in order to identify the type of response that develops during coinfection and which inflammatory markers are important.

## 2. Material and Methods

**2.1. Study Area and Study Design.** We conducted a cross-sectional survey in a rural settlement community of Porto Velho, municipality of Rondonia State, Brazilian Amazon. The settlement called Joana D'Arc is located 120 km of Porto Velho and the Brazilian Government in 2001 created it in order to give land to people. Joana D'Arc settlers were mostly rain forest native migrants, some with previous agricultural experience, but most with no knowledge of agricultural potential or techniques necessary for farming in a tropical rain forest area. They were low-income people attracted by free land and promised government support. Despite being a place where people lived for over 10 years, there is no health infrastructure in the area and the source of income of residents is from agriculture and small livestock to manufacture cheese. Samples and survey data were collected in 2010 and 2011, during the dry months of June-August, coinciding with the period of increased malaria transmission in Rondonia State. In order to be included in the study, participants had to meet the following criteria: (1) have been resident in the study area; (2) provided a stool samples; and (3) have given a blood sample for the collection of plasma and malaria diagnosis. A total of 264 participants met these criteria and formed our study population.

**2.2. Sample Size.** The sample size was estimated to determine prevalence of malaria using the formula for estimating single proportion at 95% confidence interval. The prevalence of coinfection is unknown in the area, so we used 0.50, to maximize sample size. Based on these entities and expected margin of error to be 0.1, 264 subjects were included in our study. All epidemiological, hematological, and cytokine quantification results were stored in Epi-Info version 3.2. Prior to analysis, the data were centered and standardized



to ensure equal contribution of each parameter and to avoid differences due to scale.

**2.3. Collection and Examination of Blood.** The study team visited houses selected randomly to invite participation. After written informed consent and an epidemiological survey from all adult donors or from parents of donors in the case of minors, blood was drawn by venipuncture. At the time of blood sampling, thick and thin blood smears were performed and stained with 10% Giemsa to examine for the presence of malaria parasites. Parasitological evaluation was done by examination of 200 fields at 1000x magnification under oil-immersion. The parasitemia was expressed as the number of parasites/ $\mu\text{L}$  of blood in the thick blood smear. Using the oil immersion objective, 500 leucocytes were counted at the same time as the number of parasites. Then, the number of parasites/ $\mu\text{L}$  of blood was calculated by multiplying the number of parasites counted against 500 leucocytes and the number of leucocytes of the subject and dividing the product by 500. A researcher expert in malaria diagnosis examined all slides. To confirm the parasitological diagnosis, we performed molecular analyses of all samples using primers specific for genus (*Plasmodium* sp.) and species (*P. falciparum* and *P. vivax*). The amplification protocols were described previously by Snounou et al. [37]. Subjects were considered to have malaria if they were positive in the thick blood smear and/or PCR. Blood counts, including hematologic indices, were done using an automatic hematology analyzer (Pentra, Horiba Medical, Montpellier, France) and peripheral smears of blood samples were made for routine differential blood cellular quantification. A manual differential white blood cells count was also performed to distinguish the immature neutrophils.

**2.4. Collection and Examination of Stool Samples.** All individuals were requested to provide a morning fecal sample and a labeled screw-capped plastic container was provided. A single stool sample was collected from each subject on the following day and examined by a direct unstained wet smear in normal saline and Lugol's iodine solution at 100x and 400x by a technician with expertise in intestinal parasites identification. The physicians in our team provided medication after assessing the exams results of the participants and examining them. All participants found suffering from intestinal parasites infections were given complete treatment.

**2.5. ELISA Specific for Protein C-Reactive.** The CRP levels were determined in all plasma samples using an in-house ELISA. Microtiter plates (Nunc/MaxiSorp, Rochester, NY, USA) were coated with a goat anti-human-CRP antibody (Sigma, USA; catalogue C8284) in carbonate-bicarbonate buffer ( $\text{TCO}_4$ ) overnight at 4°C. The plates were then washed three times with phosphate-buffered saline-0.05% Tween 20 (PBST) and plasma samples diluted 1:500 in PBST were incubated with the plates for 1h at 37°C. The plates were then washed three times and incubated with rabbit anti-human-CRP antibody (Sigma, USA; catalogue C3527) in PBST for 1h at 37°C. The plates were washed three times

and peroxidase-conjugated goat anti-rabbit-IgG antibodies (Sigma, USA; A0545) were added. The wells were thoroughly washed to remove all unbound horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies and an o-phenyldiamine substrate solution was added to each well. The enzyme (HRP) and substrate were allowed to react for a short incubation period. The enzyme-substrate reaction was terminated by the addition of 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and the degree of color change was measured at 492 nm  $\pm$  2 nm in a spectrophotometer (SpectraMax 250; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The plasma concentration of CRP was determined by comparison to standard concentrations of purified human CRP (Sigma, St. Louis, USA). The range of detection of CRP was 0.01–320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sera from noninfected individuals were used on every plate as negative controls. Specific CRP optical density values were converted to concentration values ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) using sigmoidal curve-fit equations derived from CRP standard curves.

**2.6. Griess Microassay Detection of Nitrite and Nitrate.** A modified Griess reaction was used to detect nitrite and nitrate ([38], modified by [39]). The NO levels in samples were indirectly measured after first converting nitrates to nitrites with a nitrate reductase treatment (*Aspergillus* species NAD [P] H, Sigma, UK) and NADPH  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA). Griess reagent [5% phosphoric acid, 1% sulphanic acid, and 0.1% N-(1-naphthyl-1)-ethylendiamine dihydrochloride, all from Sigma, UK, dissolved in 100 mL deionized water] was added and proteins were subsequently precipitated by trichloroacetic acid (BDH, England). The tube contents were mixed and centrifuged (Eppendorf centrifuge 5415 C, Germany); two samples of each supernatant were transferred to a flat-bottomed microplate and their absorbencies were read at 520 nm using a microplate reader (SpectraMax, Molecular Devices Inc). NO values were calculated from standard calibration plots [39].

**2.7. Multiplex Microsphere Cytokine Immunoassay.** Cytokine concentrations in plasma samples were determined using high throughput magnetic bead-based BioPlex assay. Thirteen cytokines IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12 p70, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , G-CSF, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ] and three chemokines (IL-8, MCP-1, and MIP-1 $\beta$ ) were analyzed using a BioPlex Kit assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) following the manufacturer instructions as described in [40]. Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of standard or test sample along with 50  $\mu\text{L}$  of mixed beads was added into the wells of a prewetted 96-well microtiter plate. After 1h of incubation and washing, 25  $\mu\text{L}$  of detection antibody mixture was added and the samples were incubated for 30°C min and then washed. Finally, 50  $\mu\text{L}$  of streptavidin-PE was added and, after 10°C min of incubation and washing, the beads were resuspended in 125  $\mu\text{L}$  assay buffer and analyzed using a BioPlex suspension array system (Bio-Rad Laboratories) and the BioPlex manager software (v3.0). A minimum of 100 beads per region were analyzed. A curve fit was applied

to each standard curve according to the manufacturer's manual and sample concentrations were interpolated from the standard curves. The lower limits of cytokines detection using this method were MIP-1 $\beta$ , 1.69 pg/mL; IL-6 1.25 pg/mL; IFN- $\gamma$ , 0.88 pg/mL; IL-5, 0.84 pg/mL; GM-CSF, 0.47 pg/mL; TNF- $\alpha$ , 0.82 pg/mL; IL-2, 0.29 pg/mL; IL-1 $\beta$ , 0.73 pg/mL; IL-13, 1.1 pg/mL; IL-4, 0.78 pg/mL; MCP-1, 1.64 pg/mL; IL-8, 1.01 pg/mL; IL-10, 0.4 pg/mL; G-CSF, 1.89 pg/mL; IL-7, 1.1 pg/mL; IL-12p70, 0.57 pg/mL; and IL-17A, 0.38 pg/mL TNF- $\alpha$ , 0.10 pg/mL. For all samples, the quantification of the analytes was done in a single day to avoid freeze-thaw cycles.

**2.8. Statistical Analysis.** We compared epidemiological and hematological parameters and cytokine production between groups, using a permutation-based ANOVA (999 permutations) followed by a post hoc test (Tukey HSD), to test for pairwise differences. Permutation-based ANOVA generates the null distributions from the data, avoiding the problems related to the violation of normality and homogeneity [41]. We also used Chi-squared test to determine the significant differences between proportions in binary variables (sex). A principal component analysis (PCA) was applied to the dataset containing cytokines, chemokines, and inflammation markers, to detect the variation patterns related to the studied groups and to identify variables accounting for the majority of the variation within the dataset. PCA is a widely used ordination methodology that reduces dimensionality of multivariate data and detects variables that are more important to explain the variance structure of the data, generating orthogonal (independent) axes using linear combinations of the original variables. PCA can be interpreted numerically: each axis (principal component, PC) is described by an eigenvalue related to the amount of variation that it explains, so that the first PC will always explain more variation than the second, and so on. In addition, variables and units have coordinates ("loadings") along these PCs, which indicate their contribution to each PC. PCA can be also interpreted visually, from the origin of the graph: variables cytokines, chemokines, CRP, and NO (inflammatory mediators) and experimental units (patients) will be located according to their correlations, and distance from the origin means higher contributions to the overall variation (higher absolute loadings). Angles from the origin are roughly proportional to correlation: collinear vectors (approaching 0° or 180°) can be interpreted as positively or negatively correlated and right angles indicate independence (orthogonality).

To further investigate the relationship between infection groups and cytokine profile, we elaborated a heatmap that relates two hierarchical cluster analyses in a bidimensional plot. Z-scores were calculated from transformed values of cytokine levels and represent standard deviations from the population mean:  $Z\text{-score} = [(\text{individual cytokine values} - \text{population cytokine mean value}) / \text{population cytokine standard deviation}]$ . Cluster analyses were performed from Z-scores using Euclidean distance metrics and Ward as the linkage algorithm. All analyses were performed using R statistical environment [42]. Permutation ANOVA was

performed with *lmPerm* package [43] and PCA analysis with *vegan* [44] and *gplots* package [45] was used to build the heatmaps.

**2.9. Ethical Consideration.** The study was conducted after obtaining ethical clearance from Fundação Oswaldo Cruz Ethical Committee (CEP/FIOCRUZ, 492/08). Individual oral and written consents were obtained from all participants. Donors positive for *P. vivax* and/or *P. falciparum* at the time of blood collection were subsequently treated using the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health.

### 3. Results

**3.1. Malaria and Intestinal Parasites Infections.** Of the 353 individuals analyzed at baseline, 264 subjects were included in our study, 16 (6.1%) were infected with malaria only, 48 (18.2%) were coinfecting with malaria and intestinal parasites, 98 (37%) were infected with intestinal parasites only, and 102 (38.7%) were uninfected with either malaria or intestinal parasites. *P. vivax* was more prevalent in both malaria infected only (81.2%) and coinfecting with intestinal parasites (75%). Protozoan parasites comprised the bulk of the infections in subjects infected with intestinal parasites only (70.4%) or coinfecting with malaria and intestinal parasites (81.2%). The prevalence of intestinal parasites was significantly higher in individuals infected with malaria than with those who were not infected (adjusted OR = 3.1, 95% CI = 1.66–5.86  $P = 0.0003$ ). The most prevalent protozoan was *Giardia intestinalis* and helminths were *Ancylostoma duodenale* and *Strongyloides stercoralis*. Multiple protozoa species were common in both intestinal parasites only (14.5%) and coinfecting with malaria (33.3%) while only one subject presented multiple helminthes species infection. Dual, triple, and quadruple protozoan and helminthes infections were observed. Data in Table 1 summarizes the prevalence of single and multiple parasites species infections. In coinfecting subjects, the prevalence of *P. vivax* malaria was 75% (36) and *P. falciparum* was 23% (11) whereas 2% (1) had mixed species infection. *G. intestinalis* was the most prevalent intestinal parasite in both *P. falciparum* and *P. vivax* coinfections. However, in *P. vivax* coinfecting subjects the species of protozoans and helminthes were more diverse (Figure 1).

**3.2. Infection Groups, Epidemiological, and Hematological Data.** As shown in Table 2, the infection groups were defined by the presence or absence of malaria infection and/or intestinal parasites infection, resulting in the following groups: malaria (M), coinfecting (CI), intestinal parasites (IP), and uninfected (UN). The majority of the subjects infected with malaria was male and presented general clinical malaria symptoms such as history of fever and headache. We did not observe differences in parasitemia between Malaria and coinfecting groups. There were no differences in age, years of residence in endemic area (TR), years of residence in Rondonia (TRO), and months since last malaria episode (LME). However the number of past malaria episodes (PME)

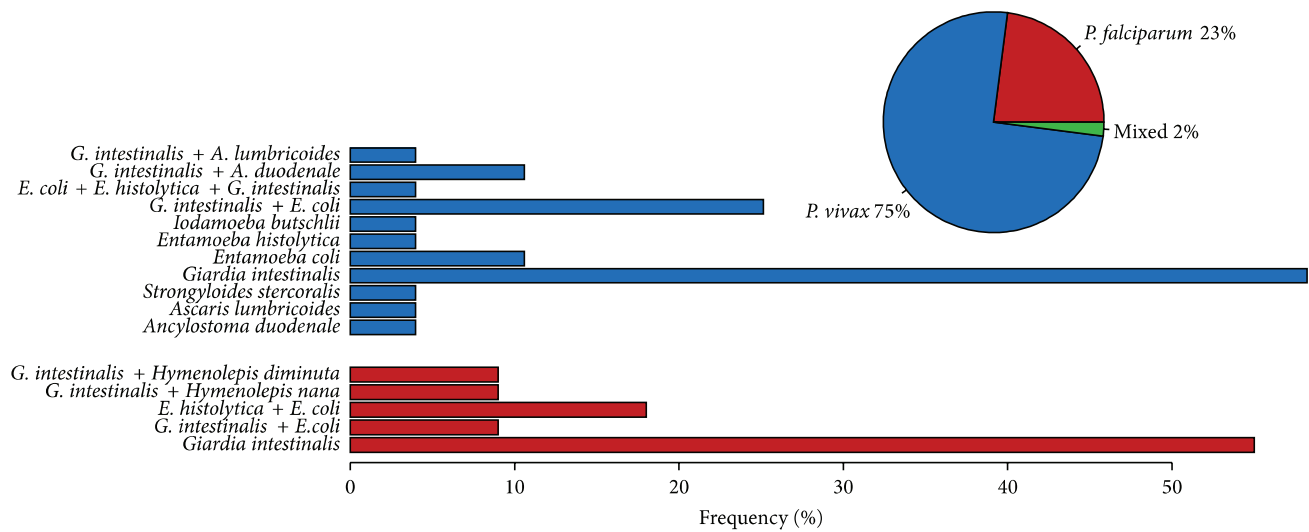


FIGURE 1: Frequency of individuals infected with *P. vivax* (blue) and *P. falciparum* (red) in the population of study. In the barplot the specific frequency of each species of intestinal parasites discriminated by *P. vivax* and *P. falciparum* is represented.

was higher in the groups negative for malaria when compared with malaria group (intestinal parasite  $P < 0.0001$  and uninfected  $P < 0.05$ ). The analysis of some hematological parameters revealed that malaria and coinfecting groups were similar and no differences were observed in the median hemoglobin, platelets, lymphocytes, band cells values, and *Plasmodium* parasites counts. However, they differ from intestinal parasites and uninfected groups presenting lower mean lymphocytes and platelets counts while band cells counts were higher. Hemoglobin levels in malaria and coinfecting groups were slightly higher when compared with the uninfected group.

**3.3. Levels of Inflammatory Mediators.** Firstly, we analyzed the median plasma levels of individual cytokines, chemokines, NO, and CRP comparing the concentration between groups (Figure 2). Cytokines levels varied widely among the cytokines ranging from 0.3 pg to 6952 pg. The cytokines IL-5, IL-7, and GM-CSF were low in most plasma samples (data not shown). Most remarkably, Malaria group presented the highest levels of CRP and intestinal parasites the highest level of IL-12p70, IL-17A, and NO. In both malaria and coinfecting groups the median levels of TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10, IL-1 $\beta$ , MCP-1, and IL-6 were observed to be mostly significantly increased compared with those intestinal parasites and uninfected groups ( $P < 0.001$  for all comparisons). The median levels of IFN- $\gamma$  and IL-8 were increased in all groups compared to uninfected group. Changes in cytokine and chemokine levels were very similar in malaria and coinfecting groups and with this analysis we could not associate changes in cytokine profile that could be due to coinfection.

**3.4. Principal Component Analysis (PCA) and Cluster Analysis of Inflammatory Mediators.** In order to assess differences in the whole multivariate set of cytokines, chemokines, NO,

and CRP data in individuals between the groups, we performed an exploratory principal component analysis (PCA), a multivariate technique to identify whether inflammatory mediators could indicate coinfection. Figure 3(a) displays a PCA of inflammatory mediator for the groups M, CI, IP, and UN. The dotted line connects each individual to the centroid of its group and the position of the centroids indicates that there was an overall difference in the mediators between two groups: M and CI and IP and UN groups. In these two groups, the individuals were gathered by their similar inflammatory mediator's profiles. The differences in the inflammatory mediators between M and CI groups from IP and UN groups were higher levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, and CRP and decreased levels of IL-17A and NO while IP and UN presented higher levels of IL-17A and NO and decreased levels of IL-10 and CRP (Figure 3(b)). In order to characterize cytokine inflammatory mediators in each studied individual, we applied a two-dimensional clustering analysis (Figure 4) using the cytokines that presented the largest loading values in the PCA analysis (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP1, IFN- $\gamma$ , IL-17A, CRP, and IL-10). This method allows coupled clustering of both the subject and the measured parameters without taking in account the groups. Interestingly, the clustering algorithm could discriminate two major clusters: one cluster included increased levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, and CRP and low levels of IL-17A predominantly in individuals from M and CI groups and the second cluster included low levels of almost all inflammatory mediators predominantly in individuals from UN group and increased levels of IL-17A predominantly in individuals from IP group.

## 4. Discussion

Overlapping distribution of intestinal parasites and malaria might result in high rate of coinfection. In the studied

TABLE 1: Prevalence of malaria and intestinal parasites in the studied population.

	Number of cases	Prevalence (%)
Infected with malaria only		
<i>P. vivax</i>	13	81.2
<i>P. falciparum</i>	3	18.8
Total	16	6.1
Infected with intestinal parasites only		
Protozoa	69	70.4
<i>Giardia intestinalis</i>	48	69.6
<i>Entamoeba coli</i>	7	10.1
<i>Entamoeba histolytica</i>	3	4.3
<i>Iodamoeba butschlii</i>	1	1.5
<i>G. intestinalis</i> + ( <i>I. butschlii</i> or <i>E. histolytica</i> or <i>E. coli</i> )	3	4.3
<i>E. histolytica</i> + ( <i>I. butschlii</i> or <i>E. coli</i> )	2	2.9
<i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i> + <i>G. intestinalis</i>	3	4.3
<i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i> + <i>I. butschlii</i>	1	1.5
<i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i> + <i>G. intestinalis</i> + <i>I. butschlii</i>	1	1.5
Helminths	17	17.4
<i>Ancylostoma duodenale</i>	6	35.3
<i>Strongyloides stercoralis</i>	5	29.4
<i>Ascaris lumbricoides</i>	3	17.6
<i>Trichuris trichiura</i>	2	11.8
<i>S. stercoralis</i> + <i>T. trichiura</i>	1	5.9
Protozoa + Helminthes	12	12.2
<i>E. coli</i> + <i>A. lumbricoides</i>	2	16.7
<i>G. intestinalis</i> + ( <i>A. duodenale</i> or <i>T. trichiura</i> or <i>S. stercoralis</i> )	7	58.4
<i>G. intestinalis</i> + <i>I. butschlii</i> + <i>A. lumbricoides</i>	1	8.3
<i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i> + <i>A. duodenale</i>	1	8.3
<i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i> + <i>I. butschlii</i> + <i>S. stercoralis</i>	1	8.3
Total	98	37.1
Coinfected with malaria + intestinal parasites		
Malaria + Protozoa	39	81.2
<i>G. intestinalis</i>	23	59.0
<i>E. coli</i>	3	7.7
<i>E. histolytica</i> or <i>I. butschlii</i>	2	5.2
<i>E. coli</i> + ( <i>G. intestinalis</i> or <i>E. histolytica</i> )	10	25.6
<i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i> + <i>G. intestinalis</i>	1	2.6
Malaria + Helminths	3	6.3
<i>A. duodenale</i> or <i>A. lumbricoides</i> or <i>S. stercoralis</i>	3	100
Malaria + Protozoa + helminthes	6	12.5
<i>G. intestinalis</i> + ( <i>A. duodenale</i> or <i>A. lumbricoides</i> )	4	66.7
<i>G. intestinalis</i> + ( <i>Hymenolepis nana</i> or <i>Hymenolepis diminuta</i> )	2	33.3
Total	48	18.2
Uninfected	102	38.6

population 24% of the individuals were infected with *Plasmodium*, 55% with intestinal parasites, and 18% with malaria and intestinal parasites. In the studied area, the likelihood of being infected with malaria was significantly higher in individuals infected with intestinal parasites. Several studies

from human populations conducted in Africa reveal that helminthic infection can have a negative effect on host response to malaria, including increased susceptibility to *Plasmodium* infection and increased severity of disease [11–14]. In our study, although malaria was more frequent in

TABLE 2: Epidemiological and hematological data in the studied groups.

	Infection groups			
	Malaria	Coinfected	Intestinal parasites <sup>a</sup>	Uninfected <sup>b</sup>
	<i>N</i> = 16 <i>n</i> (%)	<i>N</i> = 48 <i>n</i> (%)	<i>N</i> = 98 <i>n</i> (%)	<i>N</i> = 102 <i>n</i> (%)
Gender <i>n</i> (%)				
M	11 (69)	34 (71)	49 (50)	48 (47)
F	5 (31)	14 (29)	49 (50)	54 (53)
Age	24 (21–33)	31 (22–41)	30 (14–43)	29 (14–38)
TR	22 (16–27)	23 (18–32)	23 (14–34)	24 (13–31)
TRO	21 (10–24)	22 (15–27)	18 (11–30)	24 (13–30)
LME	6 (0–66)	3 (0–16)	24 (6–60)	10 (1–36)
PME	5 (2–8) <sup>***b*</sup>	4 (1–10) <sup>a*</sup>	4 (2–60) <sup>b*</sup>	5 (2–14)
Hematological				
Lymphocytes (mm <sup>3</sup> )	1316 (863–1982) <sup>b***</sup>	1170 (789–1826) <sup>a***b***</sup>	2178 (1813–2725)	2068 (1697–2467)
Platelets (mm <sup>3</sup> )	166 (148–204) <sup>a***</sup>	152 (106–197) <sup>a***b***</sup>	214 (173–245) <sup>b*</sup>	233 (193–286)
Band cells (mm <sup>3</sup> )	34 (0–141) <sup>a***b***</sup>	26 (0–143) <sup>a***b***</sup>	0 (0–0)	0 (0–0)
Eosinophils (mm <sup>3</sup> )	73 (36.75–138.75) <sup>a*</sup>	104 (42.5–328.5) <sup>a*</sup>	328 (185–720) <sup>b*</sup>	245 (146.75–484.00)
Hemoglobin (g/dL)	12.7 (12–14) <sup>b*</sup>	13.2 (12.2–14) <sup>b*</sup>	13.8 (12.8–15)	13.8 (13–14.7)
Parasitemia (parasites/ $\mu$ L)	2740 (738–5591)	1816 (641–5700)	—	—

*n* (%): number of samples (percentage); TR: Years of residence in endemic area; TRO: Years of residence in Rondonia; LME: Months since last malaria episode and PME: number of past malaria episodes. The variables Age, TR, TRO, LME and PME, values are expressed as Median (25%–75%). Differences were calculated using a TukeyHSD from a permutation based ANOVA. Differences of parasitemia between Coinfected and Malaria group were calculated using a permutation *t* test. <sup>a</sup>differences between indicated group and Intestinal parasites; <sup>b</sup>differences between indicated group and Uninfected. Statistical differences of epidemiological parameters were expressed as \*\*\**P* < 0.0001, \*\**P* < 0.001, \**P* < 0.05.

individuals infected with intestinal parasites, hematological parameters and parasitemia did not differ between coinfecting and malaria single infected individuals. In both groups anemia was not frequent and changes in lymphocytes, and platelets and band cells seem to be due to acute malaria infections while eosinophil levels were high only in intestinal parasites group. Although anemia and thrombocytopenia are the most prominent alterations in acute malaria infection and in coinfections with helminths, hematological changes in these infections are a wide and contradictory event [40, 46–50].

Differences in results obtained in different studies might depend on the species of the intestinal parasites and the age of studied population. While most of the coinfection studies are with helminthes and in children [1, 10], in our study the most prevalent intestinal parasites in the population were protozoans and the participants were adults. In addition, our sample size may be small and could not allow the stratification of the intestinal infections by helminthes and protozoans, a factor which may account for these differences.

The influence of intestinal parasites (mainly helminthes) in *Plasmodium* coinfection has gained interest because it has been hypothesized that Th2 polarized immune response elicited by helminthes could alter the natural immune response of the host to *Plasmodium* parasites [12, 34, 36]. Most of the studies associate cytokine profile mainly with the immunopathology of severe/complicated malaria [24, 51]. Few studies looked at systemic cytokines concentration in coinfection comparing plasma of infected individuals

with concurrent malaria and intestinal parasites with either infection alone [52–55]. To our knowledge, this is the first study that evaluates 16 cytokines, CRP, and NO in malaria coinfection with intestinal parasites. In our study, the analysis of individual cytokines, chemokines, CRP, and NO could not detect changes associated to coinfection. However, the use of principal component analysis and cluster analysis provided evidence that groups of individuals with malaria (M and CI) could be discriminated from the groups of individuals negative for malaria (IP and UN) based on inflammatory mediators profile. They formed two separate groups based on the levels of cytokines, CRP, and NO. For malaria infected individuals (M and CI) the profile was high levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  IL-10, and CRP and decreased levels of IL-17A while for malaria negative individuals (IP and UN) the profile was high levels of IL-17A, NO and decreased levels of IL-10 and CRP.

The high production of CRP, IL-10, TNF- $\alpha$ , and IL-6 observed in our analysis in M and CI groups is reported in several studies in acute malaria infections [50, 56, 57]. In Brazilian populations, IL-10 and CRP are an important marker of acute malaria caused by *P. vivax* [40, 50, 56].

