

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO EPSTEIN-BARR VÍRUS NA MALÁRIA
HUMANA CAUSADA POR *PLASMODIUM VIVAX***

por

Michelle Hallais França Dias

Belo Horizonte

2018

DISSERTAÇÃO MSC - IRR

M. H. França-Dias

2018

MICHELLE HALLAIS FRANÇA DIAS

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO EPSTEIN-BARR VÍRUS NA MALÁRIA
HUMANA CAUSADA POR *PLASMODIUM VIVAX***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências da Saúde do
Instituto René Rachou, como
requisito parcial para obtenção do título
de mestre em Ciências.

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Coorientação: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Belo Horizonte

2018

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

D541i 2018	<p>Dias, Michelle Hallais França Influência da infecção pelo Epstein-Barr vírus na malária humana causada por <i>Plasmodium vivax</i> / Michelle Hallais França Dias. – Belo Horizonte, 2018.</p> <p>xvii, 60 f.: il.; 210 x 297 mm.</p> <p>Bibliografia: f. 68 – 76.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.</p> <p>1. <i>Plasmodium vivax</i> 2. Malária 3. Epstein-Barr vírus. I. Título. II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação). III. Alves de Brito, Cristiana Ferreira (Coorientação).</p>
---------------	---

CDD – 22. ed. – 616.936

MICHELLE HALLAIS FRANÇA DIAS

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO EPSTEIN-BARR VÍRUS NA MALÁRIA
HUMANA CAUSADA POR *PLASMODIUM VIVAX***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências – área de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Banca examinadora

Prof. Dra . Luzia Helena Carvalho (IRR/FIOCRUZ) Presidente
Prof. Dra . Luiza Carvalho Mourão (UFMG)_Titular
Prof. Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado (IRR/FIOCRUZ) Titular
Prof. Dr. Nilton Barnabé Rodrigues (IRR/FIOCRUZ)_Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 23/02/2018.

*A todos que fizeram e fazem parte desta caminhada,
dedico essa vitória.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me mostrar que a fé faz de qualquer obstáculo um degrau, e que assim a vida ganha um propósito.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, pela oportunidade;

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho. Em especial, à CAPES pelo fornecimento da minha bolsa de mestrado e às demais agências CNPq, FAPEMIG e Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP) do CPqRR/FIOCRUZ, pela infraestrutura e recursos.

À Dra. Luzia pela oportunidade, pelos ensinamentos e principalmente por confiar em mim. Obrigada pelo amadurecimento profissional.

À Dra. Cristiana, pela coorientação que foi regada por carinho, atenção e dedicação.

Às Dra^{as}. Flora e Taís pelos conselhos e por toda a ajuda sempre que solicitada. Vocês foram fundamentais.

À minha mãe, amiga, companheira e confidente. Seu apoio e carinho fazem me sentir sempre em paz. Obrigada por estar SEMPRE ao meu lado. Você é meu porto seguro!

Aline minha querida sis, nem preciso dizer o quanto você faz parte disso tudo. Toda sua curiosidade e empolgação deixam qualquer caminhada mais prazerosa.

Ao meu pai, grande amigo e pessoa de enorme coração. Obrigada por todo cuidado sempre!

À minha avó, minha rainha, Maria Helena. Agradeço pela criação, pelo que me ensinou, e pelo que me tornei. Você é minha inspiração diária.

Ao vovô Neu, minha enciclopédia viva, fonte de amor, conhecimento e clareza. Obrigada pelo seu apoio e por amar o que eu faço tanto quanto eu.

Aos meus avós paternos, Têula e Antônio, obrigada pelo amor, e pela dedicação por todo o tempo que passamos juntos. Estão sempre em meu coração.

Ao tio Guingo e tia Joyce, obrigada por cada palavra sábia e por todo o incentivo que sempre me deram. Vocês são maravilhosos.

Tia Taninha, minha madrinha do coração. Obrigada por me apoiar, me acompanhar e por cuidar de mim. Você é muito especial.

Às minhas princesas peludas, Kira, Nina, Lolla e Cléo, obrigada pelo companheirismo e por me mostrarem o verdadeiro significado de amor incondicional.

À minha família, obrigada pelo apoio de cada um de vocês, e por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu sexteto, pela amizade maravilhosa e o companheirismo que nós temos. Eu amo vocês.

À minha querida amiga Flavinha, obrigada por fazer parte desta jornada, e principalmente da minha vida. A biologia me deu você de presente, e você me deu o maior presente do mundo: Gustavo, nosso príncipe.

Dani, amiga querida, nem preciso dizer o quanto agradeço a Deus todos os dias pela nossa amizade. A biologia me deu você também, e além de amigas, somos colegas de profissão e de vida.

À Bia, de companheira de laboratório à grande amiga. A vida realmente sabe o que faz, e colocou você no meu caminho de repente, e para ficar!

Aos meus queridos amigos Felipe, Gaby, João Paulo, Bruno e Pedro. Obrigada pela amizade de vocês em todos os momentos, bons ou ruins. Vocês são demais.

Aos amigos que a Fiocruz me deu Raianna, Daniel, Jéssica, Bárbara, Letícia, Mika, Ana Carol, Gabriel Tonelli. Obrigada pelo companheirismo, pelo carinho, pela ajuda no dia a dia e pelos momentos maravilhosos dentro e fora do trabalho.

À minha coorientadora e amiga Marina, obrigada pelos ensinamentos, pelo carinho e pela paciência. Você é minha inspiração.

Ao Armando, pela amizade, carinho e todo ensinamento. Obrigada por tudo.

Aos integrantes do Laboratório de Malária, em especial à Camila, Denise e Daniele que foram importantes nesta jornada. Vocês me ensinaram mais do que podem imaginar! Muito obrigada!

*“O homem não procura se elevar acima do homem,
mas acima de si mesmo, aperfeiçoando-se”.*

(Allan Kardec)

RESUMO

Em crianças africanas está bem estabelecida que a exposição ao vírus Epstein-Barr (EBV) e à malária por *Plasmodium falciparum* é um importante fator de risco no desenvolvimento do linfoma de Burkitt endêmico (eBL). Embora o eBL não esteja associado ao *P. vivax*, não se sabe se o EBV poderia influenciar na morbidade da malária causada por este parasito. Considerando que *P. vivax* é a espécie de plasmódio mais prevalente na Amazônia brasileira, buscou-se aqui investigar se a infecção por EBV pode influenciar na morbidade e / ou no desenvolvimento de uma resposta imune específica contra o *P. vivax*. Para isso, o estudo focou em dois grupos distintos: (i) indivíduos com infecção aguda por *P. vivax* (n=154) que procuraram atendimento em centros de referência para malária na região amazônica; esses indivíduos foram esporadicamente expostos à transmissão da malária; (ii) indivíduos com longa exposição à malária na região amazônica (n = 541) no assentamento agrícola de Rio Pardo (Amazonas, Brasil). A comunidade Rio Pardo incluiu indivíduos infectados (n = 38) e não infectados (n = 503) por *P. vivax*. Depois de configurar o melhor protocolo para amplificar o gene BALF-5 de diferentes amostras biológicas, as amostras de DNA de todos os voluntários foram amplificadas a partir do sangue total periférico utilizando o protocolo descrito por Reynaldi e colegas (2016). Em conjunto, os resultados demonstraram que: (1) a frequência de EBV_{DNA} variou entre os dois grupos estudados, com o vírus detectado em 6% (9 de 154) dos indivíduos esporadicamente expostos e em 17% (90 de 541) de longa exposição – residentes na Amazônia. Embora o motivo dessa diferença seja desconhecido, é possível que a exposição contínua à transmissão da malária (mediana de 21 anos) possa ter contribuído; (2) na infecção aguda por malária, a positividade para EBV foi associada a parâmetros hematológicos alterados, incluindo baixos níveis de hemoglobina, hematócrito e plaquetas. Embora no grupo dos indivíduos esporadicamente expostos à transmissão não tenha sido encontrada associação entre EBV_{DNA} e sintomas clínicos relacionados à malária, uma associação positiva foi encontrada para o grupo com história de longa exposição. Neste grupo, a associação entre EBV_{DNA} e sintomas foi independentemente da presença de infecção malárica; finalmente (3) a detecção de DNA viral parece ter influenciado, negativamente ou positivamente, na resposta de anticorpos naturalmente adquiridos contra diferentes proteínas do estágio sanguíneo do *P. vivax* (PvDBP II e PvAMA1, respectivamente). Em conclusão, em um estudo de prova de conceito, demonstrou-se pela primeira vez que a infecção por EBV pode influenciar na morbidade e imunidade ao *P. vivax*. Estudos futuros fazem-se necessários para validar os resultados aqui encontrados em diferentes populações de áreas endêmicas, incluindo indivíduos com malária grave por *P. vivax*.

Palavras-chaves: *Plasmodium vivax*, Malária, Epstein-Barr vírus

ABSTRACT

In African children it has long been recognized that exposure to both Epstein-Barr virus (EBV) and *Plasmodium falciparum* malaria is a major risk factor in the development of endemic Burkitt lymphoma (eBL). Although eBL is not associated with *P. vivax* malaria, it is unclear whether the EBV can influence *P. vivax* morbidity. Considering that *P. vivax* is the most prevalent malaria species in the Brazilian Amazon area, we sought to investigate whether EBV infection may influence *P. vivax* morbidity and/or the development of a specific immune response against the parasite. For that, the study focused on two major groups: (i) acute *P. vivax* infection, consisting of 154 individuals who sought care at malaria reference centers in the Amazon area; these individuals were sporadically exposed to malaria transmission; and (ii) individuals with long-term exposure to malaria in the Amazon region (n=541) living in the agricultural settlement of Rio Pardo (Amazonas, Brazil). Rio Pardo community included *P. vivax* infected (n=38) and not infected (n= 503) individuals. After determination of the best protocol to amplify EBV BALF-5 gene from different biological samples, DNA samples from all volunteers were amplified from peripheral whole blood using the protocol described by Reynaldi and colleagues (2016). Taken together the results demonstrated that: (1) the frequency of EBV_{DNA} varied between the two groups studied, with virus been detected in 6% (9 out of 154) of sporadically exposed individuals and in 17% (90 out of 541) of long-term Amazonian residents. Although the reason for the difference in positivity between groups is unclear, it is possible the continuous exposure to malaria transmission in Rio Pardo (median 21 years) may have contributed to higher virus detection; (2) in malaria acute infection, the positivity for EBV was associated with an alteration of hematological parameters, including low levels of hemoglobin, hematocrit, and platelets. While no association between EBV_{DNA} and malaria-related clinical symptoms was found in sporadically exposed individuals, a positive association between EBV_{DNA} and clinical symptoms was detected in the Amazon long-term residents, regardless the presence of acute malaria infection; finally (3) the detection of viral DNA seems to influence, positively or negatively, on the long-term acquired antibody responses to different blood stage *P. vivax* proteins (PvDBP11 and PvAMA1, respectively). In conclusion, in a prove-of-concept study, we demonstrated for the first time that EBV infection may influences on *P. vivax* morbidity and immunity. Future studies should include population of different endemic areas and individuals harboring severe *P. vivax* disease.

Key-words: *Plasmodium vivax*, Malária, Epstein-Barr vírus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Países endêmicos para malária entre os anos de 2000 e 2016.....	19
Figura 2. Distribuição de casos de malária no Brasil, em função dos níveis de transmissão	21
Figura 3. Casos de malária notificados, 2000-2016	22
Figura 4. Mapa do estado do Amazonas, região noroeste do Brasil, mostrando a localização do assentamento agrícola de Rio Pardo (representado pelo triângulo preto), dentro da municipalidade de Presidente Figueiredo, localizado a aproximadamente 160 km de Manaus	37
Figura 5. Representação gráfica ilustrando a amplificação do DNA molde de Epstein-Barr vírus a partir do protocolo molecular de qPCR descrito por Masakhwe, sendo CP-EBV o DNA controle positivo, e CN-EBV o controle negativo.....	47
Figura 6. Representação gráfica ilustrando a amplificação do DNA molde de Epstein-Barr vírus a partir do protocolo molecular de qPCR originalmente descrito por Moormann e adaptado por Reynaldi em 2016	48
Figura 7: Frequência da amplificação do gene constitutivo ABO como controle de extração de DNA total em 10 amostras controles positivos para o EBV.....	49
Figura 8: Frequência de amplificação por PCR em tempo real, do EBV _{DNA} em 10 amostras controles positivos.....	50
Figura 9: Frequência dos principais sintomas associados à malária (calafrio, cefaleia e mialgia) em indivíduos com malária aguda, na presença e ausência de DNA de Epstein – Barr vírus.....	51
Figura 10: Níveis de hemoglobina em pacientes com malária aguda por <i>P. vivax</i> na presença e ausência de DNA de Epstein – Barr vírus (EBV _{DNA}) detectado no sangue circulante	52
Figura 11: Níveis de hemoglobina em pacientes com malária aguda por <i>P. vivax</i> na presença e ausência de DNA de Epstein – Barr vírus (EBV _{DNA}) detectado no sangue circulante; (A) Indivíduos do sexo feminino;(B) Indivíduos do sexo masculino.....	53
Figura 12: Níveis de hematócrito em pacientes com malária aguda por <i>P. vivax</i> na presença e ausência de DNA de Epstein – Barr vírus (EBV _{DNA}) detectado no sangue circulante.....	54
Figura 13: Níveis de plaquetas em pacientes com malária aguda por <i>P. vivax</i> (n=154) na presença e ausência de DNA de Epstein – Barr vírus (EBV _{DNA}) detectado no sangue circulante	55

Figura 14: Frequência dos principais sintomas de malária (calafrio, cefaleia e mialgia) em indivíduos com malária aguda por <i>P. vivax</i>	56
Figura 15: Frequência dos principais sintomas associados malária (calafrio, cefaleia e mialgia) em indivíduos com histórico de longa-exposição	57
Figura 16: Perfil de resposta de anticorpos IgG antígeno específicos em indivíduos com histórico de longa exposição à malária (Rio Pardo, AM)	59
Figura 17: Índice de reatividade para PvAMA1 em indivíduos com histórico de longa exposição à malária (Rio Pardo, AM) na presença e ausência de DNA de Epstein – Barr vírus (EBV _{DNA}) detectado no sangue circulante	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos, clínicos, epidemiológicos e hematológicos dos 154 indivíduos com malária aguda por <i>P. vivax</i> diagnosticados em serviços de referência para malária em Cuiabá (MT), Manaus (AM) e/ou Porto Velho (Ro).....	35
Tabela 2. Parâmetros e sistema de pontuações utilizados para o cálculo do escore clínico.....	36
Tabela 3. Resumo dos dados demográficos, clínicos epidemiológicos e imunológicos dos 541 indivíduos com história de longa exposição ao <i>P. vivax</i> , residentes na comunidade de Rio Pardo, Amazonas	38
Tabela 4. Resumo das sequências de iniciadores da PCR convencional para amplificação dos genes do sistema ABO.....	44
Tabela 5. Resumo das sequências de iniciadores e sonda da Real-Time PCR para amplificação do gene de Epstein-Barr vírus.....	45
Tabela 6. Perfil de resposta sorológica dos 444 indivíduos de Rio Pardo.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AID - *Activation Induced Cytidine Deaminase* (Citidina Desaminase Induzida por Ativação)

BL – *Burkitt Lymphoma* (Linfoma de Burkitt)

BL - HIV – *Burkitt Lymphoma associated with HIV* (Linfoma de Burkitt associado ao HIV)

CD - *Cluster of differentiation* (Grupamento de diferenciação)

cMyC - *Cardiac myosin binding protection C* (Proteção de ligação à miosina cardíaca C)

DBP_{II} – *Duffy Binding Protein* (Proteína de ligação Duffy – região II)

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

eBL – *Endemic Burkitt Lymphoma* (Linfoma de Burkitt Endêmico)

EBNA – Antígeno Nuclear de Epstein - Barr

EBV – Epstein – Barr vírus

EBVDNA – DNA de Epstein-Barr vírus

EDTA - *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

GP350 – Glicoproteína 350

HIV - *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

MBCs – *Memory B cells* (células B de memória)

PBMC - *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (Células Mononucleares do Sangue Periférico)

PCR – *Polimerease Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PNCM – Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária

PvDBP – *Plasmodium vivax Duffy Binding Protein* (Proteína de ligação Duffy de *Plasmodium vivax*)

PvMSP 1₁₉ – *Plasmodium vivax merozoite surface protein* (Proteína de superfície do merozoíto de *Plasmodium vivax* – porção 19)

PvAMA 1 - *Plasmodium vivax apical membrane antigen 1* (Antígeno 1 de Membrana Apical de *Plasmodium vivax*)

RNA - *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

RNase – Ribonuclease

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Aspectos gerais da malária humana	19
1.1.1 Malária no mundo	19
1.1.2 Malária no Brasil	20
1.1.3 Imunidade naturalmente adquirida na malária	23
1.2 Aspectos patogênicos da malária humana causada por <i>P. vivax</i>	24
1.3 Coinfecções frequentemente associadas à malária	25
1.3.1 Epstein-Barr vírus (EBV) e linfoma de Burkitt endêmico	27
1.3.1.1 Epstein-Barr vírus	27
1.3.1.2 Linfoma de Burkitt (BL) associado ao <i>P. falciparum</i>	28
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4 METODOS	33
4.1 Populações de estudo	33
4.1.1 Indivíduos com malária aguda e sintomática por <i>P. vivax</i>	33
4.1.2 Indivíduos com longa exposição a malária	37
4.2 Obtenção das amostras sanguíneas	38
4.2.1 Obtenção de plasmas e células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	39
4.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos contra proteínas recombinantes de <i>P. vivax</i>	39
4.3.1 Antígenos recombinantes usados no teste de ELISA PvDBP, PvMSP1, PvAMA1).....	40
4.4 Amostras controles para o Epstein-Barr vírus (EBV).....	40
4.5 Padronização do protocolo de extração de DNA viral	40
4.5.1 Extração de DNA a partir de sangue total	41

4.5.2 Extração de DNA a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	41
4.5.3 Extração de DNA a partir de sangue total estocado em papel de filtro	42
4.5.4 Extração de DNA a partir de plasma	43
4.5.5 Amplificação do gene constitutivo do grupo sanguíneo ABO.....	43
4.5.6 Real-Time PCR para detecção do vírus Epstein-Barr	44
4.6 Análise de dados	45
5 RESULTADOS	46
5.1. Padronização dos protocolos de amplificação e extração do Epstein-Barr vírus	46
5.1.1. PCR em tempo real para a amplificação do gene BALF-5 de Epstein- Barr vírus	46
5.1.2 Extração de DNA de Epstein – Barr vírus (EBV _{DNA}) a partir de diferentes amostras biológicas	48
5.2 Positividade para Epstein-Barr vírus influenciando na morbidade na malária vivax	50
5.3 Frequências de infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) em indivíduos com histórico de longa-exposição à malária	55
6 DISCUSSÃO	61
6.1 Amplificação e extração de Epstein-barr vírus no sangue circulante	62
6.1.1 Protocolos para amplificação do DNA viral (EBV _{DNA})	62
6.1.2 Avaliação do desempenho de diferentes amostras para extração e amplificação do DNA viral (EBV _{DNA}) no sangue circulante	63
6.2 Epstein-Barr vírus associado a malária aguda por <i>P. vivax</i>	64
6.3 Influência da infecção pelo Epstein-Barr vírus na resposta imune de indivíduos com história de longa exposição à malária por <i>P. vivax</i> na Amazônia brasileira	66
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da malária humana

1.1.1 Malária no mundo

Considerada endêmica em países tropicais e subtropicais do mundo, a malária ocorre em 91 países e territórios (figura 1), estimando-se em cerca de 216 milhões de casos distribuídos globalmente. Sendo caracterizada como uma doença infecciosa febril aguda, é uma das principais causas de mortalidade e morbidade em crianças abaixo de cinco anos, gestantes e pessoas não imunes (WHO, 2017).

