



ARTIGO ORIGINAL

Resposta de anticorpos IgG anti-Plasmodium vivax em crianças expostas à malária, antes e após tratamento específico

IgG antibody response against Plasmodium vivax in children exposed to malaria before and after specific treatment

Ana Yecê das Neves Pinto¹, Ana Maria Revorêdo da Silva Ventura², José Maria de Souza³

Resumo

Objetivos: avaliar a resposta de anticorpos IgG anti-*P. vivax* (IgG anti-PV) e suas subclasses citofílicas (IgG1 e IgG3) e não citofílicas (IgG2), em 34 crianças com malária por *P. vivax*, de 0 a 15 anos de idade.

Método: os níveis de anticorpos IgG foram mensurados pela técnica de imunofluorescência indireta, durante a fase aguda e de controle de cura. Os pacientes foram distribuídos em dois grupos, de priminfetados e pacientes com história de malária anterior. Os níveis de anticorpos no dia do início do tratamento (ou dia zero) e no último dia de tratamento (ou D7) foram comparados (teste t de Student) e correlacionados com a parasitemia assexuada nos dois grupos (Correlação de Spearman).

Resultados e conclusões: foi observado aumento inicial significativo dos títulos de IgG anti-PV no início e no final do tratamento. As médias geométricas dos títulos de subclasses de IgG anti-PV encontradas nos pacientes com história prévia de malária foram IgG1 (806,35) > IgG3 (28,28) > IgG2 (20). Nos pacientes priminfetados as respostas obtidas foram IgG1 (709,21) > IgG3 (39,3) > IgG2 (10,7). Não ocorreu associação entre parasitemia assexuada e títulos de IgG anti-PV no primeiro dia de tratamento. Houve predominância de anticorpos citofílicos (IgG1 > IgG3) sobre os não citofílicos.

J Pediatr (Rio J) 2001; 77 (4):299-306: malária vivax, anticorpos IgG, anticorpos citofílicos, crianças.

Introdução

Recentemente, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS)/Organização Mundial de Saúde (OMS) vem divulgando estatísticas impressionantes acerca de doenças prevalentes na infância. Cinco doenças causam sete de cada dez mortes infantis, desde 1990: infecções respiratórias

Abstract

Objective: to assess the IgG antibody response against *P. vivax* (IgG anti-PV), and cytophilic (IgG1 and IgG3) and noncytophilic (IgG2) IgG subclasses in 34 children aged 0 to 15 years old infected with *P. vivax* malaria.

Methods: IgG levels were determined by indirect fluorescent antibody technique during the acute and therapeutic control phase. Patients were distributed into 2 groups according to the presence or absence of a previous malaria episode. IgG anti-PV levels were measured on the first and last day of treatment, and compared by Student's t test. Antibody levels were correlated with asexual parasitemia (Spearman's correlation test).

Results and conclusions: increased IgG levels were observed on the first and on the last day of treatment. The geometric means for IgG subclass titers found in patients with previous history of malaria were: IgG1 (806.35) > IgG3 (28.28) > IgG2 (20). In patients infected for the first time, the responses obtained were: IgG1 (709.21) > IgG3 (39.3) > IgG2 (10.7). There was no association between asexual parasitemia and antibody levels on the first day of treatment. Cytophilic antibodies (IgG1, IgG3) predominated over noncytophilic antibodies (IgG2).

J Pediatr (Rio J) 2001; 77 (4):299-306: vivax malaria, antibodies IgG, cytophilic antibodies, children.

agudas, desnutrição, diarreia, sarampo e malária. Neste mórbido *ranking* a malária figura como a quinta causa principal de morte infantil, sendo responsável por 7,7% das mortes¹.

As estratégias para enfrentar o problema da malária em crianças devem ser consideradas dentro do enfoque atual que os programas mundiais de combate à doença vêm assumindo, desde 1992: o Controle Integrado, cujas diretrizes básicas incluem a prevenção. Destacam-se, como elemento técnico fundamental na prevenção, as vacinas anti-maláricas, que estimulam o conhecimento mais profundo dos mecanismos de defesa humana antiplasmodiais.

1. Profª colaboradora da Univ. Estadual do Pará. Médica Infectologista e pesquisadora dos Programas de Malária e Doença de Chagas do Instituto Evandro Chagas (IEC)/Fundação Nacional de Saúde (FNS). Mestre em Medicina Tropical.

2. Profª assistente da Univ. Estadual do Pará. Médica Pediatra e pesquisadora do Programa de Malária do IEC/FNS. Mestre em Medicina Tropical.