The role of cytokines production in acute malaria is far from being understood and little is known about their effect in coinfection with other parasites. In our study, the levels of inflammatory mediators in individuals with acute malaria did not differ from individuals coinfecting with intestinal parasites when compared with individuals single infected with malaria. However, few reports demonstrated altered cytokines levels

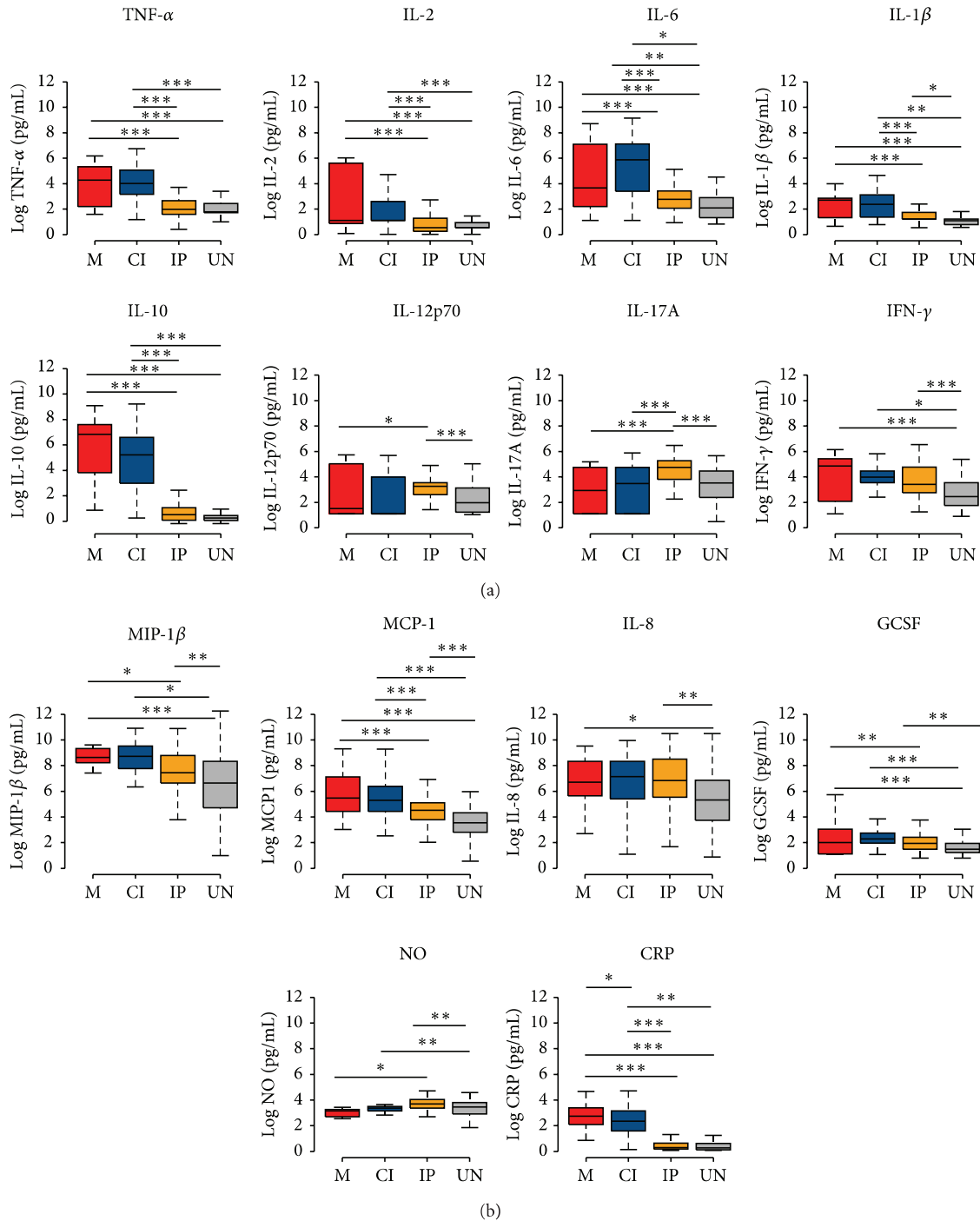


FIGURE 2: Boxplots of the levels of (a) cytokines, (b) chemokines, and inflammation markers in the groups (M = red, CI = blue, IP = orange, and UN = gray). Differences were calculated using a TukeyHSD from a permutation ANOVA over cytokine values transformed with Log. Significant statistical differences are represented in the bars and the level of significance expressed as \*\*\* $P < 0.0001$ , \*\* $P < 0.001$ , and \* $P < 0.05$ .

in children and adults coinfected with *P. falciparum* and *Schistosoma haematobium*. Higher IFN- $\gamma$  and similar TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , and IL-10 levels were found when comparing coinfected and single *P. falciparum* infected children [52] while, in adults, higher IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$  levels were

detected [53]. Elevated IL-6 and IL-10 were also associated with acute malaria in children but the levels were lower in children coinfected with *S. haematobium* when compared to children infected with *S. haematobium* alone [54]. In these studies the question of whether the high concentration of

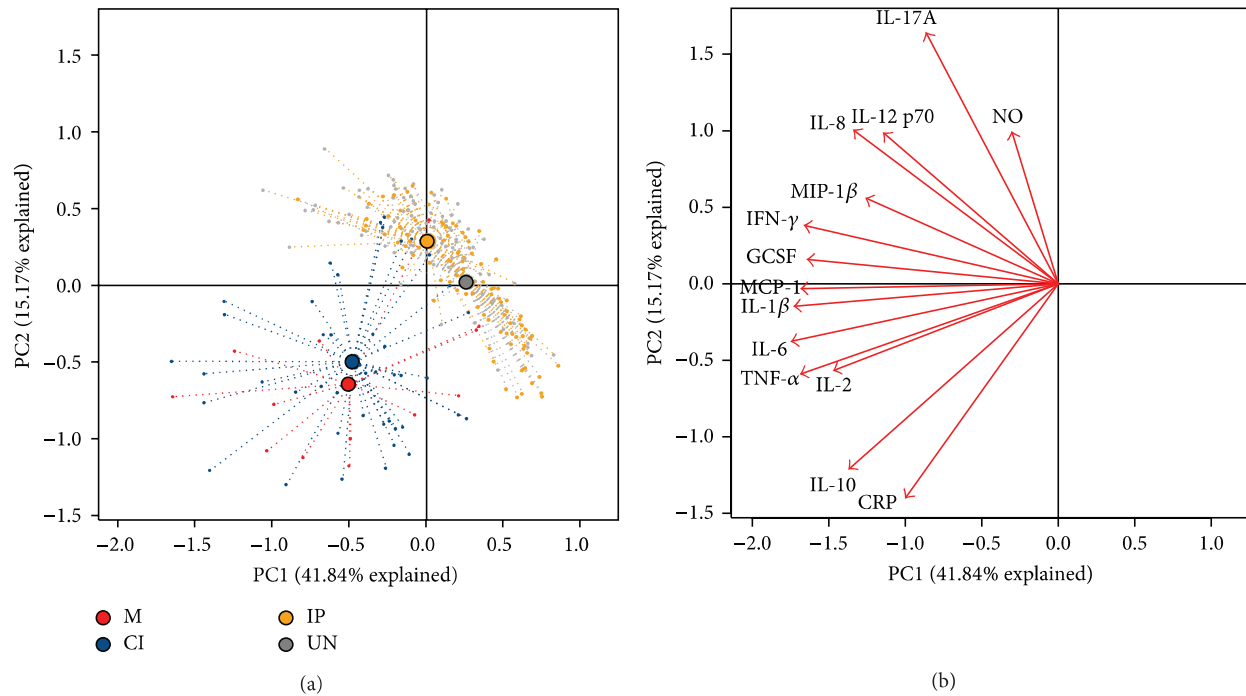


FIGURE 3: Principal component analysis (PCA) of inflammatory mediators (cytokine, chemokines, CRP, and NO). (a) Results are shown for M, CI, IP, and UN groups. Each point represents an individual from a group and each group has a color code: M = red, CI = orange, IP = blue, and UN = gray. (b) Arrows indicating the direction of maximum change while the length of arrows represents the magnitude of the change. The explanation of the first principal component (PC1) explained 41.84% of the variation of the data and the second principal component (PC2) explained 15.17%. The separation of CI and M individuals from IP and EXP and the association of some cytokines with the different groups can be observed.

cytokines in coinfecting individuals had a negative or positive effect on malaria was not addressed.

It is worth it to highlight that, specifically using PCA analysis, we observed the importance of the contribution of IL-17A to separate the M and CI from IP and UN, although IL-17A seems to be higher in IP individuals. It has been observed that IL-17 is an important marker of intestinal inflammation contributing to enhance innate barrier defenses at mucosal surfaces [58, 59]. Interestingly in the groups CI and M we also detected decreased levels of NO. This inflammatory marker has been described to be protective against *P. falciparum* *in vitro*, and low levels of this marker have been associated with suppression of NO synthesis depending of the gravity in malaria [27]. The contribution of intestinal parasites coinfection in the pathogenesis of malaria is still controversial, and its role is probably specific depending on the type of parasite involved in the coinfection. In our study in spite of the great amount of inflammatory markers evaluated, the use of multivariate analysis techniques proved to be an excellent tool to find hidden patterns in complex data systems including cytokine studies [57, 60–62]. Indeed, using cluster analysis, Prakash et al. [61] detected differences of plasmatic cytokines between individuals with mild, severe noncerebral, and cerebral malaria. In our study, this analysis was able to detect differences between individuals with malaria versus without malaria but was not able to detect differences between malaria versus intestinal parasites coinfecting individuals. Therefore, it seems that intestinal

parasites coinfection (mainly protozoan) does influence in the plasmatic cytokine levels of individuals with acute malaria and the real influence of these infections could be perceived in regions highly endemic for specific parasites such as *Ascaris lumbricoides* and *Schistosoma mansoni*.

## 5. Conclusion

In conclusion, our data suggest that, in our population, the infection with intestinal parasites (mainly protozoan) does not modify the pattern of cytokine production in individuals infected with *Plasmodium*.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

The authors are in debt to the individuals who participated in this study and Andrea Sánchez Tapia for revising the paper. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil), Pronex Malaria, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Brazil), Pronex Malaria/CNPq/DECIT/MS. JOF

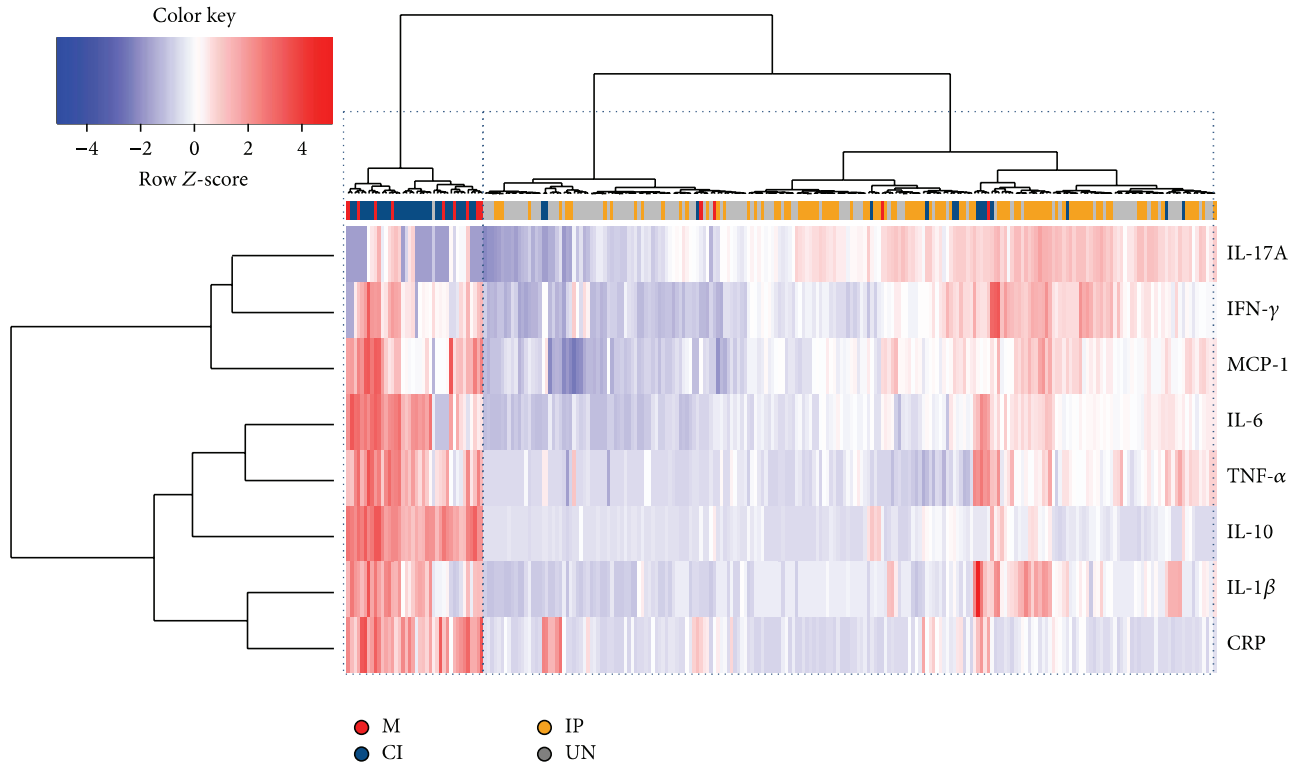


FIGURE 4: Two-way coupled cluster analysis (heatmap). Each cell indicates the value of a single mediator of inflammation among the studied individuals. The horizontal cluster illustrates the grouping of individuals considering seventeen cytokines, C-reactive protein, and nitric oxide. The vertical cluster shows the grouping of mediator of inflammation such as cytokines meaning that cytokines that presented more similar responses are closer in the clusters. The red color in the cells indicates high values and the blue color indicates low values in the production of cytokines and inflammatory proteins. The white color indicates no changes in the cytokine levels. The colors under the horizontal cluster represent the groups (M = red, CI = orange, IP = blue, and UN = gray) of each individual. Sample clustering resulting from the algorithm applied is shown at the top of the graph as a horizontal dendrogram, with an indication of the group to which each individual sample belongs. The horizontal-dotted boxes show the clusters of individuals obtained. The first vertical box with dotted lines represents the group of individuals with malaria only (M) and malaria-intestinal parasites coinfecting (CI). The second box shows the uninfected (UN) and IP individuals.

is recipient of a Research Productivity Fellowship from CNPq, and JCSA is recipient of a fellowship from Instituto Oswaldo Cruz and VAR from CNPq.

## References

- [1] R. Pullan and S. Brooker, "The health impact of polyparasitism in humans: are we under-estimating the burden of parasitic diseases?" *Parasitology*, vol. 135, no. 7, pp. 783–794, 2008.
- [2] C. Fernández Araujo and C. Leite Fernández, "Prevalence of intestinal parasitosis in the city of Eirunepé, Amazon," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 38, no. 1, p. 69, 2005.
- [3] F. M. Fleming, S. Brooker, S. M. Geiger et al., "Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil," *Tropical Medicine and International Health*, vol. 11, no. 1, pp. 56–64, 2006.
- [4] E. A. De Souza, M. Da Silva-Nunes, R. Dos Santos Malafrente, P. T. Muniz, M. A. Cardoso, and M. U. Ferreira, "Prevalence and spatial distribution of intestinal parasitic infections in a rural Amazonian settlement, Acre State, Brazil," *Cadernos de Saúde Pública*, vol. 23, no. 2, pp. 427–434, 2007.
- [5] J. G. Valverde, A. Gomes-Silva, C. J. M. de Carvalho et al., "Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian Amazon," *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 105, no. 6, pp. 413–424, 2011.
- [6] J. O. Ferrari, M. U. Ferreira, L. M. Camargo, and C. S. Ferreira, "Intestinal parasites among Karitiana Indians from Rondônia State, Brazil," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, vol. 34, no. 3, pp. 223–225, 1992.
- [7] M. A. Cardoso, M. U. Ferreira, L. M. A. Camargo, and S. C. Szarfarc, "Anaemia, iron deficiency and malaria in a rural community in Brazilian Amazon," *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 48, no. 5, pp. 326–332, 1994.
- [8] E. Eve, E. Ferraz, and V. E. Thatcher, "Parasitic infections in villagers from three districts of the Brazilian Amazon," *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 92, no. 1, pp. 79–87, 1998.
- [9] M. A. Cardoso, M. U. Ferreira, L. M. Camargo, and S. C. Szarfarc, "Anemia in a population from an endemic area of malaria, Rondônia (Brazil)," *Revista de Saude Publica*, vol. 26, no. 3, pp. 161–166, 1992.
- [10] G. C. Melo, R. C. Reyes-Lecca, S. Vitor-Silva et al., "Concurrent helminthic infection protects schoolchildren with *Plasmodium*



- vivax* from anemia,” *PLoS ONE*, vol. 5, no. 6, Article ID e11206, 2010.
- [11] J.-G. Tshikuka, M. E. Scott, K. Gray-Donald, and O.-N. Kalumba, “Multiple infection with *Plasmodium* and helminths in communities of low and relatively high socio-economic status,” *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 90, no. 3, pp. 277–293, 1996.
- [12] M. Nacher, P. Singhasivanon, S. Yimsamran et al., “Intestinal helminth infections are associated with increased incidence of *Plasmodium vivax* malaria in Thailand,” *Journal of Parasitology*, vol. 88, no. 1, pp. 55–58, 2002.
- [13] A. Spiegel, A. Tall, G. Raphenon, J.-F. Trape, and P. Druilhe, “Increased frequency of malaria attacks in subjects co-infected by intestinal worms and *Plasmodium falciparum* malaria,” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 97, no. 2, pp. 198–199, 2003.
- [14] C. Sokhna, J.-Y. Le Hesran, P. A. Mbaye et al., “Increase of malaria attacks among children presenting concomitant infection by *Schistosoma mansoni* in Senegal,” *Malaria Journal*, vol. 3, article 43, 2004.
- [15] M. J. Murray, A. B. Murray, M. B. Murray, and C. J. Murray, “Parotid enlargement, forehead edema, and suppression of malaria as nutritional consequences of ascariasis,” *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 30, no. 12, pp. 2117–2121, 1977.
- [16] V. Briand, L. Watier, J. Y. Le Hesran, A. Garcia, and M. Cot, “Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: protective effect of schistosomiasis on malaria in Senegalese children?” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 72, no. 6, pp. 702–707, 2005.
- [17] K. E. Lyke, A. Dicko, A. Dabo et al., “Association of *Schistosoma haematobium* infection with protection against acute *Plasmodium vivax* malaria in Malian children,” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 73, no. 6, pp. 1124–1130, 2005.
- [18] A. E. Shapiro, E. M. Tukahebwa, J. Kasten et al., “Epidemiology of helminth infections and their relationship to clinical malaria in southwest Uganda,” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 99, no. 1, pp. 18–24, 2005.
- [19] P. Bejon, T. W. Mwangi, B. Lowe, N. Peshu, A. V. S. Hill, and K. Marsh, “Helminth infection and eosinophilia and the risk of *Plasmodium vivax* malaria in 1- to 6-year-old children in a malaria endemic area,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 2, no. 1, p. e164, 2008.
- [20] K. Artavanis-Tsakonas, J. E. Tongren, and E. M. Riley, “The war between the malaria parasite and the immune system: Immunity, immunoregulation and immunopathology,” *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 133, no. 2, pp. 145–152, 2003.
- [21] E. M. Riley, S. Wahl, D. J. Perkins, and L. Schofield, “Regulating immunity to malaria,” *Parasite Immunology*, vol. 28, no. 1-2, pp. 35–49, 2006.
- [22] Z. Su, M. Segura, K. Morgan, J. C. Loredó-Osti, and M. M. Stevenson, “Impairment of protective immunity to blood-stage malaria by concurrent nematode infection,” *Infection and Immunity*, vol. 73, no. 6, pp. 3531–3539, 2005.
- [23] D. L. Doolan, C. Dobaño, and J. K. Baird, “Acquired immunity to malaria,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 22, no. 1, pp. 13–36, 2009.
- [24] N. P. J. Day, T. T. Hien, T. Schollaardt et al., “The prognostic and pathophysiologic role of pro- and anti-inflammatory cytokines in severe malaria,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 180, no. 4, pp. 1288–1297, 1999.
- [25] D. Doodoo, F. M. Omer, J. Todd, B. D. Akanmori, K. A. Koram, and E. M. Riley, “Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 185, no. 7, pp. 971–979, 2002.
- [26] C. Noone, M. Parkinson, D. J. Dowling et al., “Plasma cytokines, chemokines and cellular immune responses in pre-school Nigerian children infected with *Plasmodium falciparum*,” *Malaria Journal*, vol. 12, no. 1, article 5, 2013.
- [27] N. M. Anstey, J. B. Weinberg, M. Y. Hassanali et al., “Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 184, no. 2, pp. 557–567, 1996.
- [28] S. Cabantous, B. Poudiougou, A. A. Oumar et al., “Genetic evidence for the aggravation of *Plasmodium vivax* malaria by interleukin 4,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 200, no. 10, pp. 1530–1539, 2009.
- [29] S. M. Geiger, C. L. Massara, J. Bethony, P. T. Soboslay, O. S. Carvalho, and R. Corrêa-Oliveira, “Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients,” *Parasite Immunology*, vol. 24, no. 11-12, pp. 499–509, 2002.
- [30] J. D. Turner, H. Faulkner, J. Kamgno et al., “Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 188, no. 11, pp. 1768–1775, 2003.
- [31] C. A. Figueiredo, M. L. Barreto, L. C. Rodrigues et al., “Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network,” *Infection and Immunity*, vol. 78, no. 7, pp. 3160–3167, 2010.
- [32] J. D. Turner, J. A. Jackson, H. Faulkner et al., “Intensity of intestinal infection with multiple worm species is related to regulatory cytokine output and immune hyporesponsiveness,” *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 197, no. 8, pp. 1204–1212, 2008.
- [33] T. Supali, J. J. Verweij, A. E. Wiria et al., “Polyparasitism and its impact on the immune system,” *International Journal for Parasitology*, vol. 40, no. 10, pp. 1171–1176, 2010.
- [34] M. Nacher, F. Gay, P. Singhasivanon et al., “*Ascaris lumbricoides* infection is associated with protection from cerebral malaria,” *Parasite Immunology*, vol. 22, no. 3, pp. 107–113, 2000.
- [35] M. Nacher, P. Singhasivanon, U. Silachamroon et al., “Helminth infections are associated with protection from malaria-related acute renal failure and jaundice in Thailand,” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 65, no. 6, pp. 834–836, 2001.
- [36] R. M. Maizels, A. Balic, N. Gomez-Escobar, M. Nair, M. D. Taylor, and J. E. Allen, “Helminth parasites—masters of regulation,” *Immunological Reviews*, vol. 201, no. 1, pp. 89–116, 2004.
- [37] G. Snounou, S. Viriyakosol, W. Jarra et al., “High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction,” *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 61, no. 2, pp. 315–320, 1993.
- [38] K. A. Rockett, M. M. Awburn, E. J. Rockett, and I. A. Clark, “Tumor necrosis factor and interleukin-1 synergy in the context of malaria pathology,” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 50, no. 6, pp. 112–118, 1994.
- [39] H. Nahrevanian and M. J. Dascombe, “Nitric oxide and reactive nitrogen intermediates during lethal and nonlethal strains of

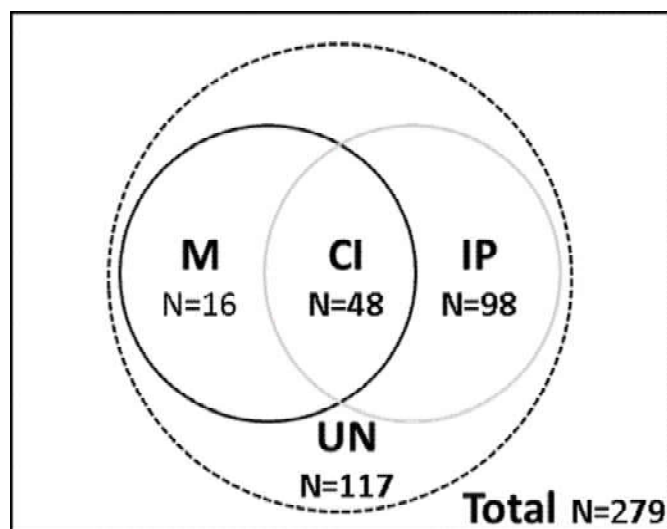
- murine malaria," *Parasite Immunology*, vol. 23, no. 9, pp. 491–501, 2001.
- [40] R. N. Rodrigues-da-Silva, J. D. C. Lima-Junior, B. D. P. Fonseca e Fonseca et al., "Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium vivax* infections," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 109, no. 2, pp. 154–162, 2014.
- [41] J. Ludbrook and H. Dudley, "Why permutation tests are superior to t and f tests in biomedical research," *American Statistician*, vol. 52, no. 2, pp. 127–132, 1998.
- [42] R Core Team, *A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013, <http://www.R-project.org/>.
- [43] "Wheeler B. lmer: permutation tests for linear models," 2010, <http://cran.r-project.org/web/packages/lmer/index.html>.
- [44] J. Oksanen, F. G. Blanchet, R. Kindt et al., *vegan: Community Ecology Package*, 2010, <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- [45] G. R. Warnes, B. Bolker, L. Bonebakker et al., "Various R programming tools for plotting data," 2014, <http://CRAN.R-project.org/package=gplots>.
- [46] E. N. T. Meeusen and A. Balic, "Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites?" *Parasitology Today*, vol. 16, no. 3, pp. 95–101, 2000.
- [47] A. D. Klion and T. B. Nutman, "The role of eosinophils in host defense against helminth parasites," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 113, no. 1, pp. 30–37, 2004.
- [48] N. Tangpukdee, H.-S. Yew, S. Krudsood et al., "Dynamic changes in white blood cell counts in uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria," *Parasitology International*, vol. 57, no. 4, pp. 490–494, 2008.
- [49] W. R. J. Taylor, H. Widjaja, H. Basri et al., "Changes in the total leukocyte and platelet counts in Papuan and non Papuan adults from northeast Papua infected with acute *Plasmodium vivax* or uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria," *Malaria Journal*, vol. 7, article 259, 2008.
- [50] J. D. C. Lima-Junior, R. N. Rodrigues-da-Silva, V. A. Pereira et al., "Cells and mediators of inflammation (C-reactive protein, nitric oxide, platelets and neutrophils) in the acute and convalescent phases of uncomplicated *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 107, no. 8, pp. 1035–1041, 2012.
- [51] P. Kern, C. J. Hemmer, J. van Damme, H.-J. Gruss, and M. Dietrich, "Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated *Plasmodium vivax* malaria," *The American Journal of Medicine*, vol. 87, no. 2, pp. 139–143, 1989.
- [52] F. Remoue, T. O. Diallo, V. Angeli et al., "Malaria co-infection in children influences antibody response to schistosome antigens and inflammatory markers associated with morbidity," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 97, no. 3, pp. 361–364, 2003.
- [53] T. O. Diallo, F. Remoue, A. M. Schacht et al., "Schistosomiasis co-infection in humans influences inflammatory markers in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria," *Parasite Immunology*, vol. 26, no. 8-9, pp. 365–369, 2004.
- [54] K. E. Lyke, A. Dabo, L. Sangare et al., "Effects of concomitant *Schistosoma haematobium* infection on the serum cytokine levels elicited by acute *Plasmodium vivax* malaria infection in Malian children," *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 10, pp. 5718–5724, 2006.
- [55] N. Imai, N. Rujeni, N. Nausch et al., "Exposure, infection, systemic cytokine levels and antibody responses in young children concurrently exposed to schistosomiasis and malaria," *Parasitology*, vol. 138, no. 12, pp. 1519–1533, 2011.
- [56] R. M. Gonçalves, K. C. Salmazi, B. A. N. Santos et al., "CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses?" *Infection and Immunity*, vol. 78, no. 11, pp. 4763–4772, 2010.
- [57] R. M. Gonçalves, K. K. G. Scopel, M. S. Bastos, and M. U. Ferreira, "Cytokine balance in human Malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium vivax*?" *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, Article ID e44394, 2012.
- [58] D. J. Cua and C. M. Tato, "Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system," *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, no. 7, pp. 479–489, 2010.
- [59] S. J. Rubino, K. Geddes, and S. E. Girardin, "Innate IL-17 and IL-22 responses to enteric bacterial pathogens," *Trends in Immunology*, vol. 33, no. 3, pp. 112–118, 2012.
- [60] H. Helmbj, M. Kullberg, and M. Troye-Blomberg, "Altered immune responses in mice with concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* infections," *Infection and Immunity*, vol. 66, no. 11, pp. 5167–5174, 1998.
- [61] D. Prakash, C. Fesel, R. Jain, P.-A. Cazenave, G. C. Mishra, and S. Pied, "Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of central India," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 194, no. 2, pp. 198–207, 2006.
- [62] S. Roy, J. Lavine, F. Chiaromonte et al., "Multivariate statistical analyses demonstrate unique host immune responses to single and dual lentiviral infection," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 10, Article ID e7359, 2009.