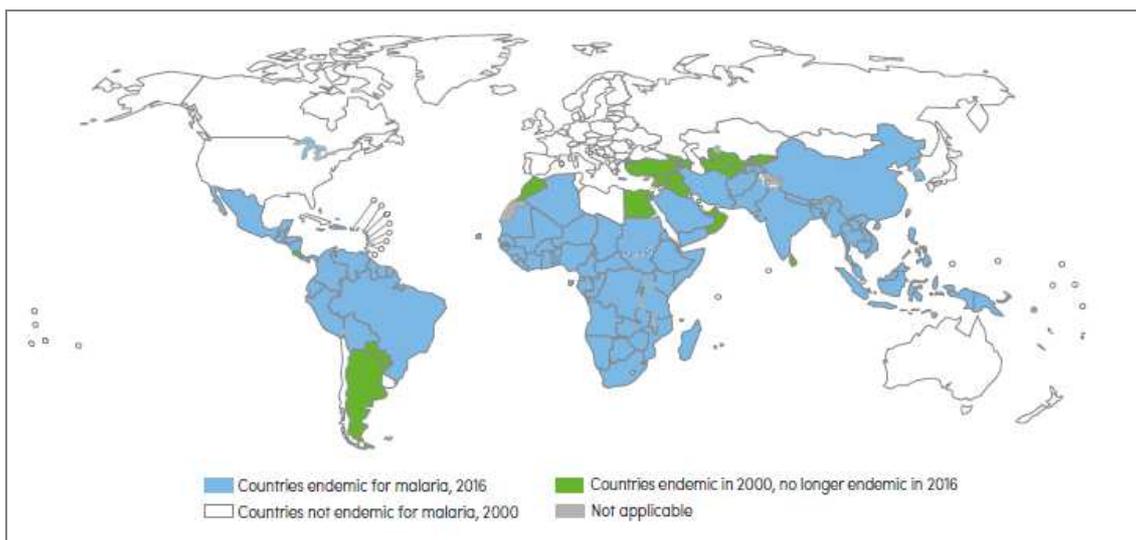


Figura 1. Países endêmicos para malária entre os anos de 2000 e 2016 (World Malaria Report – WHO, 2017).

Plasmodium falciparum, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie*, e *Plasmodium ovale* são as espécies de plasmódios que frequentemente infectam os seres humanos, sendo as duas primeiras as mais importantes do ponto de vista de saúde pública (WHO, 2017). Enquanto o *P. falciparum* é a espécie mais patogênica e prevalente no continente africano, o *P. vivax* é a mais amplamente distribuída, ocorrendo nas Américas, Ásia, Oriente Médio e Oceania (GUERRA, SNOW, & HAY, 2006).

Entre os anos de 2010 e 2016 verificou-se uma redução de aproximadamente 20% na incidência de malária no mundo, com redução significativa na taxa de mortalidade do continente africano, onde a doença é responsável por cerca de 500 mil mortes anuais, principalmente em crianças menores de 5 anos. No último ano, os dados da Organização Mundial de saúde apontaram para a permanência da diminuição no número de casos da doença na região das Américas, com exceção da Venezuela. Esta redução foi resultado dos programas de controle e eliminação da doença, que se basearam em diagnóstico e tratamento precoce (WHO, 2017).

De fato, para atingir a meta global estabelecida pela OMS, de uma redução global de mais de 90% no número de casos até 2030, os investimentos financeiros em programas de controle têm que ser reforçados (PATOUIILLARD E *et al.*, 2017).

1.1.2 Malária no Brasil

Em um contexto nacional, a malária é causada por três espécies de Plasmodium, sendo elas *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, entretanto a maioria dos casos é decorrente de infecção por *P. vivax* (SVS/MS, 2017).

No país, a doença está concentrada na região conhecida como Amazônia legal, que compreende os estados do Acre, Amapá, Amazonas (AM), Maranhão (MA), Mato Grosso (MT), Pará (PA), Rondônia (RO), Roraima (RR) e Tocantins (TO) (Figura 2). Os casos de malária fora da área endêmica são classificados como extra-amazônicos, possuem grande importância devido ao possível diagnóstico tardio, e 80% deles são importados dos estados amazônicos, bem como do continente africano e outros países da América do Sul (GUERRA, SNOW, & HAY, 2006).

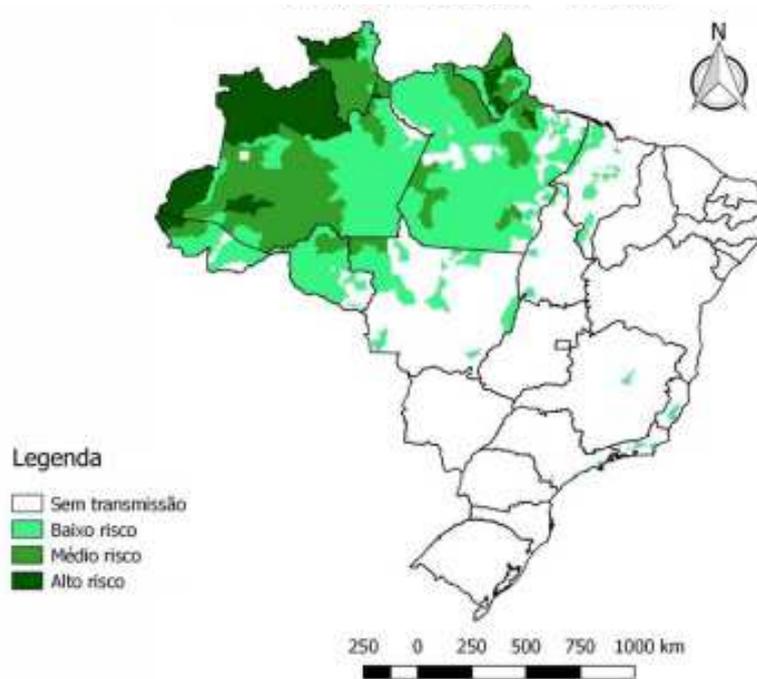


Figura 2. Distribuição de casos de malária no Brasil, em função dos níveis de transmissão (determinado através do índice Parasitário Anual) (PNCM – SVS, 2017).

No último ano cerca de 150 mil casos de malária foram registrados no país, e grande parte destes se encontram na região amazônica (SVS/MS, 2017). A ocupação intensa e desordenada das áreas peri-urbanas, o desmatamento para extração de madeira, criação de gado, agricultura e assentamentos, contribuem fortemente para o agravamento e a manutenção da transmissão de malária nessa região (MARQUES *et al.*, 1986; SVS, 2007; SVS, 2008).

Tratando-se da região extra-amazônica, mesmo sendo considerada área não endêmica para malária, existe risco elevado de transmissão autóctone da doença principalmente devido à presença de mosquitos vetores e do constante fluxo migratório de indivíduos que ocorre entre área endêmica e não endêmica (LORENZ *et al.*, 2015). De grande relevância, existe ainda a transmissão autóctone de malária em áreas de Mata Atlântica (BRASIL *et al.*, 2017) e nessas regiões, os primatas não humanos têm sido mencionados com reservatório da doença, já que os humanos podem de infectar com *P. simium*, parasito semelhante ao *P. vivax* e frequente na região (DE PINA-COSTA *et al.*, 2014).

No Brasil, estratégias do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) fizeram com que o número de casos da doença reduzisse drasticamente nos últimos anos (Figura 3). Apesar disto, o *P. vivax* continua sendo um grande desafio para os programas de controle e eliminação da doença no Brasil. Parte das dificuldades de controlar este parasito se deve as peculiaridades do seu ciclo biológico, incluindo (i) presença de formas latentes no fígado, que são responsáveis por casos de recaídas da doença; (ii) produção precoce de gametócitos, que torna a infecção de mosquitos vetores mais eficiente e (iii) invasão apenas de reticulócitos jovens, levando a baixas parasitemias difíceis de serem detectadas no diagnóstico de rotina (CHENG *et al.*, 2015). Essas razões evidenciam porque a pesquisa em *P. vivax* deve ser considerada prioridade não só no Brasil, mas no mundo (SIQUEIRA *et al.*, 2016).

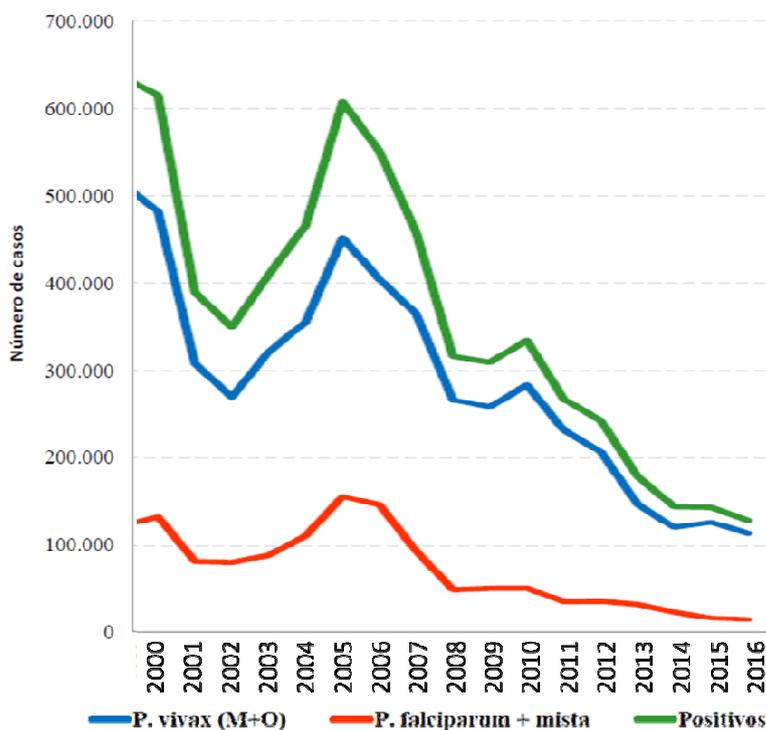


Figura 3. Casos de malária notificados, 2000-2016 (Adaptado de PNCM – SVS, 2017).

1.1.3 Imunidade naturalmente adquirida na malária

Parte dos indivíduos sem contato prévio com os parasitos da malária tende a desenvolver uma doença febril, aguda. No entanto, a apresentação da doença pode variar em assintomática, sintomática e grave, diferenças essas que vão depender de diferentes fatores relacionados ao parasito, hospedeiro vertebrado e o meio ambiente (STRUIK e RILEY, 2004).

Estudos demonstraram que a imunidade naturalmente adquirida contra a malária se desenvolve de forma lenta e gradativa após sucessivas infecções (LANGHORNE *et al.*, 2008). Em áreas hiperendêmicas para a doença, crianças menores de cinco anos são altamente susceptíveis à doença grave. Entretanto, com o passar dos anos, as crianças tendem a desenvolver uma proteção clínica contra os sintomas graves de doença, sendo que a imunidade estéril é raramente alcançada. (MARSH e KINYANJUI, 2006; WEISS *et al.*, 2010). Nestas áreas, indivíduos adultos desenvolvem uma imunidade eficiente contra os parasitos fazendo com que os casos graves sejam pouco frequentes. Já é bem demonstrado que esta imunidade naturalmente adquirida é dependente da exposição contínua ao parasito, pois na ausência desta exposição o indivíduo tende a perder a imunidade clínica adquirida (LANGHORNE *et al.*, 2008; GHANI *et al.*, 2009; CROMPTON *et al.*, 2010).

Em áreas de transmissão instável, esporádica, como é o caso do Brasil, indivíduos de todas as faixas etárias estão potencialmente sujeitos à malária sintomática (FOWKES *et al.*, 2016). Entretanto, mesmo nesta situação, indivíduos com história de longa exposição à transmissão da malária podem desenvolver malária assintomática. Estudo realizado por Kano e colaboradores em 2012, demonstrou que 50% dos indivíduos de uma comunidade localizada na Amazônia brasileira possui resposta sorológica para PvDBP, proteína responsável pelo processo de invasão do parasito no reticulócito e importante candidato vacinal. Além disso, grande parte desses indivíduos apresentou infecção assintomática, sugerindo algum grau de proteção clínica (KANO *et al.*, 2012).

1.2 Aspectos patogênicos da malária humana causada por *P. vivax*

A maioria dos casos de malária humana é causada pelo *P. falciparum* e *P. vivax*, espécies que diferem em virulência, tropismo de hemácias, sequestro de eritrócitos infectados e estágio de latência no fígado (WASSMER *et al.*, 2015). Apesar disto, nos últimos 50 anos, a maioria dos estudos de patogenia em malária se restringiram ao *P. falciparum*, espécie que causa a maior parte das mortes por malária (CUNNINGTON *et al.*, 2013). A doença causada por esta espécie caracteriza-se principalmente pela citoaderência de eritrócitos infectados ao endotélio ativado, levando ao sequestro de parasitas e obstrução da microvasculatura (GILLRIE & HO, 2017).

Embora o *P. vivax* seja a espécie de plasmódio humano com maior distribuição global este parasito foi, durante muito tempo, negligenciado (TOTINO & LOPES, 2017). Entretanto, atualmente tornou-se evidente a importância da infecção pelo *P. vivax*, uma vez que esta espécie pode estar associada frequentemente com a malária grave (PRICE *et al.*, 2007, TJITRA *et al.*, 2008, LACERDA *et al.*, 2012). Em contraste com o *P. falciparum*, a parasitemia induzida pelo *P. vivax* é mais baixa e, aparentemente, o parasito tem um sequestro mínimo na microvasculatura dos vasos (WASSMER *et al.*, 2015). Embora os mecanismos envolvidos na malária grave pelo *P. vivax* ainda não estejam muito bem definidos, achados recentes demonstram que a infecção está associada com ativação endotelial e inflamação sistêmica (BARBER *et al.*, 2015).

A ocorrência de complicações na malária induzida pelo *P. vivax* está associada a uma variedade de fatores, incluindo: intensidade de transmissão, presença de coinfeções, características do hospedeiro vertebrado como sexo, idade e *background* genético, além da resistência ao tratamento antimalárico (COSTA *et al.*, 2012). No que se refere às coinfeções associadas a este parasito, vale a pena ressaltar que aquelas relacionadas aos vírus prevalentes no nosso meio têm sido amplamente negligenciadas.

1.3 Coinfecções frequentemente associadas à malária

A infecção de um indivíduo com mais de um patógeno, pode ter consequências consideráveis na evolução clínica do paciente, podendo levar em muitos casos a uma patologia mais grave quando comparada a infecção com uma única espécie de parasito (BROOKER *et al.*, 2007), dificultando o diagnóstico e o tratamento específicos (VAUMOURIN *et al.*, 2015). Em geral, indivíduos coinfectados com mais de uma espécie de parasito tem risco aumentado para casos graves devido a interações não bem esclarecidas entre os diferentes agentes infecciosos (KINUNG'HI *et al.*, 2014).

Quando em contato com o hospedeiro vertebrado, os parasitos precisam sobreviver aos mecanismos de proteção desencadeados pelo sistema imune inato e adaptativo para se estabelecerem. Alguns patógenos são capazes de evadir do sistema imune facilitando não só sua permanência, mas também a infecção por outros organismos (SUPALI, 2010). No entanto, outros agentes infecciosos podem ser eliminados e/ou controlados por uma imunidade cruzada, isto é, induzida por outra espécie com antigenicidade similar. O ponto negativo para o hospedeiro é que a imunidade cruzada, em algumas situações específicas, pode desencadear processos auto-imunes, já que moléculas, células ou tecidos do hospedeiro também podem ser reconhecidos (VAUMOURIN *et al.*, 2015).

Uma característica comum das coinfecções parasitárias é que elas são mais prevalentes em países em desenvolvimento, particularmente, entre as populações mais pobres (HOWARD *et al.*, 2001). A falta de acesso à água limpa, às instalações de saneamento melhoradas e a higiene pessoal inadequada são fatores de risco subjacentes importantes (ASAOLU *et al.*, 2003).

No caso específico da malária, estudos epidemiológicos têm mostrado que o impacto das coinfecções é maior em populações que vivem nas regiões mais pobres do globo onde outros agentes infecciosos são altamente prevalentes, incluindo diferentes tipos de helmintos, vírus e bactérias (SHANKARKUMAR *et al.*, 2011; BROOKER *et al.*, 2007).

Entretanto alguns estudos são controversos, podendo mostrar ou não susceptibilidade a novas infecções ou influência na evolução clínica da doença

(VAUMOURIN *et al.*, 2015). Na coinfeção humana entre *P. vivax* e *Schistosoma mansoni*, por exemplo, alguns trabalhos demonstraram um aumento da morbidade da malária enquanto outros não encontraram nenhuma associação (GETIE *et al.*, 2015; MAZIGOI *et al.*, 2010). No caso do *P. vivax*, por exemplo, alguns estudos têm demonstrado que a infecção simultânea com o vírus da dengue pode resultar em quadros mais graves de malária (MAGALHAES *et al.*, 2012). Apesar disso, uma revisão sistemática de malária grave feita na Amazônia brasileira, demonstrou que as co-morbidades, agudas e crônicas, são frequentes, mas raramente associadas com morte (LACERDA *et al.*, 2012). De fato, estudos com foco em malária vivax são recentes, desta forma, estudos envolvendo co-morbidades ainda são necessários.

Enquanto as coinfeções com *P. vivax* ainda são pouco estudadas, a associação entre vírus e malária por *P. falciparum* encontra-se melhor caracterizada. Diferentes estudos realizados na África avaliaram a associação entre *P. falciparum* e HIV (MBALE *et al.*, 2016; TAY *et al.*, 2015; RATTANAPUNYA *et al.*, 2015; FRISCHKNECHT & FACKLER, 2016) onde têm sido observada uma piora do quadro clínico, podendo ou não apresentar elevadas parasitemias e baixos índices hematimétricos, sendo os quadros mais graves descritos naqueles pacientes com comprometimento de células CD4 induzido pelo HIV. Enquanto a associação HIV/malária com piora do quadro clínico ainda demonstra estes dados conflitantes, a associação entre Epstein – Barr vírus (EBV) e *P. falciparum* que leva ao desenvolvimento do linfoma de Burkitt endêmico está bem caracterizada (MOORMANN *et al.*, 2016).