3. Doutor em Medicina; Pesquisador e Coordenador do Programa de Malária do IEC.

Apesar dos mecanismos efetores da imunidade antimalárica envolverem anticorpos, células e outras substâncias solúveis, ressalta-se atualmente o papel dos anticorpos, auxiliando de forma efetiva a ação imunitária celular e comprovadamente modificando o curso da infecção em primatas^{2,3}.

A questão fundamental é se estes anticorpos são protetores ou não, discutindo-se seus mecanismos de ação contra os parasitas de malária. Um mecanismo não específico para malária que tem mostrado ser efetivo é a capacidade citofílica destes anticorpos. Anticorpos citofílicos são, portanto, anticorpos do tipo IgG que auxiliam na eficácia da imunidade celular, cooperando com células sanguíneas fagocitárias na eliminação de determinado agente infeccioso. Entre os anticorpos IgG já foram descritas quatro subclasses – IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, e entre estas, duas (IgG1 e IgG3) são consideradas citofílicas⁴.

Em casos de malária, alguns anticorpos se formam contra as formas evolutivas do plasmódio que circulam livres no sangue, os merozoítos (anticorpos antimerozoíticos); estes cooperam com monócitos sanguíneos facilitando a fagocitose de células infectadas⁵. Desde que esta cooperação se realiza somente entre anticorpos citofílicos e monócitos, é interessante entender detalhadamente a distribuição destes anticorpos e suas subclasses, no soro de indivíduos com estados definidos de resistência ou suscetibilidade à malária.

Assim, vários estudos de comparação entre populações intensamente expostas à transmissão de malária (consideradas semi-ímmunes) e populações não expostas (não ímmunes) foram realizados na tentativa de estabelecer o padrão de anticorpos IgG presentes nestes indivíduos^{6,7}, contribuindo dessa forma para o desenvolvimento de metodologias para a análise da eficácia de vacinas antimaláricas.

O presente trabalho objetiva avaliar a frequência e os níveis de anticorpos IgG e suas subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 em crianças de 0 a 15 anos, portadoras de malária por *P. vivax*, atendidas ambulatorialmente, e tratadas com o esquema terapêutico padrão, durante o ataque agudo da doença e o seguimento que se convencionou chamar controle de cura; correlacionar níveis de anticorpos classe IgG com parasitemia assexuada, entre crianças priminfetadas e crianças com história de ataques maláricos anteriores e comparar as respostas de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 durante o ataque agudo e em fase de controle de cura.

Material e Métodos

Foram estudadas 34 crianças e adolescentes entre 0 a 15 anos de idade, portadoras de malária por *P. vivax*, no período de março de 1995 a março de 1996, diagnosticadas pelo método da gota espessa, procedentes da demanda espontânea do ambulatório do Programa de Malária do

Instituto Evandro Chagas (APM/IEC), avaliadas em 2 momentos: a) durante a fase aguda (D0 - dia zero), aqui distribuídas em dois grupos: *priminfetadas* (paciente que nunca apresentou sintomas e/ou parasitas de malária no sangue periférico, evidenciados por exame laboratorial e/ou referência de malária anterior (um total de 28 crianças); e *crianças com história anterior de malária (ou semi-ímmunes)*, que apresentam referência de um ou mais episódios de malária, antecedendo o episódio atual (total de seis crianças); b) durante o controle de cura (crianças tratadas): correspondente aos dias D7 (dia 7), D60 (dia sessenta), D120 (dia cento e vinte) e D180 (dia cento e oitenta). Foram excluídas adolescentes gestantes ou lactantes.

Todos os pacientes foram tratados no APM/IEC, com esquemas antimaláricos preconizados pela Fundação Nacional de Saúde⁸.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa do Instituto Evandro Chagas. Após a explicação dos objetivos e aplicações do estudo, os responsáveis pelos pacientes assinaram termo de participação.

Procedimentos

Quantificação de parasitas no sangue periférico: feita em material coletado nos dias 0, 1, 2, 3, 4 e assim sucessivamente, até que se obtivessem dois exames negativos consecutivos e ainda nos dias 7 e 14. Os exames foram processados pelo método da gota espessa, conforme técnica já descrita⁹.