## 5.2 Trabalho 2:

Nesta seção descreveremos os resultados correspondentes ao Trabalho 2 “The influence of intestinal parasites on *Plasmodium vivax* specific antibody responses to MSP-1<sub>19</sub> and AMA-1 in rural populations of the Brazilian Amazon”, anexo no ítem 11 página 95 da presente tese.

## 5.3 Prevalência de Malária e parasitoses intestinais

A partir do diagnóstico parasitológico de helmintos e parasitológico e molecular de *Plasmodium*, os 279 indivíduos participantes do estudo foram agrupados dependendo do tipo de infecção em quatro grupos: Infectados só por *Plasmodium* (5,8%, **M**), indivíduos coinfectados com *Plasmodium* e parasitoses intestinais (17,2%, **CI**), indivíduos infectados unicamente com parasitoses intestinais (35,1%, **IP**) e indivíduos sem infecções por *Plasmodium* e/ou parasitoses intestinais (41,9%, **UN**) (Figura 5-1).



**Figura 5-1 Distribuição e número de indivíduos entre os grupos de acordo com diagnóstico de malária e parasitoses intestinais.** **M:** indivíduos infectados só com *Plasmodium*; **CI:** Indivíduos coinfectados com *Plasmodium* e parasitoses intestinais; **IP:** indivíduos infectados só com parasitoses intestinais; **UN:** indivíduos não infectados por *Plasmodium* ou parasitoses intestinais.

Dentre os indivíduos com malária (grupos **M** e **CI**) *P. vivax* foi a espécie mais prevalente (81,2% e 75,0% respetivamente). Da mesma forma, entre os indivíduos infectados com *Plasmodium*, a maior parte encontrava-se infectada com parasitoses intestinais (75%) comparada com indivíduos sem este tipo de infecções (25%).

Nos 146 indivíduos infectados com parasitoses intestinais foram detectadas 10 espécies de parasitos (Figura 5-2). Dessas 10 espécies, 4 foram protozoários (*G. intestinalis*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica/díspar*, *Iodamoeba butschlii*) e 6 foram helmintos (*A. duodenale*, *Strongyloides stercoralis*, *A. lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*). Entre os protozoários, *G. intestinalis* e *E. coli* foram as espécies mais prevalentes encontradas, tanto em infecções simples quanto associadas com outras espécies de protozoários e helmintos. Por outro lado, *A. duodenale* e *S. stercoralis* foram as espécies mais prevalentes de helmintos. A prevalência de protozoários no grupo CI (81,25%) não foi diferente estatisticamente da prevalência no grupo IP (70,4%).

Adicionalmente, não houve diferenças na prevalência de *G. intestinalis* e *E. coli* entre os indivíduos dos grupos CI e IP. Por outro lado, as infecções múltiplas de *E. coli* com outros protozoários estavam particularmente restritas aos indivíduos do grupo CI.

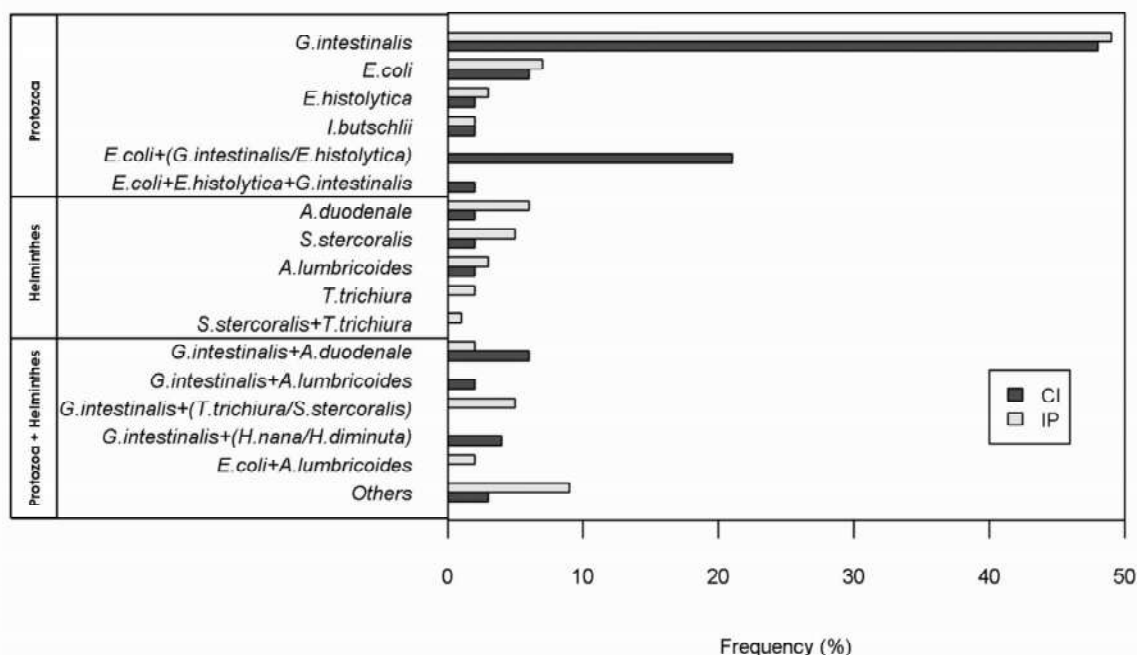


Figura 5-2 Prevalência de parasitoses intestinais em indivíduos coinfetados com *Plasmodium*-parasitos intestinais (CI) e só com parasitoses intestinais (IP). As barras escuras indicam a frequência de parasitoses no grupo CI e as barras cinza indicam a frequência de parasitoses intestinais no grupo IP. O eixo Y mostra as espécies correspondentes as infecções com protozoários, helmintos e protozoários + helmintos.

#### 5.4 Características dos indivíduos estudados

As características da população estudada encontra-se resumida na Tabela 5-1. Todos os indivíduos participantes do estudo com malária apresentaram sintomas

clínicos como febre e cefaleia. Na população estudada houve uma predominância de indivíduos do sexo masculino, nos grupos M e CI, enquanto os grupos IP e UN estavam equilibrados na quantidade de indivíduos de cada gênero. Não houve diferenças significativas de idade e tempo desde a última malária (LME) entre os grupos estudados. Isto significa que, apesar de não estarem infectados com malária no momento de estudo, indivíduos do grupo IP e UN já tiveram contato com os plasmódios.

Das variáveis hematológicas analisadas neste trabalho, observamos que havia uma frequência de anemia maior nos indivíduos dos grupos M e CI ( $P < 0,05$ ), entretanto, valores aumentados de eosinófilos foram encontrados principalmente nos grupos IP ( $P < 0,001$ ) e UN ( $< 0,001$  comparado com o grupo M e  $P < 0,05$  comparado com o grupo CI). Considerando as variáveis hematológicas e LME, houve semelhança entre os indivíduos com malária (grupos CI e M) e indivíduos sem malária (grupos IP e UN).

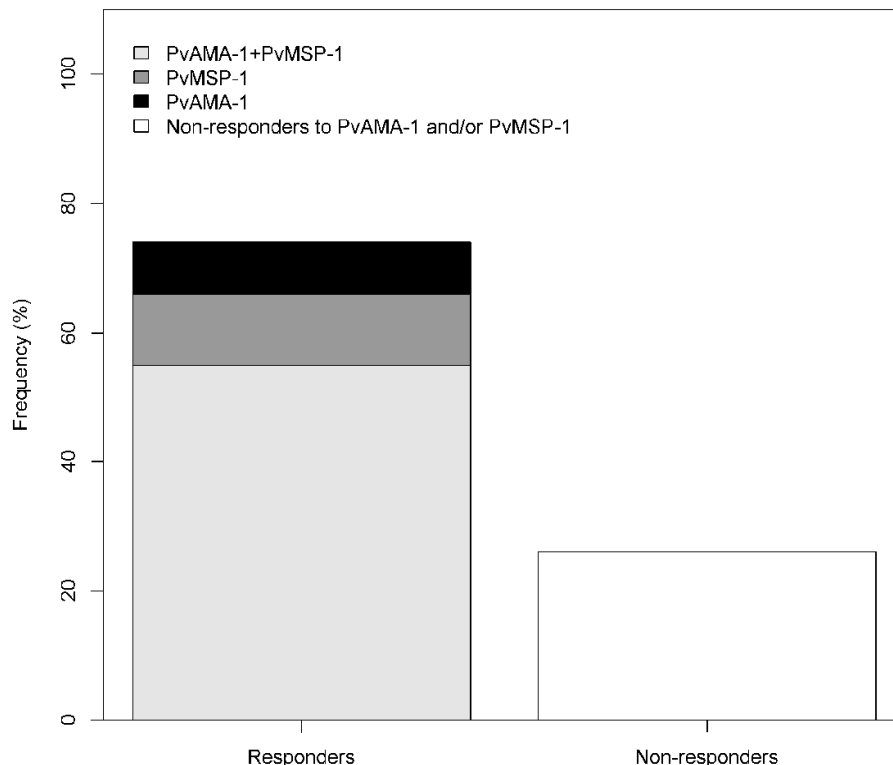
Finalmente, observamos que não houve diferença entre os valores de parasitemia de *Plasmodium* entre os indivíduos só com malária (grupo M) e os indivíduos coinfectados com *Plasmodium*-parasitoses intestinais (grupo CI)

Tabela 5-1. Características da população estudada.

	Malária(+) N=64		Malária(-) N=215	
	M <sup>a</sup> N=16	CI <sup>b</sup> N=48	IP N=98	UN N=117
<b>Gênero (N, %)</b>				
Masculino	11 (69)	34 (71)	49 (50)	55 (47)
Feminino	05 (31)	14 (29)	49 (50)	62 (53)
<b>Idade (anos)</b>	24 (21-33)	31 (22-41)	30 (14-43)	31 (15-39)
<b>Parasitemia (parasitos/<math>\mu</math>L)</b>	2740(738.5-56)	1816(641-57)	(-)	(-)
<b>LME (meses)</b>	6 (0-66)	3 (0-16)	24(6-60)	10.5(1-36)
<b>Anemia (%)</b>	56.2	43.7	<b>28 a*</b>	<b>23 a*b*</b>
<b>Eosinófilos (células/<math>\text{mm}^3</math>)</b>	73(36.75-138.75)	104 (42.5-328.5)	<b>328 (185-72) a***b***</b>	<b>224(146-44) a**b*</b>

**M:** indivíduos infectados só com *Plasmodium*; **CI:** indivíduos coinfectados com *Plasmodium* e parasitos intestinais; **IP:** indivíduos infectados só com parasitos intestinais e **UN:** indivíduos não infectados. **LME:** Tempo desde a última malária. Todos os valores da tabela representam medianas e os percentis (25%-75%). As diferenças entre os grupos foram calculadas a partir de *Pairwise Test for Multiple Comparisons of Mean Rank Sums (Nemenyi-Tests)*. Diferenças de parasitemia entre indivíduos coinfectados e só com malária foram calculados a partir de testes t não-paramétricos de *Wilcoxon-Mann-Whitney*. Diferenças nas frequências de anemia foram calculadas a partir do  $\chi^2$  com correção de Yates. <sup>a</sup> diferenças entre o grupo indicado e o grupo M; <sup>b</sup> diferenças entre o grupo indicado e o grupo CI. Diferenças estatísticas entre parâmetros epidemiológicos e hematológicos foram expressos como \*\*\* P< 0.0001, \*\* P< 0.001, \* P< 0.05

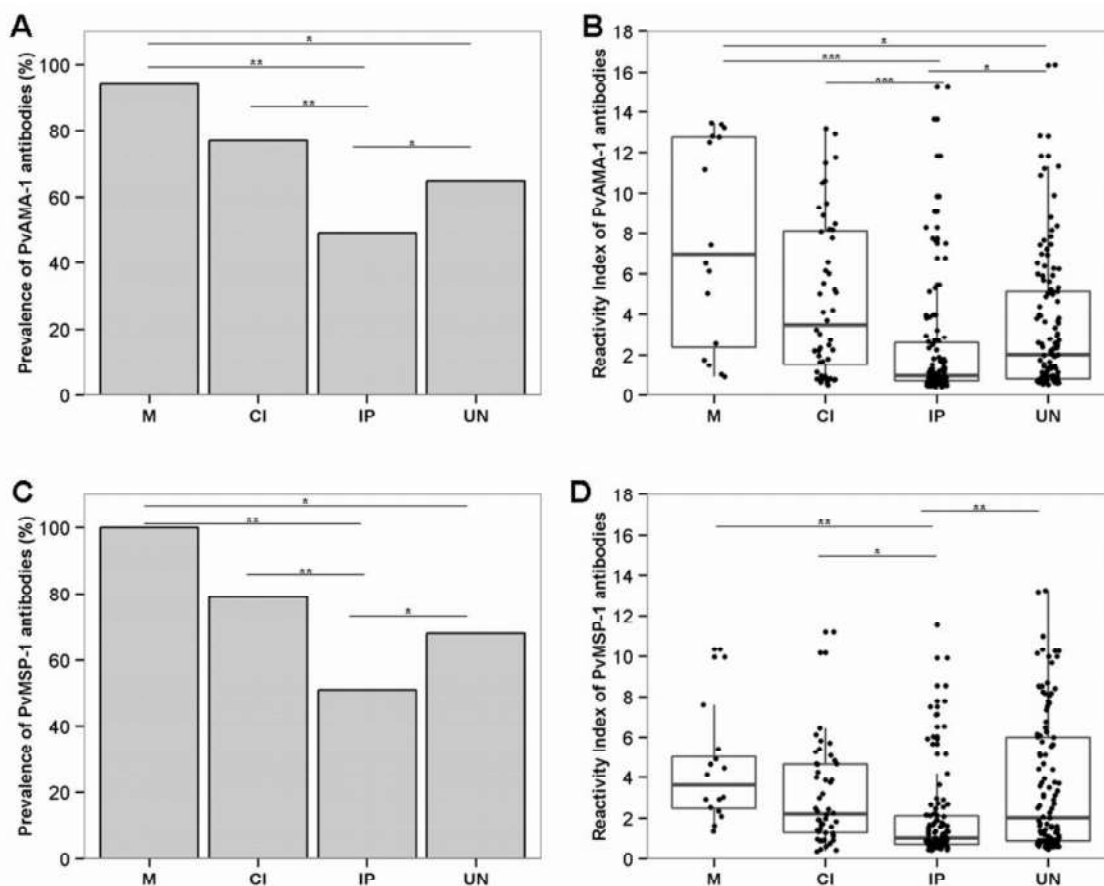
A frequência de indivíduos com resposta naturalmente adquirida de anticorpos IgG contra as proteínas PvAMA-1 e/ou PvMSP-1<sub>19</sub> estão apresentadas na Figura 5-3.



**Figura 5-3. Frequência de anticorpos específicos a PvAMA-1 ou PvMSP-1<sub>19</sub> em indivíduos de área endêmica de malária, determinada por ELISA.** Os indivíduos foram divididos em Respondedores e Não Respondedores às proteínas recombinantes. O eixo Y representa a frequência (%) de indivíduos respondedores PvAMA1+PvMSP-1<sub>19</sub>, PvAMA-1 ou PvMSP-1<sub>19</sub>, e indivíduos não respondedores a PvAMA-1 e/ou PvMSP-1<sub>19</sub>.

Anticorpos contra PvAMA-1 e/ou PvMSP-1 foram detectados na maior parte da população (74% dos participantes do estudo) e 26% dos indivíduos avaliados não apresentaram IgG contra nenhuma das proteínas recombinantes testadas. Por outro lado, a proporção de indivíduos que reconhecem as duas proteínas (55%) foi maior que daqueles que só reconhecem uma proteína (8% PvAMA-1 e 11% PvMSP-1<sub>19</sub>).

Para determinar se a presença de coinfeções estava associada com o desgaste da resposta de IgG, comparamos a frequência da prevalência específica e índices de reatividade de IgG direcionada a PvAMA-1 e PvMSP-1<sub>19</sub> entre os quatro grupos estudados (M, CI, IP, UN) (Figura 5-4).



**Figura 5-4. Soroprevalência de IgG e Índice de Reatividade a PvAMA-1 e PvMSP-1<sub>19</sub>:**

**M:** indivíduos infectados só com *Plasmodium*; **CI:** indivíduos coinfectados com *Plasmodium* e parasitos intestinais; **IP:** indivíduos infectados só com parasitos intestinais e **UN:** indivíduos não infectados com *Plasmodium* ou parasitos intestinais.

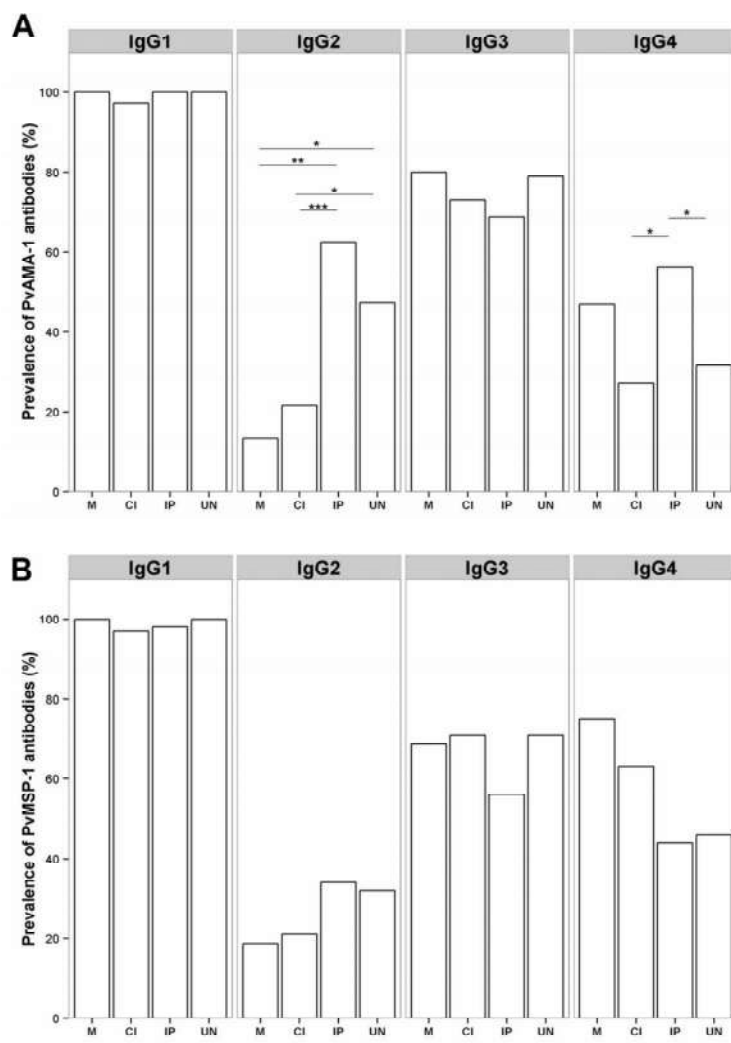
**A.** Soroprevalência de IgG contra PvAMA-1 nos grupos M, CI, IP, UN. **B.** Índice de Reatividade para PvAMA-1 entre os grupos M, CI, IP, UN. **C.** Soroprevalência de IgG contra PvMSP-1<sub>19</sub> nos grupos M, CI, IP, UN. **D.** Índice de Reatividade para PvMSP-1<sub>19</sub> entre os grupos M, CI, IP, UN. Nos painéis B e D a barra horizontal dentro dos *Boxplots* representa a mediana dos valores do índice de reatividade, enquanto cada valor individual é representado como pontos. *Boxplots* estendem-se 1,5x o intervalo interquartil ou o valor mínimo/máximo, quando estes caem dentro 1,5x o intervalo interquartil. Diferenças do índice de reatividade foram calculadas a partir do *Pairwise Test for Multiple Comparisons of Mean Rank Sums (Nemenyi-Tests)*. Diferenças estatísticas encontradas entre os grupos a partir do  $\chi^2$  e Nemenyi Test estão representadas por linhas horizontais com o respectivo P-valor:\*\*\* P< 0.0001, \*\* P< 0.001, \* P< 0.05



A prevalência de IgG específica para as duas proteínas foi semelhante nos quatro grupos estudados, contudo a menor frequência de respondedores foi encontrada no grupo IP. Entre os indivíduos estudados, aqueles com malária (grupos M e CI) apresentaram as maiores prevalências de IgG para as duas proteínas estudadas. Especificamente, o grupo M apresentou a maior frequência de indivíduos respondedores para as duas proteínas estudadas comparado com o grupo IP e UN, enquanto o grupo CI só apresentou frequências maiores comparado com o grupo IP para as duas proteínas (Figura 5-4A e C). Um padrão semelhante ao observado nas prevalências foi detectado nos valores de índice de reatividade. Os valores de índice de reatividade obtidos para PvAMA-1 não foram maiores que para PvMSP-1<sub>19</sub>. No entanto, o RI foi mais baixo no grupo IP comparado com todos os grupos e para as duas proteínas estudadas (Figura 5-4B e D). Da mesma maneira, não observamos diferenças na frequência de respondedores ou no índice de reatividade (RI) entre os grupos M e CI (Figura 5-4A e C).

#### **5.5 Níveis de subclasses de IgG para as proteínas de *P. vivax* AMA-1 e MSP-1<sub>19</sub>.**

Considerando que as subclasses de IgG em resposta a antígenos pode determinar a função daquele anticorpo na resposta imune, estas respostas foram avaliadas em indivíduos respondedores para as proteínas recombinantes PvAMA-1 e PvMSP-1<sub>19</sub>. Entre os indivíduos respondedores para IgG, as subclasses citofílicas IgG1 e IgG3 foram as mais prevalentes em todos os grupos estudados para a proteína PvAMA-1, enquanto para PvMSP-1<sub>19</sub> houve uma alta proporção de respondedores para as subclasses IgG1, IgG3 e IgG4. Analisando os anticorpos não-citofílicos contra PvAMA-1, houve uma alta frequência de respondedores a IgG2 nos indivíduos do grupo IP e UN comparados com os grupos M e CI, enquanto frequências elevadas de IgG4 foram maiores no grupo IP (Figura 5-5A). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na prevalência de anticorpos não-citofílicos específicos para PvMSP-1<sub>19</sub> entre os grupos estudados (Figura 5-5B).

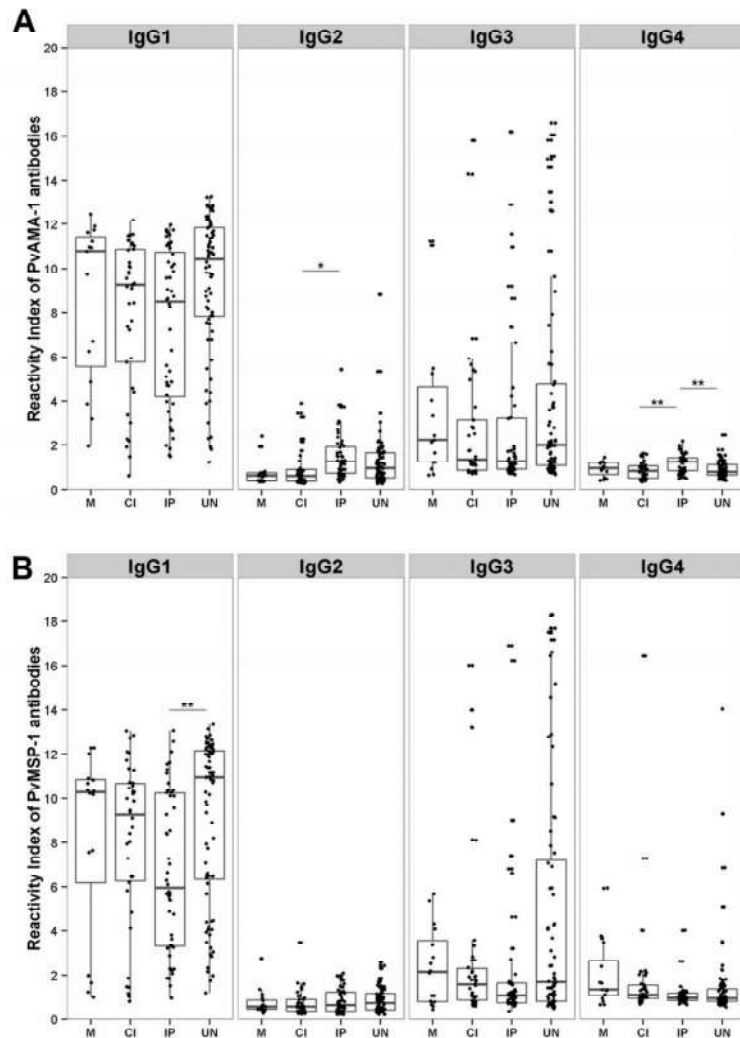


**Figura 5-5. Seroprevalência de IgG para PvAMA-1 e PvMSP-1<sub>19</sub>:**

**M:** indivíduos infectados só com *Plasmodium*; **CI:** indivíduos coinfetados com *Plasmodium* e parasitos intestinais; **IP:** indivíduos infectados só com parasitos intestinais e **UN:** indivíduos não infectados com *Plasmodium* ou parasitos intestinais.