Existe um consenso de que em áreas hiperendêmicas para *P. falciparum*, como é o caso do continente africano, a infecção crônica ou repetida por este parasito pode resultar na reativação do EBV, sendo isto fator de risco para o desenvolvimento do chamado Linfoma de Burkitt endêmico; o termo endêmico foi atribuído para especificar este tipo de câncer que tem elevada prevalência em crianças vivendo em áreas onde a malária é endêmica (MOORMANN *et al.*, 2011). Nestas áreas, observa-se que a maioria das crianças já é soropositiva para o EBV aos três anos de idade (MOORMANN *et al.*, 2005), ao passo que outras são infectadas antes mesmo dos seis meses de vida (PIRIOU *et al.*, 2012), o que as torna altamente vulneráveis a este tipo de câncer.

1.3.1 Epstein-Barr Vírus (EBV) e linfoma de Burkitt endêmico

1.3.1.1. Epstein-Barr vírus

Entre os agentes virais associados à coinfeções maláricas, destaca-se o Epstein-Barr Vírus, um herpes vírus da família Herpesviridae e subfamília Gammaherpesvirinae (RICKINSON *et al.*, 2007). Seu genoma é composto de uma molécula de DNA linear em fita dupla com aproximadamente 172 mil pares de bases, codificando cerca de 85 genes. As diferenças entre as sequências que codificam os antígenos nucleares (EBNA) permitem a identificação de dois genótipos de EBV; Tipo 1 (ou tipo A) distribuído entre as populações asiáticas e caucasianas, e Tipo 2 (ou tipo B) distribuído na população africana (COHEN, 2011).

O EBV é transmitido na maioria das vezes por contato com secreções respiratórias de um indivíduo infectado e, desta forma, consegue se disseminar facilmente. Diante disso, estima-se que cerca de 90% da população mundial possui resposta sorológica positiva para o EBV (MASAKHWE *et al.*, 2016). Evidências indicam que a infecção primária ao vírus ocorre no início da vida, com a maioria das crianças de países em desenvolvimento, positivas antes dos três anos de idade (REYNALDI *et al.*, 2015).

As gamaherpesviroses, como a causada pelo EBV, são linfotrópicas, isto é, possuem as células de linhagem linfóide como células-alvo que são infectadas primeiramente e se proliferam através do ciclo lítico, mantendo-se em latência ao longo da vida do hospedeiro por meio do ciclo lisogênico (MATAR *et al.*; 2015). Em um primeiro momento, o vírus infecta as células B não primadas (“naive”) que estão no epitélio orofaríngeo, porta de entrada do vírus. Estas células vão migrar para os linfonodos para apresentar os antígenos às células T, que vão se tornar específicas para EBV, e desta forma controlar a infecção, mantendo o vírus latente dentro das células B de memória (PIRIOU *et al.*, 2009).

Acredita-se que o vírus consegue se manter em latência na célula, por que desenvolveu mecanismos eficientes de escape do sistema imune do

hospedeiro vertebrado, como por exemplo, a presença de uma glicoproteína em seu envelope viral (GP350) que permite invadir rapidamente os linfócitos B (receptor CD21) e escapar de outras células do sistema imune, incluindo linfócitos T e células *Natural Killer* (CALATTINI *et al.*, 2010). Assim, esses linfócitos infectados vão migrar e disseminar o vírus em diferentes órgãos incluindo medula óssea e gânglios linfáticos.

Os sintomas da infecção pelo vírus dependem da idade e do estado imunológico do indivíduo. Nas crianças a doença se manifesta através de febre e problemas respiratórios, e na maioria dos casos é confundida com outras doenças febris. Já nos adultos, a infecção pelo EBV se manifesta através da mononucleose infecciosa, que desencadeia nos indivíduos, na maioria dos casos, febre e faringite (NOWALK & GREEN, 2016). Entretanto, a maior parte dos pacientes infectados pelo EBV é assintomática, e estes indivíduos quando não tratados, contribuem intensivamente para a transmissão do vírus (SMETS *et al.*, 2000).

De forma contraditória, dada a natureza onipresente e assintomática da infecção, o EBV é considerado um vírus oncogênico desde a década de sessenta. Essas características incomuns são, em parte, devido às diversas maneiras pelas quais o EBV evoluiu para exibir um controle otimizado sobre a morte celular. De fato, o EBV foi o primeiro vírus associado a uma forma incomum e agressiva de linfoma infantil (EPSTEIN *et al.*, 1964), e, atualmente, estima-se que pode contribuir com mais de 200 mil novos tipos de câncer diagnosticados todos os anos (COHEN *et al.*, 2011).

1.3.1.2 Linfoma de Burkitt (BL) na malária associado ao *P. falciparum*

Está bem estabelecido que a presença do EBV associada à malária por *P. falciparum* aumenta o risco de desenvolvimento do Linfoma de Burkitt (BL), a forma de câncer infantil mais comum na África (MOORMANN *et al.*, 2005). O Linfoma de Burkitt é um câncer do sistema linfático considerado de alto grau de malignidade dos linfócitos B produtores de anticorpos e ocorre com maior frequência em crianças com idade entre quatro e sete anos residentes em áreas endêmicas para a malária (MOLYNEUX *et al.*, 2012).

Estudos demonstram que a exposição crônica ou repetida à malária resulta na reativação do EBV e desta forma no aumento do número de células B infectadas, contribuindo para o Linfoma de Burkitt endêmico (MOORMANN *et al.*, 2011). Embora os mecanismos envolvidos na associação *P. falciparum* / BL não estejam bem esclarecidos, achados recentes sugerem que a longa exposição ao parasito leva a reativação do EBV e, desta forma, aumenta muito a expressão da enzima Citidina Desaminase Induzida por Ativação (AID). Isso facilita o desenvolvimento de mutações no DNA dos linfócitos B, e quando este processo acontece de forma repetida e contínua, como no caso das crianças africanas, aumenta a probabilidade de mutação no proto-oncogene cMyC, responsável pela proliferação celular, favorecendo o desenvolvimento do câncer (REYNALD *et al.*, 2016).

Diante do relevante papel da malária como cofator para o desenvolvimento de LB, foi possível classificá-lo em variantes clínicas de acordo com a endemicidade para *P. falciparum*: (i) Linfoma de Burkitt endêmico (eBL), presente em áreas onde a malária ocorre frequentemente, apresentando 90% de casos de coinfeção com o EBV, (ii) Linfoma de Burkitt esporádico (BL), que se apresenta normalmente sob a forma de tumores abdominais, com 10-15% dos casos relacionados ao EBV (MAGRATH, 2012), e (iii) Linfoma de Burkitt associado ao HIV (BL-HIV), que esta presente em indivíduos imunossuprimidos pelo vírus HIV com um terço dos casos em associação com EBV (CARBONE *et al.*, 2009).

No Brasil o Linfoma de Burkitt endêmico nunca foi descrito, sendo o tipo esporádico o mais frequente no país, isto é, não associado a infecção malárica, e que se caracteriza, normalmente, sob a forma de tumores abdominais (MAGRATH, 2012, MASAKHWE *et al.*, 2016). Desta forma, os baixos níveis de endemicidade do *P. falciparum* na Amazônia, quando comparada aos níveis africanos, parecem explicar estas diferenças (DE PINA-COSTA *et al.*, 2014, SVS/MS, 2017).

Embora não existam estudos que demonstrem a associação entre Linfoma de Burkitt e *P. vivax*, não se pode descartar a possibilidade de que o EBV possa alterar o quadro clínico da malária (AKIN *et al.*, 2013). Por ser o *P. vivax*, a espécie mais prevalente na Amazônia, a hipótese de trabalho é que o EBV poderá influenciar na morbidade na malária.

2. JUTIFICATIVA

A malária é uma doença de grande impacto nas populações presentes em regiões mais pobres de países em desenvolvimento, particularmente da África, Ásia e América Latina. Nessas áreas a presença de outras infecções é comum, como infecções por vírus, bactérias e helmintos. Isso pode resultar frequentemente em coinfeções, que podem agravar ainda mais o estado de saúde das populações vulneráveis (SHANKARKUMA *et al.*, 2011).

Estima-se que cerca de 90% dos adultos do mundo já tiveram um primeiro contato com o EBV (MASAKHWE *et al.*, 2016). Em países em desenvolvimento, a primeira infecção pelo EBV ocorre mais frequentemente na primeira década de vida e, uma vez adquirida, a infecção permanece durante toda a vida do indivíduo (MORMANN & BAILEY, 2016). Na África, por exemplo, as crianças se tornam positivas para o vírus aos três anos de idade, e concomitantemente, estão expostas a intensa transmissão de malária por *P. falciparum*, uma vez que a malária tem elevada endemicidade no continente (REYNALD *et al.*, 2016). Nesta situação, o *P. falciparum* é sabidamente considerado um cofator importante para o desenvolvimento do Linfoma de Burkitt chamado endêmico, forma de câncer infantil causada pelo EBV e frequente no continente africano (PIRIOU *et al.*, 2012).

Em contrapartida, não existem evidências de que outras espécies de plasmódios, como *P. vivax*, podem estar associadas a qualquer tipo de câncer relacionado ao EBV. Isto sugere que estes plasmódios têm peculiaridades biológicas importantes que resultam em quadros clínicos diferentes. No caso do *P. vivax*, até o momento, existe apenas um relato de caso associando a infecção por EBV com malária sintomática (AKIN *et al.*, 2013). Uma vez que o *P. vivax* é a espécie mais prevalente no Brasil, e que não existem estudos na literatura caracterizando esta coinfeção, pretende-se aqui avaliar uma possível associação entre a morbidade da malária causada por *P. vivax*, e a presença simultânea de EBV circulante.

Considerando ainda que o EBV infecta preferencialmente células B, pretende-se, ainda, investigar se a presença do vírus circulante pode influenciar no desenvolvimento de uma resposta imune humoral *P. vivax*-específica. Isto é relevante já que a imunidade naturalmente adquirida contra a

malária se desenvolve de forma lenta e gradativa, sendo dependente de anticorpos e, portanto, de uma resposta de memória de células B (MBCs) eficiente (LANGHORNE *et al.*, 2008). Portanto a hipótese de estudo a ser investigada é a de que indivíduos com história de longa exposição à malária na Amazônia brasileira e coinfectados pelo EBV, tem uma morbidade aumentada na malária além da resposta de anticorpos e /ou de MBCs vivax-específica comprometidas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo investigar a associação entre o vírus Epstein-Barr e a malária por *Plasmodium vivax*, com ênfase na influência do EBV na morbidade da malária e/ou no desenvolvimento de uma resposta humoral antígeno-específica.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Comparar a eficiência da extração de DNA viral a partir de diferentes amostras biológicas, incluindo células mononucleares do sangue periférico, plasma, sangue total ou estocado em papel de filtro;

3.2.2. Avaliar a associação entre EBV e a morbidade da malária causada por *P. vivax*.

3.2.3. Determinar se a presença de DNA de EBV na circulação influencia na resposta imune humoral de indivíduos com histórico de longa-exposição à malária na Amazônia brasileira.

4. METODOS

4.1 Populações de estudo

Para cumprir os objetivos aqui propostos, o presente estudo envolveu dois grupos de indivíduos: (i) o primeiro grupo foi constituído por indivíduos com malária sintomática por *P. vivax*, que foram diagnosticados e tratados em serviços de referência em malária dos estados do Amazonas, Mato Grosso e/ou Rondônia. Este grupo de indivíduos foi envolvido nos estudos que avaliaram a relação entre morbidade da malária por *P. vivax* e presença de EBV circulante (objetivo-específico 3.2.2); (ii) o segundo grupo foi constituído por indivíduos com história de longa-exposição à malária, residentes na comunidade agrícola de Rio Pardo (AM) e que apresentavam ou não malária aguda no momento da coleta de sangue. Os residentes desta comunidade foram utilizados nos estudos que avaliaram a relação entre o EBV e resposta imune específica anti-*vivax* (objetivo-específico 3.2.3).

4.1.1 Indivíduos com malária aguda e sintomática por *P. vivax*

Este grupo é constituído de 154 pacientes infectados por *P. vivax* que adquiriram malária nos estados do Mato Grosso (MT), Amazonas (AM) ou Rondônia (RO). Amostras sanguíneas de todos os indivíduos encontravam-se congeladas no Biorrepositório do Grupo de Pesquisas em Biologia Molecular e Imunologia da Malária (BMIM), tendo sido obtidas no período de 2010 a 2014. Para a seleção dos indivíduos a serem estudados, os seguintes critérios de inclusão foram utilizados: (i) indivíduos de ambos os sexos com idade igual ou superior a dois anos; (ii) em caso de sexo feminino, ausência de gravidez (auto-relato); (iii) diagnóstico positivo para *P. vivax* (gota espessa positiva) realizado pelos serviços de referência em malária em Cuiabá (Hospital Julio Muller), Manaus (Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado) ou Porto Velho (Centro de Medicina Tropical de Porto Velho); (iv) ausência de infecção por outra espécie de plasmódio, confirmada por PCR espécie-específica, realizada posteriormente pelo grupo de pesquisa (BMIM, IRR, Fiocruz-Minas).

Nos centros de referência, todo o procedimento, incluindo diagnóstico microscópico foi realizado por técnicos capacitados das unidades de saúde locais. A condução clínica e o tratamento antimalárico foram realizados sob a supervisão do Dr. Cor Fontes (Cuiabá, MT e Porto Velho, RO) ou do Dr. Marcus Lacerda (Amazonas, AM), seguindo as recomendações determinadas pelo Programa Nacional de Controle da Malária (GUIA DE TRATAMENTO DA MALÁRIA NO BRASIL, 2010) Dados clínicos e demográficos foram obtidos durante a anamnese, utilizando protocolos determinados pelo grupo de pesquisa (CERAVOLO *et al.*, 2008; KANO *et al.*, 2012) e os dados hematológicos foram obtidos através de hemograma completo, que foi realizado nos laboratórios de referência (Tabela 1).

Tabela 1. Dados demográficos, clínicos, epidemiológicos e hematológicos dos 154 indivíduos com malária aguda por *P. vivax* diagnosticados em serviços de referência para malária em Cuiabá (MT), Manaus (AM) e/ou Porto Velho (RO).

	Malária Aguda
Dados demográficos	
Feminino - n (%)	40 (26%)
Masculino - n (%)	114 (74%)
Idade - mediana (IQR)	38 (27 - 50)
Dados clínico/epidemiológicos	
Episódios prévios de malária - mediana (IQR)	2 (1 - 8)
Tempo de sintomas (dias) - mediana (IQR)	4 (3 - 7)
Principais sintomas clínicos	
Febre - n (%)	130 (83,8%)
Calafrio - n (%)	135 (87%)
Cefaleia - n (%)	136 (87,7%)
Dados hematológicos	
Hemoglobina (g/dL) - mediana (IQR)	
Feminino	12,4 (11,3 - 13,3)
Masculino	13,3 (12,4 - 14,2)
Hematócrito (%) - mediana (IQR)	
Feminino	38,5 (36,2 - 41,4)
Masculino	40,4 (38 - 42,7)
Plaquetas (mm ³) - mediana (IQR)	
97.000 (61.750 - 135.000)	
Trombocitopenia (<150.000mm ³) - n (%)	90 (58%)
Trombocitopenia grave (<50.000mm ³) - n (%)	27 (18%)
Dados de escore clínico	
Baixo (0 a 3) - n (%)	97 (64%)
Alto (4 a 7) - n (%)	56 (36%)

*Parâmetros utilizados para classificação do escore clínico: ocorrência ou não de febre, níveis de hemoglobina, hematócrito e plaquetas. As definições de pontuação foram adaptadas de FRANKLIN e colaboradores (2011).

Como mostrado na tabela acima, a maior parte dos indivíduos estudados eram do sexo masculino (72%), adultos (mediana de 38 anos). Com base nos dados clínicos e hematológicos, os pacientes foram caracterizados de acordo com um escore clínico, como definido por FRANKLIN e colaboradores (2011). Para a determinação do escore clínico foi considerada a ocorrência ou não de febre ($>37^{\circ}\text{C}$), além de parâmetros hematológicos – níveis de hemoglobina, hematócrito e plaquetas. A pontuação “zero” foi atribuída ao parâmetro quando este estava ausente (dentro dos valores de referência), e a pontuação “um” foi atribuída quando o parâmetro estava presente (fora da faixa de referência). No caso das plaquetas, porém, indivíduos com níveis acima de $150.000/\text{mm}^3$ receberam pontuação igual a “zero”; aqueles com níveis entre 150.000 e $100.000/\text{mm}^3$, pontuação igual a “um”; níveis entre 100.000 e $50.000/\text{mm}^3$, pontuação igual a “dois”; e aqueles que apresentaram trombocitopenia grave (contagem de plaquetas menor que $50.000/\text{mm}^3$) receberam pontuação igual a “três”, conforme descrito na Tabela 2. No final, a soma dos pontos para todos os parâmetros analisados consistiu no escore total, que variou de zero a sete.

Tabela 2. Parâmetros e sistema de pontuações utilizados para o cálculo do escore clínico.

Parâmetros	Pontuação definida			
Febre	0 se ausente	1 se presente		
Hemoglobina	0 se ≥ 12 (mulher)	1 se < 12 (mulher)		
	0 se ≥ 12 (mulher)	1 se < 13 (homem)		
Hematócrito	0 se > 37	1 se < 37		
Leucócitos	0 se ≥ 4.000	1 se < 4.000		
Plaquetas	0 se ≥ 150.000	1 se < 150.000	2 se < 100.000	3 se < 50.000

Todos os voluntários selecionados assinaram o termo de consentimento livre esclarecido, de acordo com as diretrizes para pesquisa em seres humanos especificadas pelo Conselho Nacional de Saúde. Em adição ao termo de consentimento, termos de assentimento foram obtidos dos menores envolvidos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres

Humanos do Instituto René Rachou/ FIOCRUZ (Pareceres n. 03/2008, 29/2010 e CAAE 50522115.7.0000.5091).

4.1.2 Indivíduos com longa exposição a malária

O segundo grupo foi constituído de 541 indivíduos com histórico de longa exposição à malária, residentes na comunidade agrícola de Rio Pardo, Amazonas, onde nosso grupo de pesquisa tem conduzido um estudo de base populacional do tipo longitudinal (KANO *et al.*, 2012; KANO *et al.*, 2016). O assentamento está localizado no município de Presidente Figueiredo (Amazonas, Brasil), que fica a 160 km de Manaus (figura 4).