Testes sorológicos: utilizada a técnica de Imunofluorescência indireta. Para detecção de anticorpos IgG anti-*P. vivax* (IgG anti-PV), coletou-se cerca de 3ml de sangue na chegada do paciente (D0) e, posteriormente, aos sete dias após o início do tratamento (D7), aos sessenta dias (D60), aos cento e vinte dias (D120) e, finalmente, aos cento e oitenta dias (D180). Para a detecção de anticorpos subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 anti-PV, foram utilizadas apenas duas destas mesmas coletas, sendo a primeira referente a D0 e a segunda escolhida entre as coletas posteriores (D60 ou D120 ou D180) correspondentes a diferentes fases do período de controle de cura.

Detecção de anticorpos antiplasmodiais classe IgG anti-PV

Para o padrão positivo foi selecionado um painel de oito soros com títulos iguais ou acima de 320 e soros com títulos menores que 320, exclusive, obtidos de pacientes com infecção atual pelo *P. vivax*. Para padrão negativo foi selecionado um painel de soros não reagentes obtidos a partir de indivíduos não infectados, clínica e parasitologicamente examinados, sem história de exposição anterior à malária.

A técnica foi desenvolvida após fixação das lâminas contendo o antígeno, com acetona, por 2 minutos, e lavadas com PBS poço por poço. Alíquotas de 10 µl dos soros diluídos (1/20 a 1/20480) foram adicionadas a cada poço da lâmina conforme seqüência pré-estabelecida. As lâminas foram então incubadas a 37° C por 30 minutos em câmara úmida. Após incubação foram submetidas a três lavagens de 5 minutos cada, com PBS. O conjugado fluorescente (Fluoline G anti g, globulina de carneiro anti-IgG humano marcado pelo isotiocianato de fluoresceína - Código 022.009-BIOLAB), foi diluído a 1:200 em solução de Azul de Evans a 1% e adicionado às lâminas 10 µl por poço. Após nova incubação em câmara úmida durante 30 minutos a 37° C, as lâminas foram submetidas a nova lavagem de 5 minutos com PBS por 3 vezes. Após secagem foram montadas com glicerina tamponada e lidas em microscópio de imunofluorescência. Foram considerados positivos todos os soros com fluorescência igual ou maior àquela apresentada pelo controle positivo, a partir da diluição de 1:40, em conformidade com estudos de sensibilidade e especificidade da técnica desenvolvidos por outros autores¹⁰.

Detecção dos anticorpos antiplasmodiais subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 anti-PV

Soros padrões foram obtidos dentro de uma amostra de oito soros de pacientes conhecidamente positivos para *P. vivax*, contendo títulos elevados de anticorpos antiplasmodiais totais do tipo IgG, detectados por técnicas de IFI e ELISA (Enzimatic Linked Imunosorbent Assay). Estes soros foram então testados em duas diluições (1:40 e 1:80) para as três subclasses de IgG, evidenciando títulos positivos para IgG1 e IgG3. Não foram encontrados títulos de IgG2 nesta amostra. Posteriormente, foram testados outros soros de indivíduos conhecidamente positivos, na tentativa de encontrar um padrão para IgG2, porém sem sucesso. Dessa forma, utilizou-se como padrão positivo de IgG2 um soro conhecidamente positivo para IgG2, porém obtido de paciente infectado por *P. falciparum*.

A técnica foi desenvolvida da mesma forma descrita para anticorpos totais, acrescida de uma etapa inicial, onde os soros foram submetidos a três diluições de triagem de 1:20, 1:40 e 1:80. A partir dos resultados iniciais procedeu-se à continuação ou não das diluições para o estabelecimento do títulos finais. Para efeito de resultado positivo foi estabelecido um ponto de corte de 1:20, devido à alta especificidade dos conjugados monoclonais (Monoclonal Anti-Human IgG1, IgG2 e IgG3 FITC Conjugate, clones 8c/6-39, HP-6014, HP-6050 respectivamente, da SIGMA Chemical Co., Lotes 086H4812, 095H4825 e 068TF48741). A titulação dos conjugados foi feita a partir dos soros positivos e negativos previamente encontrados e com base em estudo longitudinal de acompanhamento do padrão de anticorpos IgG1, IgG2 e IgG3, realizado em comunidades da Região Amazônica¹¹.

Procedimento estatístico

A digitação e sistematização das informações foram realizadas em banco de dados próprio, do programa de análise de dados epidemiológicos EPI-INFO, versão 6.04.