**A.** Seroprevalência de IgG contra PvAMA-1 nos grupos M, CI, IP, UN. **B.** Seroprevalência de IgG contra PvMSP-1<sub>19</sub> nos grupos M, CI, IP, UN. Diferenças estatísticas encontradas entre os grupos a partir do  $\chi^2$  estão representadas por linhas horizontais com o respectivo P-valor:\*\*\* P < 0.0001, \*\* P < 0.001, \* P < 0.05

Índices de Reatividade de anticorpos citofílicos, IgG1 e IgG3, foram detectados e estiveram incrementados para as duas proteínas em todos os grupos estudados (Figura 5-6A e B). Em contraste, as subclasses não-citofílicas IgG2 e IgG4 contra as proteínas PvAMA-1 e PvMSP-1<sub>19</sub> apresentaram valores de IR valores de RI baixos para as duas proteínas. Apesar desse padrão, níveis de RI ligeiramente maiores dessas subclasses não-citofílicas para a proteína PvAMA-1 nos indivíduos do grupo **IP** (Figura 5-6A).



**Figura 5-6. Índice de Reatividade a PvAMA-1 e PvMSP-119:**

**M:** indivíduos infectados só com *Plasmodium*; **CI:** indivíduos coinfetados com *Plasmodium* e parasitos intestinais; **IP:** indivíduos infectados só com parasitos intestinais e **UN:** indivíduos não infectados com *Plasmodium* ou parasitos intestinais.

**A.** Índice de Reatividade para PvAMA-1 entre os grupos M, CI, IP, UN. **B.** Índice de Reatividade para PvMSP-119 entre os grupos M, CI, IP, UN. Nos painéis B e D a barra horizontal dentro dos *Boxplots* representa a mediana dos valores do índice de reatividade, enquanto cada valor individual é representado como pontos. *Boxplots* estendem-se 1,5x o intervalo interquartil ou o valor mínimo/máximo, quando estes caem dentro 1,5x o intervalo interquartil. Diferenças do índice de reatividade foram calculadas a partir do *Pairwise Test for Multiple Comparisons of Mean Rank Sums (Nemenyi-Tests)*. Diferenças estatísticas encontradas entre os grupos a partir do *Nemenyi Test* estão representadas por linhas horizontais com o respectivo P-valor:\*\*\* P< 0.0001, \*\* P< 0.001, \* P< 0,05

## 6 DISCUSSÃO

As coinfeções entre malária e parasitoses intestinais são um fenômeno comum nas áreas tropicais devido à ampla distribuição do parasitismo intestinal, incluindo as regiões endêmicas de malária.

Na última década, as parasitoses intestinais têm sido alvo de muitos estudos devido à ampla distribuição e devido ao efeito (em particular dos helmintos) que podem exercer na resposta imune dos hospedeiros.

Considerando que nas áreas endêmicas de malária no Brasil também há uma alta prevalência de parasitoses intestinais e que os estudos da coinfeção malária-parasitoses intestinais são raros no Brasil (Melo et al. 2010), nos propusemos avaliar a prevalência da coinfeção malária e parasitos intestinais e os efeitos desta interação na resposta imune do hospedeiro em indivíduos residentes em um assentamento em área rural do município de Porto Velho, Rondônia.

Nossos objetivos foram estudar quão frequentes são as coinfeções no assentamento Joana D'Arc. Considerando os indivíduos coinfectados, a nossa hipótese foi que a coinfeção causa alterações nas variáveis hematológicas e de citocinas quando comparados com indivíduos infectados só com *Plasmodium*. Posteriormente nossa hipótese foi que a coinfeção com parasitos intestinais altera a resposta imune humoral a antígenos de *P. vivax* em comparação com indivíduos só com malária.

Demostramos que no assentamento de terra Joana D'Arc, a coinfeção malária e parasitoses intestinais é frequente. A prevalência geral de parasitoses intestinais foi elevada com mais da metade dos indivíduos que participaram do nosso estudo infectado com algum tipo de parasito intestinal. Dez espécies foram detectadas, quatro de protozoários (*G. intestinalis*, *E.coli*, *E. histolytica*, *I. butschlii*) e seis de helmintos (*A. duodenale*, *S. stercoralis*, *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *H. nana*, *H. diminuta*). A taxa de prevalência de protozoários foi maior do que a de helmintos; a espécie de protozoário mais prevalente foi *G. intestinalis* e a de helminto *A. duodenale*. No Brasil, vários levantamentos coproparasitológicos têm mostrado resultados similares aos encontrados. Na região Amazônica, estudos em um assentamento agrícola no Estado do Acre, detectaram prevalências similares de parasitoses intestinais com predominância de *G. intestinalis*. Entretanto, *A. lumbricoides* foi o helminto predominante (Souza et al. 2007). Em outro estudo no município de Barcellos, no Estado do Amazonas, foi detectada uma prevalência alta

de parasitoses intestinais (69,4%) e *A. lumbricoides* foi a espécie mais prevalente (Coura et al. 1994). Em outro estudo realizado em crianças de comunidades ribeirinhas do Rio Solimões, observou-se 83% de prevalência de enteroparasitoses, sendo *A. lumbricoides* a espécie mais comum (Santos et al. 2010).

Prevalências mais altas em alguns estudos podem ser observadas devido à faixa etária dos participantes. Na população de nosso estudo, a maioria dos participantes foi de adultos em contraposição com vários estudos onde o público alvo eram crianças em idade escolar. Mesmo assim, ainda podemos considerar como alta a prevalência de parasitoses intestinais para uma população compostas principalmente por adultos. O baixo nível econômico, as condições ambientais desfavoráveis e a falta de saneamento básico são responsáveis pela alta prevalência das parasitoses intestinais no assentamento estudado.

Da mesma maneira, diferenças na prevalência de algumas espécies de parasitos intestinais podem ter origem variada, podendo ser explicadas, por exemplo, pelo mecanismo de transmissão de cada parasito, onde algumas espécies como *G. intestinalis* e *A. lumbricoides* são frequentemente transmitidas através da água e/ou alimentos, enquanto a *Ancylostoma* depende da transmissão através do contato da pele com as larvas localizadas no solo. Portanto, o contato com o solo pode ser um dos mais importantes mecanismos de transmissão dos geohelmintos entre crianças menores de seis anos de idade, enquanto que acima de seis anos os fatores mais importantes são contaminação da água e falta de higiene, principalmente com os alimentos (Coura et al. 1994; Souza et al. 2007; Santos et al. 2010; Valverde et al. 2011).

Trabalhos que estudam a influência dos parasitos intestinais na resposta imune à malária se concentram somente nos efeitos dos helmintos. Estes estudos são realizados, geralmente, em regiões com alta prevalência de helmintos como *S. mansoni* e *A. lumbricoides* e raramente estudam os efeitos do poliparasitismo com protozoários. No nosso estudo não foi possível analisar separadamente a influência de cada espécie de parasito intestinal na resposta imune. A diversidade de parasitos intestinais não permitiu a formação de grupos com tamanhos amostrais adequados para poder inferir algum tipo de efeito na coinfeção. Da mesma maneira, a baixa frequência de indivíduos infectados com helmintos não permitiu a formação deste grupo e optamos por fazer um grupo único de parasitoses intestinais que incluiu helmintos e protozoários.

Nos indivíduos com malária, *P. vivax* foi a espécie mais prevalente tanto nos indivíduos só com malária (81,2%) quanto no grupo de indivíduos coinfectados com malária e parasitoses intestinais (75%). Estas frequências são similares as registradas no Brasil em 2011, ano em que fizemos o estudo (*P. vivax* - 87% e *P. falciparum* 13%) (SIVEP-Malária Ministério da Saúde 2011; WHO 2012). A malária na população estudada acometeu uma proporção maior de homens do que de mulheres. Este fato pode estar associado com a atividade dos homens, como a caça, pesca ou extração de madeira, que os deixam mais expostos às infecções pelos plasmódios.

Nos indivíduos coinfectados, foi observada uma maior riqueza de espécies de parasitos intestinais nos infectados com *P. vivax*, provavelmente devido à alta prevalência desta espécie plasmodial entre os indivíduos com malária. Neste grupo de indivíduos, *G. intestinalis* foi a espécie mais prevalente.

Vale ressaltar que indivíduos com *P. vivax* apresentaram uma maior frequência de parasitoses intestinais e entre os coinfectados observamos uma diversidade maior de parasitos intestinais. É possível que indivíduos com parasitoses intestinais sejam mais susceptíveis a malária. Alguns estudos epidemiológicos conduzidos na África também mostraram que indivíduos coinfectados com *A. lumbricoides* não só apresentavam um maior risco de infecções por *P. falciparum*, como eram mais propensos a desenvolver formas graves da malária (Nacher et al. 2002; Le Hesran et al. 2004).

Infecções por helmintos podem ter um efeito na resposta imune à malária, devido à indução de uma resposta imune do tipo-2, tornando os hospedeiros mais susceptíveis a infecções pelos plasmódios (Hartgers and Yazdanbakhsh 2006; Jackson et al. 2009). Apesar destas observações, os estudos que avaliam a influência das coinfeções com helmintos na suscetibilidade à malária são contraditórios. Há trabalhos reportando efeitos benéficos (Tshikuka et al. 1996; Nacher et al. 2002; Spiegel et al. 2003; Sokhna et al. 2004), efeitos prejudiciais (Murray et al. 1977; Briand et al. 2005; Lyke et al. 2005), ou não têm nenhum efeito no hospedeiro (Shapiro et al. 2005; Bejon et al. 2008). Exemplos claros desta contradição encontram-se nos trabalhos descrevendo os efeitos de *A. lumbricoides* na coinfeção com *P. falciparum*. Em área endêmica de malária na Tailândia observou-se uma maior incidência de malária e de carga de gametócitos de *P. falciparum* nos indivíduos coinfectados com parasitoses intestinais (Nacher et al. 2001b, 2002). Já em outro trabalho a coinfeção entre estes mesmos parasitos

esteve associada à proteção contra a malária cerebral, complicações renais e icterícia devido à malária (Nacher et al. 2000, 2001a).

Não observamos nenhuma diferença na carga parasitária dos plasmódios entre os indivíduos só com malária ou coinfectados com parasitoses intestinais. Desafortunadamente, devido às condições em campo, não conseguimos avaliar a intensidade de infecção das parasitoses intestinais para determinar se havia algum tipo de correlação entre as cargas parasitárias dos plasmódios e a dos parasitos intestinais.

Mais recentemente foi mostrado que a infecção por *S. haematobium* exerce um papel protetor nas infecções contra *P. falciparum*. Crianças coinfectadas que apresentavam baixas cargas de ovos de *S. haematobium* também apresentaram baixas parasitemias de *P. falciparum* quando comparadas com as crianças não infectadas por *S. haematobium* (Lemaitre et al. 2014). Um estudo na Etiópia mostrou uma correlação positiva entre as ancilostomíases e a parasitemia de *P. falciparum*, e negativa entre *A. lumbricoides* e *P. falciparum* (Getachew et al. 2013).

Nos estudos de coinfeções malária e helmintos as alterações hematológicas importantes têm sido detectadas em estudos em crianças que são mais susceptíveis a parasitoses intestinais e a malária grave. A espécie plasmodial (*P. falciparum*), a coinfeção com helminto e a idade da população parece ter influência nas alterações hematológicas (Pullan and Brooker 2008; Melo et al. 2010). Em nosso estudo, além de que a maior parte dos indivíduos estudados serem adultos, nenhum indivíduo apresentou malária grave e as infecções intestinais mais frequentes foram por protozoários.

A influência de parasitos intestinais (principalmente helmintos) nas coinfeções com *Plasmodium* tem despertado interesse dos malariologistas devido à hipótese de que a resposta do tipo Th2 induzida pelos helmintos poderia alterar a resposta imune natural dos hospedeiros aos plasmódios (Nacher et al. 2000, 2002; Maizels et al. 2004). Entretanto, grande parte dos estudos associam o perfil de citocinas com a imunopatologia da malária complicada ou grave (Kern et al. 1989; Day et al. 1999), e poucos estudos exploram a influência da coinfeção com parasitos intestinais na resposta imune a malária (Remoue et al. 2003; Diallo et al. 2004; Lyke et al. 2006; Imai et al. 2011).

O nosso trabalho (Trabalho 1 - Sánchez-Arcila et al. 2014), é o primeiro estudo no Brasil que avalia o efeito da coinfeção malária-parasitoses intestinais sobre o perfil de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, fatores de crescimento,

quimiocinas, CRP e NO em grupos de indivíduos infectados com malária (M), com parasitoses intestinais (IP), coinfectados com malária e parasitoses intestinais (CI) e sem nenhuma das duas (UN). A análise individual dos níveis das citocinas, quimiocinas e marcadores inflamatórios nos grupos estudados revelou uma grande variação nas concentrações séricas e não observamos diferenças nas concentrações médias destes mediadores associadas à coinfeção.

Alguns trabalhos contendo grupos complexos de dados como os nossos (que incluem a avaliação de muitas variáveis simultaneamente) têm utilizado metodologias de análise multivariada como a análise de componentes principais PCA e análise de classificação (*cluster analysis*). O PCA é uma técnica da estatística multivariada que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais. A análise de cluster é uma ferramenta de análise exploratória que permite revelar a existência ou não de relações entre as variáveis medidas e de relações ou agrupamentos entre amostras (Roy et al. 2009; Yan et al. 2011; Gonçalves et al. 2012; Rao et al. 2014). Um dos poucos exemplos desta aplicação na malária está no trabalho de Prakash et al. (2006), onde técnicas de cluster foram utilizadas para detectar diferenças de citocinas plasmáticas entre indivíduos com malária aguda, grave e malária cerebral.

No nosso estudo utilizamos a análise de componentes principais (PCA) e análises de *cluster* para avaliar as alterações nos níveis das citocinas e dos marcadores inflamatórios nos grupos estudados. Estas técnicas permitiram diferenciar os grupos de indivíduos com malária (grupos M e CI) dos grupos de indivíduos sem malária (grupos IP e UN) baseados no perfil dos mediadores de inflamação. Os grupos de indivíduos com malária (grupo M e CI) apresentaram um perfil com altos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e CRP e baixos níveis de IL-17, enquanto os grupos sem malária (IP e UN) apresentaram altos níveis de IL-17A e NO e baixos níveis de IL-10 e CRP. .

Os nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que revelaram que a citocina IL-10 e a CRP são marcadores importantes de malária aguda causada por *P. vivax* e são encontrados em elevados níveis nas populações brasileiras (Gonçalves et al. 2012; Lima-Junior et al. 2012; Rodrigues-da-Silva et al. 2014). A PCA mostrou claramente que os altos níveis de IL-10 e CRP servem como marcadores na discriminação dos indivíduos infectados com *Plasmodium*. Contudo, indivíduos infectados com parasitoses intestinais se caracterizam por apresentarem



níveis baixos destes marcadores.

O papel da produção de citocinas na malária aguda está longe de ser entendido e pouco se conhece sobre seu efeito na coinfeção com outros parasitos. No nosso estudo, os níveis de citocinas no grupo com malária aguda não foram diferentes dos coinfectados com parasitoses intestinais. Entretanto, alguns trabalhos encontraram níveis alterados de citocinas em indivíduos coinfectados com *P. falciparum* e *S. haematobium*. Níveis elevados de IFN- $\gamma$  e níveis similares de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  e IL-10 foram observados em indivíduos coinfectados quando comparados com indivíduos só com *P. falciparum* (Remoue et al. 2003). O aumento de IFN- $\gamma$  foi associado ao controle dos plasmódios, enquanto que o aumento de IL-10 foi associado a proteção contra os sinais clínicos. Em contraste, altos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  foram detectados na mesma população em adultos coinfectados com *P. falciparum* e *S. haematobium*. Os níveis aumentados de IFN- $\gamma$  foram associados com um aumento dos sinais clínicos da malária e o aumento do conjunto de citocinas, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ , TNFR1 e TNFR2 foram associados a proteção contra os plasmódios (Diallo et al. 2004). Em crianças, níveis elevados de IL6 e IL10, normalmente associados com malária aguda, estiveram diminuídos nas coinfectadas com *P. falciparum* e *S. haematobium* e esta diminuição foi associada a uma redução nos sinais clínicos associados à malária (Lyke et al. 2006).

Observamos que embora IFN- $\gamma$  estivesse aumentada nos indivíduos com malária, não houve diferença entre indivíduos com malária e infectados com parasitoses intestinais.

É importante ressaltar que usando a PCA observamos a importância da IL-17A para separar os grupos M e CI dos grupos IP e UM, embora IL-17A parece se apresentar mais elevada no grupo IP. A IL-17A é um marcador importante de inflamação intestinal, que contribui para incrementar a resposta inata na superfície das mucosas intestinais (Cua and Tato 2010; Rubino et al. 2012) e os altos níveis desta citocinas no grupo IP (só com parasitos intestinais) sinaliza que esta citocina pode ser um interessante marcador de infecções por parasitos intestinais. Outro dado interessante foram os baixos níveis de NO nos grupos com malária (M e CI). O papel do óxido nítrico na malária por *P. falciparum* tem sido discordante. Alguns autores propõem que NO contribui para o desenvolvimento de malária grave enquanto outros argumentam que tem um papel protetor (Cabrales et al. 2011; Martins et al. 2012). No nosso trabalho observamos baixos níveis de NO nos indivíduos com malária (grupos CI e M) e como não tem nenhum caso de malária

grave nestes grupos e a maioria é causada pelo *P. vivax*, os baixos níveis de NO podem representar o uso desta molécula no mecanismo de controle dos plasmódios exercendo um efeito protetor contra malária grave.

Apesar do grande número de marcadores inflamatórios avaliados, o uso de técnicas de análise multivariada provou ser uma excelente ferramenta para verificar padrões dentro de uma grande quantidade de marcadores inflamatórios utilizados. Este tipo de técnica permitiu detectar diferenças entre o grupo de indivíduos com e sem malária. Contudo, em nossas análises não foi possível discriminar dentre os grupos com malária, os só com malária (M) daqueles coinfectados com malária e parasitoses intestinais (CI). Portanto, é possível que a coinfecção por parasitos intestinais (principalmente protozoários) não influencie nos níveis de citocinas de indivíduos com malária aguda. Provavelmente a influência real dessas coinfecções possa ser percebida somente em regiões de alta endemicidade para parasitos como *A. lumbricoides*, *S. mansoni* e *S. haematobium*. De fato, a contribuição da coinfecção com parasitos intestinais na patogenia da malária ainda é controversa, e seu papel específico depende, provavelmente, das espécies parasitárias envolvidas, assim como de fatores genéticos associados aos parasitos e aos hospedeiros.

Uma outra questão que vem sendo abordada na coinfecção malária e parasitoses intestinais são os efeitos das coinfecções na resposta imune específica ao plasmódio e a candidatos vacinais (Nacher 2001; Druilhe et al. 2005; Supali et al. 2010). Como nosso grupo tem caracterizado a resposta imune a vários antígenos de *P. vivax* candidatos a compor uma vacina antimalárica em áreas endêmicas brasileiras nos propomos no Trabalho 2 a avaliar a influência da coinfecção malária com parasitoses intestinais na resposta imune às proteínas de superfície de merozoítos de *P. vivax* AMA-1 e MSP-1 nos mesmos grupos do Trabalho 1.

Embora alguns estudos tenham explorado a influência da coinfecção malária e helminto na produção de anticorpos dirigidos para o *P. falciparum* (Mutapi et al. 2007; Diallo et al. 2010; Courtin et al. 2011; Esen et al. 2012), o nosso trabalho é o primeiro que avalia os efeitos da coinfecção na resposta imune humoral ao *P. vivax*.

Nossos resultados mostraram que 73,8% dos indivíduos apresentaram anticorpos pelo menos para uma das proteínas estudadas (PvAMA-1 ou PvMSP-1<sub>19</sub>) indicando que estas proteínas são imunogênicas. Estas frequências são comparáveis às observadas em outros estudos em populações da região Amazônica (Soares et al. 1999; Rodrigues et al. 2005; Morais et al. 2006; Barbedo et al. 2007).

Nos grupos estudados as prevalências de anticorpos e os níveis (RI) de IgG para as duas proteínas foram mais altos nos indivíduos com malária (grupos M e CI) quase 100% nos indivíduos só com Malária (M). Isto confirma que PvAMA-1 e PvMSP-1<sub>19</sub> são moléculas imunogênicas durante a infecção natural de malária e que a presença de parasitoses intestinais parece não interferir na resposta humoral a estes antígenos. Por outro lado, o grupo de indivíduos infectados apenas com parasitos intestinais apresentou uma prevalência reduzida de IgG e menores IR para as duas proteínas, inclusive quando comparado com o grupo não infectado. Resultado semelhante foi encontrado em crianças gabonenses infectadas com o helminto *Trichuris trichiura* que quando vacinadas com o antígeno candidato vacinal GMZ2 apresentaram menores níveis de anticorpos contra este antígeno quando comparadas as crianças vacinadas não-portadoras deste helminto antígeno (Esen et al. 2012). Entretanto neste mesmo estudo verificou-se que a diferença de *T. trichiura*, *A. lumbricoides* não alterou a resposta humoral à vacina (Esen et al. 2012).

Outros trabalhos mostraram níveis reduzidos de IgG contra antígenos de *P. falciparum* em indivíduos coinfectados com *P. falciparum*-helmintos (Diallo et al. 2010; Courtin et al. 2011). Apesar de também detectarmos níveis de anticorpos reduzidos, os nossos resultados não podem ser comparados com estes estudos, visto que as infecções por helmintos corresponderam a apenas 19,7% do grupo coinfectados (CI) e 29,6% do grupo só com parasitoses intestinais (IP). A prevalência de 30% de helmintos no grupo IP não parece ser responsável pela prevalência e IR reduzidos de anticorpos específicos para as proteínas de *P. vivax*. Além disso, a prevalência de anticorpos no grupo coinfectados não diminuiu e foi similar ao grupo só com malária.

Não consideramos estes dados contraditórios devido à grande diversidade de parasitos intestinais encontrados na nossa população e o tamanho amostral que não nos permitiu fazer estratificações, como por exemplo um grupo com *G. intestinalis* que foi o protozoário mais frequente, para explorar o efeito das espécies de protozoários na infecção malárica. Estudos de coinfeção malária e protozoários são escassos e não se sabe o efeito dos protozoários na coinfeção com plasmódios. Foi sugerido que infecções crônicas por protozoários parecem estar associadas com uma resposta imune do tipo Th1 (Ebert 1999).

A análise da resposta de subclasses às proteínas PvAMA-1 e Pv-MSP1<sub>19</sub> também foi avaliada, uma vez que as subclasses IgG1 e IgG3 específicas para antígenos plasmodiais estão associadas aos anticorpos protetores.

Os nossos dados confirmam dados anteriores que mostraram que as subclasses IgG1 e IgG3 específicas para PvAMA-1 e PvMSP-1 predominaram em todos os grupos (Soares et al. 1999; Morais et al. 2006; Fernandez-Becerra et al. 2010). Os anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 foram predominantes em todos os grupos estudados. Portanto, a presença de parasitos intestinais nos indivíduos com malária não parece alterar na resposta de anticorpos citofílicos e não citofílicos específicas para PvAMA-1 e PvMSP-1. O aumento da prevalência e RI das subclasses IgG2 e IgG4 específicas para PvAMA-1 no grupo de indivíduos com parasitoses intestinais (IP) não parece dever-se aos parasitos intestinais visto que, a frequência de IgG2 também se encontrou aumentada no grupo exposto (UN), sem parasitos intestinais.

Estudos investigando as coinfeções malária-helminto mostraram uma redução nos níveis de IgG1 e IgG3 à proteína MSP1 e um incremento de IgG4 contra MSP3 em indivíduos infectados com *A. lumbricoides*, *S. stercoralis*, *T. trichiura* e *H. nana* (Roussillon et al. 2010). Do mesmo modo, em indivíduos coinfectados com *S. haematobium* e *P. falciparum* foi observada uma redução de anticorpos citofílicos contra GLURP, MSP-3, AMA-1, MSP-1 e MSP-2, além de ter sido encontrada uma associação negativa entre a infecção por *Schistosoma* e IgG1 e IgG3 direcionadas contra extratos totais de *P. falciparum* (Courtin et al. 2011). Em contraste, foi observado um aumento em IgG1 contra MSP1 assim como de IgG1 e IgG3 contra extrato total de *P. falciparum* em indivíduos coinfectados com *S. haematobium* (Diallo et al. 2010)

Os resultados mostram que a coinfeção de malária com parasitos intestinais, principalmente com protozoários, não causam alterações no padrão de produção de citocinas, quimiocinas e marcadores inflamatórios. Entretanto, a PCA mostrou claramente que os altos níveis de IL-10 e CRP servem como marcadores na discriminação dos indivíduos com malária (M e CI) dos sem malária (IP e UM) e também observamos a importância do aumento da IL-17A nos grupos IP e UM, embora IL-17A parece se apresentar mais elevada no grupo IP. A coinfeção malária e parasitoses intestinais também não altera o padrão de produção de subclasses específicas para as proteínas PvAMA-1 e Pv-MSP-1<sub>19</sub>. Portanto, concluímos que as mudanças no perfil hematológico e de citocinas e de resposta de anticorpos parecem estar fortemente governadas pela infecção com o *Plasmodium*.

Ainda assim, considerando a variabilidade de parasitoses intestinais nas áreas endêmicas de malária e especificamente de algumas espécies de

protozoários, é evidente a necessidade da realização de novos estudos que avaliem a influência real das infecções por protozoários intestinais nas coinfeções com *Plasmodium*, não só no Brasil, mas em todas as regiões que possuam uma alta prevalência destes organismos.

## 7 CONCLUSÕES

1. A coinfeção com parasitos intestinais foi encontrada em 75% dos indivíduos infectados com malária confirmando a nossa hipótese de que as coinfeções malária-parasitos intestinais são frequentes na área de estudo.
2. Contrário a nossa hipótese, a coinfeção com parasitos intestinais (principalmente protozoários) não alterou os parâmetros hematológicos, parasitemia ou níveis de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios comparando os indivíduos do grupo **CI** com os do grupo **M** na população estudada. Contudo a mudança no perfil hematológico e de citocinas parece estar fortemente governado pela infecção com *Plasmodium*.
3. A análise multivariada mostrou-se uma ferramenta efetiva para a análise de dados complexos, revelando padrões gerais na resposta de citocinas, quimiocinas e marcadores inflamatórios.
4. Ao contrário da nossa hipótese inicial, não houve diferença de produção de IgG e subclasses de IgG específicas para as proteínas PvAMA-1 e PvMSP-1<sub>19</sub> comparando indivíduos do grupo **CI** (coinfectados principalmente com protozoários) com indivíduos do grupo **M** na população estudada. Porém, a produção de anticorpos parece estar forte influenciada pela infecção com *Plasmodium* ou com parasitos intestinais.
5. Indivíduos do grupo **IP** apresentaram menor frequência de indivíduos respondedores e índices de reatividade reduzidos de IgG específicas para as proteínas PvAMA-1 e PvMSP-1<sub>19</sub>.
6. A presença de resposta de anticorpos para PvAMA-1 e PvMSP-1<sub>19</sub> em todos os grupos estudados confirma a premissa de que a maioria dos indivíduos têm sido expostos à malária. Adicionalmente, as repostas de IgG e subclasses estão de acordo com estudos realizados em áreas endêmicas de malária no Brasil.
7. Nos indivíduos estudados, a mudança no perfil hematológico e de citocinas e de resposta de anticorpos parece estar fortemente governado pela infecção com *Plasmodium*.
8. São necessárias mais investigações para determinar a influência dos protozoários intestinais na resposta imune à malária.