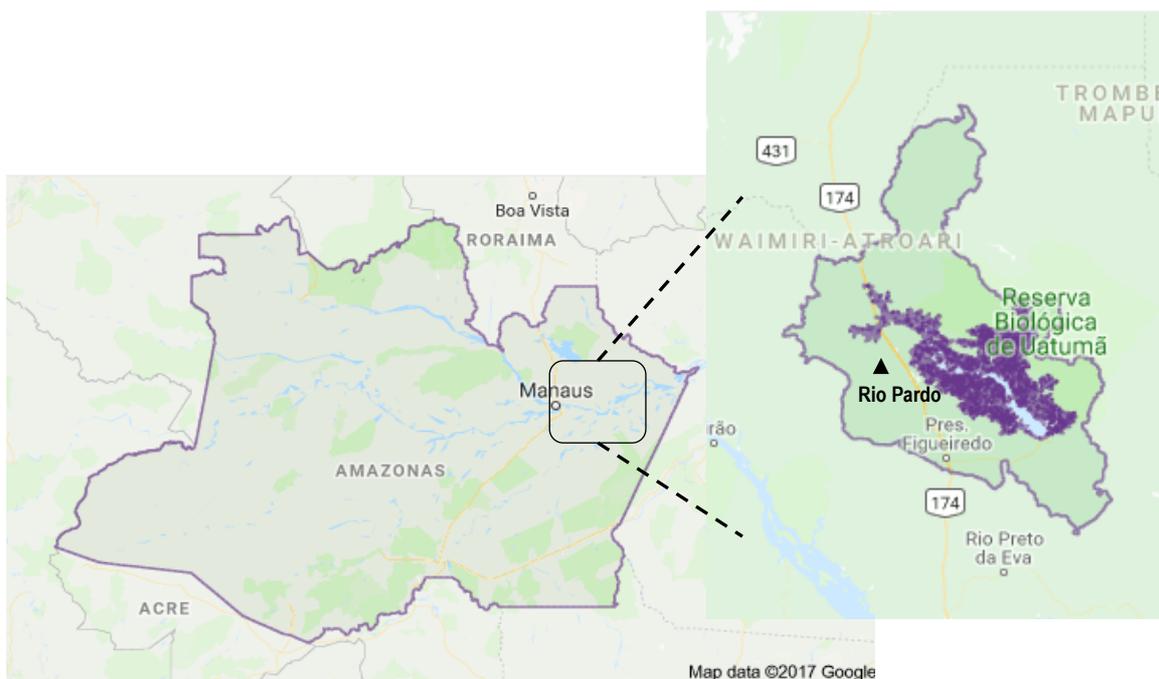


Figura 4: Mapa do estado do Amazonas, região da Amazônia Legal, mostrando a localização do assentamento agrícola de Rio Pardo (representado pelo triângulo preto), localizado no município de Presidente Figueiredo (representado em roxo), a aproximadamente 160 km de Manaus.

A população local vive da agricultura e da pesca de subsistência, residindo em habitações pouco estruturadas (muitas vezes sem parede completa), o que torna ineficaz as medidas de controle do vetor baseadas em inseticidas residuais. (KANO *et al.*, 2012). Como mostrado na Tabela 3, a

população foi constituída, principalmente por indivíduos adultos, de ambos os sexos, com uma mediana de 21 anos de residência na Amazônia. No momento da coleta de sangue, a maioria não apresentava nenhum sintoma relacionado a qualquer doença infecciosa aguda (n= 370; 68%). Entre os indivíduos com malária aguda por *P. vivax* (n=38; 7%), a maior parte era sintomático (25 em 38; 66%), sendo os principais sintomas cefaleia, calafrio e mialgia (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo dos dados demográficos, clínicos epidemiológicos e imunológicos dos 541 indivíduos com história de longa exposição ao *P. vivax*, residentes na comunidade de Rio Pardo, Amazonas.

	Longa exposição à malária
Dados demográficos	
Feminino - n (%)	239 (44,2%)
Masculino - n (%)	302 (55,8%)
Idade - mediana (IIR)	23 anos (10 - 45)
Dados clínico/epidemiológicos	
Tempo residência no Amazonas (anos) - mediana (IIR)	21 anos (11 - 38)
Episódios prévios de malária	>5 episódios (por pessoa)
Indivíduos com malária aguda – n (%)	38 (7%)
Principais sintomas clínicos (associados à malária)	
Febre - n (%)	1 (3%)
Calafrio - n (%)	6 (16%)
Cefaleia - n (%)	12 (32%)
Mialgia - n (%)	6 (16%)
Indivíduos sem sintomas – n (%)	370 (68%)

4.2. Obtenção das amostras sanguíneas

O delineamento experimental desta parte do estudo já foi detalhado em publicações anteriores do grupo (KANO *et al.*, 2012; SOUSA-SILVA *et al.*, 2014). Todas as amostras biológicas estudadas (DNA, células do sangue periférico e plasmas) se encontram estocadas no biorepositório do grupo de

pesquisas em Biologia molecular e imunologia da malária (BMIM) do IRR, Fiocruz. O biorepositório se encontra regulamentado pelo comitê de ética em pesquisa do IRR (*Protocolos e N ° 07/2009 e n ° 26/2013*).

4.2.1. Obtenção de plasmas e células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Para a obtenção das células mononucleares, o sangue total dos indivíduos foi coletado em tubos a vácuo contendo EDTA (Becton Dickinson, Rutherford, NJ), e após centrifugação (150 x *g* por 10min a 4°C), o plasma foi aliquotado e conservados a -20°C até o uso. Após a centrifugação, o anel de PBMC se torna visível e desta forma passível de coleta. Esta coleta foi realizada utilizando a separação por gradiente de densidade [Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)], seguindo as instruções do fabricante. Foram obtidos em torno de 40mL de sangue de cada indivíduo, o que rendeu aproximadamente 2×10^7 PBMCs / mL, que é suficiente para a extração de DNA a partir de cultura de células. Após coletadas, as células foram armazenadas a -80°C até o uso.

4.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG contra proteínas recombinantes do *P. vivax*

O ensaio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para detecção de anticorpos IgG anti-DBP_{II}, anti-MSP1₁₉ e anti-AMA1 foi realizado utilizando-se soros dos indivíduos, de acordo com protocolos bem padronizados no laboratório (CERÁVOLO *et al.*, 2005).

O cálculo do ponto de corte (*cut off*) para cada proteína foi calculado utilizando-se a média da Densidade Óptica (DO_{490nm}) de 30 soros de indivíduos negativos (não expostos à transmissão da malária) mais 3 vezes o desvio padrão. Indivíduos com Índice de Reatividade (médias das DOs sobre o valor do *cut off*) maior que 1, foram classificados como positivos.

4.3.1 Antígenos recombinantes usados no teste de ELISA (PvDBP, PvMSP1, PvAMA1)

A proteína recombinante *Plasmodium vivax Duffy Binding Protein* (PvDBP) foi produzida de acordo com o protocolo descrito por Souza e Silva em 2014, e se encontra estocada em nosso laboratório, no Instituto René Rachou. As proteínas *Plasmodium vivax merozoite surface protein* (PvMSP1₁₉) recombinante e *Plasmodium vivax apical membrane antigen 1* (PvAMA1) (aminoácido 43 até 487) foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Irene Soares da Universidade de São Paulo (USP), colaboradora do estudo.

4.4 Amostras controles para o Epstein-Barr vírus (EBV)

Como amostra controle positivo, foi utilizado material genético de EBV gentilmente cedido pela Dra. Talita Antônia Furtado Monteiro (Universidade Federal Do Pará, Belém, PA). O DNA viral (153 pares de base) foi extraído a partir de linfócitos B de paciente infectado.

Como controles adicionais, foram utilizadas amostras de sangue de 10 indivíduos voluntários, residentes em Belo Horizonte (MG), com história prévia de diagnóstico clínico de mononucleose Infecciosa. Estas amostras com maior chance de positividade pelo EBV foram utilizadas para a padronização inicial do melhor protocolo para extração do DNA viral.

4.5 Padronização do protocolo de extração de DNA viral

Para realizar a padronização do protocolo de extração de DNA viral, foi feita a extração por quatro fontes diferentes de amostras biológicas do mesmo indivíduo: células mononucleares do sangue periférico (PBMC), plasma, sangue total e sangue estocado em papel de filtro. Para tal, foi coletado em tubos contendo EDTA, 4mL de sangue de 10 indivíduos voluntários com história de infecção por EBV. O plasma foi separado, e as PBMCs foram preparadas conforme o item 6.2.1. Para o sangue em papel de filtro, foram gotejadas 30µL de sangue em papel de filtro convencional. Posteriormente

foram realizados os processos de extração de DNA para todas as fontes citadas.

4.5.1 Extração de DNA a partir de sangue total

Para a extração do DNA genômico dos indivíduos foi utilizado o kit QIAGEN (PUROGENE®, Gentra Systens, Minneapolis, USA) seguindo as especificações do fabricante. Resumidamente, 1mL de sangue total foi utilizado para cada extração, ao qual acrescentou-se 3mL de solução de lise para eritrócitos. Após a lise, a reação foi centrifugada (3.500 rpm por 10 min) formando um sobrenadante que foi removido e o material restante no pellet foi ressuspendido em solução de lise celular. Para a próxima etapa, adicionou-se 330 µL de Solução de Precipitação de Proteínas, que com a centrifugação permitiu concentrar as proteínas no precipitado formado. O sobrenadante contendo DNA foi colocado em um tubo com 1mL de Isopropanol P.A. absoluto (Merck). A solução foi centrifugada (3.500rpm por 3min) e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 1mL de etanol 70% (gelado) para a lavagem do DNA seguido de centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e após a evaporação total do etanol (por aproximadamente 15 minutos), e o DNA foi hidratado com 330µL de Solução de Hidratação (Tris-hidrometil aminometano, EDTA) e incubado por uma hora a 65°C. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o uso.

4.5.2 Extração de DNA a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Para as extrações de DNA a partir de PBMCs, foram utilizados 100µl de uma suspensão contendo $1 - 2 \times 10^7$ células/mL. As extrações foram realizadas através do kit QIAGEN (PUREGENE®, Gentra Systens, Minneapolis, USA) seguindo as especificações do fabricante. Adicionou-se 300µL de solução de lise de células à suspensão celular. Após a lise, foi adicionado 1,5µL da solução de RNase para uma extração livre de RNA. Para isto a reação foi incubada à 37°C durante 5 minutos, e resfriada no gelo durante um minuto. Para a precipitação das proteínas da reação, foi adicionado 100µL da Solução

de Precipitação de Proteína, e a reação foi passada no Vortex por 20 segundos. Após a precipitação a reação foi centrifugada formando um sedimento de proteínas. O sobrenadante contendo o DNA foi misturado à 300µL de Isopropanol e invertido gentilmente por 50 vezes para a revelação do DNA. Em seguida, adicionou-se 300µl de etanol 70% e verteu-se várias vezes para lavar o DNA. A reação foi centrifugada e o sobrenadante descartado. Ao sedimento restante foi adicionado 50 µL de Solução de Hidratação de DNA. Para finalizar, a reação foi incubada por uma hora a 65° C. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o uso.

4.5.3 Extração de DNA a partir de sangue total estocado em papel de filtro

Para a extração do DNA genômico em papel de filtro, utilizou-se o kit QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN), que é frequentemente usado pelo grupo de pesquisa. A extração foi realizada de acordo com as especificações do fabricante. Em resumo, três círculos de sangue em papel de filtro de aproximadamente 3mm de diâmetro foram cortados e colocados em microtubos (Eppendorf) de 1,5 mL. Adicionou-se 180µL de tampão de lise celular ao tubo, que foi incubado a 85°C por 10 minutos. Para a inibição das proteínas da reação, acrescentou-se 20µL de proteinase K e a mistura foi homogeneizada e incubada a 56°C por uma hora. Após foi adicionado 200µL de tampão de lise (AL), os tubos foram novamente homogeneizados e incubados a 70°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 200µL de etanol 100% (gelado) e a reação foi homogeneizada. Posteriormente, todo o material foi colocado em uma coluna QIAamp spin. As colunas foram centrifugadas e, em seguida, os tubos contendo o filtrado foram descartados e as colunas contendo os DNAs foram colocadas em tubos novos de 2mL. Adicionou-se 500µL tampão (AW₁) para a lavagem do DNA e o material foi centrifugado. As colunas foram colocadas em tubos novos de 2mL e os tubos contendo o filtrado foram descartados.

Adicionou-se 500µL de tampão (AW₂) para a lavagem do DNA e o material foi centrifugado. Os tubos foram descartados e cada coluna foi colocada em novos microtubos do tipo eppendorf 1,5mL. Foi acrescentado 150µL de tampão de eluição (AE) ou água destilada para eluir o DNA, em

seguida o material foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugado a 8.000rpm por um minuto. Finalmente as colunas foram descartadas e o DNA foi armazenado a -20°C até o uso.

4.5.4 Extração de DNA a partir de plasma

Para esta extração foi utilizado o kit QIAGEN (PUROGENE®, Gentra Systems, Minneapolis, USA), seguindo as especificações do fabricante. Em resumo, adicionou-se 50 µl de plasma em um tubo estéril de 1,5ml contendo 250µL de Solução de Lise de Células. Para a obtenção de DNA livre de proteínas, adicionou-se 1,5µL de Proteinase K e incubou a reação a 55°C por uma hora. Após a incubação adicionou-se 100µL de Solução de Precipitação de Proteína e a reação foi mantida por 5 minutos no gelo e depois centrifugada a 13.200 x g por 3 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi adicionado a um tubo contendo 300µL de Isopropanol e o sedimento com as proteínas foi descartado. A reação foi misturada por inversão (50 vezes), mantida a temperatura ambiente por 5 minutos e depois centrifugada a 13.200 x g por 5 minutos. O sobrenadante então foi descartado, e o tubo contendo o DNA no sedimento foi seco ao ar por 5 minutos. Após isso, adicionou-se 300µL de etanol 70% para lavar o DNA. Após centrifugação (13.000 x g por um minuto) o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi hidratado com 100µL de Solução de Hidratação de DNA. A reação foi incubada a 65°C por uma hora. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o uso.

4.5.5 Amplificação do gene constitutivo do grupo sanguíneo ABO

Depois de extraídas, as amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de PCR que possui o gene constitutivo ABO como alvo, de modo a averiguar se as extrações de DNA foram realizadas com sucesso. O protocolo utilizado foi descrito por Olsson e colaboradores (1998), que utiliza iniciadores alvo para sequências no exon 7 do gene do grupo sanguíneo ABO (tabela 4), amplificando um fragmento de 419 pares de bases. O procedimento contou com as seguintes concentrações de reagentes; 6,25µL de Master Mix, 1,0µL de

iniciador senso (20 μ M), 1,0 μ L de iniciador antisenso (20 μ M), 1,25 μ L de Magnésio, 2,0 μ L de água para PCR e 1,0 μ L da amostra de DNA.

As reações foram realizadas no termociclador automático para PCR (Veriti Thermal Cycler - Applied Biosystems), nas seguintes condições; 95°C por cinco minutos, 34 ciclos de 95°C durante um minuto, 68°C por um minuto, 72°C por um minuto e finalmente, uma etapa de 72°C por cinco minutos.

Tabela 4. Resumo das sequências de iniciadores da PCR convencional para amplificação dos genes do sistema ABO.

Alvo	Iniciadores*	Sequência
<u>Sistema ABO</u>	516 S	5'GCTGGAGGTGCGCGCTAC3'
	96 AS	5'ACGAATTCTACTTGTTTCAGGTGGCTGTGCGTC3'

*PCR ABO (Olsson et al., 1998).

4.5.6 Real-Time PCR para a detecção do vírus Epstein-Barr

Para a identificação do vírus nas amostras de DNA extraídas, foi utilizado um ensaio de PCR em tempo real descrito por Moormann e colaboradores em 2005, modificado por Reynaldi e colaboradores em 2016. Este protocolo utiliza um par de iniciadores e uma sonda (tabela 5) para a detecção de um alvo já bem descrito, que se baseia na amplificação do gene BALF-5, responsável pela codificação de uma proteína de replicação do vírus, que desempenha a função de DNA polimerase.

Inicialmente, foram utilizadas amostras de DNA controles, conforme descrito do item 4.2.1 e, em seguida, amostras de indivíduos com história de infecção pelo EBV. Neste sentido, a técnica foi padronizada no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, software versão 2.0.5), da Plataforma de PCR em Tempo Real, do Instituto René Rachou.

Tabela 5. Resumo das sequências de iniciadores e sonda da Real-Time PCR para amplificação do gene de Epstein-Barr vírus.

Alvo	Iniciadores/sonda	Sequência
<u>Epstein-Barr vírus</u>	Foward	5'CGGAAGCCCTCTGGACTTC3'
	Reverse	5'CCCTGTTTATCCGATGGAATG3'
	Sonda	[FAM] TGTACACGCACGAGAAATGCGCC [TAMRA]

4.6 Análises dos dados

Neste estudo, verificou-se uma possível associação entre vírus Epstein Barr e malária por *Plasmodium vivax*, e seu efeito sobre parâmetros clínicos e hematológicos dos pacientes, tais como níveis de hemoglobina, hematócrito e contagem de plaquetas. Além disso, investigamos a influência da infecção viral na resposta imune de indivíduos com história de longa exposição à malária na Amazônia brasileira. Um banco de dados foi construído com as informações obtidas dos pacientes (pacote estatístico EpiData 2002).

Para tanto, foram feitas análises univariadas para comparação de medianas, utilizando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, quando os grupos não apresentaram distribuição normal, e o teste *t* de student em caso de distribuição normal dos dados. A fim de comparar proporções, realizou-se o teste qui-quadrado (χ^2) ou, quando necessário, o teste Exato de Fisher. Todos os testes consideraram nível de significância de 5%. O *software* utilizado nas análises estatísticas foi *GraphPad (InStat 4.0; Prism 6)*.

5. RESULTADOS

5.1. Padronização dos protocolos de amplificação e extração do Epstein-Barr vírus

5.1.1. PCR em tempo real para a amplificação do gene BALF-5 de Epstein-Barr vírus

Com o intuito de padronizar um protocolo de PCR em tempo real (qPCR) para a amplificação do DNA de Epstein-Barr vírus, optou-se por utilizar, primeiramente, o protocolo descrito por Masakhwe e colaboradores em 2016. Para tal, foram utilizados 0,5 μ L de cada primer (estoque a 10 μ M/ reação 0,2 μ M), 0,25 μ L de sonda (estoque a 10 μ M / reação 0,1 μ M), 2,0 μ L de DNA, 12,5 μ L de TaqMan universal (Applied Biosystems) e 9,5 μ L de água para PCR em um volume final de 25 μ L. A PCR foi realizada conforme as seguintes condições de temperatura, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos (45 ciclos) e 60°C por 1 minuto.