As médias geométricas dos títulos de anticorpos classe G anti-PV (MGTAG) e subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 anti-PV (MGTS), em D0, foram calculadas a partir dos títulos de anticorpos positivos e negativos. As MGTAG dos dias 0 e 7 foram comparadas, no grupo total e subgrupos, utilizando-se o teste t de Student para amostras pareadas, com transformação dos valores absolutos dos títulos em valores logarítmicos. A correlação entre níveis de anticorpos totais e parasitemia foi calculada pelo coeficiente de correlação de Spearman, com nível alfa de 0,05.

Resultados

Vinte e oito pacientes estudados eram primoinfectados, e apenas seis apresentavam episódio anterior de malária (semi-ímmunes). Encontram-se, na Tabela 1, as características gerais e a mediana de títulos de anticorpos IgG anti-*P. vivax* no primeiro dia antes do início do tratamento (dia zero) no grupo estudado, além do número de episódios e tipo de malária anterior no grupo semi-ímmune.

Títulos de anticorpos IgG durante a fase aguda e controle de cura

As médias geométricas dos títulos de anticorpos classe G (MGTAG) durante a fase aguda e o controle de cura podem ser vistas na Tabela 2. Observa-se uma elevação significativa de títulos em D7 e posterior queda progressiva durante o controle de cura. As coletas feitas aos 60 dias após tratamento mostraram diminuição significativa de títulos, e as coletas feitas após 120 dias ou mais mostraram, em sua maioria, a negatização dos títulos de anticorpos totais. A comparação dos logaritmos dos títulos de IgG anti-PV entre D0 e D7 para o grupo total mostrou diferença significativa ($p=0,027$ / t de Student).

A Figura 1 mostra comparativamente, as MGTAG em D0, D7, D60, D120 e D180 dos grupos de crianças primoinfectadas e aquelas com história prévia de malária, evidenciando-se uma resposta quantitativamente maior em D7 em ambos os subgrupos, principalmente para o grupo de indivíduos já expostos anteriormente à doença. Não ocorreram diferenças significativas nas comparações dos valores logaritmos dos títulos de anticorpos anti-PV em D0 e D7 dos dois grupos (primoinfectados: $p=0,0606$ / t de Student; crianças com história de malária anterior: $p=0,235$).

Parasitemia assexuada e títulos de anticorpos totais anti-P. vivax

Observou-se, durante o tratamento, coincidentemente com o aumento de títulos de anticorpos, a queda progres-

Tabela 1 - Características gerais e mediana de títulos de anticorpos IgG anti-PV no primeiro dia (D0) antes do início do tratamento de 34 crianças estudadas, conforme faixas etárias

Idade (anos)	Nº de indivíduos	Ataques maláricos anteriores *		Sexo		Mediana de títulos	Tempo Doença†
		Priminfectados	Semi-imune	F	M		
0 - 2	3	3	0	2	1	640	10,6
3 - 6	9	6	3	4	5	1280	21,8
7 - 11	11	9	2	5	6	2560	11,8
12 - 15	11	10	1	5	6	1280	9,1
Total	34	28	6	16	18		

* Priminfectados: crianças sem história anterior de malária. Semi-ímmunes: crianças com um ou mais episódios anteriores de malária. Entre o grupo semi-ímmunes, cinco referiram 1 episódio de malária por *P. vivax*, e um referiu 2 episódios de malária por *P. falciparum*.

† Média de dias de doença até o dia da primeira avaliação.

siva da parasitemia assexuada que estava presente no máximo até o 4º dia de acompanhamento. Nas coletas realizadas durante o controle de cura, as parasitemias persistiram negativas, não tendo ocorrido nenhum caso de recaída.

A correlação entre títulos de anticorpos anti-PV e parasitemia assexuada em D0 de cada grupo demonstrou tendência positiva entre indivíduos com história de exposição prévia à doença e tendência negativa entre os priminfectados.

Subclasses de anticorpos IgG anti-PV

No dia zero os títulos de anticorpos IgG1 anti-PV predominaram sobre as demais subclasses, com valores iguais ou próximos dos títulos de IgG total. Os títulos de IgG3 anti-PV foram bem menores, tendo sido detectados apenas nos pacientes que apresentavam títulos iniciais de

IgG total acima de 640. A subclasse IgG2 foi evidenciada em títulos limítrofes ao ponto de corte considerado negativo e apenas na primeira coleta, tanto em indivíduos sem episódio anterior de malária, como nos priminfectados.

As coletas realizadas aos 60, ou aos 120, ou aos 180 dias após o tratamento evidenciaram manutenção dos títulos de IgG1 próximos aos níveis de IgG total e diminuição considerável de IgG2 e IgG3 em ambos os subgrupos. Os títulos de IgG3 desapareceram no pós-tratamento apenas nos pacientes já expostos a infecção anteriormente. No subgrupo de priminfectados IgG3 manteve-se positiva no pós-tratamento, em níveis baixos.