## 8 PERSPECTIVAS

- Avaliar a alteração dos níveis de IgE e IgG contra antígenos de *Ancylostoma*, *A. lumbricoides*, *Strongyloides* e *G. intestinalis* associada à coinfeção
- Verificar se existe reação cruzada da produção de anticorpos entre antígenos plasmodiais e dos parasitos intestinais mais prevalentes na população
- Determinar a especificidade da redução de IgG nos indivíduos com parasitoses intestinais.
- Realizar outros tipos de análise multivariada (*networks*, árvores de classificação) integrando outros tipos de dados (alelos de HLA de classe I e II) com o objetivo de descobrir variáveis alterados associados à malária ou às coinfeções
- Estudar as alterações das populações de linfócitos de memória (memória central e memória efetora) associados à malária
- Verificar as populações de células multifuncionais (e relação à produção de citocinas) expandidas em resposta a peptídeos sintéticos representando regiões antigênicas das proteínas de *P. vivax* CS, MSP-1 e MSP-9 (Experimentos em andamento)

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abanyie FA, McCracken C, Kirwan P, Molloy SF, Asaolu SO, Holland CV, et al. *Ascaris* co-infection does not alter malaria-induced anaemia in a cohort of Nigerian preschool children. *Malar J.* 2013 Jan 2;12(1):1.
- Abbas AKM, PhD AHLM, PhD SPM. *Cellular and Molecular Immunology*, 8e. Edición: 8. Philadelphia, PA: Saunders; 2014.
- Águas R, White LJ, Snow RW, Gomes MGM. Prospects for Malaria Eradication in Sub-Saharan Africa. *PLoS ONE.* 2008 Mar 12;3(3):e1767.
- Akanmori BD, Kawai S, Suzuki M. Recombinant mouse IL-6 boosts specific serum anti-plasmodial IgG subtype titres and suppresses parasitaemia in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. *Parasite Immunol.* 1996 Apr;18(4):193–9.
- Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med.* 2006 Feb;12(2):220–4.
- Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LMA, Barral A, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J.* 2010;9:13.
- Andrade BB, Santos CJN, Camargo LM, Souza-Neto SM, Reis-Filho A, Clarêncio J, et al. Hepatitis B Infection Is Associated with Asymptomatic Malaria in the Brazilian Amazon. *PLoS ONE.* 2011 May 18;6(5):e19841.
- Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol.* 2007 Dec;7(12):975–87.
- Araujo CF, Fernández CL. Prevalence of intestinal parasitosis in the city of Eirunepé, Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005 Feb;38(1):69–69.
- Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol.* 2003 Aug;133(2):145–52.
- Ayimba E, Hegewald J, Ségbéna AY, Gantin RG, Lechner CJ, Agossou A, et al. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol.* 2011 Nov;166(2):218–26.
- Baer K, Klotz C, Kappe SHI, Schnieder T, Frevert U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog.* 2007 Nov;3(11):e171.
- Barbedo MB, Ricci R, Jimenez MCS, Cunha MG, Yazdani SS, Chitnis CE, et al. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Jun;102(3):335–40.



- Bastos FI, Barcellos C, Lowndes CM, Friedman SR. Co-infection with malaria and HIV in injecting drug users in Brazil: a new challenge to public health? *Addict Abingdon Engl*. 1999 Aug;94(8):1165–74.
- Bazaz-Malik G. Increased resistance to malaria after Mycobacterium tuberculosis infection. *Indian J Med Res*. 1973 Jul;61(7):1014–24.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL. *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. John Wiley & Sons; 2009.
- Bejon P, Mwangi TW, Lowe B, Peshu N, Hill AVS, Marsh K. Helminth infection and eosinophilia and the risk of Plasmodium falciparum malaria in 1- to 6-year-old children in a malaria endemic area. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(1):e164.
- Belnoue E, Costa FTM, Frankenberg T, Vigário AM, Voza T, Leroy N, et al. Protective T Cell Immunity against Malaria Liver Stage after Vaccination with Live Sporozoites under Chloroquine Treatment. *J Immunol*. 2004 Feb 15;172(4):2487–95.
- Berg A, Patel S, Gonca M, David C, Otterdal K, Ueland T, et al. Cytokine Network in Adults with Falciparum Malaria and HIV-1: Increased IL-8 and IP-10 Levels Are Associated with Disease Severity. *PLoS ONE [Internet]*. 2014 Dec 11 [cited 2015 Jun 18];9(12). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4263737/>
- Berretta F, St-Pierre J, Piccirillo CA, Stevenson MM. IL-2 contributes to maintaining a balance between CD4+Foxp3+ regulatory T cells and effector CD4+ T cells required for immune control of blood-stage malaria infection. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2011 Apr 15;186(8):4862–71.
- Boef AGC, May L, van Bodegom D, van Lieshout L, Verweij JJ, Maier AB, et al. Parasitic infections and immune function: Effect of helminth infections in a malaria endemic area. *Immunobiology*. 2012 Aug 20;
- Boia MN, da Motta LP, Salazar M do SP, Mutis MPS, Coutinho RBA, Coura JR. Estudo das parasitoses intestinais e da infecção chagásica no Município de Novo Airão, Estado do Amazonas, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 1999;15:497–504.
- Braga WSM, Brasil LM, Souza RAB de, Melo MS de, Rosas MDG, Castilho M da C, et al. Prevalência da infecção pelos vírus da hepatite B (VHB) e da hepatite Delta (VHD) em Lábrea, Rio Purus, Estado do Amazonas. *Epidemiol E Serviços Saúde*. 2004 Mar;13(1):35–46.
- Braga WSM, Souza RAB de, da Silva EB, da Fonseca JCF, Tosta CE. Coinfection between hepatitis B virus and malaria: clinical, serologic and immunologic aspects. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 Feb;39(1):27–31.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos [Internet]. 2009 [cited 2015 Aug 12]. Available from: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_diagnostico\\_laboratorial\\_malaria\\_2ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_laboratorial_malaria_2ed.pdf)

- Briand V, Watier L, LE Hesran J-Y, Garcia A, Cot M. Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: protective effect of schistosomiasis on malaria in senegalese children? *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Jun;72(6):702–7.
- Cabantous S, Poudiougou B, Oumar AA, Traore A, Barry A, Vitte J, et al. Genetic evidence for the aggravation of *Plasmodium falciparum* malaria by interleukin 4. *J Infect Dis.* 2009 Nov 15;200(10):1530–9.
- Cabrales P, Zanini GM, Meays D, Frangos JA, Carvalho LJM. Nitric Oxide Protection Against Murine Cerebral Malaria Is Associated With Improved Cerebral Microcirculatory Physiology. *J Infect Dis.* 2011 May 15;203(10):1454–63.
- Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Rossi S, Montecchini S, Dell’Anna ML, et al. Accurate identification of the six human *Plasmodium* spp. causing imported malaria, including *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium knowlesi*. *Malar J.* 2013 Sep 13;12(1):321.
- Carne B, Matheus S, Donutil G, Raulin O, Nacher M, Morvan J. Concurrent Dengue and Malaria in Cayenne Hospital, French Guiana. *Emerg Infect Dis.* 2009 Apr;15(4):668–71.
- Carvalho LH, Sano G-I, Hafalla JCR, Morrot A, Curotto de Lafaille MA, Zavala F. IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages. *Nat Med.* 2002 Feb;8(2):166–70.
- Chaisavaneeyakorn S, Moore JM, Mirel L, Othoro C, Otieno J, Chaiyaroj SC, et al. Levels of macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta in intervillous blood plasma samples from women with placental malaria and human immunodeficiency virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jul;10(4):631–6.
- Chakravorty SJ, Carret C, Nash GB, Ivens A, Szeszak T, Craig AG. Altered phenotype and gene transcription in endothelial cells, induced by *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells: Pathogenic or protective? *Int J Parasitol.* 2007 Jul;37(8-9):975–87.
- Chandramohan D, Greenwood BM. Is there an interaction between human immunodeficiency virus and *Plasmodium falciparum*? *Int J Epidemiol.* 1998 Apr;27(2):296–301.
- Chiwakata CB, Hemmer CJ, Dietrich M. High Levels of Inducible Nitric Oxide Synthase mRNA Are Associated with Increased Monocyte Counts in Blood and Have a Beneficial Role in *Plasmodium falciparum* Malaria. *Infect Immun.* 2000 Jan 1;68(1):394–9.
- Clark IA, Allison AC, Cox FE. Protection of mice against *Babesia* and *Plasmodium* with BCG. *Nature.* 1976 Jan 29;259(5541):309–11.
- Clark IA, Cowden WB, Butcher GA, Hunt NH. Possible roles of tumor necrosis factor in the pathology of malaria. *Am J Pathol.* 1987 Oct;129(1):192–9.

- Clark IA, Yaman FM al-, Cowden WB, Rockett KA. Does malarial tolerance, through nitric oxide, explain the low incidence of autoimmune disease in tropical Africa? *Lancet*. 1996 Nov 30;348(9040):1492–4.
- Coelho HCC, Lopes SCP, Pimentel JPD, Nogueira PA, Costa FTM, Siqueira AM, et al. Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* Malaria Is Related to Platelets Phagocytosis. *PLoS One*. 2013;8(5):e63410.
- Cohen C, Karstaedt A, Frean J, Thomas J, Govender N, Prentice E, et al. Increased prevalence of severe malaria in HIV-infected adults in South Africa. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2005 Dec 1;41(11):1631–7.
- Coleman RE, Edman JD, Semprevivo LH. *Leishmania mexicana*: effect of concomitant malaria on cutaneous leishmaniasis. Development of lesions in a *Leishmania*-susceptible (BALB/c) strain of mouse. *Exp Parasitol*. 1988 Apr;65(2):269–76.
- Consoli RAGB, Oliveira RL de. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. SciELO - Editora FIOCRUZ; 1994.
- Coura JR, Willcox HPF, Tavares A de M, Paiva DD de, Fernandes O, Rada ÉLJC, et al. Aspectos epidemiológicos, sociais e sanitários de uma área no Rio Negro, estado do Amazonas, com especial referência às parasitoses intestinais e à infecção chagásica. *Cad Saúde Pública*. 1994;10:S327–36.
- Courtin D, Djilali-Saiah A, Milet J, Soulard V, Gaye O, Migot-Nabias F, et al. *Schistosoma haematobium* infection affects *Plasmodium falciparum*-specific IgG responses associated with protection against malaria. *Parasite Immunol*. 2011 Feb;33:124–31.
- Couto RD, Latorre M do RD de O, Santi D, Maria S, Natal D. Autochthonous malaria notified in the State of São Paulo: clinical and epidemiological characteristics from 1980 to 2007. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Feb;43(1):52–8.
- Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):755–66.
- Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):479–89.
- Cuadros DF, Branscum AJ, Crowley PH. HIV–malaria co-infection: effects of malaria on the prevalence of HIV in East sub-Saharan Africa. *Int J Epidemiol*. 2011 Aug 1;40(4):931–9.
- Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TT, et al. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis*. 1999 Oct;180(4):1288–97.
- Dembic Zlatko. *The Cytokines of the Immune System: The Role of Cytokines in Disease Related to Immune Response*. 1 edition. Boston, MA: Academic Press; 2015.
- Diallo TO, Remoue F, Gaayeb L, Schacht A-M, Charrier N, De Clerck D, et al. Schistosomiasis Coinfection in Children Influences Acquired Immune

- Response against *Plasmodium falciparum* Malaria Antigens. PLoS ONE. 2010 Sep 15;5(9):e12764.
- Diallo TO, Remoue F, Schacht AM, Charrier N, Dompnier J-P, Pillet S, et al. Schistosomiasis co-infection in humans influences inflammatory markers in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasite Immunol.* 2004 Sep;26(8-9):365–9.
- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519–50.
- Doodoo D, Omer FM, Todd J, Akanmori BD, Koram KA, Riley EM. Absolute Levels and Ratios of Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokine Production In Vitro Predict Clinical Immunity to *Plasmodium falciparum* Malaria. *J Infect Dis.* 2002 Apr 1;185(7):971–9.
- Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):13–36, Table of Contents.
- Doolan DL, Hoffman SL. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1999 Jul 15;163(2):884–92.
- Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T Cell Dynamics in Hiv-1 Infection\*. *Annu Rev Immunol.* 2003;21(1):265–304.
- Druilhe P, Pérignon JL. A hypothesis about the chronicity of malaria infection. *Parasitol Today Pers Ed.* 1997 Sep;13(9):353–7.
- Druilhe P, Pérignon J-L. The Role of Variant-specific Immunity in Asymptomatic Malaria Infections: Maintaining a Fine Balance—Reply. *Parasitol Today.* 1998 Jan 5;14(5):208.
- Druilhe P, Tall A, Sokhna C. Worms can worsen malaria: towards a new means to roll back malaria? *Trends Parasitol.* 2005 Aug;21(8):359–62.
- Ebert EC. *Giardia* induces proliferation and interferon gamma production by intestinal lymphocytes. *Gut.* 1999 Mar;44(3):342–6.
- Egima CM, Macedo SF, Sasso GR, Covarrubias C, Cortez M, Maeda FY, et al. Co-infection with *Trypanosoma cruzi* protects mice against early death by neurological or pulmonary disorders induced by *Plasmodium berghei* ANKA. *Malar J.* 2007;6:90.
- Eiras ÁE. Culicidae. *Parasitol Humana. Medicina e Saúde* edition. ATHENEU RIO; 2011.
- Epelboin L, Hanf M, Dussart P, Ouar-Epelboin S, Djossou F, Nacher M, et al. Is dengue and malaria co-infection more severe than single infections? A retrospective matched-pair study in French Guiana. *Malar J.* 2012 May 1;11:142.
- Esen M, Mordmüller B, de Salazar PM, Adegnika AA, Agnandji ST, Schaumburg F, et al. Reduced antibody responses against *Plasmodium falciparum* vaccine

- candidate antigens in the presence of *Trichuris trichiura*. *Vaccine*. 2012 Dec 14;30(52):7621–4.
- Fernandes AAM, Carvalho LJ de M, Zanini GM, Ventura AMR da S, Souza JM, Cotias PM, et al. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. *Clin Vaccine Immunol* CVI. 2008 Apr;15(4):650–8.
- Fernandez-Becerra C, Sanz S, Brucet M, Stanisic DI, Alves FP, Camargo EP, et al. Naturally-acquired humoral immune responses against the N- and C-termini of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay. *Malar J*. 2010 Jan 21;9(1):29.
- Ferreira A, Schofield L, Enea V, Schellekens H, van der Meide P, Collins WE, et al. Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon. *Science*. 1986 May 16;232(4752):881–4.
- Francischetti IMB, Seydel KB, Monteiro RQ. Blood Coagulation, Inflammation, and Malaria. *Microcirculation*. 2008 Feb 1;15(2):81–107.
- Frevert U, Usynin I, Baer K, Klotz C. Nomadic or sessile: can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cell Microbiol*. 2006 Oct;8(10):1537–46.
- Getachew M, Tafess K, Zeynudin A, Yewhalaw D. Prevalence Soil Transmitted Helminthiasis and malaria co-infection among pregnant women and associated risk factors in Gilgel Gibe dam Area, Southwest Ethiopia. *BMC Res Notes*. 2013 Jul 9;6(1):263.
- Getachew M, Yewhalaw D, Tafess K, Getachew Y, Zeynudin A. Anaemia and associated risk factors among pregnant women in Gilgel Gibe dam area, Southwest Ethiopia. *Parasit Vectors*. 2012;5(1).
- Ghosh K, Ghosh K. Pathogenesis of anemia in malaria: a concise review. *Parasitol Res*. 2007 Nov;101(6):1463–9.
- Gonçalves RM, Lima NF, Ferreira MU. Parasite virulence, co-infections and cytokine balance in malaria. *Pathog Glob Health*. 2014 Jun;108(4):173–8.
- Gonçalves RM, Scopel KKG, Bastos MS, Ferreira MU. Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium falciparum*? *PloS One*. 2012;7(9):e44394.
- Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, Hommel M, et al. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med*. 1989 Jun 15;320(24):1586–91.
- Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32(1):659–702.
- Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Oct 26;107(43):18640–5.

- Hahn MB, Gangnon RE, Barcellos C, Asner GP, Patz JA. Influence of deforestation, logging, and fire on malaria in the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2014;9(1):e85725.
- Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE. Malaria: Mechanisms of Erythrocytic Infection and Pathological Correlates of Severe Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2007;2(1):217–49.
- Hamilton JA, Achuthan A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends Immunol*. 2013 Feb;34(2):81–9.
- Hänscheid T, Längin M, Lell B, Pötschke M, Oyakhrome S, Kremsner PG, et al. Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity. *Malar J*. 2008 Jun 12;7(1):109.
- Hansen DS. Inflammatory Responses Associated with the Induction of Cerebral Malaria: Lessons from Experimental Murine Models. *PLoS Pathog*. 2012 Dec 27;8(12):e1003045.
- Haque A, Echchannaoui H, Seguin R, Schwartzman J, Kasper LH, Haque S. Cerebral malaria in mice: Interleukin-2 treatment induces accumulation of  $\gamma\delta$  T cells in the brain and alters resistant mice to susceptible-like phenotype. *Am J Pathol*. 2001;158(1):163–72.
- Haque R. Human Intestinal Parasites. *J Health Popul Nutr*. 2007 Dec;25(4):387–91.
- Harhay MO, Horton J, Olliaro PL. Epidemiology and control of human gastrointestinal parasites in children. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 Feb;8(2):219–34.
- Harms G, Feldmeier H. Review: HIV infection and tropical parasitic diseases – deleterious interactions in both directions? *Trop Med Int Health*. 2002 Jun 1;7(6):479–88.
- Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Co-infection of helminths and malaria: modulation of the immune responses to malaria. *Parasite Immunol*. 2006 Oct;28(10):497–506.
- Le Hesran JY, Akiana J, Ndiaye el HM, Dia M, Senghor P, Konate L. Severe malaria attack is associated with high prevalence of *Ascaris lumbricoides* infection among children in rural Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004 Jul;98:397–9.
- van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol*. 2006 Nov;22(11):503–8.
- Hoffman SL, Goh LML, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, et al. Protection of Humans against Malaria by Immunization with Radiation-Attenuated *Plasmodium falciparum* Sporozoites. *J Infect Dis*. 2002 Apr 15;185(8):1155–64.

- Ho M, Schollaardt T, Snape S, Looareesuwan S, Suntharasamai P, White NJ. Endogenous Interleukin-10 Modulates Proinflammatory Response in *Plasmodium falciparum* Malaria. *J Infect Dis.* 1998 Aug 1;178(2):520–5.
- Ho M, Webster HK, Green B, Looareesuwan S, Kongchareon S, white NJ. Defective production of and response to IL-2 in acute human *falciparum* malaria. *J Immunol.* 1988;141(8):2755–9.
- Horowitz A, Hafalla JCR, King E, Lusingu J, Dekker D, Leach A, et al. Antigen-Specific IL-2 Secretion Correlates with NK Cell Responses after Immunization of Tanzanian Children with the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine. *J Immunol.* 2012 May 15;188(10):5054–62.
- Hotez PJ, Brooker S, Bethony JM, Bottazzi ME, Loukas A, Xiao S. Hookworm Infection. *N Engl J Med.* 2004 Aug 19;351(8):799–807.
- IBGE. IBGE Rondônia [Internet]. 2015 [cited 2015 Jun 22]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=ro>
- Imai N, Rujeni N, Nausch N, Bourke CD, Appleby LJ, Cowan G, et al. Exposure, infection, systemic cytokine levels and antibody responses in young children concurrently exposed to schistosomiasis and malaria. *Parasitology.* 2011 Oct;138(12):1519–33.
- Ioannidis LJ, Nie CQ, Hansen DS. The role of chemokines in severe malaria: more than meets the eye. *Parasitology.* 2014 Apr;141(05):602–13.
- Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Yoshimura A, et al. IL-23 protection against *Plasmodium berghei* infection in mice is partially dependent on IL-17 from macrophages. *Eur J Immunol.* 2013 Oct 1;43(10):2696–706.
- Jackson JA, Friberg IM, Little S, Bradley JE. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology.* 2009 Jan;126(1):18–27.
- Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect.* 2013 Sep 18;2(9):e60.
- Katsuragawa TH, Cunha RP de A, de Souza DCA, Gil LHS, Cruz RB, Silva A de AE, et al. Malaria and hematological aspects among residents to be impacted by reservoirs for the Santo Antônio and Jirau Hydroelectric Power Stations, Rondônia State, Brazil. *Cad Saúde Pública.* 2009 Jul;25(7):1486–92.
- Katsuragawa TH, Gil LHS, Tada MS, da Silva LHP. Endemic and epidemic diseases in Amazonia: malaria and other emerging diseases in riverine areas of the Madeira river. A school case. *Estud Av.* 2008 Dec;22(64):111–41.
- Kern P, Hemmer CJ, Van Damme J, Gruss HJ, Dietrich M. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Med.* 1989 Aug;87(2):139–43.
- Kremsner PG, Winkler S, Wildling E, Prada J, Bienzle U, Graninger W, et al. High plasma levels of nitrogen oxides are associated with severe disease and

- correlate with rapid parasitological and clinical cure in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996 Jan;90(1):44–7.
- Krotoski WA, Krotoski DM, Garnham PC, Bray RS, Killick-Kendrick R, Draper CC, et al. Relapses in primate malaria: discovery of two populations of exoerythrocytic stages. Preliminary note. *Br Med J.* 1980 Jan 19;280(6208):153–4.
- Kumaratilake LM, Ferrante A. IL-4 inhibits macrophage-mediated killing of *Plasmodium falciparum* in vitro. A possible parasite-immune evasion mechanism. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1992 Jul 1;149(1):194–9.
- Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet.* 1990 Nov 17;336(8725):1201–4.
- Lacerda-Queiroz N, Martins Teixeira M, Teixeira AL. Imunopatogênese da malária cerebral. *Rev Bras Neurol.* 2008;44(1):13–9.
- Lam KMC, Syed N, Crawford DH, Whittle H. Circulating Epstein-Barr virus-carrying B cells in acute malaria. *The Lancet.* 1991 Apr;337(8746):876–8.
- Lee SH, Looareesuwan S, Chan J, Wilairatana P, Vanijanonta S, Chong SM, et al. Plasma macrophage colony-stimulating factor and P-selectin levels in malaria-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* 1997 Feb;77(2):289–93.
- Lemaitre M, Watier L, Briand V, Garcia A, Le Hesran JY, Cot M. Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: additional evidence of the protective effect of Schistosomiasis on malaria in Senegalese children. *Am J Trop Med Hyg.* 2014 Feb;90(2):329–34.
- Lima-Junior J da C, Rodrigues-da-Silva RN, Pereira VA, Storer FL, Perce-da-Silva D de S, Fabrino DL, et al. Cells and mediators of inflammation (C-reactive protein, nitric oxide, platelets and neutrophils) in the acute and convalescent phases of uncomplicated *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Dec;107(8):1035–41.
- Lundström W, Fewkes NM, Mackall CL. IL-7 in human health and disease. *Semin Immunol.* 2012 Jun;24(3):218–24.
- Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, et al. Serum Levels of the Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 Beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, IL-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and IL-12(p70) in Malian Children with Severe *Plasmodium falciparum* Malaria and Matched Uncomplicated Malaria or Healthy Controls. *Infect Immun.* 2004 Oct 1;72(10):5630–7.
- Lyke KE, Dabo A, Sangare L, Arama C, Daou M, Diarra I, et al. Effects of concomitant *Schistosoma haematobium* infection on the serum cytokine levels elicited by acute *Plasmodium falciparum* malaria infection in Malian children. *Infect Immun.* 2006 Oct;74:5718–24.
- Lyke KE, Dicko A, Dabo A, Sangare L, Kone A, Coulibaly D, et al. Association of *Schistosoma haematobium* infection with protection against acute



- Plasmodium falciparum malaria in Malian children. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Dec;73:1124–30.
- Magalhães BML, Alexandre MAA, Siqueira AM, Melo GC, Gimaque JBL, Bastos MS, et al. Clinical profile of concurrent dengue fever and Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon: case series of 11 hospitalized patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Dec;87(6):1119–24.
- Magalhães BML, Siqueira AM, Alexandre MAA, Souza MS, Gimaque JB, Bastos MS, et al. P. vivax Malaria and Dengue Fever Co-infection: A Cross-Sectional Study in the Brazilian Amazon. Diemert DJ, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Oct 23;8(10):e3239.
- Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE. Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev.* 2004 Oct;201:89–116.
- Maizels RM, Bundy DA, Selkirk ME, Smith DF, Anderson RM. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature.* 1993 Oct 28;365:797–805.
- Marques CS, Rolão N, Centeno-Lima S, Lousada H, Maia C, Campino L, et al. Studies in a co-infection murine model of Plasmodium chabaudi chabaudi and Leishmania infantum: interferon-gamma and interleukin-4 mRNA expression. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Dec;100(8):889–92.
- Martins YC, Zanini GM, Frangos JA, Carvalho LJM. Efficacy of Different Nitric Oxide-Based Strategies in Preventing Experimental Cerebral Malaria by Plasmodium berghei ANKA. *PLoS ONE.* 2012 Feb 13;7(2):e32048.
- Matangila JR, Doua JY, Linsuke S, Madinga J, Inocêncio Da Luz R, Van Geertruyden J-P, et al. Malaria, schistosomiasis and soil transmitted helminth burden and their correlation with anemia in children attending primary schools in kinshasa, democratic republic of congo. *PLoS ONE.* 2014;9(11).
- Matar CG, Anthony NR, O'Flaherty BM, Jacobs NT, Priyamvada L, Engwerda CR, et al. Gammaherpesvirus Co-infection with Malaria Suppresses Anti-parasitic Humoral Immunity. *PLoS Pathog.* 2015 May;11(5):e1004858.
- Matsumoto S, Yuki take H, Kanbara H, Yamada H, Kitamura A, Yamada T. Mycobacterium bovis bacillus calmette-guérin induces protective immunity against infection by Plasmodium yoelii at blood-stage depending on shifting immunity toward Th1 type and inducing protective IgG2a after the parasite infection. *Vaccine.* 2000 Nov 22;19(7-8):779–87.
- McKenzie FE, Prudhomme WA, Magill AJ, Forney JR, Permpnich B, Lucas C, et al. White Blood Cell Counts and Malaria. *J Infect Dis.* 2005 Jul 15;192(2):323–30.
- Medana IM, Turner GDH. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol.* 2006 May 1;36(5):555–68.
- Megnekou R, Tenou S, Bigoga JD, Djontu JC, Medou FM, Lissom A. Placental malaria and modulation of immune and hormonal responses in Cameroonian women. *Acta Trop.* 2015 Jul;147:23–30.