Para a padronização deste protocolo, foram utilizadas 10 amostras de DNA dos indivíduos considerados controle positivo (item 6.5), as quais foram extraídas a partir de sangue total (item 6.6.1). Além da amplificação do DNA de referência, o protocolo original foi capaz de amplificar apenas 3 de 10 amostras testadas (30%). Com o intuito de aumentar o rendimento desta reação, optou-se, primeiramente, por aumentar os volumes dos DNAs (controles e testes), entretanto, não houve aumento de positividade. Posteriormente, a ciclagem foi alterada de 45 para 50 ciclos. Contudo também não foram verificadas alterações (Figura 5). Finalmente, optou-se por adaptar o protocolo original para uma reação com volume final de 20 μ L, que foi padronizada nas seguintes condições; 0,4 μ L de cada primer, 0,2 μ L de sonda, 2,0 μ L de DNA, 12,5 μ L de TaqMan universal (Applied Biosystems) e 4,5 μ L de água para PCR. Mesmo com essas alterações, a capacidade de detecção do DNA viral permaneceu baixa nas amostras consideradas controles (30%).

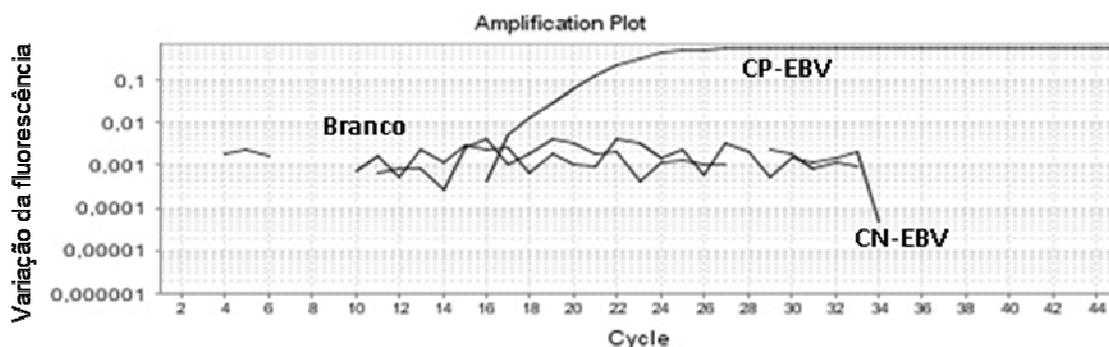


Figura 5. Representação gráfica ilustrando a amplificação do DNA molde de Epstein-Barr vírus a partir do protocolo molecular de qPCR descrito por Masakhwe, sendo CP-EBV o DNA controle positivo, e CN-EBV o controle negativo.

Visando comparar diferentes protocolos baseados no gene BALF-5 de Epstein-Barr vírus, optou-se por testar um segundo protocolo de PCR em tempo real frequentemente citado na literatura, descrito por Moormann e colaboradores em 2005 e adaptado por Reynaldi e colaboradores em 2016. Desta forma, para um volume final de 20 μ L de reação foram utilizados inicialmente: 0,75 μ L de cada primer (estoque a 10 μ M/ reação 0,2 μ M), 0,50 μ L de sonda (estoque a 10 μ M/ reação 0,1 μ M), 0,5 μ L de DNA, 12,5 μ L de TaqMan universal (Applied Biosystems), e 5,0 μ L de água para PCR. Com relação à ciclagem, inicialmente foram testadas as condições universais, com 40 ciclos; 50°C por 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, 95°C por 15 segundos e 60°C no intervalo de 1 minuto final.

Para esta padronização, também foram utilizadas as 10 amostras de DNA dos indivíduos considerados controles (item 6.5), que foram extraídas a partir de sangue total (item 6.6.1). Apesar do DNA de referência ter sido amplificado, as condições iniciais do ensaio permitiram a detecção de apenas 3 das 10 amostras controle testadas (30%). A fim de garantir melhores resultados, optou-se por dobrar a concentração inicial de DNA, além de reduzir pela metade o volume final da reação. Desta forma, o protocolo foi padronizado com sucesso para um volume final de 10 μ L, distribuídos entre 0,2 μ L de cada primer (estoque a 10 μ M/ reação 0,2 μ M), 0,1 μ L de sonda (estoque a 10 μ M/ reação 0,1 μ M), 1,0 μ L de DNA, 5,0 μ L de TaqMan universal (Applied Biosystems) e 3,5 μ L de água para PCR. A partir das alterações realizadas, foi possível

detectar 6 das 10 amostras (60%). A ciclagem e o tempo de reação foram mantidos conforme o protocolo original (Figura 6).

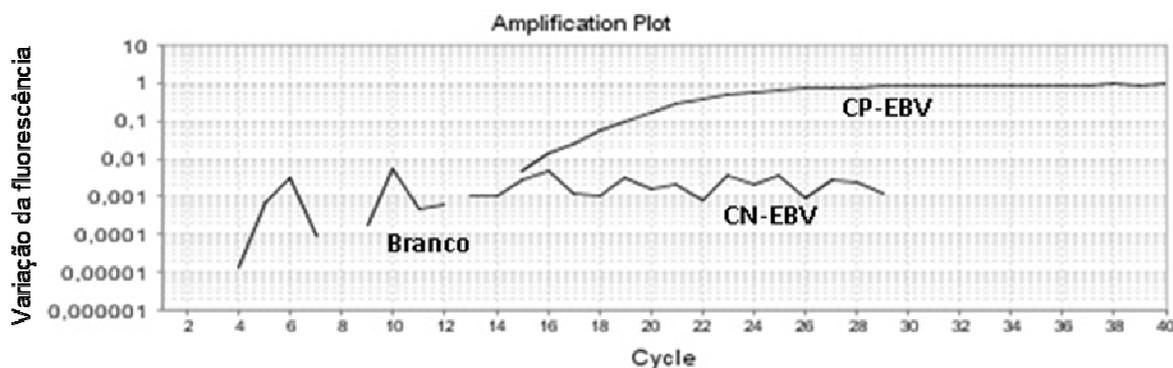


Figura 6. Representação gráfica ilustrando a amplificação do DNA molde de Epstein-Barr vírus a partir do protocolo molecular de qPCR originalmente descrito por Moormann e adaptado por Reynaldi em 2016, sendo CP-EBV o DNA controle positivo, e CN-EBV o controle negativo.

Diante dos resultados apresentados acima, verificou-se que o protocolo adaptado por Reynaldi e colaboradores em 2016, demonstrou um melhor desempenho na detecção de amostras consideradas positivas (60%) para Epstein-Barr vírus, além de possuir um melhor custo benefício, uma vez que foi capaz de detectar um grande número de amostras positivas com uma menor quantidade de reagentes quando comparado com o outro protocolo testado.

5.1.2 Extração de DNA de Epstein – Barr vírus (EBV_{DNA}) a partir de diferentes amostras biológicas

Com o objetivo de determinar qual a amostra biológica mais apropriada (sangue total, PBMC, sangue estocado em papel de filtro ou plasma) para a obtenção do DNA viral, as amostras de sangue periférico coletadas dos 10 indivíduos com histórico de infecção pelo Epstein – Barr vírus (EBV) foram utilizadas como controles “positivos” (item 6.5). Para isto, quatro diferentes protocolos de extração foram utilizados (item 6.6) para cada amostra, incluindo os que utilizam sangue total, cultura de células, sangue em papel de filtro e plasma. Após a extração, o DNA total obtido foi submetido à técnica de PCR convencional para amplificação do gene constitutivo ABO (controle da

extração, item 6.6.5) e, posteriormente, ao protocolo para amplificação do DNA viral (item 6.6.6).

Com relação à amplificação do gene constitutivo ABO como controle de extração, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os quatro protocolos testados ($\chi^2 = 25,4$, $p < 0,0001$) (Figura 7). Considerando os protocolos com maior positividade, PBMC (80%) e sangue total (90%), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre estes grupos ($p = 1$, teste exato de Fisher). Desta forma, ambos os protocolos poderiam ser utilizados para extração do DNA total, já que apresentaram as maiores frequências de amplificação.

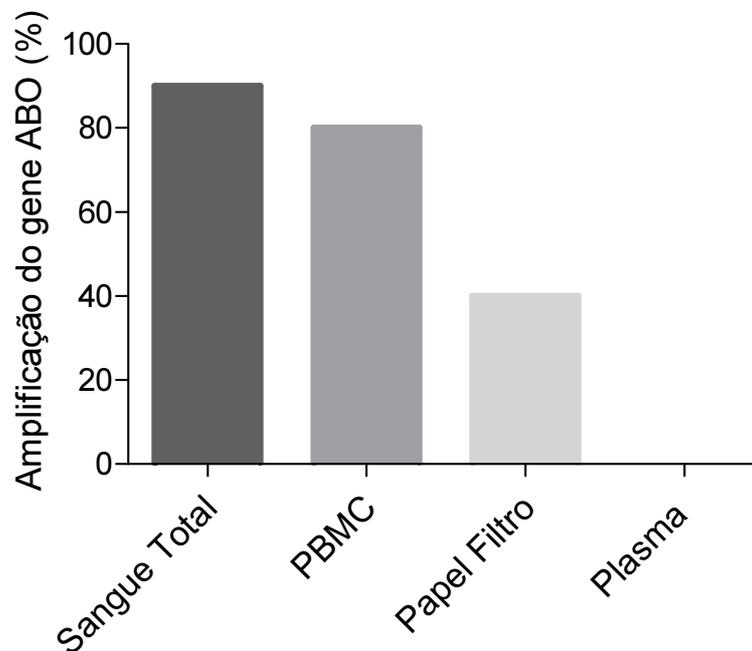


Figura 7: Frequência de amplificação do gene constitutivo ABO como controle de extração de DNA total em 10 amostras controles consideradas positivas para o EBV. As amostras de DNA foram extraídas a partir de sangue total, células mononucleares do sangue periférico (PBMC), sangue total estocado em papel de filtro ou plasma.

Quando se avaliou nestas mesmas amostras a amplificação do DNA viral, observou-se diferença estatisticamente significativa na capacidade de amplificação do EBV_{DNA} entre os quatro tipos de material biológico ($\chi^2 = 19,1$, $p < 0,0003$) (Figura 8). Entretanto, apesar de não existir diferença estatisticamente significativa entre a amplificação do EBV_{DNA} nas amostras de

sangue total (60%) e PBMC (80%) ($p=0,6285$, teste exato de Fisher), optou-se, aqui, por utilizar a amplificação futura das amostras a partir de sangue total, pela impossibilidade de se obter células mononucleares do sangue periférico de todos os indivíduos estudados (541 indivíduos).

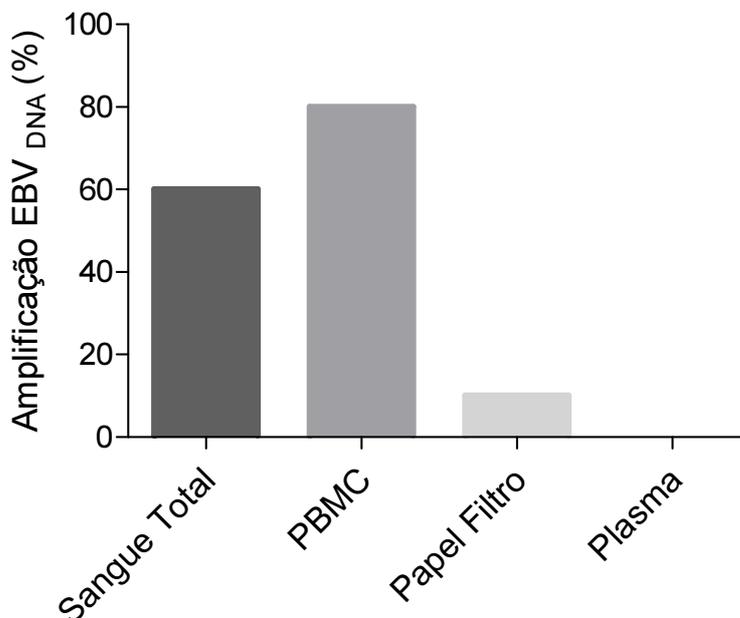


Figura 8: Frequência de amplificação por PCR em tempo real, do EBV_{DNA} em 10 amostras consideradas controles positivos. O DNA viral foi extraído a partir de sangue total, células mononucleares do sangue periférico (PBMC), sangue total estocado em papel de filtro ou plasma.

5.2 Presença de Epstein-Barr vírus na circulação influenciando na morbidade na malária vivax

Visando investigar se a infecção simultânea pelo Epstein-Barr vírus e *P. vivax* poderia agravar o quadro de malária clínica, a presença do DNA viral foi avaliada em 154 pacientes infectados pelo *P. vivax*, apresentando ou não sintomas clínicos.

Como apresentado na figura 9, na amostra constituída predominantemente de indivíduos sintomáticos para malária, a presença do DNA viral circulante não foi associada à presença de sintomas clínicos, já que a frequência de

sintomas foi similar entre os grupos com ou sem amplificação do DNA viral ($p=0.3157$, teste exato de Fisher).

Sintomas em indivíduos com malária aguda vs EBV_{DNA}

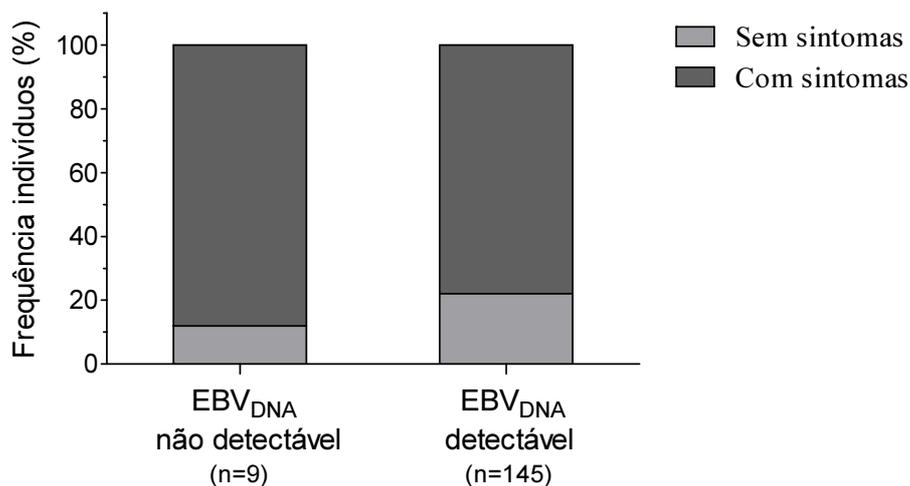


Figura 9: Frequência de sintomas clínicos associados à malária (calafrio, cefaleia e mialgia) em indivíduos com malária aguda, na presença (n=9) e ausência (n=145) de detecção do DNA de Epstein – Barr vírus. No eixo Y está representada a frequência relativa de indivíduos e no eixo X os dois grupos de indivíduos com DNA viral detectável (positivo) ou não (negativo) no sangue circulante.

Na amostra estudada não foi possível associar o escore clínico à presença do DNA viral. Isto porque a maioria dos indivíduos (64%) possuía um escore clínico baixo (0-3) (tabela 1; item 6.6.1). Por esta razão, buscou-se, em seguida, uma associação entre a presença do DNA viral e os parâmetros hematológicos tais como hemoglobina, hematócrito e plaquetas.

Embora a frequência de indivíduos positivos para o EBV tenha sido baixa neste grupo (9 em 154; 6%), foi possível encontrar associação positiva entre morbidade e o vírus circulante. Mais especificamente, conforme demonstrado na figura 10, os níveis de hemoglobina foram estatisticamente menores nos indivíduos com EBV_{DNA} detectável quando comparado aqueles com EBV_{DNA} não detectável ($p=0.0142$, teste de *Mann Whitney*).

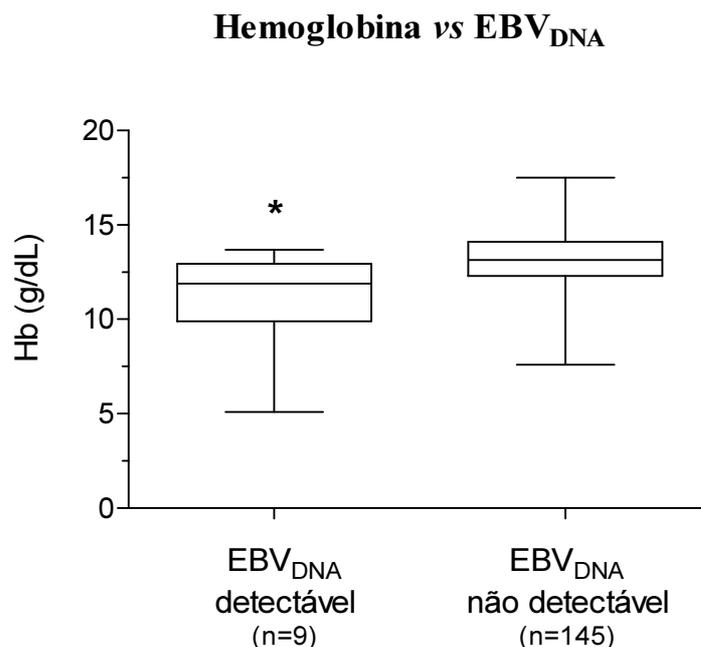
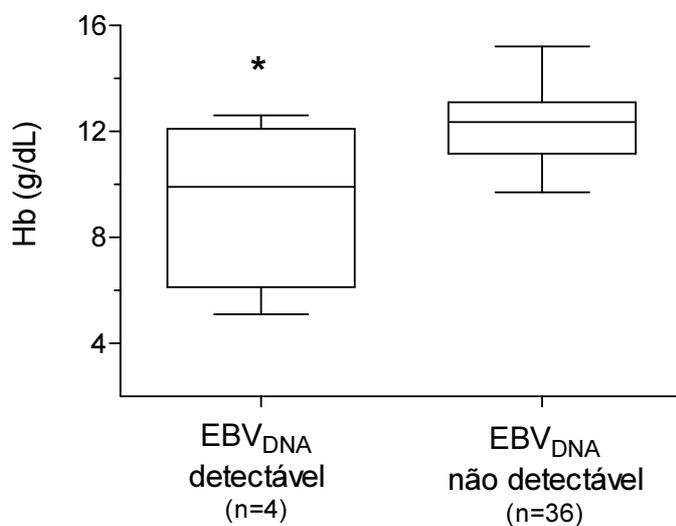


Figura 10: Níveis de hemoglobina em pacientes com malária aguda por *P. vivax* na presença (n=9) e na ausência (n=145) de DNA de Epstein – Barr vírus (EBV_{DNA}) detectado no sangue circulante; no eixo Y estão representados os níveis de hemoglobina (g/dL) e, no eixo X, os dois grupos de indivíduos com EBV_{DNA} detectável ou não, pela amplificação do gene BALF-5 por PCR em tempo real (* p=0,0142).