As médias geométricas e desvio-padrão dos títulos de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2 e IgG3 anti-*P. vivax*, bem como a proporção de indivíduos com resultados positivos de anticorpos IgG encontram-se na Tabela 3.

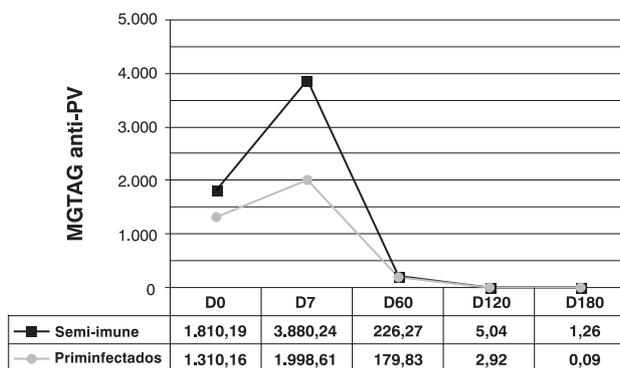
Tabela 2 - Média geométrica de títulos de anticorpos IgG anti-PV na fase aguda e no controle de cura de 34 crianças tratadas

	D0 n=34	D7 n=34	D60 N=21	D120 n=16	D180 n=14
Média geométrica de títulos e desvio-padrão	1388,75 ± 4,901	2209,96 ± 4,519	217,89 ± 7,595	6,25 ± 28,789	0,68 ± 23,233
% Positividade	100	100	95,2	62,5	28,5

Tabela 3 - Média geométrica dos títulos de anticorpos IgG anti-PV total e IgG1, IgG2, e IgG3, e percentual de positividade encontrada nos pacientes em fase aguda e durante o controle de cura, conforme exposição anterior à malária

Anticorpos		Priminfetados (n=28)		Semi-ímmunes † (n= 6)	
		Fase aguda	Controle de cura	Fase aguda	Controle de cura
IgG Total	Positivo (%)	100	58.1	100	61.8
	Títulos*	1312.08 ± 5.433	236.29 ± 1.517	1810.19 ± 2.861	160 ± 1.633
IgG1	Positivo (%)	96.4	46.4	100	83.3
	Títulos*	709.21 ± 4.038	122.99 ± 3.919	806.35 ± 2.578	139.29 ± 4.494
IgG2	Positivo (%)	10.7	3.6	16.7	NR
	Títulos*	20 ± 1	NR	20 ± 1	NR
IgG3	Positivo (%)	39.3	7.1	66.6	NR
	Títulos*	22.69 ± 1.519	28.28 ± 1.633	28.28 ± 1.492	NR

* Média geométrica de títulos de anticorpos e desvio-padrão geométrico; † crianças com um ou mais episódios anteriores de malária; NR: não realizado



Teste t de Student: comparação de médias entre D0 e D7
Priminfetados p = 0,0606; crianças com episódio de malária anterior (semi-ímmunes) p = 0,235

Figura 1 - Média geométrica de títulos de anticorpos IgG (MGTAG) anti-PV nos dias D0, D7, D60, D120 and D180, nos grupos de priminfetados e crianças com episódio anterior de malária (semi-ímmunes)

Comentários e Discussão

Fato já demonstrado em áreas endêmicas, a chamada imunidade antitóxica em malária é incompleta, não esterilizante e adquirida progressivamente após inúmeras exposições¹².

A maior parte dessa proteção relativa é atribuída a anticorpos da classe IgG, cuja efetividade foi demonstrada

graças aos experimentos de transferência passiva de anticorpos feitos por vários autores¹³⁻¹⁵. Em um estudo mais recente, Sabchareon *et al.*¹⁶, usando IgG purificada, obtida de doadores semi-ímmunes africanos, conseguiu diminuir a parasitemia assexuada de 11 indivíduos com malária por *P. falciparum* recrudescente. Apesar de essa proteção não ter sido esterilizante, provou ser uniforme, específica do estágio e específica da espécie, corroborando os estudos feitos anteriormente.