- Mehlhorn H, Aspöck H. *Encyclopedia of Parasitology: A-M*. Springer Science & Business Media; 2008.
- Melo GC, Reyes-Lecca RC, Vitor-Silva S, Monteiro WM, Martins M, Benzecry SG, et al. Concurrent helminthic infection protects schoolchildren with *Plasmodium vivax* from anemia. *PLoS One*. 2010;5(6):e11206.
- Mendonça VRR, Queiroz ATL, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Netto M. Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2013;12:69.
- Midzi N, Mtapuri-Zinyowera S, Mapingure MP, Sangweme D, Chirehwa MT, Brouwer KC, et al. Consequences of polyparasitism on anaemia among primary school children in Zimbabwe. *Acta Trop*. 2010 Aug;115(1-2):103–11.
- Miller JL, Sack BK, Baldwin M, Vaughan AM, Kappe SHI. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. *Cell Rep*. 2014 Apr 24;7(2):436–47.
- Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettli AU, Braga EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Oct;75(4):582–7.
- Morrot A, Hafalla JCR, Cockburn IA, Carvalho LH, Zavala F. IL-4 receptor expression on CD8+ T cells is required for the development of protective memory responses against liver stages of malaria parasites. *J Exp Med*. 2005 Aug 15;202(4):551–60.
- Mota MM, Hafalla JCR, Rodriguez A. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nat Med*. 2002 Nov;8(11):1318–22.
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*. 2001 Jan 5;291(5501):141–4.
- Múfalo BC, Gentil F, Bargieri DY, Costa FTM, Rodrigues MM, Soares IS. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. *Microbes Infect Inst Pasteur*. 2008 Oct;10(12-13):1266–73.
- Murray J, Murray A, Murray M, Murray C. The biological suppression of malaria: an ecological and nutritional interrelationship of a host and two parasites. *Am J Clin Nutr*. 1978 Aug;31(8):1363–6.
- Murray MJ, Murray AB, Murray MB, Murray CJ. Parotid enlargement, forehead edema, and suppression of malaria as nutritional consequences of ascariasis. *Am J Clin Nutr*. 1977 Dec;30:2117–21.
- Mutapi F, Roussilhon C, Mduluzza T, Druilhe P. Anti-malaria humoral responses in children exposed to *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Jun;102(3):405–9.
- Mwangi TW, Bethony J, Brooker S. Malaria and helminth interactions in humans: an epidemiological viewpoint. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006 Oct;100(7):551–70.

- Nacher M. Malaria vaccine trials in a wormy world. *Trends Parasitol.* 2001 Dec 1;17(12):563–5.
- Nacher M. Interactions between worms and malaria: Good worms or bad worms? *Malar J.* 2011 Sep 12;10(1):259.
- Nacher M, Gay F, Singhasivanon P, Krudsood S, Treeprasertsuk S, Mazier D, et al. *Ascaris lumbricoides* infection is associated with protection from cerebral malaria. *Parasite Immunol.* 2000 Mar;22:107–13.
- Nacher M, Singhasivanon P, Silachamroon U, Treeprasertsuk S, Vannaphan S, Traore B, et al. Helminth infections are associated with protection from malaria-related acute renal failure and jaundice in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2001a Dec;65(6):834–6.
- Nacher M, Singhasivanon P, Silachamroon U, Treeprasertsu S, Krudsood S, Gay F, et al. Association of helminth infections with increased gametocyte carriage during mild falciparum malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2001b Nov;65(5):644–7.
- Nacher M, Singhasivanon P, Yimsamran S, Manibunyong W, Thanyavanich N, Wuthisen R, et al. Intestinal helminth infections are associated with increased incidence of *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *J Parasitol.* 2002 Feb;88(1):55–8.
- Nahrevanian H. Immune effector mechanisms of the nitric oxide pathway in malaria: cytotoxicity versus cytoprotection. *Braz J Infect Dis.* 2006 Aug;10(4):283–92.
- Nahrevanian H, Dascombe MJ. The role of nitric oxide and its up/downstream molecules in malaria: cytotoxic or preventive? *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2003;34 Suppl 2:44–50.
- Naing C, Whittaker MA, Nyunt-Wai V, Reid SA, Wong SF, Mak JW, et al. Malaria and soil-transmitted intestinal helminth co-infection and its effect on anemia: a meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013 Nov;107(11):672–83.
- Naus CW, Jones FM, Satti MZ, Joseph S, Riley EM, Kimani G, et al. Serological responses among individuals in areas where both schistosomiasis and malaria are endemic: cross-reactivity between *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis.* 2003 Apr 15;187:1272–82.
- Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective Immunity produced by the Injection of X-irradiated Sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature.* 1967 Oct 14;216(5111):160–2.
- Nussler AK, Rénia L, Pasquetto V, Miltgen F, Matile H, Mazier D. In vivo induction of the nitric oxide pathway in hepatocytes after injection with irradiated malaria sporozoites, malaria blood parasites or adjuvants. *Eur J Immunol.* 1993 Apr;23(4):882–7.
- Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho M, Kan KE, et al. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med.* 1992 Oct 1;176(4):1183–9.

- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010;9:115.
- Ombrain MC D', Robinson LJ, Stanisic DI, Taraika J, Bernard N, Michon P, et al. Association of early interferon-gamma production with immunity to clinical malaria: a longitudinal study among Papua New Guinean children. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2008 Dec 1;47(11):1380–7.
- Pamplona A, Hanscheid T, Epiphanyo S, Mota MM, Vigário AM. Cerebral malaria and the hemolysis/methemoglobin/heme hypothesis: shedding new light on an old disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Apr;41(4):711–6.
- Paul R, Sinha PK, Bhattacharya R, Banerjee AK, Raychaudhuri P, Mondal J. Study of C reactive protein as a prognostic marker in malaria from Eastern India. *Adv Biomed Res [Internet]*. 2012 Aug 28 [cited 2015 Jun 19];1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3544111/>
- Perkmann T, Winkler H, Graninger W, Kremsner PG, Winkler S. Circulating levels of the interleukin (IL)-4 receptor and of IL-18 in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. *Cytokine*. 2005 Feb 21;29(4):153–8.
- Peyron F, Burdin N, Ringwald P, Vuillez JP, Rousset F, Banchereau J. High levels of circulating IL-10 in human malaria. *Clin Exp Immunol*. 1994 Feb;95(2):300–3.
- Pied S, Rénia L, Nussler A, Miltgen F, Mazier D. Inhibitory activity of IL-6 on malaria hepatic stages. *Parasite Immunol*. 1991 Mar 1;13(2):211–7.
- Piguet PF, Kan CD, Vesin C. Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. 2002 Apr;7(2):91–8.
- Pina-Costa A de, Brasil P, Santi SMD, Araujo MP de, Suárez-Mutis MC, Santelli ACF e S, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Aug;109(5):618–33.
- Pohlert T. The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). 2014.
- Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, Cloonan N, et al. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *The Lancet*. 2002 Aug 24;360(9333):610–7.
- del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 1;88(9):4030–4.
- Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave P-A, Mishra GC, Pied S. Clusters of Cytokines Determine Malaria Severity in *Plasmodium falciparum*-Infected Patients from Endemic Areas of Central India. *J Infect Dis*. 2006 Jul 15;194(2):198–207.
- Prudêncio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Nov;4(11):849–56.

- Pullan R, Brooker S. The health impact of polyparasitism in humans: are we underestimating the burden of parasitic diseases? *Parasitology*. 2008 Jun;135(7):783–94.
- Rai RR, Jain P. Plasmodium falciparum and hepatitis B virus co-infection--a rare cause of acute hepatitis. *J Gastrointest Liver Dis JGLD*. 2009 Jun;18(2):252–3.
- Rao K, Erb-Downward JR, Walk ST, Micic D, Falkowski N, Santhosh K, et al. The Systemic Inflammatory Response to Clostridium difficile Infection. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Mar 18 [cited 2014 May 23];9(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3958555/>
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013. Available from: <http://www.R-project.org/>
- Remoue F, Diallo TO, Angeli V, Hervé M, de Clercq D, Schacht AM, et al. Malaria co-infection in children influences antibody response to schistosome antigens and inflammatory markers associated with morbidity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003 May;97(3):361–4.
- Rey L. Os Plasmódios e a Malária: Ecologia e Epidemiologia. *Parasitol Parasitos E Doenças Parasitárias Homem Nas Américas E Na África*. Rio de Janeiro; 2001a. p. 371–85.
- Rey L. Os Plasmódios e a Malária: II. A Doença. *Parasitol Parasitos E Doenças Parasitárias Homem Nas Américas E Na África*. Rio de Janeiro; 2001b. p. 349–70.
- Rey L. Os Plasmódios e a malária: I. Os Parasitos. *Parasitol Parasitos E Doenças Parasitárias Homem Nas Américas E Na África*. Rio de Janeiro; 2001c. p. 337–48.
- Rhee MSM, Akanmori BD, Waterfall M, Riley EM. Changes in cytokine production associated with acquired immunity to Plasmodium falciparum malaria. *Clin Exp Immunol*. 2001 Dec;126(3):503–10.
- Righetti AA, Glinz D, Adiossan LG, Koua A-YG, Niamké S, Hurrell RF, et al. Interactions and potential implications of Plasmodium falciparum-hookworm coinfection in different age groups in south-central Côte d'Ivoire. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(11):e1889.
- Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol*. 2006 Feb;28(1-2):35–49.
- Riopel J, Tam M, Mohan K, Marino MW, Stevenson MM. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Deficient Mice Have Impaired Resistance to Blood-Stage Malaria. *Infect Immun*. 2001 Jan 1;69(1):129–36.
- Rochford R, Cannon MJ, Moormann AM. Endemic Burkitt's lymphoma: a polymicrobial disease? *Nat Rev Microbiol*. 2005 Feb;3(2):182–7.

- Rockett KA, Awburn MM, Rockett EJ, Clark IA. Tumor necrosis factor and interleukin-1 synergy in the context of malaria pathology. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Jun;50(6):735–42.
- Rodrigues-da-Silva RN, Lima-Junior J da C, Fonseca B de PF e, Antas PRZ, Baldez A, Storer FL, et al. Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 Apr;109(2):154–62.
- Rodrigues MHC, Rodrigues KM, Oliveira TR, Cômodo AN, Rodrigues MM, Kocken CHM, et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int J Parasitol.* 2005 Feb;35(2):185–92.
- Roll Back Malaria Partnership. Roll Back Malaria Annual Report [Internet]. 2013. Available from: [http://www.rollbackmalaria.org/files/files/resources/RBM-Annual-Report-2013\(1\).pdf](http://www.rollbackmalaria.org/files/files/resources/RBM-Annual-Report-2013(1).pdf)
- Rosenberg R, Wirtz RA, Schneider I, Burge R. An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990 Mar;84(2):209–12.
- Roussillon C, Brasseur P, Agnamey P, Perignon JL, Druilhe P. Understanding human-*Plasmodium falciparum* immune interactions uncovers the immunological role of worms. *PLoS One.* 2010;5:e9309.
- Roy S, Lavine J, Chiaromonte F, Terwee J, VandeWoude S, Bjornstad O, et al. Multivariate Statistical Analyses Demonstrate Unique Host Immune Responses to Single and Dual Lentiviral Infection. *PLoS ONE.* 2009 Oct 6;4(10):e7359.
- Rubino SJ, Geddes K, Girardin SE. Innate IL-17 and IL-22 responses to enteric bacterial pathogens. *Trends Immunol.* 2012 Mar;33(3):112–8.
- Sánchez-Arcila JC, Perce-da-Silva D de S, Vasconcelos MPA, Rodrigues-da-Silva RN, Pereira VA, Aprígio CJL, et al. Intestinal Parasites Coinfection Does Not Alter Plasma Cytokines Profile Elicited in Acute Malaria in Subjects from Endemic Area of Brazil. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:857245.
- Santos FS dos, Gama ASM, Fernandes AB, Reis Junior JD dos D, Guimarães J. Prevalência de enteroparasitismo em crianças de comunidades ribeirinhas do Município de Coari, no médio Solimões, Amazonas, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saúde.* 2010;1:23–8.
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 2011 May;1813(5):878–88.
- Schofield L, Ferreira A, Altszuler R, Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Interferon-gamma inhibits the intrahepatocytic development of malaria parasites in vitro. *J Immunol.* 1987a Sep 15;139(6):2020–5.

- Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R, Nussenzweig V.  $\gamma$  Interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature*. 1987b Dec 23;330(6149):664–6.
- Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol*. 2003 Sep;4(9):835–42.
- Shapiro AE, Tukahebwa EM, Kasten J, Clarke SE, Magnussen P, Olsen A, et al. Epidemiology of helminth infections and their relationship to clinical malaria in southwest Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005 Jan;99(1):18–24.
- Singh J, Ray AP, Nair CP. Relationship of tuberculosis on the course and intensity of plasmodial infections in *M. mulatta*. *Indian J Malariol*. 1956 Mar;10(1):3–10.
- Sinha AK. *Malaria*. APH Publishing; 2005.
- SIVEP-Malária Ministério da Saúde. Sivep Malária [Internet]. 2011 [cited 2011 May 4]. Available from: [http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep\\_malaria](http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria)
- SIVEP-Malária Ministério da Saúde. Sivep Malária [Internet]. 2015 [cited 2015 Jun 22]. Available from: [http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep\\_malaria](http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria)
- S L, Jg D, DI A, Sh L, D B, Nj W. Thrombocytopenia in malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1992 Mar;23(1):44–50.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Oct;61(2):315–20.
- Soares IS, da Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Portillo HAD, Rodrigues MM. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Mar 1;60(3):357–63.
- Sokhna C, Le Hesran J-Y, Mbaye PA, Akiana J, Camara P, Diop M, et al. Increase of malaria attacks among children presenting concomitant infection by *Schistosoma mansoni* in Senegal. *Malar J*. 2004 Nov 15;3:43.
- Souza EA de, da Silva-Nunes M, Malafronte R dos S, Muniz PT, Cardoso MA, Ferreira MU. Prevalence and spatial distribution of intestinal parasitic infections in a rural Amazonian settlement, Acre State, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2007 Feb;23(2):427–34.
- Spiegel A, Tall A, Raphenon G, Trape JF, Druilhe P. Increased frequency of malaria attacks in subjects co-infected by intestinal worms and *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003 Apr;97(2):198–9.
- Strunz EC, Addiss DG, Stocks ME, Ogden S, Utzinger J, Freeman MC. Water, Sanitation, Hygiene, and Soil-Transmitted Helminth Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med*. 2014 Mar 25;11(3):e1001620.
- Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science*. 2006 Sep 1;313(5791):1287–90.

- Supali T, Verweij JJ, Wiria AE, Djuardi Y, Hamid F, Kaisar MMM, et al. Polyparasitism and its impact on the immune system. *Int J Parasitol.* 2010 Aug 15;40(10):1171–6.
- Susi H, Barrès B, Vale PF, Laine A-L. Co-infection alters population dynamics of infectious disease. *Nat Commun [Internet].* 2015 Jan 8 [cited 2015 Jun 21];6. Available from: <http://www.nature.com/ncomms/2015/150108/ncomms6975/full/ncomms6975.html>
- Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J Infect Dis.* 2010 May 15;201(10):1544–50.
- Su Z, Segura M, Morgan K, Loredano-Osti JC, Stevenson MM. Impairment of protective immunity to blood-stage malaria by concurrent nematode infection. *Infect Immun.* 2005 Jun;73(6):3531–9.
- Tangpukdee N, Yew H-S, Krudsood S, Punyapradit N, Somwong W, Looareesuwan S, et al. Dynamic changes in white blood cell counts in uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria. *Parasitol Int.* 2008 Dec;57(4):490–4.
- Thomson AW, Lotze MT. *The Cytokine Handbook, Two-Volume Set, Volume 1-2, Fourth Edition.* 4th ed. Academic Press; 2003.
- Troye-Blomberg M, Berzins K. Immune interactions in malaria co-infections with other endemic infectious diseases: implications for the development of improved disease interventions. *Microbes Infect Inst Pasteur.* 2008 Jul;10(9):948–52.
- Tshikuka JG, Scott ME, Gray-Donald K, Kalumba ON. Multiple infection with *Plasmodium* and helminths in communities of low and relatively high socio-economic status. *Ann Trop Med Parasitol.* 1996 Jun;90:277–93.
- Valverde JG, Gomes-Silva A, De Carvalho Moreira CJ, Leles De Souza D, Jaeger LH, Martins PP, et al. Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian Amazon. *Ann Trop Med Parasitol.* 2011;105(6):413–24.
- Vanderberg JP. Studies on the motility of *Plasmodium* sporozoites. *J Protozool.* 1974 Oct;21(4):527–37.
- Vanderberg JP, Frevert U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int J Parasitol.* 2004 Aug;34(9):991–6.
- Velde AA te, Huijbens RJ, de Vries JE, Figdor CG. IL-4 decreases Fc gamma R membrane expression and Fc gamma R-mediated cytotoxic activity of human monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1990 Apr 15;144(8):3046–51.
- Wammes LJ, Mpairwe H, Elliott AM, Yazdanbakhsh M. Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. *Lancet Infect Dis.* 2014 Nov;14(11):1150–62.

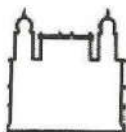


- Wanderley DMV, da Silva RA, Andrade JCR de. Epidemiological aspects of malaria in the State of S.Paulo, Brasil, 1983 to 1992. *Rev Saúde Pública*. 1994 Jun;28(3):192–7.
- Wassmer SC, Lépolard C, Traoré B, Pouvelle B, Gysin J, Grau GE. Platelets Reorient Plasmodium falciparum–Infected Erythrocyte Cytoadhesion to Activated Endothelial Cells. *J Infect Dis*. 2004 Jan 15;189(2):180–9.
- Wenisch C, Parschalk B, Narzt E, Looareesuwan S, Graninger W. Elevated Serum Levels of IL-10 and IFN- $\gamma$  in Patients with Acute Plasmodium falciparum Malaria. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995 Jan;74(1):115–7.
- White NJ. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. *Malar J*. 2011 Oct 11;10(1):297.
- WHO. WHO | World Malaria Report 2012 [Internet]. WHO. 2012 [cited 2013 Sep 2]. Available from: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/en/index.html](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/index.html)
- WHO. Factsheet on the World Malaria Report 2014 [Internet]. WHO. 2014a [cited 2015 Apr 28]. Available from: [http://www.who.int/malaria/media/world\\_malaria\\_report\\_2014/en/](http://www.who.int/malaria/media/world_malaria_report_2014/en/)
- WHO. WHO | World Malaria Report 2014 [Internet]. World Health Organization; 2014b. Available from: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/)
- WHO. Tuberculosis fact sheet [Internet]. WHO. 2015 [cited 2015 May 26]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
- Wilson NO, Bythwood T, Solomon W, Jolly P, Yatich N, Jiang Y, et al. Elevated levels of IL-10 and G-CSF associated with asymptomatic malaria in pregnant women. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2010;2010.
- Xu L, Zheng X, Berzins K, Chaudhuri A. Cytokine dysregulation associated with malarial anemia in Plasmodium yoelii infected mice. *Am J Transl Res*. 2013 Mar 28;5(2):235–45.
- Yamaguchi S, Kubota T, Yamagishi T, Okamoto K, Izumi T, Takada M, et al. Severe thrombocytopenia suggesting immunological mechanisms in two cases of vivax malaria. *Am J Hematol*. 1997 Nov;56(3):183–6.
- Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol*. 2007 May 1;9(5):1215–22.
- Yan X-J, Dozmorov I, Li W, Yancopoulos S, Sison C, Centola M, et al. Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011 Nov 10;118(19):5201–10.
- Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res*. 2006 Jan;16(1):3–10.



## 10 APÊNDICES

### A. Aprovação do projeto pelo comité de ética em pesquisa



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 26 de março de 2009.

Carta: 024/09

De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dra. Joseli de Oliveira Ferreira e  
- Dr. Christian M. Gabriel Niel

Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **492/08** intitulado "**Malária, leishmaniose tegumentar e tuberculose: aspectos clínico-epidemiológico, parasitológico, bioquímico e imunológicos e avaliação das co-infecções em área com população de assentamento no Estado de Rondônia**" com a deliberação de **APROVADO**.

Atenciosamente

Carla Dias Netto  
Secretária Geral  
CEP/Fiocruz

### B. Termo de consentimento livre e esclarecido de participação no projeto de pesquisa

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

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

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

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

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

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

**Nome do Voluntário:** \_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Inicialmente haverá coleta de informações sobre a doença através de uma entrevista detalhada e preenchimento de um questionário por um membro da equipe, exame médico e coleta de sangue para realização de vários exames (distensão e gota espessa para diagnóstico, hemograma completo, testes imunológicos, tipagem de células e produtos secretados por elas, entre outros). Para isto será necessária a coleta 30mL de sangue por via endovenosa em duas ocasiões: no dia do diagnóstico antes do tratamento (D0), podendo ser solicitada para uma coleta em outra ocasião para verificação de cura. Se a médica suspeitar que eu tenho Leishmaniose farão um teste na pele (injeção de 0,1 mL em um dos braços), chamado teste de Montenegro (para leishmaniose) para auxiliar no diagnóstico dessa doença. Além disso, se eu tiver alguma ferida no corpo que seja suspeita de leishmaniose, será feita uma biópsia (com anestesia) com retirada de um pedaço (não maior eu 6mm de diâmetro) da ferida, que será dividido em partes para o diagnóstico da doença, isolando o parasito e fazendo histopatologia, e para o estudo científico. No caso de suspeita de tuberculose eu terei de colher uma amostra de escarro para diagnóstico de tuberculose em pote limpo

e levar um pote limpo para casa para colher uma amostra de escarro na manhã do dia seguinte ao despertar. Para verificar se eu tenho alguma verminose vou ter que colher uma amostra de fezes em um pote limpo (chamada amostra fresca) e uma amostra de fezes num pote contendo um líquido vermelho (chamada fezes conservadas). Fui informado que o líquido vermelho (MIF) não é para ser tomado, e sim para colocar as fezes nele dentro do pote (as fezes servem para fazer o diagnóstico das parasitoses intestinais). Todos estes procedimentos são usados na rotina de diagnóstico e servem para confirmar que estou com um dos parasitos que provocam as doenças que vão ser estudadas. Eu posso fazer todos os exames ou apenas alguns, mas como cada um deles serve para doenças diferentes poderei não ser diagnosticado para algumas deles se não fizer todos os exames.

#### **D- Benefícios:**

Com a exceção da malária, as outras doenças não são diagnosticadas com facilidade, e isto traz problemas para o controle delas na minha região. Com o diagnóstico poderei ser encaminhado a uma unidade de saúde para cuidar do meu caso. Além disto, alguns trabalhos têm mostrado que se uma pessoa tiver mais de um parasito produzindo doença ao mesmo tempo, algumas vezes as doenças podem ter mais problema para serem curadas pelos remédios. O estudo da resposta imune em pacientes com as doenças do estudo tem apontado para um importante papel de algumas células e fatores do organismo (imunológicos) na evolução das doenças. No entanto, mais estudos são necessários para tentar esclarecer o seu papel na regulação da resposta imune levando à cura ou à proteção. Estes conhecimentos poderão fornecer importantes informações para se prever a evolução destas enfermidades nos indivíduos doentes e, para estabelecer uma futura vacina para uma ou mais delas.

#### **E- Inconvenientes:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

---

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

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

### C. Questionário epidemiológico

REGISTRO N°

Data:

#### DADOS PESSOAIS

NOME:	SEXO:	
<input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M		
IDADE:	NATURALIDADE:	PROCEDÊNCIA:
ENDEREÇO ATUAL:		
NÚMERO DE RESIDENTES NO ENDEREÇO ATUAL:		
PROFISSÃO:		

#### TEMPO DE RESIDÊNCIA (ANOS):

Área endêmica (anos) :

Rondônia (anos):

#### HISTÓRIA PREGRESSA DE MALÁRIA

#### NÚMERO DE INFECCÕES ANTERIORES DE MALÁRIA:

Espécies:  *P. falciparum*  *P. vivax*  *P. malariae*  Nenhuma  Não lembra

#### NÚMERO DE INFECCÕES NO ÚLTIMO ANO:

Espécies:  *P. falciparum*  *P. vivax*  *P. malariae*  Nenhuma  Não lembra

#### DATA DA ÚLTIMA INFECCÃO:

Espécies:  *P. falciparum*  *P. vivax*  *P. malariae*  Nenhuma  Não lembra

#### LOCAL PROVÁVEL DE INFECCÃO:

FEZ O TRATAMENTO COMPLETO?:  Sim  Não

JÁ FOI HOSPITALIZADO COM MALÁRIA:  Sim  Não Data:

MALÁRIA GRAVE NA FAMÍLIA:  Sim  Não Data:

#### OBS:

TEM ALGUÉM NA FAMÍLIA COM MALÁRIA OU QUE TEVE MALÁRIA RECENTEMENTE?  Sim  Não Data:



## EXPOSIÇÃO A INFEÇÃO MALÁRICA

### LOCALIZAÇÃO DA CASA

Floresta       Coleção d'água       Cidade       Nenhuma

### TIPO DE CASA (proteção em relação ao contato com mosquito)

Boa       Parcial       Nenhuma

### ATIVIDADES AO AMANHECER:

### ATIVIDADES AO ANOITECER:

### SABE COMO A MALÁRIA É TRANSMITIDA?

Sim     Não     Foi informado     Foi informado, mas não acredita

### COMO?:

### USO DE MEDIDAS PROFILÁTICAS

Mosquiteiro     Inseticida     antimaláricos     Outras     Nenhuma

Data da última borrifação de inseticida (FNS):

## INFEÇÃO ATUAL

### SINTOMAS

Febre     Cefaléia     Calafrios     Náusea/Vômito     Mialgia     Artralgia  
 Sudorese  
 Nenhum

### DATA DO INICIO DOS SINTOMAS:

DIAGNÓSTICO:  *P. falciparum*     *P. vivax*     *P. malariae*   

Nenhuma

### PARASITEMIA:

### LOCAL PROVÁVEL DE INFEÇÃO:

RECEBEU TRANSFUSÃO DE SANGUE?:  Sim     Não      Data:

É DOADOR DE SANGUE?:  Sim     Não      Data da última doação:

### COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

GOTA ESPESSA     DISTENSÃO SANGUÍNEA     SANGUE   

PARASITOS

OBS:

## 11 ANEXO: TRABALHO 2 (PUBLICADO)

RESEARCH

Open Access



# The influence of intestinal parasites on *Plasmodium vivax*-specific antibody responses to MSP-1<sub>19</sub> and AMA-1 in rural populations of the Brazilian Amazon

Juan Camilo Sánchez-Arcila<sup>1</sup>, Marcelle Marcolino de França<sup>1</sup>, Virginia Araujo Pereira<sup>1</sup>, Mariana Pinheiro Alves Vasconcelos<sup>2</sup>, Antonio Têva<sup>3</sup>, Daiana de Souza Perce-da-Silva<sup>4</sup>, Joffre Rezende Neto<sup>5</sup>, Cesarino Junior Lima Aprígio<sup>6</sup>, Josue da Costa Lima-Junior<sup>1</sup>, Mauricio Martins Rodrigues<sup>7</sup>, Irene Silva Soares<sup>8</sup>, Dalma Maria Banic<sup>4</sup> and Joseli Oliveira-Ferreira<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Polyparasitism is a common condition in humans but its impact on the host immune system and clinical diseases is still poorly understood. There are few studies of the prevalence and the effect of malaria-intestinal parasite co-infections in the immune response to malaria vaccine candidates. The present study determines whether the presence of malaria and intestinal parasites co-infection is associated with impaired IgG responses to *Plasmodium vivax* AMA-1 and MSP-1<sub>19</sub> in a rural population of the Brazilian Amazon.