Considerando que os níveis de hemoglobina variam em função do gênero, fez-se necessário analisar os níveis entre mulheres e homens (Figura 11). Foi possível observar que a associação entre a presença do EBV_{DNA} e diminuição dos níveis de hemoglobina, foi estatisticamente significativa apenas para o sexo feminino (p=0,0473, teste de *Mann Whitney*).

A Hemoglobina (sexo feminino) vs EBV_{DNA}



B Hemoglobina (sexo masculino) vs EBV_{DNA}

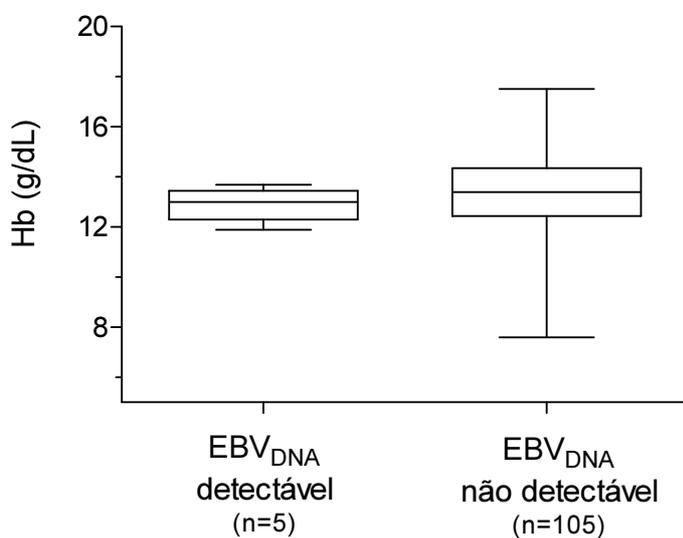


Figura 11: Níveis de hemoglobina em pacientes com malária aguda por *P. vivax* na presença e ausência de DNA de Epstein – Barr vírus (EBV_{DNA}) detectado no sangue circulante; **(A)** Indivíduos do sexo feminino (n=40): EBV_{DNA} detectável (n=4) e EBV_{DNA} não detectável (n=36); **(B)** Indivíduos do sexo masculino (n=110): EBV_{DNA} detectável (n=5) e EBV_{DNA} não detectável (n=105). No eixo Y estão representados os níveis de hemoglobina (g/dL) e no eixo X os dois grupos de indivíduos com EBV_{DNA} detectável ou não, pela amplificação do gene BALF-5 por PCR em tempo real (* p=0,0473).

Quando se avaliou os níveis de hematócrito nestes indivíduos, observou-se que a presença do DNA viral detectável foi associada a uma diminuição estatisticamente significativa dos níveis de hematócrito ($p=0,0345$, teste de *Mann Whitney*) (figura 12) e, neste caso, o gênero não influenciou nos resultados.

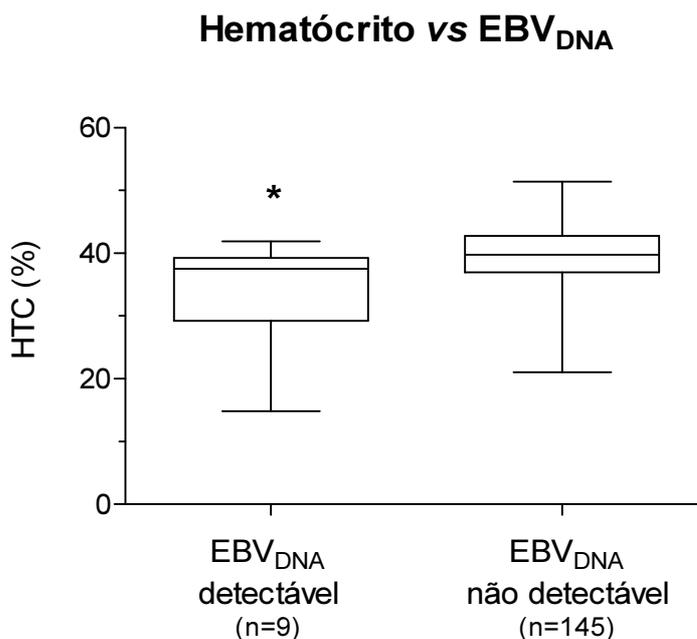


Figura 12: Porcentagem de hematócrito em pacientes com malária aguda por *P. vivax* na presença ($n=9$) e na ausência ($n=145$) de DNA de Epstein – Barr vírus (EBV_{DNA}) detectado no sangue circulante; no eixo Y estão representadas as porcentagens de hematócrito (%) e no eixo X os dois grupos de indivíduos com EBV_{DNA} detectável ou não, pela amplificação do gene BALF-5 por PCR em tempo real (* $p=0,0345$).

No que se refere aos níveis plaquetários, observou-se que, na presença do EBV_{DNA}, houve uma diminuição estatisticamente significativa dos níveis plaquetários ($p=0,0208$, teste de *Mann Whitney*) (Figura 13). Na malária, é normal os níveis plaquetários se apresentarem reduzidos (≤ 100.000 plaquetas/ mm^3). Entretanto, nos casos de coinfeção com Epstein-Barr vírus observou-se uma diminuição ainda maior desses níveis, já que foram constatados indivíduos com níveis de plaquetas inferiores a 50.000 plaquetas/ mm^3 , o que indica a ocorrência de quadros de trombocitopenia grave.

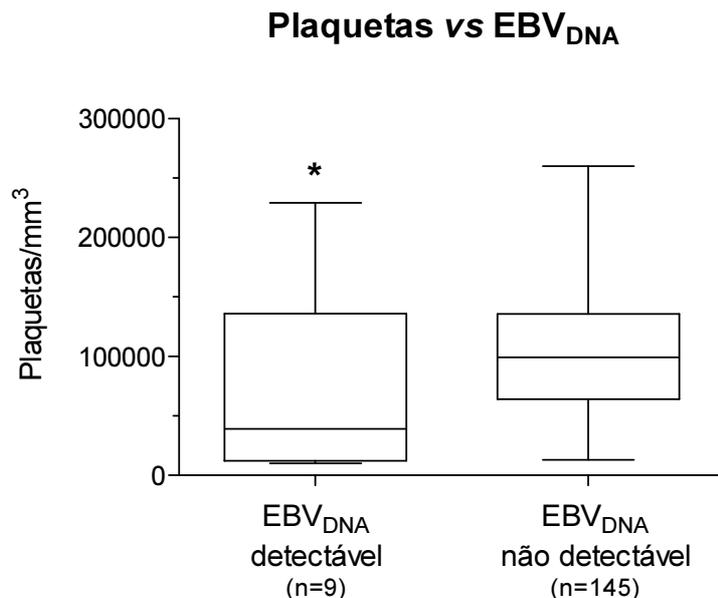


Figura 13: Níveis de plaquetas em pacientes com malária aguda por *P. vivax* na presença (n=9) e ausência (n=145) de DNA de Epstein – Barr vírus (EBV_{DNA}) detectado no sangue circulante; no eixo Y estão representados os níveis de plaquetas (mm³) e no eixo X os dois grupos de indivíduos com EBV_{DNA} detectável ou não, pela amplificação do gene BALF-5 por PCR em tempo real (* p=0,0208).

5.3 Frequências de infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) em indivíduos com histórico de longa-exposição à malária

Uma vez que os indivíduos de Rio Pardo (AM) estão continuamente expostos à infecção por *P. vivax*, podendo ou não estar infectados, avaliou-se a presença de sintomas relacionados à malária nos 38 indivíduos diagnosticados com essa doença através de gоста espessa e/ou PCR específico para o parasito. Dentre os 38 indivíduos com malária aguda, o DNA de EBV foi detectado em 6 (16%) indivíduos. Considerando estes 6 indivíduos com DNA viral positivo, 5 (83%) deles apresentaram sintomas clínicos associados à malária. Por outro lado, no grupo de indivíduos com malária aguda com EBV_{DNA} não detectável, a frequência de sintomas clínicos foi de apenas 38% (n=12) (Figura 14). Entretanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas, provavelmente, devido ao pequeno número de indivíduos por grupo (p=0,0877, teste exato de Fisher).

Sintomas em indivíduos diagnosticados com malária vs EBV

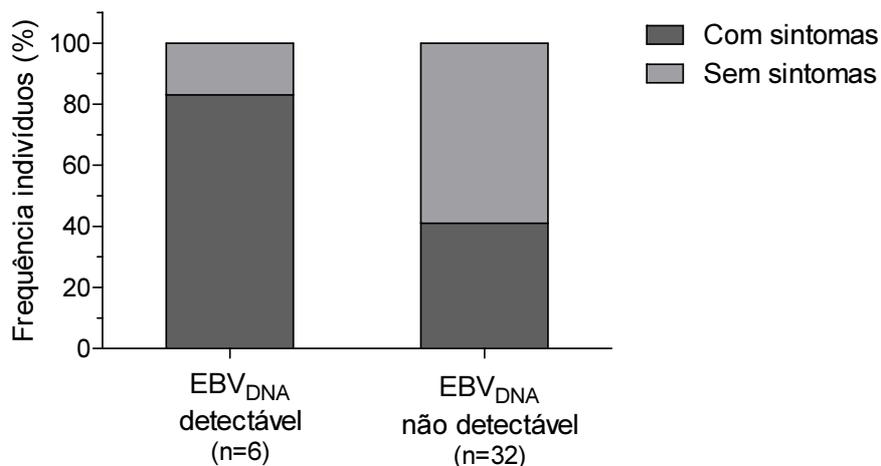


Figura 14: Frequência dos principais sintomas de malária (calafrio, cefaleia e mialgia) em indivíduos com malária aguda por *P. vivax* (n=38). No eixo Y está representada a frequência relativa de indivíduos com sintomas e no eixo X os dois grupos de indivíduos com EBV_{DNA} detectável (n=6) e com EBV_{DNA} não detectável (n=32).

Quando se avaliou a presença de sintomas potencialmente associados à infecções por plasmódios (calafrio, cefaleia e mialgia) em todos os indivíduos expostos a malária, observou-se que os indivíduos que possuem o EBV_{DNA} apresentaram uma frequência maior de sintomas clínicos (43%) quando comparado com os indivíduos que não possuem o DNA viral (29%) (p=0.0232, teste exato de Fisher) (Figura 15).

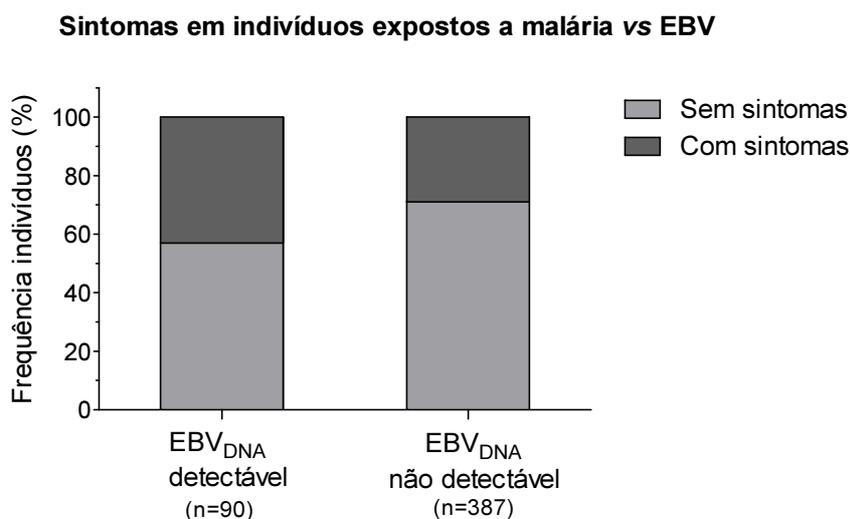


Figura 15: Frequência dos principais sintomas associados malária (calafrio, cefaleia e mialgia) em indivíduos com histórico de longa-exposição. No eixo Y está representada a frequência relativa de indivíduos com sintomas e no eixo X os dois grupos de indivíduos com EBV_{DNA} detectável (n=90) e com EBV_{DNA} não detectável (n=387).

Tratando-se de uma área endêmica para a doença, onde a população está frequentemente exposta ao risco de infecção pelo *P. vivax*, buscou-se avaliar a associação entre o número prévio de episódios de malária destes indivíduos, e a presença do DNA viral. Contudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p=0.3131$, teste exato de Fisher).

Visto que os indivíduos de Rio Pardo estão continuamente expostos à malária, espera-se que os adultos desenvolvam uma resposta imune específica, avaliada aqui pela produção antígeno-específica de anticorpos. Desta forma, hipotetizou-se que a presença do DNA viral poderia influenciar na resposta de anticorpos específicos. Para tal, anticorpos IgG contra diferentes proteínas de *P. vivax* (PvDBP_{II}, PvAMA-1 e PvMSP-1₁₉) foram avaliados em 444 (82%) dos 541 indivíduos estudados. De acordo com os resultados do ensaio sorológico para *P. vivax*, os indivíduos estudados foram categorizados como Respondedores (presença de anticorpos específicos) e Não Respondedores (anticorpos não detectáveis) (Tabela 6).

Tabela 6. Perfil de resposta sorológica dos 444 indivíduos de Rio Pardo.

Tipo de resposta*	PvDBPII	PvMSP-1 ₁₉	PvAMA-1
Respondedor - n (%)	233 (52%)	305 (69%)	284 (86%)
Não respondedor - n (%)	211 (48%)	139 (31%)	160 (14%)

*Anticorpos anti - PvDBPII, anti - PvMSP-1₁₉ e anti - PvAMA-1 foram avaliados pelo ensaio sorológico de ELISA considerando como respondedores índices de reatividade >1, conforme descrito anteriormente (item 6.4).

A partir desta classificação, foi avaliado se a presença do EBV_{DNA} em indivíduos expostos repetidamente à malária (item 4.1.2) poderia interferir na resposta de anticorpos contra proteínas de *P. vivax* (Figura 16).

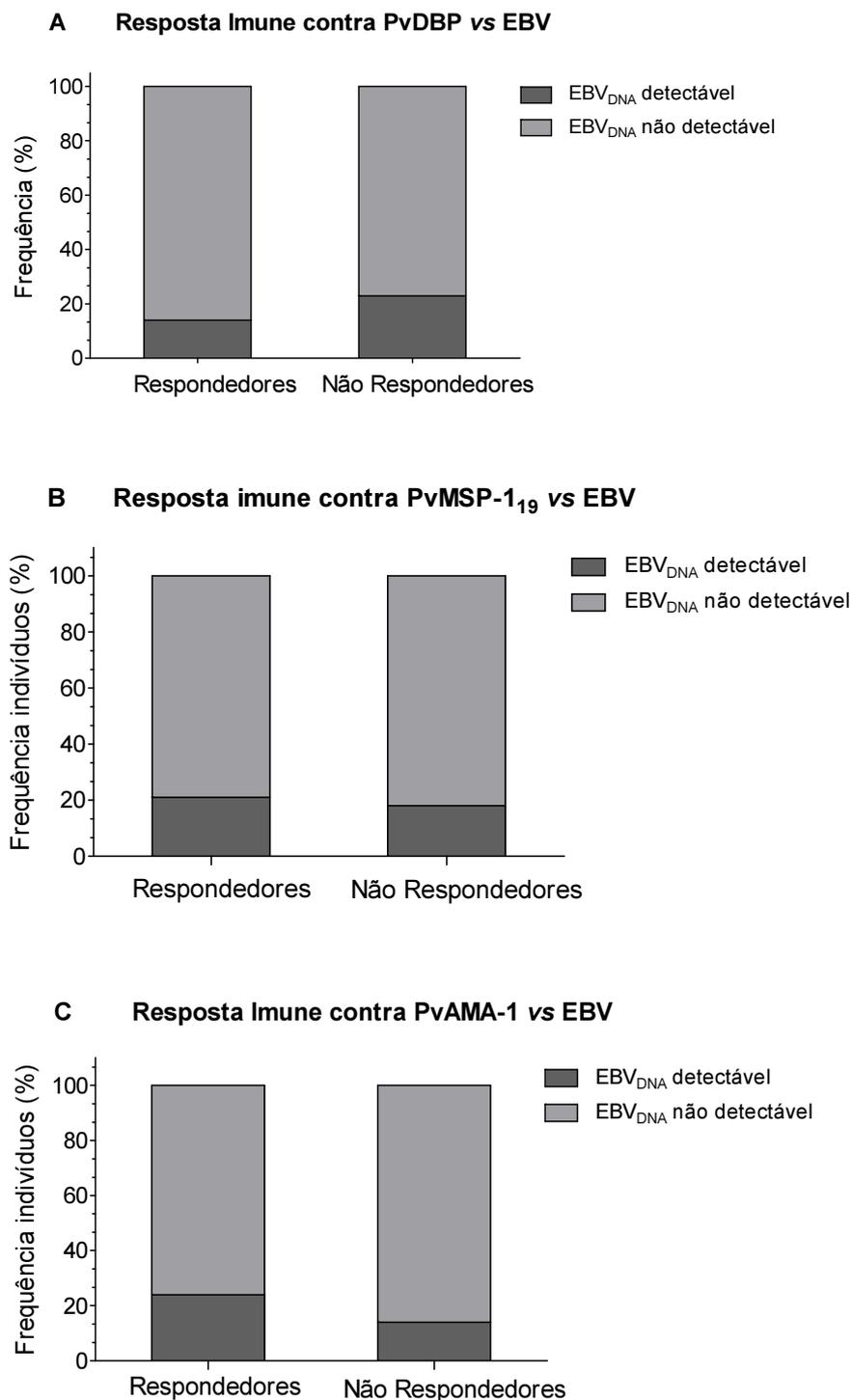


Figura 16: Perfil de resposta de anticorpos IgG antígeno específicos em indivíduos com histórico de longa exposição à malária (Rio Pardo, AM). No eixo Y está representada a frequência relativa de indivíduos com EBV_{DNA} detectável ou não detectável e no eixo X os dois grupos de indivíduos classificados como Respondedores e Não respondedores para cada proteína: **(A)** Resposta contra PvDBP_{II}; Respondedores (n=233), Não Respondedores (n=211); **(B)** Resposta contra PvMSP-1₁₉; Respondedores (n=305), Não Respondedores (n=139); **(C)** Resposta contra PvAMA-1; Respondedores (n=284), Não Respondedores (n=160).

Em relação à PvDBP11 (Figura 16A), o DNA viral pode ser detectado mais frequentemente entre os não respondedores (23%) do que entre os respondedores (14%) ($p= 0.0366$, teste exato de Fisher). Em relação a MSP1-19 (Figura 16B), nenhuma diferença foi observada entre respondedores e não respondedores ($p= 0.6124$, teste exato de Fisher). Por outro lado, quando se avaliou a resposta para a proteína PvAMA-1, observou-se um resultado contrário do esperado (Figura 16C), já que o grupo dos indivíduos respondedores possuía uma frequência maior de DNA viral detectável que o grupo dos não respondedores (21% versus 18%); embora pouco expressiva, essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0.0197$, teste exato de Fisher). Os resultados encontrados para PvAMA1 foram confirmados através do índice de reatividade dos indivíduos no teste de ELISA ($p<0.0001$, teste de *Mann Whitney*) (Figura 17).