No presente estudo, os níveis de anticorpos IgG anti-PV, obtidos em D0 e D7, seguiram uma linha ascendente dos títulos neste período. Esta elevação mostrou diferenças significativas no grupo total, revelando níveis de anticorpos mais elevados em relação ao primeiro dia de tratamento. O rápido aumento de títulos de anticorpos até D7, principalmente em indivíduos com história anterior de malária, apesar de não significativo, pode sugerir uma resposta quantitativamente mais rápida em ataques secundários da doença, em concordância com estudos de malária induzida, de 1966¹⁵.

Vários autores estudaram a persistência dos anticorpos antimaláricos em diferentes períodos da infecção. Lunn *et al.*¹⁸ estudaram a resposta de anticorpos à malária por *P. vivax* e por *P. falciparum* em ataques primários induzidos e recaídas e/ou recrudescências. As recaídas por *P. vivax* demonstraram duas respostas distintas. Na primeira, os títulos apresentaram uma queda inicial transitória, atribuída à possível ligação de anticorpos pré-existentes aos antígenos produzidos naquele momento. O segundo tipo de resposta foi um aumento nos títulos de anticorpos, com algumas poucas evidências de que tais anticorpos eram mais

protetores que aqueles do ataque primário. Os experimentos feitos em voluntários adultos com malária induzida por *P. falciparum* mostram um aumento dos títulos de anticorpos em média 3 a 6 dias após a parasitemia patente. Estes títulos são mantidos enquanto se mantiver a parasitemia. Fontes *et al.*¹⁹ demonstraram que anticorpos contra a proteína circunsporozoíta de *P. vivax* (CSP) são rapidamente sintetizados e persistem por até oito meses em indivíduos não imunes expostos a ataques primários da doença, em área não endêmica.

Collins *et al.*²⁰ inocularam em voluntários seis diferentes cepas de *P. vivax* e mediram os anticorpos tipo IgG por meio de duas técnicas: imunofluorescência indireta e hemaglutinação. A imunofluorescência indireta mostrou picos máximos de anticorpos entre 11 a 20 dias após parasitemia patente. Após este tempo, os títulos declinaram gradativamente. Ao fim de 60 dias alguns títulos caíram até diluição de 1:10. Aos 240 dias a mediana de títulos permanecia em 10. Nesse mesmo experimento alguns indivíduos com história de recaídas de longa duração (média de 189 dias após a infecção primária) foram inoculados com cepas de *P. vivax*. Conforme se esperava, as médias geométricas dos títulos de anticorpos se elevaram a altos níveis (até 120 dias após), em comparação com as respostas obtidas na infecção primária, reafirmando o conceito já conhecido de resposta imune secundária quantitativamente maior.

Em estudos de malária induzida freqüentemente é possível correlacionar os títulos de anticorpos com parasitemia assexuada, pois, conhecido o inóculo parasitário inicial (momento da infecção), pode-se acompanhar efetivamente a evolução da parasitemia e correlacioná-la ao título de anticorpos. Ao contrário, no presente trabalho, a população estudada é procedente de demanda espontânea, e o número de dias decorridos entre o início da doença e o procedimento de estudo (dosagem de anticorpos) é muito variável entre os indivíduos estudados (vide Tabela 1). Talvez esta variabilidade do tempo tenha dificultado o estabelecimento de uma correlação ente parasitemia assexuada e níveis de anticorpos.

No presente estudo, todas as crianças foram tratadas com esquema clássico, utilizando cloroquina como esquizotônica sangüínea, e apresentaram clareamento da parasitemia assexuada até o 4º dia de tratamento. Os títulos de IgG em D7, portanto, pelo menos quatro dias após a supressão da parasitemia assexuada evidente ao exame da gota espessa, foram maiores em relação ao dia zero. Os títulos, com exceção do aumento inicial obtido em D7, foram acompanhados por até 180 dias em intervalos de dois meses, mostrando declínio gradativo. Aos 60 dias após o início do tratamento, apenas um doente (4,7%) apresentava exame sorológico negativo. Aos 120 dias após o tratamento específico, 31,2% dos pacientes apresentavam resultados negativos, e os títulos positivos variavam entre 40 e 320 (média geométrica de títulos de 2,63). Aos 180 dias após o início do tratamento, 71,4% dos indivíduos apresentavam resultado negativo, e aqueles cujos títulos de anticorpos

IgG anti-PV persistiam, apresentavam níveis variáveis entre 40 e 160 (média geométrica de títulos de 0,13).

Em relação aos achados de subclasses de anticorpos, em nossa amostra houve um predomínio evidente de anticorpos IgG1 sobre as demais subclasses, seguido da presença de IgG3 e a quase inexistência de IgG2, independente de exposição anterior à malária. Este padrão sugere uma resposta muito semelhante ao comportamento de indivíduos procedentes de áreas hiperendêmicas, exceto pela predominância quase absoluta de IgG1.