**Methods:** A cross-sectional survey was performed in a rural area of Rondonia State and 279 individuals were included in the present study. At recruitment, whole blood was collected and *Plasmodium* and intestinal parasites were detected by microscopy and molecular tests. Blood cell count and haemoglobin were also tested and antibody response specific to *P. vivax* AMA-1 and MSP-1<sub>19</sub> was measured in plasma by ELISA. The participants were grouped according to their infection status: singly infected with *Plasmodium* (M); co-infected with *Plasmodium* and intestinal parasites (CI); singly infected with intestinal parasites (IP) and negative (N) for both malaria and intestinal parasites.

**Results:** The prevalence of intestinal parasites was significantly higher in individuals with malaria and protozoan infections were more prevalent. IgG antibodies to PvAMA-1 and/or PvMSP-1<sub>19</sub> were detected in 74 % of the population. The prevalence of specific IgG was similar for both proteins in all four groups and among the groups the lowest prevalence was in IP group. The cytophilic sub-classes IgG1 and IgG3 were predominant in all groups for PvAMA-1 and IgG1, IgG3 and IgG4 for PvMSP-1<sub>19</sub>. In the case of non-cytophilic antibodies to PvAMA-1, IgG2 was significantly higher in IP and N group when compared to M and CI while IgG4 was higher in IP group.

**Conclusions:** The presence of intestinal parasites, mainly protozoans, in malaria co-infected individuals does not seem to alter the antibody immune responses to *P. vivax* AMA-1 and MSP-1<sub>19</sub>. However, IgG response to both AMA1 and MSP1 were lower in individuals with intestinal parasites.

**Keywords:** Malaria, Intestinal parasites, Co-infection, *Plasmodium vivax*, AMA-1, MSP-1<sub>19</sub>

\*Correspondence: lila@ioc.fiocruz.br

<sup>1</sup> Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil  
Full list of author information is available at the end of the article

## Background

It is well known that polyparasitism is a common condition in humans, however, little is known about the interaction between parasites and its impact on the host immune system and clinical diseases [1]. Malaria and intestinal parasitic infections are distributed throughout the world and are highly prevalent in humid and warm environments in the tropics. The World Health Organization estimates that 3.3 billion people, almost half the world's population, are at risk of contracting malaria and approximately 3.5 billion people are affected by intestinal protozoa and/or helminths [2]. Thus, protozoa of the genus *Plasmodium*, etiological agents of malaria, and many species of intestinal parasites (protozoa and helminths) share the same geographic distribution area and both types of parasites can infect the same population of hosts.

The implication of concomitant infection in humans has been evaluated mainly regarding the effects of intestinal helminth infections on falciparum malaria, obtaining conflicting results. While *Ascaris lumbricoides* infection may protect against cerebral malaria [3, 4] and *Schistosoma haematobium* has a protective effect on the density of the *Plasmodium falciparum* infection, [5, 6] children carrying intestinal helminth infections including *Ascaris lumbricoides* were more susceptible to either *P. falciparum* infection or acute malaria attacks [7–9]. In other studies, co-infections can make no difference [10–13]. In rodent models of co-infection, schistosome and plasmodia infections are affected at the immunological level [14–17]. In humans, studies demonstrating an effect of helminths on vaccine-induced immune responses against influenza, cholera and tetanus have been described [18, 19]. So far, little information is available about whether and how co-infections of helminths and malaria parasites can affect specific immune response to malaria parasites and vaccine candidates [20–26]. In some epidemiological studies schistosomiasis co-infection favors anti-malarial protective antibody responses [21, 25] while in others no significant association between schistosome-specific and *Plasmodium*-specific antibody responses was observed [22, 23]. Similarly, systemic cytokine levels rose with age as well as with infection and exposure to schistosome or had no effect [22, 26].

The effects of helminths on falciparum malaria in humans remain uncertain and few data are available about the interaction between intestinal parasites and *Plasmodium vivax* [27]. In Brazil, *P. vivax* is the most prevalent malaria species corresponding to 83.7 % of the 134,907 cases registered in 2014 and it is concentrated in the Amazon region where intestinal parasites infections are prevalent [28, 29].

AMA-1 is expressed on merozoites and sporozoites as a type I integral membrane protein and MSP-1 is expressed abundantly on the merozoite surface and synthesized as a 195-kDa protein and sequentially processed into a cysteine-rich 19-kDa fragment (MSP-1<sub>19</sub>) [30, 31]. The proteins MSP-1 and AMA-1 are promising vaccine candidates for both *P. falciparum* and *P. vivax* and they are involved in erythrocyte invasion [32, 33].

Therefore, the aim of the study was to determine the prevalence of co-infection of malaria and intestinal parasites and whether the presence of co-infection was associated with impaired IgG responses against *P. vivax* proteins, apical membrane antigen-1 (AMA-1) and merozoite surface protein (MSP-1<sub>19</sub>) in individuals co-infected with *Plasmodium* and intestinal parasites and in individuals with single infections.

## Methods

### Study population

The individuals who took part in this study were part of a previous study investigating the effect of intestinal parasites on the circulating levels of cytokines and inflammatory markers [20]. The study area and population were also described in detail in this study. Briefly, a cross-sectional survey was conducted in a rural settlement community of Porto Velho, municipality of Rondonia State, and Brazilian Amazon. Only individuals that lived in the area and provided a blood sample and stool samples were included in the study (279 participants).

### Ethical consideration

Ethical approval was given by the Fundação Oswaldo Cruz Ethical Committee (CEP/FIOCRUZ, 492/08). Informed and written consents were obtained from all participants. For all eligible participants a clinical examination was performed. Donors positive for *P. vivax* and/or *P. falciparum* at the time of blood collection were subsequently treated using the chemotherapeutic regimen recommended by the Brazilian Ministry of Health. Participants positive for intestinal parasites were also treated.

### Sample collection and diagnosis

After written informed consent and an epidemiological survey from all adult donors or from parents of donors in the case of minors, blood samples were collected by venipuncture for serological assay and a thick and thin blood smear was prepared for microscopic detection of *Plasmodium*. Parasitaemia was expressed as the number of parasites/ $\mu$ L of blood in the thick blood smear. To confirm the parasitological diagnoses, molecular analyses of all samples using primers specific for genus (*Plasmodium* sp.)

and species (*P. falciparum* and *P. vivax*) were done. PCR amplification and detection and the PCR primers used have been previously described [34]. Subjects positive in the thick blood smear and/or PCR were considered positive for malaria infection. Blood cell counts, including haematologic indices, were done using an automatic haematology analyzer (Pentra, Horiba Medical, Montpellier, France). The individuals were considered anaemic when their haemoglobin levels were  $\leq 13$  g/dL blood in males and  $\leq 12$  g/dL blood in females.

#### Collection and examination of stool samples

For parasitological examinations, participants were requested to provide a morning faecal sample and a labelled screw-capped plastic container was provided. A single stool sample was collected from each subject on the following day and samples were screened for intestinal parasites and examined at the same day by direct wet mount microscopic and concentration techniques by a technician with expertise in intestinal parasites identification.

#### Specific antibody for *Plasmodium vivax* antigen-specific IgG antibody and sub-classes in plasma samples

Specific IgG antibodies to PvMSP-1<sub>19</sub> and PvAMA-1 in plasma were determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). The expression and purification of the recombinant proteins were performed as previously described [35, 36]. The recombinant proteins were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2 to a concentration of 2  $\mu$ g/ml. High-binding ELISA plates (Nunc/Maxisorp) were coated with 100  $\mu$ L of recombinant proteins and incubated overnight at 4 °C. Plates were washed four times with washing buffer, PBS-0.05 % Tween 20 (PBS-T) and were then blocked with blocking buffer (PBS-T containing 5 % low-fat milk) for 2 h at 37 °C. Individual plasma samples were diluted 1:100 in blocking buffer, 100  $\mu$ L were added in duplicate to the respective wells and incubated for 1 h at 37 °C. After four washes with PBS-T, bound antibodies were detected with peroxidase-conjugated goat antihuman IgG (Sigma, St Louis, MO, USA) followed by *o*-phenylenediamine and hydrogen peroxide. The absorbance was read at 492 nm using an ELISA reader (Spectramax 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The results for total IgG were expressed as reactivity indices (RI), which were calculated by dividing the mean optical density (OD) values of tested samples by the mean OD values plus three standard deviations (SD) of 24 non-exposed control individuals living in non-endemic areas of malaria (cut-off: PvAMA-1 = 0.1881, PvMSP-1<sub>19</sub> = 0.1915). As positive controls, five plasma samples from exposed native individuals with high antibodies OD levels for both proteins

were used. Subjects were considered as positive to the corresponding antigen if the RI was higher than 1. An ELISA to detect the IgG sub-classes was also performed for positive responders. Plates were coated with antigen, blocked and incubated with plasma diluted 1:100 as in the ELISA for total IgG. After washing, plates were incubated for 1 h at 22 °C with mouse mAbs to human IgG sub-classes diluted in blocking buffer according to the manufacturer's specifications. The mAbs were from clones HP-6001 for IgG1, HP-6002 for IgG2, HP-6050 for IgG3, and HP-6023 for IgG4 (Sigma) and have been used previously to characterize IgG subclass reactivity. After incubation, plates were washed and incubated for 1 h at 22 °C with peroxidase-labelled goat anti-mouse antibody (KPL) diluted 1:1,000 in blocking buffer.

Plates were washed, incubated with ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) substrate solution, and the (OD) measured as described above. Sub-class-specific prevalence for each antigen was determined from OD values using three standard deviation (SD) above the appropriate mean OD of 24 non-exposed controls as the cut-off for positivity. The corresponding cut-offs for PvAMA-1 were: IgG1 = 0.1910, IgG2 = 0.2401, IgG3 = 0.1558, IgG4 = 0.1828, and for PvMSP-1<sub>19</sub> were: IgG1 = 0.1885, IgG2 = 0.2718, IgG3 = 0.1579, IgG4 = 0.1462.

#### Statistical analysis

Epidemiological and experimental data were stored in Epi-Info 3.5.1 (CDC, Atlanta, GA, USA). Statistical analysis were performed using the R statistical environment and all p values were adjusted with false discovery rate method [37]. The risk of malaria associated with intestinal parasites was estimated using odds ratios (OR) and confidence interval of 95 % (CI). Chi-squared ( $\chi^2$ ) with Yates correction was used to calculate differences in seroprevalence between groups. Wilcoxon-Mann-Whitney rank sum test was used for comparison between M and CI groups. Differences of reactivity index values were calculated with a pairwise test for multiple comparisons of mean rank sums (Nemenyi-Tests) [38]. P values of <0.05 were considered as significant.

## Results

#### Prevalence of malaria and intestinal parasites

Combining the results across all tests (Table 1), 279 individuals were grouped according to their infection status: individuals infected with *Plasmodium* only (n = 16, M); individuals co-infected with *Plasmodium* and intestinal parasites (48, CI); individuals infected with intestinal parasites only (98, IP) and individuals negative (117, N). The group N was defined as subjects with no symptoms, negative for *Plasmodium* by thick blood smear and PCR

**Table 1 Distribution and number of individuals among the groups and subgroups according to malaria and intestinal parasites diagnosis**

Groups	Subgroups	Description	Number of individuals	Total
Malaria (M)		Individuals infected with <i>Plasmodium</i> only	16	16
Co-infected (CI)	H	Individuals co-infected with <i>Plasmodium</i> and helminths only	3	48
	P	Individuals co-infected with <i>Plasmodium</i> and protozoa only	39	
	P+H	Individuals co-infected with <i>Plasmodium</i> and helminths + protozoa	6	
Intestinal parasites (IP)	H	Individuals infected with helminths only	17	98
	P	Individuals infected with protozoa only	69	
	P+H	Individuals infected with helminths and protozoa only	12	
Negative (N)		Individuals negative for malaria and intestinal parasites diagnosis	117	117
Total				279

CI subgroups, H individuals co-infected with helminths only, P protozoa only, P + H both helminths and protozoa

and negative for intestinal parasites by direct wet mount microscopic and concentration techniques. CI and IP groups were composed of individuals positive for intestinal parasite infection: helminths only (H), protozoa only (P), and both helminths and protozoa (P+H).

In both M and CI groups, *P. vivax* was the most prevalent species (81.2 and 75.0 %, respectively). The prevalence of intestinal parasites was significantly higher in individuals infected with malaria (75 %) than with those who were not infected (45 %). Of note, all study participants with malaria presented clinical symptoms, such as history of fever and headache, and no difference was observed in the parasitaemia levels between malaria and co-infected groups. Among the 146 individuals infected with intestinal parasites, ten different parasite species were detected (Fig. 1), four intestinal protozoa (*Giardia intestinalis*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*, *Iodamoeba butschlii*) and six helminths (*Ancylostoma duodenale*, *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*). *Giardia intestinalis* and *Entamoeba coli* were the most prevalent protozoa, found in single infections or associated with other species of protozoa and helminths (*Ancylostoma duodenale*, *Strongyloides stercoralis*). The prevalence of protozoan in CI group (81.25 %) was not statistically different from IP (70.4 %). In both, CI and IP groups, *Giardia intestinalis* and *Entamoeba coli* were the most prevalent protozoan and *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides* the most prevalent helminths.

#### Characteristics of the studied groups

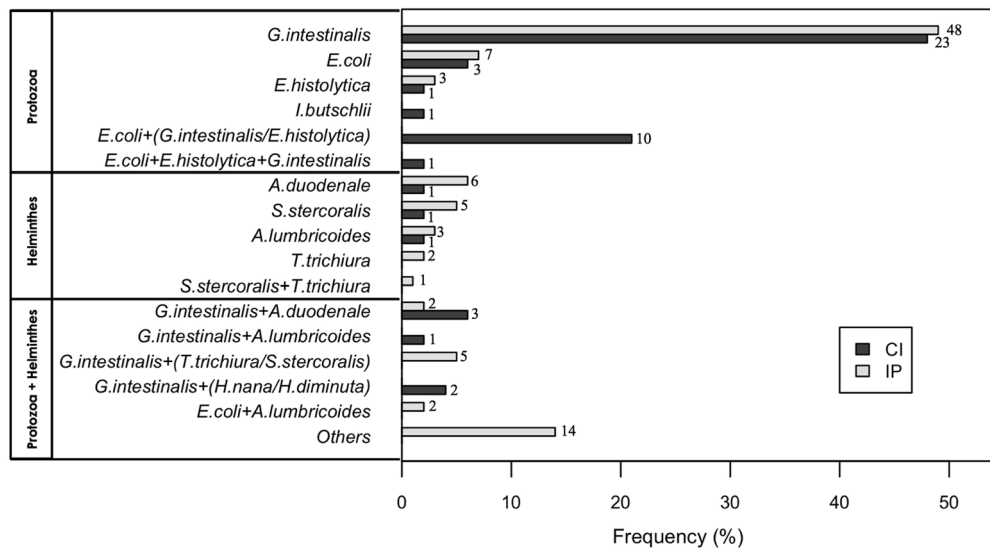
Table 2 summarizes the characteristics of the studied groups. Male were overrepresented in the M and CI groups and no differences were observed in the median age between all groups. Comparing M and CI groups, there were no differences in age, time since last malaria episode (LME) and eosinophils count. Anaemia was

more prevalent in individuals from malaria and co-infected groups than in IP and N. Additionally, IP and N groups were similar and differed from M and CI in LME, and both groups presented higher eosinophils counts.

#### Specific IgG antibody responses to *Plasmodium vivax* AMA-1 and MSP-1<sub>19</sub>

The percentage of individuals containing naturally acquired IgG antibodies against PvAMA-1 and PvMSP-1<sub>19</sub> is presented in Fig. 2. IgG antibodies to PvAMA-1 and/or PvMSP-1<sub>19</sub> were detected in 74 % of the population. The prevalence of individuals that recognize both proteins (55 %) was higher than those that recognize a single protein (8 % PvAMA-1 and 11 % PvMSP-1<sub>19</sub>). To determine whether the presence of co-infection was associated with impaired IgG responses, the prevalence of specific IgG directed to PvAMA-1 and PvMSP-1<sub>19</sub> between groups were compared (Fig. 3). The prevalence of specific IgG was similar for both proteins in all four groups and among the groups, the lowest prevalence was in IP. The M group presented the highest frequency of IgG responders as compared to uninfected, and no appreciable differences were observed between M and CI groups (Fig. 3a, c). When plasma levels from individual serum samples were compared, the RI values obtained for the recombinant protein PvAMA-1 were not significantly higher than the values obtained for PvMSP-1<sub>19</sub> (Fig. 3b, d). However, the RIs were lower in IP group for both proteins.

Results in Fig. 4 show the prevalence and reactivity index of IgG response specific to PvAMA-1 and PvMSP-1 in the groups CI and IP among individuals infected with helminths (H), protozoa (P) and both protozoa and helminths (PH). There was no significant changes in the prevalence and RI of antibody to PvAMA-1 (Fig. 4a) and PvMSP-1 (Fig. 4b) in CI and IP groups when individuals infected with H, P and PH were compared in each



**Fig. 1** Prevalence of intestinal parasites among individuals co-infected with *Plasmodium* and intestinal parasites (CI) and individuals infected with intestinal parasites only (IP) in the studied population. *Black bars* indicate the frequency of intestinal parasite species in CI group and *grey bars* indicate the frequency of intestinal parasites in the IP group. Y axis illustrates the species corresponding to infections with Protozoa, Helminths and Protozoa + Helminths. *Numbers on top of bars* indicate number of individuals infected with each species of protozoa and helminths

**Table 2** Characteristic of the studied groups

	Malaria (+) N = 64		Malaria (-) N = 215	
	Malaria (M) <sup>a</sup> N = 16	Co-infected (CI) <sup>b</sup> N = 48	Intestinal parasite (IP) <sup>c</sup> N = 98	Negative (N) <sup>d</sup> N = 117
Gender N (%)				
M	11 (69)	34 (71)	49 (50)	55 (47)
F	5 (31)	14 (29)	49 (50)	62 (53)
Age (years)	24 (21–33)	31 (22–41)	30 (14–43)	31 (15–39)
Parasitaemia (parasites/ $\mu$ L)	2740 (738.5–56)	1816 (641–57)	(-)	(-)
LME (months)	6 (0–66)	3 (0–16)	24 (6–60)	10.5 (1–36)
Anemia (%)	56.2	43.7	28 <sup>a*</sup>	23 <sup>a*b*</sup>
Eosinophils (cells/ $\text{mm}^3$ )	73 (36.75–138.75)	104 (42.5–328.5)	328 (185–72) <sup>a***b***</sup>	224 (146–44) <sup>a**b*</sup>

All the values in the table represent the median (25–75 %) of the data

Differences between groups were calculated from pairwise test for multiple comparisons of mean rank sums (Nemenyi-Tests)

Differences of parasitaemia between co-infected and malaria group were calculated using Wilcoxon, a non-parametric t test

LME time since last malaria episode

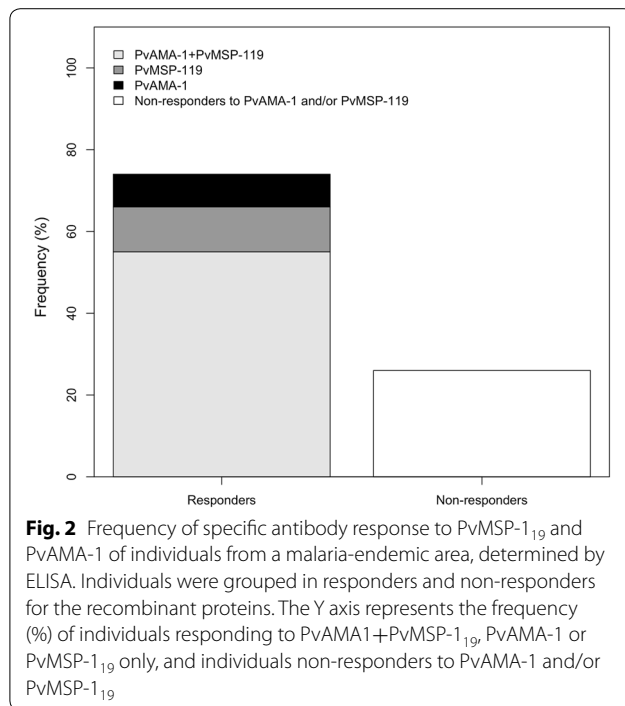
Statistical differences of epidemiological parameters were expressed as \* P < 0.05, \*\* P < 0.001, \*\*\* P < 0.0001

<sup>a</sup> Differences between indicated group and M group

<sup>b</sup> Differences between indicated group and CI group

group. However, IgG response to both PvAMA-1 and PvMSP-1 were lower in individuals with protozoa in the Intestinal parasites group when compared to Co-infected group. Similar results were also observed when the reactivity index were compared between the same groups. Although in some groups the sample size were small after

stratification in H, P and HP, the group of individuals with P in both CI and IP groups seemed to be comparable. In the group Intestinal parasites, individuals infected with protozoa (P) also presented lower antibodies prevalence and RI to PvAMA-1 and PvMSP-1 than the group Malaria (p < 0.001 for PvAMA-1 and Pv-MSP-1) and



negative ( $p < 0.01$  for PvAMA-1 and PvMSP-1). In contrast, no differences were observed in prevalence and RI of antibodies to PvAMA-1 and PvMSP-1 between co-infected group infected with P and Malaria or Negative groups.

#### Comparison of IgG subclasses to *Plasmodium vivax* PvAMA-1 and PvMSP-1<sub>19</sub>

Since the IgG subclass produced in response to a given antigen may determine the function of the antibody, plasma samples positive for total anti-PvAMA-1 and anti-PvMSP-1 IgG were evaluated for IgG sub-class responses. Among the IgG responders, the cytophilic sub-class IgG1 and IgG3 were predominant in all groups for PvAMA-1 and IgG1, IgG3 and IgG4 for PvMSP-1<sub>19</sub>. In the case of non-cytophilic antibodies to PvAMA-1, IgG2 was significantly higher in IP and N group when compared to M and CI, while IgG4 was higher in IP group (Fig. 5a, c). No differences were observed in the prevalence of non-cytophilic antibodies specific to PvMSP-1<sub>19</sub> among the groups. RIs of specific IgG subclasses were also measured and increased IgG1 followed by IgG3 were detected for both proteins in all groups (Fig. 5b, d). In contrast, although IgG2 and IgG4 were frequent in the groups, their RI was low or similar for both proteins in all groups. However, RI of IgG2 to AMA-1 was significantly higher in IP when compared to CI group while IgG4 was higher in IP when compared to N and CI

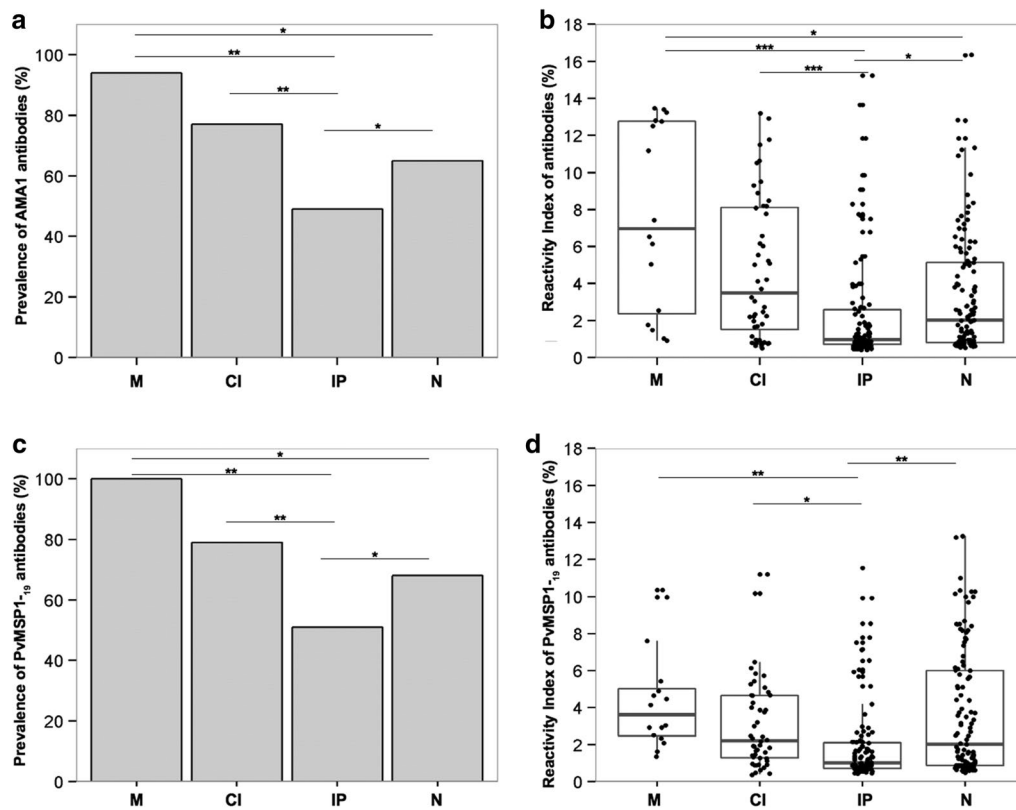
groups. Moreover, IgG1 RI to MSP-1 was significantly lower in IP group than in N group.

#### Discussion

Although some studies have explored the influence of helminth co-infections on antibody production directed to *P. falciparum* antigens [21, 25, 39, 40], this is the first study to evaluate the influence of intestinal parasites on the acquired specific humoral immune responses to *P. vivax* malaria antigens [21, 24, 25, 39]. The present results show that in malaria-endemic area of Rondonia State, the prevalence of individuals singly infected with intestinal parasites (52.3 %) and co-infected with malaria and intestinal parasites (17.2 %) was higher than that singly infected with malaria (5.7 %). Some epidemiological studies have demonstrated an increased risk of infection by *P. falciparum* in those individuals co-infected with helminths but the results were conflicting [3, 6, 27, 40]. However, in the present study helminth infection was not predominant, the protozoan *Giardia intestinalis* alone or associated with other parasites was the most prevalent parasite in IP and CI groups, and *P. vivax* was the predominant *Plasmodium* species. Studies reporting the prevalence of co-infection in malaria-endemic areas of Brazil are scarce but a high prevalence of intestinal parasites has been reported in several areas of the Brazilian Amazon [27–29]. Although the prevalence of intestinal parasites was significantly higher in individuals infected with malaria, parasitaemia did not differ between co-infected and malaria-infected individuals. On the other hand, anaemia was frequent in both groups and increased numbers of eosinophils were observed in individuals with intestinal parasites and in the uninfected group. It seems that the haematological alteration observed in both malaria and co-infected groups is due to the effect of malaria, rather than intestinal parasites or co-infection. Indeed, anaemia is a common feature of acute malaria while increased number of eosinophils is common in helminths infections [41].