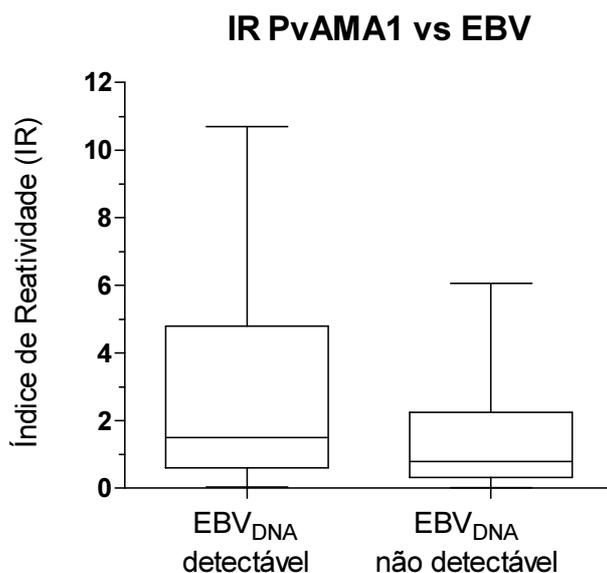


Figura 17: Índice de reatividade para PvAMA1 em indivíduos com histórico de longa exposição à malária (Rio Pardo, AM) na presença ($n=90$) e ausência ($n=387$) de DNA de Epstein – Barr vírus (EBV_{DNA}) detectado no sangue circulante; no eixo Y estão representados os índices de reatividade; no eixo X os dois grupos de indivíduos com EBV_{DNA} detectável ou não, pela amplificação do gene BALF-5 por PCR em tempo real.

6. DISCUSSÃO

Populações de países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, estão frequentemente expostas a infecções por mais de um patógeno. Essas coinfeções podem ter consequências consideráveis na evolução do quadro clínico do indivíduo, dificultando o diagnóstico e o tratamento específico (VAUMOURIN *et al.*, 2015). Estudos têm mostrado que o impacto das coinfeções envolvendo a malária é maior em populações que vivem nas regiões mais pobres do mundo, como é o caso do continente africano, onde é alta a prevalência de outros agentes patogênicos (SHANKARKUMAR *et al.*, 2011; BROOKER *et al.*, 2007).

No que se refere a infecções envolvendo malária e vírus, nota-se que grande parte dos estudos tem avaliado a associação entre *P. falciparum* e HIV ou o Epstein-barr vírus (EBV). Em estudos que envolvem infecções por *P. falciparum* e HIV/Aids, os resultados de evolução do quadro clínico do indivíduo ainda são conflitantes, podendo ou não resultar em elevadas parasitemias e baixos índices hematimétricos (MBALE *et al.*, 2016; TAY *et al.*, 2015; RATTANAPUNYA *et al.*, 2015; FRISCHKNECHT & FACKLER, 2016). Por outro lado, a associação *P. falciparum*/EBV levando ao linfoma de Burkitt em crianças africanas está bem estabelecida (MOORMANN *et al.*, 2011). Apesar de o EBV ser considerado um vírus altamente prevalente da população mundial (MASAKHWE *et al.*, 2016), apenas no continente africano, onde a transmissão de malária é hiperendêmica, o vírus está associado a esta modalidade de linfoma denominado Burkitt endêmico (MOORMANN *et al.*, 2011; PIRIOU *et al.*, 2012; ROBBIANI *et al.*, 2015).

Enquanto a associação *P. falciparum*/Linfoma de Burkitt está bem caracterizada, não existem evidências de que outras espécies de plasmódio, como *P. vivax*, estão associadas a casos de câncer relacionados ao EBV. Até o momento, existe apenas um relato de caso clínico associando a infecção pelo EBV com malária sintomática (AKIN *et al.*, 2013). Uma vez que *P. vivax* é a espécie de plasmódio prevalente no Brasil, e que os dados na literatura sobre a coinfeção entre esse parasito e o EBV são escassos, faz-se necessário estudos que avaliem as possíveis alterações causadas na evolução clínica da

malária vivax na presença do EBV. Neste sentido, o estudo aqui apresentado foi de “prova-de-conceito” e a hipótese investigada foi a de que a exposição simultânea ao EBV e ao *P. vivax* poderia influenciar, de alguma forma, na morbidade e/ou resposta imune específica para a malária.

6.1 Amplificação e extração de Epstein-barr vírus no sangue circulante

6.1.1 Protocolos para amplificação do DNA viral (EBV_{DNA})

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para a detecção de EBV no sangue circulante, incluindo a detecção de anticorpos IgM e IgG contra proteínas do capsídio viral (VCA) e antígenos nucleares (EBNAs) (PASCHALE & CLERICI, 2012; MORISON *et al.*, 2015), e, mais recentemente, a detecção da proteína ZEBRA (Zta) que está envolvida na replicação viral (HABBIB *et al.*, 2017). Entretanto, as aplicações destas técnicas sorológicas demonstram melhor desempenho na diferenciação entre infecções recentes ou passadas pelo vírus, funcionando como marcadores de infecção ativa (NOWALK & GREEN, 2016). Além disso, os protocolos baseados na detecção de anticorpos podem ser pouco eficientes em pacientes com sistema imune comprometido, já que a manutenção desses anticorpos na circulação depende de vários fatores, incluindo a dinâmica da doença na presença de outras infecções (GARTNER *et al.*, 2000; NOWALK & GREEN, 2016).

Desta forma, as técnicas moleculares que se baseiam na amplificação do DNA viral, têm sido frequentemente utilizadas para a detecção viral em diferentes situações, incluindo pacientes imunocompetentes ou não (NOWALK & GREEN, 2016). No caso do Epstein-Barr vírus, inúmeros genes têm sido utilizados para a amplificação por protocolos moleculares, incluindo aqueles que codificam antígenos nucleares do EBV, EBNAs 1, 2 e 3C. Entretanto, o gene BALF5, expresso no ciclo lítico do vírus, tem sido o mais frequentemente amplificado de acordo com a literatura especializada (PIRIOU *et al.*, 2012, REYNALDI *et al.*, 2015, MASAKHWE *et al.*, 2016).

No presente estudo buscou-se comparar dois protocolos recentemente descritos na literatura: (i) o protocolo descrito por Masakhwe e colaboradores (2016) e (ii) protocolo descrito por Reynaldi e colaboradores (2016). Ambos se

baseiam na amplificação do gene BALF-5 de EBV, por meio da técnica de PCR em tempo real, utilizando-se iniciadores e sonda específicos. Embora ambos os protocolos tenham se baseado do protocolo original descrito por Kimura e colaboradores (1999), o protocolo de Reynaldi e colaboradores (2016) compilou ainda adaptações previamente descritas por Moormann e colaboradores (2005) e tem sido citado na literatura com maior frequência (PIRIOU *et al.*, 2012, REYNALDI *et al.*, 2015, WILMORE *et al.*, 2015).

De fato, os resultados aqui apresentados demonstraram que enquanto o protocolo de Masakhwe e colaboradores (2016) amplificou 30% de amostras potencialmente positivas, o protocolo de Reynaldi e colaboradores (2016) amplificou 60% das amostras do mesmo painel. Além disso, este segundo protocolo foi economicamente mais viável, já que utiliza volumes menores de reagentes. Desta forma, o protocolo descrito por Reynaldi e colaboradores demonstrou melhor custo benefício e foi utilizado nos ensaios subsequentes.

6.1.2 Avaliação do desempenho de diferentes amostras para a extração e a amplificação do DNA viral (EBV_{DNA}) no sangue circulante

Tendo em vista que o EBV é um vírus linfotrópico, mantendo-se em latência nestas células ao longo da vida do indivíduo infectado (MATAR *et al.*; 2015), grande parte dos estudos determina a presença do EBV através de amostras de DNA provenientes de células B (WILMORE *et al.*, 2015; MOORMANN *et al.*, 2007), seguida por amostras proveniente de sangue total (REYNALDI *et al.*, 2016; PIRIOU *et al.*, 2012). Neste intuito, realizou-se aqui a comparação do DNA viral extraído a partir de quatro amostras biológicas, sangue total, células mononucleares do sangue periférico (PBMC), sangue estocado em papel de filtro e plasma. De fato, os resultados aqui apresentados não demonstraram diferença entre os protocolos de extração a partir de amostras de sangue total e PBMC, confirmando a possibilidade do uso de ambas as amostras para a extração do DNA viral.

O pior desempenho da extração de DNA viral a partir de plasma e de sangue estocado em papel de filtro justifica, de uma maneira geral, a utilização de sangue total e PMBCs encontrada na literatura. Assim, optou-se aqui por amplificar DNA viral a partir de sangue total, já que o grande número de

amostras envolvidos neste estudo limitou a possibilidade de usar PBMCs. Especulou-se ainda a possibilidade que o DNA amplificado a partir do sangue total poderia ser um indicativo de viremia, isto é, da ativação do ciclo de replicação viral. Entretanto, para confirmar esta hipótese fazem-se necessários experimentos futuros para detectar proteínas associadas à replicação viral, como o ensaio recém-descrito para identificar a proteína ZEBRA, o principal fator de transcrição de EBV, expresso durante a ativação do ciclo lítico viral (HABBIB *et al.*, 2017).

6.2 Epstein-Barr vírus associado à malária aguda por *P. vivax*

Até o momento, poucos estudos têm buscado avaliar coinfeções envolvendo *P. vivax*. Apesar disto, as comorbidades parecem ser frequentes em áreas endêmicas, podendo resultar em quadros mais graves de malária vivax (MAGALHAES *et al.*, 2012), embora raramente sejam associadas com morte (LACERDA *et al.*, 2012).

Neste sentido, buscou-se aqui uma associação entre a presença do DNA viral, e alterações no quadro clínico da malária vivax. Para isso, o presente estudo envolveu a busca passiva (indivíduos sintomáticos que procuram os serviços de referência para diagnóstico e tratamento) e a busca ativa (estudos de campo para identificar casos agudos, com ou sem sintomas, em área de transmissão). Esta abordagem permitiu incluir no estudo dois tipos de população infectada por o *P. vivax*: (i) agudos sintomáticos, com exposição esporádica a malária, ou seja, não residentes em área endêmicas ou residentes em centros urbanos (busca passiva, n= 154 agudos) e (ii) agudos, com ou sem sintomas, mas com história de longa exposição à transmissão malárica, residentes do assentamento agrícola da Amazônia, comunidade de Rio pardo (busca ativa, n=38 agudos).

Considerando que um indivíduo de área não endêmica está sujeito a um menor número de casos de malária que um indivíduo de área endêmica, espera-se que em áreas não endêmicas, os sintomas clínicos sejam mais frequentes (FOWKES *et al.*, 2016). De fato, os resultados demonstram que a maior parte dos pacientes com malária aguda de busca passiva tinham sintomas (132 em 154, 86%) e, neste grupo, a sintomatologia independeu da

detecção do DNA viral no sangue circulante. Desta forma, o vírus EBV parece não ter afetado a morbidade do *P. vivax* neste grupo de indivíduos. Apesar disto, o presente estudo envolve duas limitações importantes. A primeira foi a impossibilidade de incluir na amostra indivíduos com malária vivax grave já que a maioria dos indivíduos incluídos no estudo foram tratados ambulatorialmente sem necessidade de internação (baixo escore clínico). A segunda limitação foi o baixo número de amostras positivas para o DNA viral (9 em 154, 6% de positividade). Portanto, seria necessário ampliar o “n” amostral de indivíduos com EBV, bem como incluir pacientes infectados por *P. vivax* com morbidade significativa. Neste sentido, novos experimentos encontram-se em andamento.

De forma interessante, para os indivíduos com malária vivax continuamente expostos à transmissão de malária (busca ativa), observou-se que embora o DNA viral tenha sido detectado no sangue circulante de apenas 6 de 38 (16%), 5 deles (83%) apresentaram sintomas clínicos de malária. No grupo sem DNA viral detectável (n=32) apenas 38% tinham sintomas de malária. Estes resultados, embora sem significado estatístico pelo pequeno número amostral, indicam que é possível que a associação *P. vivax* / EBV em áreas endêmicas de malária possam piorar o quadro clínico dessa infecção. De fato, na população de Rio Pardo observou-se que a presença do DNA viral foi mais frequentemente associada aos sintomas considerados comuns à malária; este achado foi independente da presença de malária aguda detectável (por microscopia e/ou PCR específico para plasmódio). Este resultado sugere que estes sintomas podem ser indicativos da presença de EBV sintomático nestes indivíduos ou, ainda, que o vírus circulante pode estar influenciando na presença de sintomas de outras doenças infecciosas agudas. Estudos futuros fazem-se necessário neste sentido para avaliar se a presença de viremia influencia em outras comorbidades presentes na Amazônia brasileira.

Além dos parâmetros de sintomatologia clínica, buscou-se, ainda, associar a presença do DNA viral a critérios hematológicos bem definidos que estão frequentemente alterados na malária por *P. vivax*, como os níveis de hemoglobina, hematócrito e plaquetas. Infelizmente, na população de Rio Pardo (busca ativa) estas variáveis não puderam ser avaliadas pela falta de informação disponível, já que o estudo de coorte não incluiu exames hematológicos (KANO *et al.*, 2012; KANO *et al.*, 2016). Assim, fez-se

necessário considerar apenas os indivíduos agudos obtidos por busca passiva. Neste grupo, foi possível demonstrar que os níveis de hemoglobina, hematócrito e plaquetas se encontravam significativamente menores nos casos em que a presença do DNA viral foi detectável. De interesse, a mediana de plaquetas no subgrupo positivo para o DNA viral indicou trombocitopenia grave ($< 50\text{mil plaquetas por mm}^3$); por outro lado, embora a mediana de plaquetas do subgrupo sem DNA detectável tenha indicado trombocitopenia ($\sim 100\text{mil plaquetas por mm}^3$), este valor foi cerca de duas vezes superior aquele obtido para os indivíduos com DNA viral positivo. A ausência de dados da literatura neste sentido dificulta a comparação com outros estudos. De fato, até o momento, apenas um relato de caso de malária vivax sintomática e com baixos valores hematimétricos foi descrito na literatura (AKIN *et al.*, 2013).

Em conjunto, os dados aqui apresentados reforçam a hipótese de trabalho e sugerem que a infecção simultânea por EBV e por *P. vivax* pode influenciar a morbidade da malária. Para aprofundar os dados aqui apresentados, fazem-se necessários estudos futuros que possam incluir outras áreas endêmicas de malária e pacientes com malária vivax grave.

6.3 Influência da infecção pelo Epstein-Barr vírus na resposta imune humoral para *P. vivax* em indivíduos com história de longa exposição à malária

Já está bem estabelecido que em áreas hiper e holo-endêmicas de transmissão de malária por *P. falciparum*, a infecção crônica e contínua pelo parasito resulta na reativação do EBV (MOORMANN & BAILEY, 2016). Neste sentido, o presente estudo buscou avaliar se a exposição contínua ao *P. vivax* na Amazônia, ainda que em intensidade baixa, poderia resultar em ativação viral que, em última instância, poderia influenciar no perfil de anticorpos específicos contra *P. vivax*.

Para tal, na comunidade de Rio Pardo, onde os indivíduos são frequentemente expostos à malária, buscou-se uma associação entre a presença do DNA viral e alterações na resposta de anticorpos contra diferentes proteínas do estágio sanguíneo do *P. vivax* (PvDBPII, PvAMA-1 e PvMSP-1₁₉).

Os resultados aqui obtidos demonstraram que a presença do DNA viral exerceu uma influência relativamente discreta no perfil de resposta destes anticorpos. Em relação à PvDBP_{II}, foi observada uma diminuição na frequência de anticorpos contra essa proteína na presença do DNA viral. A PvDBP é uma proteína pouco imunogênica, que é expressa na superfície do parasito somente no momento da invasão dos reticulócitos (ADAMS *et al.*, 1990). Portanto, pode-se especular que, pelo fato de o EBV infectar células B (WILMORE *et al.*, 2015), a resposta de células B de memória (MBCs) específicas para a DBP_{II} poderia estar comprometida. Para tal, estudos encontram-se em andamento para a avaliação de células B de memória DBP_{II} específicas e os resultados preliminares parecem confirmar esta hipótese, seja através da diminuição das MBCs clássicas ou aumento das chamadas MBCs atípicas, que estão associadas a não-funcionalidade da resposta imune (dados não mostrados).

Em relação às proteínas de superfície dos merozoítos de *P. vivax* que são mais imunogênicas, PvMSP1-19 e PvAMA-1, apenas para AMA-1 foi observada alguma influência. Contrariamente ao que esperado, anticorpos anti-PvAMA-1 estavam ligeiramente aumentados (frequência e níveis) nos indivíduos positivos para a amplificação do DNA viral. As razões para esta associação ainda são desconhecidas, mas pode-se especular que por serem os anticorpos anti-AMA-1 marcadores de infecção malárica recente nesta área (PIRES *et al.*, trabalho em preparação), a associação aqui encontrada poderia sugerir que estes indivíduos positivos para o vírus tiveram infecções maláricas recentes. Entretanto, os resultados aqui obtidos não mostraram associação entre a presença do DNA viral e o número prévio de episódios de malária, não sendo possível, neste momento, afirmar se a presença do EBV poderia interferir na frequência dos casos agudos de malária.

Em resumo, embora os resultados indiquem que uma possível viremia poderia influenciar na resposta de anticorpos específicos para o parasito, mais estudos são necessários para avaliar a influência do Epstein-Barr vírus na resposta humoral, com ênfase no seu desenvolvimento na memória imunológica malária-específica. Neste sentido, pretende-se incluir populações de outras áreas endêmicas, bem como avaliar o perfil de diferentes subpopulações de MBCs *vivax*-específicas nos grupos com ou sem viremia.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- i. A amplificação do gene BALF-5 do Epstein-Barr vírus (EBV) foi obtida com sucesso pelo protocolo descrito por Reynaldi e colaboradores (2016) em amostras de sangue total ou células mononucleares do sangue periférico;
- ii. A positividade para EBV é influenciada pelo tempo de exposição dos indivíduos em área de transmissão de malária, já que a frequência de positivos foi superior naqueles indivíduos com história de longa-exposição à malária na Amazônia brasileira;
- iii. A presença do DNA de Epstein-Barr vírus no sangue circulante está associada a níveis hematimétricos mais baixos em pacientes com malária aguda por *P. vivax*; por outro lado, apenas em indivíduos com histórico de longa exposição à transmissão malárica, a presença do DNA viral está mais frequentemente associada a sintomatologia clínica;
- iv. Em indivíduos com histórico de longa-exposição à malária, a presença do DNA viral tem influência discreta no perfil de anticorpos específicos naturalmente adquiridos, podendo resultar em diminuição (PvDBPII) ou aumento (AMA-1) da frequência de respondedores.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS JH, HUDSON DE, TORII M, WARD GE, WELLEMS TE, AIKAWA M, MILLER LH. The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell*. 1990 Oct 5;63(1):141-53.