Foi demonstrado que, em ensaios de imunofluorescência, os anticorpos IgG de subclasse mais rara, assim como anticorpos de baixa afinidade, poderiam ser subestimados, devido à competição dos antígenos com as subclasses mais comuns²¹. Além do mais, a vida média dos anticorpos IgM e IgG3, bastante curta quando comparada a IgG1, IgG2 e IgG4, poderia também resultar em baixa estimativa daqueles dois anticorpos, particularmente em indivíduos com níveis de anticorpos séricos baixos, ou coletados muito tempo após a doença manifesta²². Em nossos achados, títulos de anticorpos baixos foram evidenciados muito raramente; ao contrário, a maioria dos pacientes apresentava altos níveis séricos de anticorpos antimaláricos. Por outro lado, é possível que a baixa afinidade dos anticorpos tenha tornado os anticorpos IgG2 quase indetectáveis, ou ainda, devido ao fato de o padrão de leitura para IgG2 ter sido obtido de paciente infectado por *P. falciparum*, e não por *P. vivax*, tenha havido uma diminuição considerável da especificidade do teste. Aqui, nos referimos a diminuição da especificidade, e não a perda, por tratar-se de mensuração de anticorpos totais indicadores de respostas a antígenos totais, e não a proteínas específicas relativas a cada espécie de plasmódio.

Também existe a possibilidade de desaparecimento de IgG3 devido a sua vida média curta, visto que os doentes se apresentaram para a primeira consulta, em média, referindo 13,4 dias de doença.

Bouharoun-Tayoun e Druilhe²³ estudaram as subclasses de anticorpos em indivíduos portadores de diferentes graus de resistência à malária. Em indivíduos hiperimunes duas classes citofílicas de anticorpos predominaram (IgG1 e IgG3). Ao contrário, em indivíduos não imunes (crianças e adultos primariamente infectados), foram encontradas diversas situações: 1) anticorpos não citofílicos (IgG2) predominando principalmente em adultos; 2) predomínio de anticorpos IgM (não citofílicos) em crianças; 3) menos freqüentemente, níveis totais baixos de anticorpos antimaláricos não citofílicos (IgG2 e/ou IgM) em indivíduos não protegidos.

Em um experimento semelhante ao anterior, feito em uma comunidade africana que incluía adultos e crianças, a parasitemia não mostrou nenhuma correlação com os níveis de IgG total, e níveis mais elevados de IgG3 estão relacionados a menor risco de ataque malárico⁶. No presente estudo, não se estabeleceu nenhuma evidência significativa

de predominância de IgG3 em indivíduos previamente expostos, sendo este resultado talvez influenciado pelo tamanho da amostra de priminfetados.

Estudo cruzado seccional realizado em 50 indivíduos de uma comunidade rural de Rondônia, na Amazônia ocidental brasileira, avaliando as subclasses de IgG contra diversos antígenos somáticos e exoantígenos de *P. falciparum*, obteve achados contrários àqueles descritos para indivíduos semi-ímmunes africanos¹¹. Nesta comunidade da Amazônia, a subclasse IgG2 contra exoantígenos predominou sobre as outras subclasses de forma significativa, porém em relação aos anticorpos IgG1 contra antígenos somáticos, a diferença estatística foi duvidosa ($p=0,052$).

Mais recentemente, os estudos de resposta imune à malária têm sido desenvolvidos com proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos correspondentes a regiões imunologicamente relevantes, consideradas alvos potenciais para composição de vacinas. Assim é, que por exemplo, Soares et al.²⁴ estudaram a resposta de anticorpos e células T contra onze proteínas recombinantes, correspondentes às regiões N e C-Terminais da MSP1 de *P. vivax*, em indivíduos apresentando ataques agudos e em indivíduos convalescentes, procedentes de Belém, tendo observado que 83% dos indivíduos estudados têm anticorpos contra estas proteínas. Além disso, observaram que estes anticorpos eram predominantemente das subclasses IgG1 e IgG3, o que é semelhante aos resultados encontrados no presente trabalho em relação à resposta de anticorpos anti-PV.

Conclusões

O grupo de crianças estudadas desenvolveu anticorpos IgG anti-PV, que seguiram um padrão de títulos semelhantes àqueles estudados em malária induzida, com exceção de uma elevação significativa ocorrida entre o primeiro e oitavo dia de acompanhamento, independente de exposição anterior ou não à malária, com declínio até os 180 dias de acompanhamento.