The study of antibody responses to *Plasmodium* antigens is a key process to the discovery and development of malaria vaccines. Several studies report high antibody response to *P. vivax* antigens in individuals exposed to malaria infection [42–44]. In malaria-endemic areas of Brazil, high prevalences of antibodies specific to *P. vivax* circumsporozoite protein [45], PvMSP-1 [46], MSP-9 [47], and PvAMA-1 [44] have been reported. In the present study, 73.8 % of individuals presented antibodies for at least one of the two studied proteins, indicating that both proteins are immunogenic. These values are comparable to other studies in the Amazon region [44, 46, 48, 49]. Higher prevalences and RI of specific antibodies

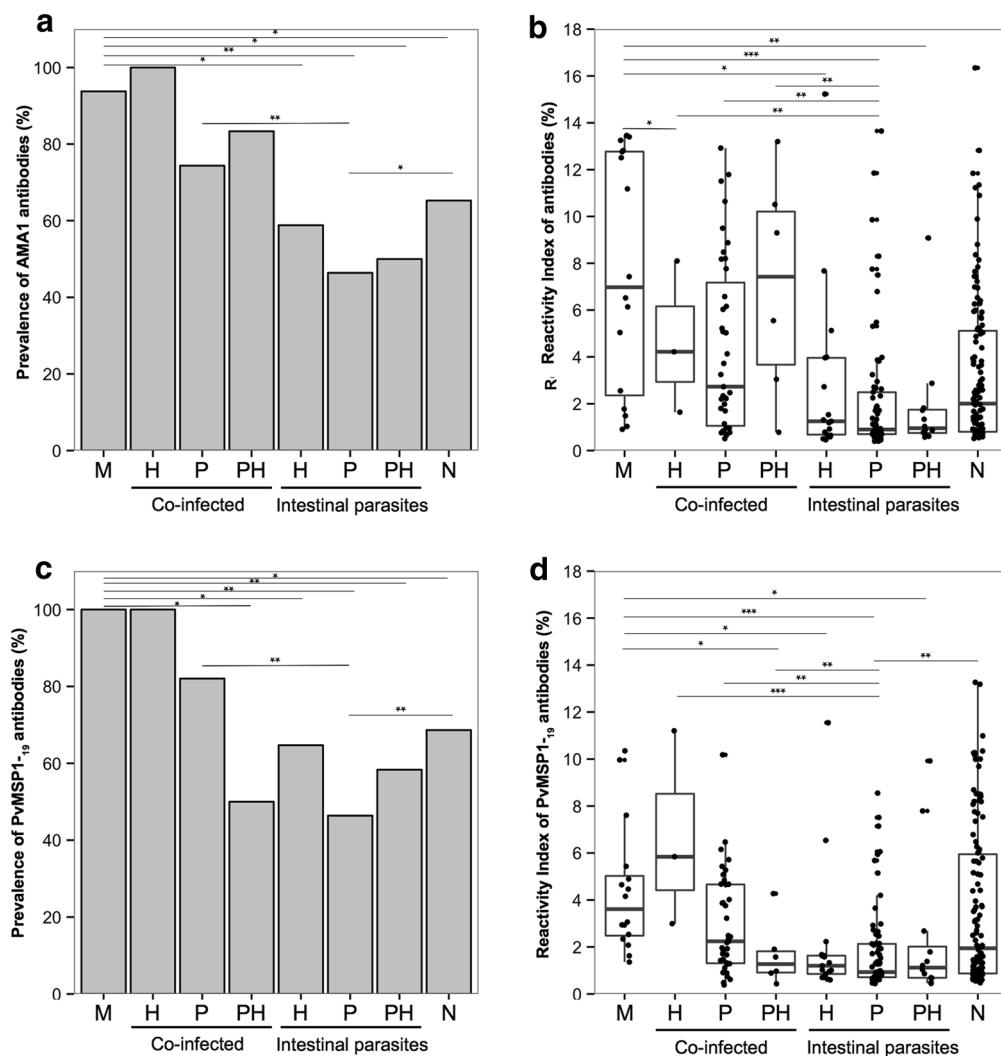




**Fig. 3** Prevalence and reactivity index of IgG antibodies to *P. vivax* AMA1 and MSP-1<sub>19</sub> recombinant antigens. *M* individuals infected with *Plasmodium* only, *CI* individuals co-infected with *Plasmodium* and intestinal parasites, *IP* individuals infected with intestinal parasites only and *N* negative for both malaria and intestinal parasites. **a** Prevalence of PvAMA-1 IgG in *M*, *CI*, *IP* and *N* groups. **b** IgG Reactivity Index for PvAMA-1 among *M*, *CI*, *IP* and *N* groups. **c** Prevalence of PvMSP-1<sub>19</sub> IgG in *M*, *CI*, *IP* and *N* groups. **d** IgG Reactivity Index for PvMSP-1<sub>19</sub> among *M*, *CI*, *IP* and *N* groups. In **b** and **d** panels, the horizontal bolded-bar in the Box and whisker plot represents the median value and all individual data points are shown as dots. Whiskers extend  $\times 1.5$  of the interquartile range or to the minimum/maximum value, when these fall within  $\times 1.5$  of the interquartile range. Differences of reactivity index values were calculated from pairwise test for multiple comparisons of mean rank sums (Nemenyi-Tests) and all differences of prevalence between groups were calculated using  $\chi^2$  with Yates correction. Significant statistical differences are represented in the bars and the level of significance expressed as \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$

were observed in the groups of individuals with patent *P. vivax* infection (groups *M* and *CI*) reaching almost 100 % in the group of individuals singly infected with malaria (*M* group). This confirms that PvAMA-1 and PvMSP-1<sub>19</sub> are immunogenic molecules during natural malaria infections and that the presence of intestinal parasites does not interfere in the antibody response to both antigens. However, it cannot be ignored the reduced IgG prevalence and RI to both proteins in the group of individuals singly infected with intestinal parasites (*IP*), even when compared with the Negative Group. These results cannot be compared to those that reported reduced levels of IgG directed to *P. falciparum* antigens in helminths and *P. falciparum* co-infection, since helminth infections counted for only 19.7 % of the intestinal parasites detected in *IP* and 29.6 % in *CI* groups [21, 24]. On the other hand, Protozoa were the most prevalent

intestinal parasites in the *IP* (70 %) and *CI* (80 %) and reduced antibodies prevalence and reactivity index in the *IP* group could be due to the presence of intestinal protozoa. However, in the group *CI*, the IgG prevalence and reactivity indexed were not reduced and were similar to the group infected with malaria only (*M*). In the *CI* group, the effect of intestinal protozoa might not be relevant when compared to the effect of *Plasmodium* in the immune response. It seems that *Plasmodium* have some effect on intestinal protozoa and not the contrary since lower antibodies response is only observed in *IP* group. Chronic protozoan infections have previously been suggested to be associated with type 1-regulatory immune response and combined with the induced pro-inflammatory response induced by the *Plasmodium* could balance the anti-inflammatory effect of the response [50]. Studies on malaria and protozoan co-infections are rare and

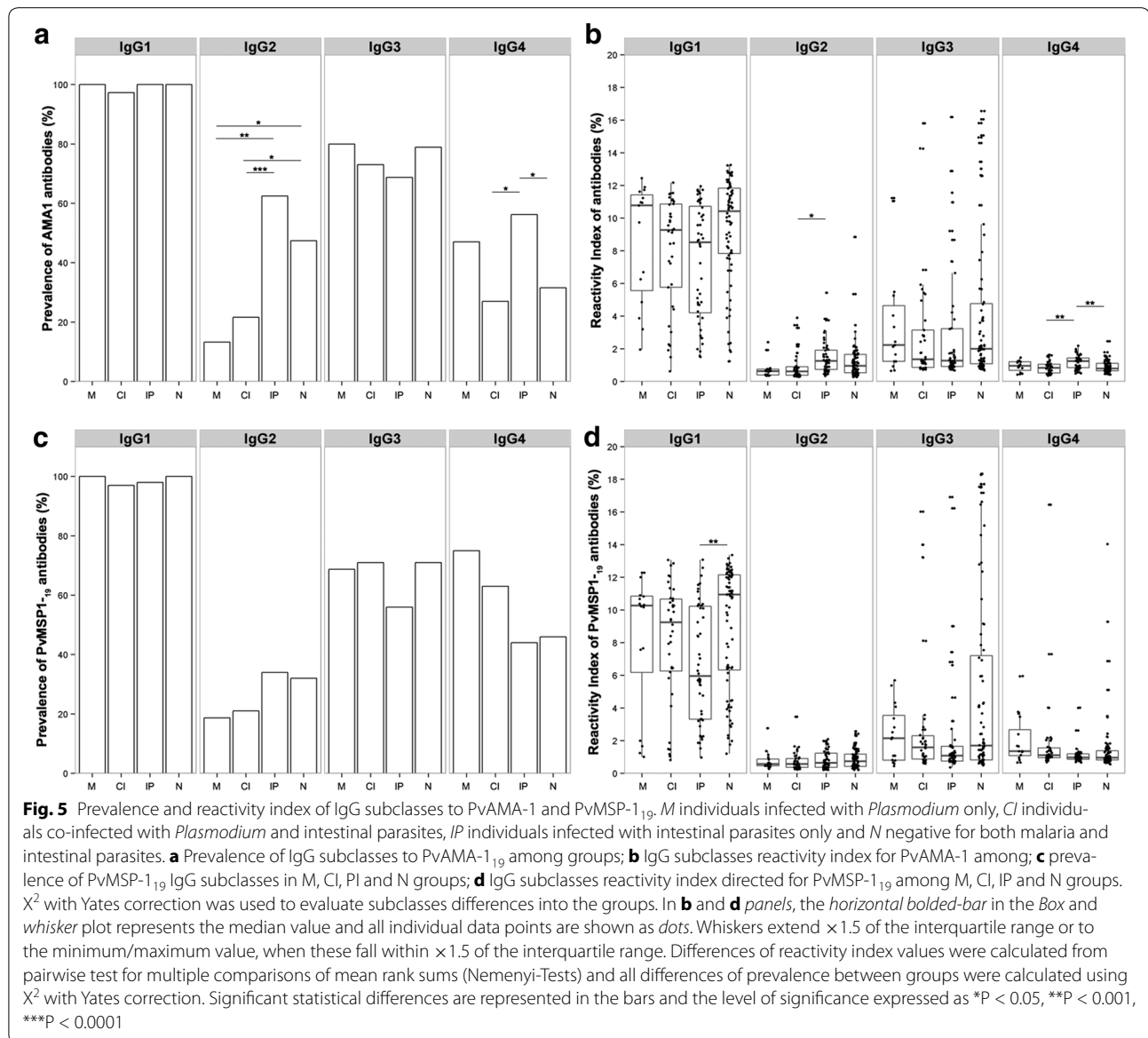


**Fig. 4** Prevalence and reactivity index of IgG antibodies to PvAMA-1 and PvMSP-1<sub>19</sub> in the group of individuals co-infected with malaria and intestinal parasites (CI) and infected with intestinal parasites only (IP) according to intestinal parasite infection. *H* individuals infected with helminths, *P* individuals infected with protozoa, *PH* individuals infected with protozoa + helminths. **a** Prevalence of PvAMA-1 IgG in CI and IP groups among *H*, *P* and *PH* infected individuals; **b** IgG reactivity index for PvAMA-1 in CI and IP groups among *H*, *P* and *PH* infected individuals; **c** Prevalence of PvMSP-1<sub>19</sub> IgG in CI and IP groups among *H*, *P* and *PH* infected individuals; **d** IgG Reactivity Index for PvMSP-1<sub>19</sub> in CI and IP groups among *H*, *P* and *PH* infected individuals. In **b** and **d** panels, the horizontal bolded-bar in the Box and whisker plot represents the median value and all individual data points are shown as dots. Whiskers extend  $\times 1.5$  of the interquartile range or to the minimum/maximum value, when these fall within  $\times 1.5$  of the interquartile range. Differences of reactivity index values were calculated from pairwise test for multiple comparisons of mean rank sums (Nemenyi-Tests) and all differences of prevalence between groups were calculated using  $\chi^2$  with Yates correction. Significant statistical differences are represented in the bars and the level of significance expressed as \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$

the effect of intestinal protozoa on malaria infections or the contrary it is unknown.

Analysis of IgG isotypes response to PvAMA-1 and PvMSP-1<sub>19</sub> antigens is important for evaluating protective activity as IgG subclasses differ in their immune effector functions and having such knowledge is important for understanding the immunity to vaccine development. The results of the present study confirmed studies that showed IgG1 and IgG3 isotypes, previously

identified as protective to malaria, were the predominant subclasses in response to both antigens in all groups [44, 46, 51]. Therefore, the presence of intestinal parasites in malaria-infected individuals does not seem to alter the cytophilic and non-cytophilic response to PvAMA-1 and PvMSP-1<sub>19</sub> in malaria and intestinal parasites co-infected individuals. However, in the IP group IgG1 reactivity index to MSP-1 were lower when compared to individuals from N. These results suggest that the presence



of intestinal parasites can induce non-cytophilic antibodies that could counterbalance the production of cytophilic antibodies in IP group. The increased prevalence observed for non-cytophilic IgG2 response to PvAMA-1 in IP group does not seem to be due to intestinal parasites since N group also presented increased IgG2. In this group IgG4 RI to AMA-1 were also increased when compared to CI and N groups. Studies that investigate malaria and helminths co-infection reported a decrease of cytophilic IgG1 and IgG3 responses to MSP-1 and an increase in non-cytophilic IgG4 response to MSP-3 in individuals infected by *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichuris trichiura* and *Hymenolepis nana* [52]. Similarly, a generalized decrease in cytophilic IgG directed to both GLURP, MSP-3, AMA-1, MSP-1, and

MSP-2 and a significant negative association between *Schistosoma* infection and IgG1 and IgG3 directed to anti-malarial total extract was reported in individuals infected with *Schistosoma haematobium* and malaria [24]. In contrast, an increased IgG1 to MSP-1 response as well as IgG1 and IgG3 to total extract in malaria and *Schistosoma haematobium* co-infection was also reported [21]. Although protozoa infection was predominant in the present study, it is generally believed that in helminth infection the type 2 T helper (Th2) response induced by helminths could alter the natural immune response of the host to *Plasmodium*, due to the anti-inflammatory effect of cytokines induced by helminths. However, the cytokine profile of this population have been published and for malaria-infected individuals (M

and CI groups) the profile showed high levels of IL-1, IL-6, TNF, IL-10, and CRP and decreased levels of IL-17A while for malaria-negative individuals (IP and N) the profile was high levels of IL-17A, NO and decreased levels of IL-10 and CRP [20]. Therefore, it seems that intestinal parasites co-infection (mainly protozoan) does not influence the plasmatic cytokine levels of acute malaria-infected individuals.

## Conclusions

The presence of antibody responses to both *P. vivax* AMA-1 and MSP-1 proteins in all groups indicated that the participants had been exposed to malaria infection and the IgG subclass responses were largely in agreement with previously published results. Although in the present work there were changes in total IgG directed to PvAMA1 and PvMSP-1<sub>19</sub> in Intestinal parasites group, a decrease in IgG and in cytophilic responses associated to co-infections was not observed. These responses might perhaps relate to other factors such as antigen properties, number and time of exposure, host age and genetic determinants. Further studies should be conducted to determine the effect of intestinal protozoa in the immune response to malaria antigens.

## Authors' contributions

JOF conceived and supervised the study. JOF and DMB designed the study. Fieldwork and sample collection was performed by JOF, JCSA, JCLJ, DSPS, MPAV, JRN, CJLA, and DMB; JCSA, MMF, VAP, and JCSA carried out the experiments. MMR and ISS produced the recombinant proteins. Data were collected and analysed by JCSA and MMF with support from JOF. The first draft of this manuscript was written by JCSA and MMF; JOF critically read and advised on the manuscript. All authors read and approved the final version and agreed to the submission. All authors read and approved the final manuscript.

## Author details

<sup>1</sup> Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>2</sup> Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, Brazil. <sup>3</sup> Laboratório de Imunodiagnóstico, Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>4</sup> Laboratório de Simulídeos e Oncocercose, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>5</sup> Instituto de Gastroenterologia de Goiânia, Goiânia, Goiás, Brazil. <sup>6</sup> Agência de Vigilância em Saúde da Secretaria de Estado da Saúde - AGEVISA, Rondonia, Brazil. <sup>7</sup> Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCMol), Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil. <sup>8</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

## Acknowledgements

The authors are in debt to the individuals who participated in this study, the Secretary of Health and Laboratory Central (LACEN) of Rondonia, the local malaria control team in Joana D'Arc settlement for their logistic support and the Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) for overall support. This work was supported by PRONEX Malaria network funded by the Brazilian Ministry of Science and Technology (MCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil). PROEP, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Brazil). JOF is recipient of a Research Productivity Fellowship from CNPq, JCSA is recipient of a fellowship from Instituto Oswaldo Cruz and VAR, MM from CNPq.

## Competing interests

The authors have declared that they have no competing interests.

Received: 14 April 2015 Accepted: 29 October 2015

Published online: 06 November 2015

## References

- Griffiths EC, Pedersen AB, Fenton A, Petchey OL. The nature and consequences of coinfection in humans. *J Infect*. 2011;63:200–6.
- WHO. Control of tropical disease. Geneva: World Health Organization; 1998.
- Nacher M, Gay F, Singhasivanon P, Krudsood S, Treeprasertsuk S, Mazier D, et al. *Ascaris lumbricoides* infection is associated with protection from cerebral malaria. *Parasite Immunol*. 2000;22:107–13.
- Brutus L, Watier L, Hanitrasoamampionona V, Razanatsoarilala H, Cot M. Confirmation of the protective effect of *Ascaris lumbricoides* on *Plasmodium falciparum* infection: results of a randomized trial in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:1091–5.
- Lemaitre M, Watier L, Briand V, Garcia A, Le Hesran JY, Cot M. Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: additional evidence of the protective effect of Schistosomiasis on malaria in Senegalese children. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90:329–34.
- Lyke KE, Dicko A, Dabo A, Sangare L, Kone A, Coulibaly D, et al. Association of *Schistosoma haematobium* infection with protection against acute *Plasmodium falciparum* malaria in Malian children. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73:1124–30.
- Nacher M, Singhasivanon P, Yimsamran S, Manibunyong W, Thanayanich N, Wuthisen R, et al. Intestinal helminth infections are associated with increased incidence of *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *J Parasitol*. 2002;88:55–8.
- Sokhna C, Le Hesran JY, Mbaye PA, Akiana J, Camara P, Diop M, et al. Increase of malaria attacks among children presenting concomitant infection by *Schistosoma mansoni* in Senegal. *Malar J*. 2004;3:43.
- Spiegel A, Tall A, Raphenon G, Trape JF, Druilhe P. Increased frequency of malaria attacks in subjects co-infected by intestinal worms and *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003;97:198–9.
- Shapiro AE, Tukahebwa EM, Kasten J, Clarke SE, Magnussen P, Olsen A, et al. Epidemiology of helminth infections and their relationship to clinical malaria in southwest Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005;99:18–24.
- Ojuronbe O, Adegbayi AM, Bolaji OS, Akindele AA, Adefoye OA, Adeyeba OA. Asymptomatic falciparum malaria and intestinal helminths co-infection among school children in Osogbo, Nigeria. *J Res Med Sci*. 2011;16:680–6.
- Abanyie FA, McCracken C, Kirwan P, Molloy SF, Asaolu SO, Holland CV, et al. *Ascaris* co-infection does not alter malaria-induced anaemia in a cohort of Nigerian preschool children. *Malar J*. 2013;12:1.
- Florey LS, King CH, Van Dyke MK, Muchiri EM, Mungai PL, Zimmerman PA, et al. Partnering parasites: evidence of synergism between heavy *Schistosoma haematobium* and *Plasmodium* species infections in Kenyan children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1723.
- Wang ML, Cao YM, Luo EJ, Zhang Y, Guo YJ. Pre-existing *Schistosoma japonicum* infection alters the immune response to *Plasmodium berghei* infection in C57BL/6 mice. *Malar J*. 2013;12:322.
- Laranjeiras RF, Brant LC, Lima AC, Coelho PM, Braga EM. Reduced protective effect of *Plasmodium berghei* immunization by concurrent *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103:674–7.
- Helmbly H, Kullberg M, Troye-Blomberg M. Altered immune responses in mice with concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* infections. *Infect Immun*. 1998;66:5167–74.
- Saric J, Li JV, Swann JR, Utzinger J, Calvert G, Nicholson JK, et al. Integrated cytokine and metabolic analysis of pathological responses to parasite exposure in rodents. *J Proteome Res*. 2010;9:2255–64.
- Cooper PJ, Espinel I, Wieseman M, Paredes W, Espinel M, Guderian RH, et al. Human onchocerciasis and tetanus vaccination: impact on the postvaccination antitetanus antibody response. *Infect Immun*. 1999;67:5951–7.
- Sabin EA, Araujo MI, Carvalho EM, Pearce EJ. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J Infect Dis*. 1996;173:269–72.
- Sánchez-Arcila JC, Perce-da-Silva Dde S, Vasconcelos MP, Rodrigues-da-Silva RN, Pereira VA, Aprigio CJ, et al. Intestinal parasites coinfection does not alter plasma cytokines profile elicited in acute malaria in subjects from endemic area of Brazil. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:857245.

21. Diallo TO, Remoue F, Gaayeb L, Schacht AM, Charrier N, De Clerck D, et al. Schistosomiasis coinfection in children influences acquired immune response against *Plasmodium falciparum* malaria antigens. *PLoS One*. 2010;5:e12764.
22. Imai N, Rujeni N, Nausch N, Bourke CD, Appleby LJ, Cowan G, et al. Exposure, infection, systemic cytokine levels and antibody responses in young children concurrently exposed to schistosomiasis and malaria. *Parasitology*. 2011;138:1519–33.
23. Sangweme DT, Midzi N, Zinyowera-Mutapuri S, Mduluzi T, Diener-West M, Kumar N. Impact of schistosome infection on *Plasmodium falciparum* Malarimetric indices and immune correlates in school age children in Burma Valley Zimbabwe. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e882.
24. Courtin D, Djilali-Saiah A, Millet J, Soulard V, Gaye O, Migot-Nabias F, et al. Schistosoma haematobium infection affects *Plasmodium falciparum*-specific IgG responses associated with protection against malaria. *Parasite Immunol*. 2011;33:124–31.
25. Mutapi F, Roussillon C, Mduluzi T, Druilhe P. Anti-malaria humoral responses in children exposed to *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:405–9.
26. Mutapi F, Winborn G, Midzi N, Taylor M, Mduluzi T, Maizels RM. Cytokine responses to *Schistosoma haematobium* in a Zimbabwean population: contrasting profiles for IFN-gamma, IL-4, IL-5 and IL-10 with age. *BMC Infect Dis*. 2007;7:139.
27. Melo GC, Reyes-Lecca RC, Vitor-Silva S, Monteiro WM, Martins M, Benzecry SG, et al. Concurrent helminthic infection protects schoolchildren with *Plasmodium vivax* from anemia. *PLoS One*. 2010;5:e11206.
28. de Souza EA, da Silva-Nunes M, Malafrente Rdos S, Muniz PT, Cardoso MA, Ferreira MU. Prevalence and spatial distribution of intestinal parasitic infections in a rural Amazonian settlement, Acre State, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2007;23:427–34.
29. Araujo CF, Fernandez CL. Prevalence of intestinal parasitosis in the city of Eirunepe, Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38:69 (in Portuguese).
30. Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med*. 1990;172:379–82.
31. Bannister LH, Hopkins JM, Dluzewski AR, Margos G, Williams IT, Blackman MJ, et al. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *J Cell Sci*. 2003;116:3825–34.
32. Dutta S, Ware LA, Barbosa A, Ockenhouse CF, Lanar DE. Purification, characterization, and immunogenicity of a disulfide cross-linked *Plasmodium vivax* vaccine candidate antigen, merozoite surface protein 1, expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2001;69:5464–70.
33. Kocken CH, Dubbeld MA, Van Der Wel A, Pronk JT, Waters AP, Langermans JA, et al. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in Macaca mulatta immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. *Infect Immun*. 1999;67:43–9.
34. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 61:315–20.
35. Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine*. 2001;20:385–96.
36. Vicentin EC, Francoso KS, Rocha MV, Iourtov D, Dos Santos FL, Kubrusly FS, et al. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 expressed in *Pichia pastoris* yeast. *Infect Immun*. 2014;82:1296–307.
37. Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2013.
38. Pohlert T. The pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). 2014.
39. Hartgers FC, Obeng BB, Boakye D, Yazdanbakhsh M. Immune responses during helminth-malaria co-infection: a pilot study in Ghanaian school children. *Parasitology*. 2008;135:855–60.
40. Nacher M. Severe malaria attack is associated with high prevalence of *Ascaris lumbricoides* infection among children in rural Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005;99:161–3.
41. Meeusen EN, Balic A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol Today*. 2000;16:95–101.
42. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, Scopel KK, Braga EM, Bastos Mda S, Wunderlich G, et al. Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)-1(19) and cumulative exposure to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:943–51.
43. Lima-Junior JC, Jiang J, Rodrigues-da-Silva RN, Banic DM, Tran TM, Ribeiro RY, et al. B cell epitope mapping and characterization of naturally acquired antibodies to the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3alpha (PvMSP-3alpha) in malaria exposed individuals from Brazilian Amazon. *Vaccine*. 2011;29:1801–11.
44. Moraes CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU, Braga EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:582–7.
45. Arruda ME, Zimmerman RH, Souza RM, Oliveira-Ferreira J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:367–71.
46. Soares IS, da Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60:357–63.
47. Lima-Junior JC, Rodrigues-da-Silva RN, Banic DM, Jiang J, Singh B, Fabricio-Silva GM, et al. Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles on IgG antibody response to the *P. vivax* MSP-1, MSP-3alpha and MSP-9 in individuals from Brazilian endemic area. *PLoS One*. 2012;7:e36419.
48. Barbedo MB, Ricci R, Jimenez MC, Cunha MG, Yazdani SS, Chitnis CE, et al. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:335–9.
49. Rodrigues MH, Rodrigues KM, Oliveira TR, Comodo AN, Rodrigues MM, Kocken CH, et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int J Parasitol*. 2005;35:185–92.
50. Diaz A, Allen JE. Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. *Eur J Immunol*. 2007;37:3319–26.
51. Fernandez-Becerra C, Sanz S, Brucet M, Stanicic DI, Alves FP, Camargo EP, et al. Naturally-acquired humoral immune responses against the N- and C-termini of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay. *Malar J*. 2010;9:29.
52. Roussillon C, Brasseur P, Agnamey P, Perignon JL, Druilhe P. Understanding human-*Plasmodium falciparum* immune interactions uncovers the immunological role of worms. *PLoS One*. 2010;5:e9309.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