AKIN F, KOCAOGLU C, SOLAK SE, OZDEMIR H, PEKTAS S, ARSLAN S. Coinfection of *Plasmodium vivax* and Epstein-Barr virus: case report. *Asian Pac J Trop Dis*. 2013 Feb; 3(1): 74–75.

ASAOLU SO, OFOEZIE IE. The role of health education and sanitation in the control of helminth infections. *Acta Trop* 2003; 86:283–94.

BARBER BE, WILLIAM T, GRIGG MJ, PARAMESWARAN U, PIERA KA, PRICE RN, YEO TW, ANSTEY NM. Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction and disease severity in vivax malaria. *PLoS Pathog*. 2015 Jan 8;11(1): e1004558.

BRASIL P, ZALIS MG, DE PINA-COSTA A, SIQUEIRA AM, JÚNIOR CB, SILVA S, AREAS ALL, PELAJO-MACHADO M, DE ALVARENGA DAM, DA SILVA SANTELLI ACF, ALBUQUERQUE HG, CRAVO P, SANTOS DE ABREU FV, PETERKA CL, ZANINI GM, SUÁREZ MUTIS MC, PISSINATTI A, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, DE BRITO CFA, DE FÁTIMA FERREIRA-DA-CRUZ M, CULLETON R, DANIEL-RIBEIRO CT. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health*. 2017 Oct;5(10): e1038-e1046.

BROOKER S, AKHWALE W, PULLAN R; *et al*. Epidemiology of *Plasmodium*-helminth co-infection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 77. no. 6. 2007; pp. 88–98.

CALATTINI S, SERETI I, SCHEINBERG P, KIMURA H, CHILDS RW, COHEN JI. Detection of EBV genomes in plasmablasts/plasma cells and non-B cells in the blood of most patients with EBV lymphoproliferative disorders by using Immuno-FISH. *Blood*. 2010; 116 (22):4546-4559.

CARBONE A, CESARMAN E, SPINA M, GLOGHINI A, SCHULZ TF. HIV associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood*, 2009 Feb 5; 113 (6):1213-24.

CERÁVOLO IP, BRUNA-ROMERO O, BRAGA EM, FONTES CJ, BRITO CF, SOUZA JM, KRETTLI AU, ADAMS JH, CARVALHO LH. Anti-Plasmodium vivax duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Jun;72(6):675-81.

CERAVOLO IP, SOUZA-SILVA F A, FONTES CJF, BRAGA EM, MADUREIRA AP, KRETTLI AU; *et al.* Inhibitory properties of the antibody response to Plasmodium vivax Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scand J Immunol.* 2008; 67(3):270–8.

CHENG, Q.; CUNNINGHAM, J.; GATTON, M. L. Systematic Review of Submicroscopic *P. vivax* Infections: Prevalence and Determining Factors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Jan; 9(1): e3413.

COHEN, J.I.; FAUCI, A.S.; VARMUS, H.; NABEL, G.J. Epstein-Barr virus: An important vaccine target for cancer prevention. *Sci.Transl. Med.* 2011, 3, 107fs7.

COSTA FTM, LOPES SCP, ALBRECHT L, ATAÍDE R, SIQUEIRA AM, SOUZA RM, *et al.* On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol. Australian Society for Parasitology Inc.;* 2012;42(12):1099–105.

CROMPTON, P. D. *et al.* A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 15, p. 6958-63, Apr 13 2010.

CUNNINGTON AJ, RILEY EM, WALTHER M. Stuck in a rut? Reconsidering the role of parasite sequestration in severe malaria syndromes. *Trends in Parasitology.* 2013. p. 585–92.

DE PINA-COSTA A, BRASIL P, DI SANTI SM, DE ARAUJO MP, SUÁREZ-MUTIS MC, SANTELLI AC, OLIVEIRA-FERREIRA J, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, DANIEL-RIBEIRO CT. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 Aug;109(5):618-33.

DE PINA-COSTA A, BRASIL P, DI SANTI SM, DE ARAUJO MP, SUÁREZ-MUTIS MC, SANTELLI AC, OLIVEIRA-FERREIRA J, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, DANIEL-RIBEIRO CT. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 Aug;109(5):618-33.

EPSTEIN, M.A.; ACHONG, B.G.; BARR, Y.M. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1964, 1, 702–703.

FOWKES FJ, BOEUF P, BEESON JG. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. *Parasitology*. 2016 Feb;143(2):139-53

FRANKLIN BS, VITORINO BL, COELHO HC, MENEZES-NETO A, SANTOS ML, CAMPOS FM, BRITO CF, FONTES CJ, LACERDA MV, CARVALHO LH. Plasma circulating nucleic acids levels increase according to the morbidity of *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS One*. 2011;6(5):e19842.

FRISCHKNECHT F, FACKLER OT. Experimental systems for studying *Plasmodium*/HIV coinfection. *FEBS Lett*. 2016 Jul;590(13):2000-13.

GARTNER BC, KORTMANN K, SCHAFER M, MULLER-LANTZSCH N, SESTER U, KAUL H, PESS H. No correlation in Epstein-Barr virus reactivation between serological parameters and viral load. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2458.

GETIE S, WONDIMENEH Y, GETNET G, WORKINEH M, WORKU L, KASSU A, et al. Prevalence and clinical correlates of *Schistosoma mansoni* co-infection among malaria infected patients, Northwest Ethiopia. *BMC research notes*. 2015; 8:480.

GHANI, A. C. et al. Loss of population levels of immunity to malaria as a result of exposure-reducing interventions: consequences for interpretation of disease trends. *PLoS One*, v. 4, n. 2, p. e4383, 2009.

GILLRIE MR, HO M. Dynamic interactions of *Plasmodium* spp. with vascular endothelium. *Tissue Barriers*. 2017 Jan 2;5(1): e1268667.

GUERRA CA, SNOW RW, HAY SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol*. 2006 Aug; 22(8):353-8.

GUIA PRÁTICO DE TRATAMENTO DA MALÁRIA NO BRASIL / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

HABIB M, BUISSON M, LUPO J, AGBALIKA F, SOCIÉ G, GERMI R, BACCARD M, IMBERT-MARCILLE BM, DANTAL J, MORAND P, DROUET E. Lytic EBV infection investigated by detection of Soluble Epstein-Barr virus ZEBRA in the serum of patients with PTLD. *Sci Rep*. 2017 Sep 5;7(1):10479

HASANG W, DEMBO EG, WIJESINGHE R, MOLYNEUX ME, KUBLIN JG, ROGERSON S. HIV-1 infection and antibodies to *Plasmodium falciparum* in adults. *J Infect Dis*. 2014 Nov 1;210(9):1407-14.

HAY, S.; OKIRO, A.; GETHING, W.; PATIL, P.; TATEM, J.; et al. Estimating the

global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. *PLoS Med.* Jun 2010;15;7.

HOWARD SC, DONNELLY CA, CHAN MS. Methods for estimation of associations between multiple species parasite infections. *Parasitology.* 2001; 122:233–51.

KANO, F. S., SANCHEZ, B. A. M., SOUSA, T. N., TANG, M. L., SALIBA, J., OLIVEIRA, F. M., ... CARVALHO, L. H. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: Baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. 2012. *Tropical Medicine and International Health*, 17(8), 989–1000.

KANO FS, SOUZA-SILVA FA, TORRES LM, LIMA BA, SOUSA TN, ALVES JR, ROCHA RS, FONTES CJ, SANCHEZ BA, ADAMS JH, BRITO CF, PIRES DE, ASCHER DB, SELL AM, CARVALHO LH. The Presence, Persistence and Functional Properties of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Dec 13;10(12): e0005177.

KIMURA H, MORITA M, YABUTA Y, KUZUSHIMA K, KATO K, KOJIMA S, MATSUYAMA T, MORISHIMA T. Quantitative analysis of Epstein-barr virus load by using a real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology.* 1999; Jan, p. 132-136.

KINUNG'HI SM, MAGNUSSEN P, KAATANO GM, KISHAMAWE C, VENNERSVALD BJ. Malaria and Helminth Co-Infections in School and Preschool Children: A Cross-Sectional Study in Magu District, North-Western Tanzania. *PLoS ONE.* 2014; 9(1): e86510.

LACERDA MV, MOURÃO MP, ALEXANDRE MA, SIQUEIRA AM, MAGALHÃES BM, MARTINEZ-ESPINOSA FE, FILHO FS, BRASIL P, VENTURA AM, TADA MS, COUTO VS, SILVA AR, SILVA RS, ALECRIM MG. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J.* 2012 Jan 9; 11:12.

LANGHORNE, J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol*, v. 9, n. 7, p. 725-32, Jul 2008.

LORENZ, C.; VIRGINIO, F.; AGUIAR, B.; SUESDEK, L.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. *Malar. J.* 2015; 14:408.

MAGALHÃES BM, ALEXANDRE MA, SIQUEIRA AM, MELO GC, GIMAQUE JB, BASTOS MS, FIGUEIREDO RM, CARVALHO RC, TAVARES MA, NAVECA FG, ALONSO P, BASSAT Q, LACERDA MV, MOURÃO MP. 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.

MAGRATH I. Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma. *Br J Haematol* 2012; 156:744–56. doi: 10.1111/j.1365- 2141.2011.09013.x.

MARQUES AC. Migration and dissemination of malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* .1986; 81(2):17-30.

MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*, v. 28, n. 1-2, p. 51-60, Jan-Feb 2006.

MASAKHWE C, OCHANDA H, NYAKOE N, OCHIEL D, WAITUMBI, J. Frequency of Epstein – Barr Virus in patients presenting with acute febrile illness in Kenya. *Plos One.* 2016; (11) 5: e0155308.

MATAR C. G., JACOBS N. T., SPECK S. H., LAMB T. J. & MOORMANN A. M. Does EBV alter the pathogenesis of malaria? *Parasite Immunology*, 2015; (37) 433–445.

MAZIGOI HD, KIDENYA BR, AMBROSE EE, ZINGA M, WAIHENYA R. Association of intestinal helminths and *P. falciparum* infections in co-infected school children in northwest Tanzania. *Tanzania journal of health research.* 2010;12(4):299-301.

MBALE EW, MOXON CA, MUKAKA M, CHAGOMERANA M, GLOVER S, CHISALA N, OMAR S, MOLYNEUX M, SEYDEL K, CRAIG AG, TAYLOR T, HEYDERMAN RS, MALLEWA M. HIV coinfection influences the inflammatory response but not the outcome of cerebral malaria in Malawian children. *J Infect.* 2016 Sep;73(3):189-99.

MOLYNEUX EM, ROCHFORD R, GRIFFIN B, et al. Burkitt's lymphoma. *Lancet* 2012; 379:1234–44. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61177-X.

MOORMANN AM, CHELIMO K, SUMBA PO, et al. Exposure to holoendemic malaria results in elevated Epstein-Barr virus loads in children. *J Infect Dis* 2005; 191:1233-8

MOORMANN AM, SNIDER CJ, CHELIMO K – The company malaria keeps: how co-infection with Epstein – Barr virus leads to endemic Burkitt lymphoma. *Curr Opin Infect Dis.* 2011; 24:435-41.

MOORMANN AM AND BAILEY JA. Malaria — how this parasitic infection aids and abets EBV-associated Burkitt lymphomagenesis. *Current Opinion in Virology.* 2016; 20:78–84.

MORRISON BJ, LABO N, MILEY WJ, WHIBY D. Serodiagnosis for tumor viruses. *Semin Oncol.* 2015; 42: 191 – 206.

NOWALK A, GREEN M. Epstein-Barr virus. *Microbiol Spectrum.* 2016;4(3): DMIH2-0011-2015.

OLSSON, M. L.; HANSSON, C.; AVENT, N. D.; AKESSON, I. E.; GREEN, C. A.; DANIELS, G. L. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy blood group locus using polymerase chain reaction with allele specific primers. *Transfusion.* 1998; 38:168-173.

PASCHALE M & CLERICI P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World Journal of Virology,* 2012;1(1): 31-43.

PATOUILLARD E, GRIFFIN J, BHATT S, GHANI A, CIBULSKIS R. Global investment targets for malaria control and elimination between 2016 and 2030. *BMJ Glob Health.* 2017 May 16;2(2): e000176.

PIRIOU E, KIMMEL R, CHELIMO K, *et al.* Serological evidence for long-term Epstein- Barr virus reactivation in children living in a holoendemic malaria region of Kenya. *J Med Virol.* 2009; 81: 1088–1093.

PIRIOU E, ASITO AS, SUMBA PO, *et al.* Early age at time of primary Epstein-Barr virus infection results in poorly controlled viral infection in infants from Western Kenya: clues to the etiology of endemic Burkitt lymphoma. *J Infect Dis.* 2012; 205:906–13.

PRICE RN, TJITRA E, GUERRA CA, YEUNG S, WHITE NJ, ANSTEY NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Dec; 77(6 Suppl):79-87. Review.

RAHIMI BA, THAKKINSTIAN A, WHITE NJ, SIRIVICHAYAKUL C, DONDORP AM, CHOKEJINDACHAI W. Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. *Malar J.* 2014 Dec 8; 13:481.

RASO G, Luginbuhl A, Adjoua C. A, *et al.* Multiple parasite infections and their relationship to self-reported morbidity in a community of rural. Cote d'Ivoire. International Journal of Epidemiology. 2004; vol. 33, no. 5, pp. 1092–1102.

RATTANAPUNYA S, KUESAP J, CHAIJAROENKUL W, RUEANGWEERAYUT R, NA-BANGCHANG K. Prevalence of malaria and HIV coinfection and influence of HIV infection on malaria disease severity in population residing in malaria endemic area along the Thai-Myanmar border. Acta tropica. 2015; 145:55-60.

REYNALDI A, SCHLUB ET, CHELIMO K, SUMBA OK, PIROU E, OGOLLA S, MOORMANN AM, ROCHFORD R, DAVENPORT PM. Impact of *Plasmodium falciparum* Coinfection on Longitudinal Epstein – Barr Virus Kinetics in Kenyan Children. J Infect Dis 2016; 213:985-91

RICKINSON, A.B., KIEFF, E.D. KNIPE, D, M., HOWLEY.P.M., GRIFFIN, D.E., LAMB, R.A., MARTIN, M.A., ROIZMAN, B., STRUS, S.S. (EDS). Epstein Barr virus In: Fields Virology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007; p. 2656-2660 5th.

ROBBIANI DF, DEROUBAIX S, FELDHahn N, OLIVEIRA TY, CALLEN E, WANG Q, JANKOVIC M, SILVA IT, ROMMEL PC, BOSQUE D, EISENREICH T, NUSSENZWEIG A, NUSSENZWEIG MC. Plasmodium Infection Promotes Genomic Instability and AID-Dependent B Cell Lymphoma. Cell. 2015 Aug 13;162(4):727-37.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA À SAÚDE (SVS). Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Serviço de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, 2007.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA À SAÚDE (SVS). Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Serviço de Vigilância à Saúde, Ministério da Saúde, 2008.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA À SAÚDE (SVS). Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM), Departamento de Doenças Transmissíveis, Ministério da Saúde, 2017.

SHANKARKUMAR U, SHANKARKUMAR A, GHOSH K. HIV and malaria co-infection in Mumbai, western India. J Vector Borne Dis. 2011; 48:155–8.

SIQUEIRA AM, MESONES-LAPOUBLE O, MARCHESINI P, SAMPAIO VS, BRASIL P, TAUIL PL, FONTES CJ, COSTA FT, DANIEL-RIBEIRO CT, LACERDA MV, DAMASCENO CP, SANTELLI AC. Plasmodium vivax Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. Am J Trop Med Hyg. 2016 Dec 28;95(6 Suppl):87-96.

SMETS F, BODEUS M, GOUBAU P, REDING R, OTTE JB, BUTS JP, SOKAL EM. Characteristics of Epstein-Barr virus primary infection in pediatric liver transplant recipients. *J Hepatol.* 2000; 32:100–104.

SNOW, R. W.; GUERRA, C. A.; NOOR, A. M.; MYINT, H. Y.; HAY, S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2005 Mar 10; 434 (7030):214-7.

SOUZA-SILVA FA, DA SILVA-NUNES M, SANCHEZ BA, CERAVOLO IP, MALAFRONTA RS, BRITO CF, FERREIRA MU, CARVALHO LH. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2010 Feb; 82(2): 185-93.

SOUZA-SILVA FA, TORRES LM, SANTOS-ALVES JR, TANG ML, SANCHEZ BAM, et al. Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) Polymorphisms and Its Involvement in Acquisition of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II (DBPII) Immunity. *PLoS ONE.* 2014; 9(4): e93782.

STRUIK, S. S.; RILEY, E. M. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev.* v. 201, p. 268-90, Oct 2004.

SUPALI T, VERWEIJ JJ, WIRIA AE, DJUARDI Y, HAMID F, KAISAR MM, WAMMES LJ, VAN LIESHOUT L, LUTY AJ, SARTONO E, YAZDANBAKHSH M. Polyparasitism and its impact on the immune system. *Int J Parasitol.* 2010 Aug 15;40(10):1171-6.

TAY SC, BADU K, MENSAH AA, GBEDEMA SY. The prevalence of malaria among HIV seropositive individuals and the impact of the co- infection on their hemoglobin levels. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials.* 2015; 14: 10.

TJITRA E, ANSTEY NM, SUGIARTO P, WARIKAR N, KENANGALEM E, KARYANA M, LAMPAH DA, PRICE RN. Multidrug-Resistant *Plasmodium vivax* Associated with Severe and Fatal Malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia. *PLoS Med.* 2008 Jun; 5(6): e128.

TOTINO PR, LOPES SC. Insights into the Cytoadherence Phenomenon of *Plasmodium vivax*: The Putative Role of Phosphatidylserine. *Front Immunol.* 2017 Sep 20; 8:1148.

VAUMOURIN E, VOURC'H G, GASQUI P, VAYSSIER-TAUSSAT M. The importance of multiparasitism: examining the consequences of co-infections for human and animal health. *Parasites & vectors*. 2015; 8:545.

WASSMER SC, TAYLOR TE, RATHOD PK, MISHRA SK, MOHANTY S, AREVALO-HERRERA M, DURAISINGH MT, SMITH JD. Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Sep;93(3 Suppl):42-56

WILMORE JR, ASITO AS, WEI C, PIRIOU E, SUMBA PO, SANZ I, ROCHFORD R. AID expression in peripheral blood of children living in a malaria holoendemic region is associated with changes in B cell subsets and Epstein-Barr virus. *Int J Cancer*. 2015 Mar 15;136(6):1371-80.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *World Malaria Report 2017*. Geneva: World Health Organization; 2017.