Não houve associação entre parasitemia assexuada no dia zero e níveis de anticorpos totais IgG anti-PV no pré-tratamento.

Houve predominância de anticorpos citofílicos nas seguintes proporções na amostra estudada: IgG1 > IgG3. Os anticorpos não citofílicos (IgG2) foram evidenciados em níveis muito baixos.

Agradecimentos

Pelas valiosas contribuições, a Ricardo Luis Dantas Machado, Marinete Marins Póvoa, Irene da Silva Soares, Cor de Jesus Fontes e Salma Gomes de Oliveira. Pela contribuição na análise estatística dos dados, agradecemos especialmente ao Prof. Manuel Ayres.

Referências bibliográficas

1. Organización Panamericana de la Salud. Atención de las enfermedades prevalentes en el contexto de la salud integral del niño. (HCP/HCT/ARI/28.15/118-96 (E). Washington; 1996.p.1-2.
2. Gysin J, Hommel M, Pereira da Silva L. Experimental infection of the squirrel monkey *Saimiri sciureus* with *Plasmodium falciparum*. J Parasitol 1980; 66:1003-8.
3. Muniz-junqueira MI. Imunopatologia da malária: mecanismos de imunidade. In: Resumos da Reunião Nacional de Pesquisadores em Malária; 5º Simpósio Brasil Colômbia sobre Malária; 1996; Belém, PA, Brasil. CNPq, SESPA, IEC, Fundação Nacional de Saúde/MS; 1996.p.76.
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Antibodies and antigens. In: __. Cellular and molecular immunology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1994.p.31-64
5. Khusmith S, Druilhe P. Cooperation between antibodies and monocytes that inhibit *in vitro* proliferation of *P. falciparum*. Infect Immun 1983; 41:219-24.
6. Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, et al. Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, West Africa). Am J Trop Med Hyg 1996; 54:449-57.
7. Ferreira UM, Kimura EAS, Souza JM, Katzin AM. The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients. Am J Trop Med Hyg 1996; 55:315-23.
8. Fundação Nacional de Saúde. Manual de terapêutica de malária. Brasília: FNS; 1996.p.99.
9. Antuñano FJL. Diagnóstico microscópico en la sangre. In: Diagnóstico da malária. Washington: OPAS - Publicación científica nº 512; 1988. p.78-86.
10. Sulzer AJ, Wilson M, Hall E. Indirect fluorescent-antibody tests for parasitic diseases. Am J Trop Med Hyg 1969; 18:199-205.
11. Ferreira MU, Kimura ES, Camargo LMA, Alexandre COP, Pereira da Silva LH, Katzin AM. Antibody response against *Plasmodium falciparum* exoantigens and somatic antigens: a longitudinal survey in a rural community in Rondônia, Western Brazilian Amazon. Acta Trop 1994; 57:35-46.
12. Baird JK. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. Parasitol Today 1993; 11:105-11.
13. Cohen S, Mcgregor IA, Carrington SP. Gammaglobulin and acquired immunity to human malaria. Nature 1961; 192:733-7.
14. Edozien JC, Gilles HM, Udeozo IOK. Adult and cord-blood immunoglobulin immunity to malaria in Nigerians. Lancet 1962; 2:591-955.
15. Mcgregor IA, Carrington SP, Cohen, S. Treatment of East African *P. falciparum* malaria with West African human gammaglobulin. Trans R Soc Trop Med and Hyg 1963; 57:170-5.
16. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg 1991; 45:297-308.
17. Tobie JE, Abele DC, Hill GJ, Contacos, PG, Evans CB. Fluorescent antibody studies on the immune response in sporozoite-induced and blood-induced vivax malaria and the relationship of antibody production to parasitemia. Am J Trop Med Hyg 1966; 15:676-83.
18. Lunn SJ, Chin W, Contacos MPG, Coatney GR. Changes in antibody titers and serum protein fractions during the course of prolonged infections with vivax or with falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg 1966; 15:3-10.

19. Fontes CJ, Bathurst I, Krettli AU. *Plasmodium vivax* sporozoite antibodies in individuals exposed during a single malaria outbreak in a non-endemic area. Am J Trop Med Hyg 1991; 44:23-33.
20. Collins WE, Lunde MN, Skinner J. Development of antibodies to *Plasmodium vivax* as measured by two different serologic techniques. Am J Trop Med Hyg 1975; 24:413-22.
21. Wahlgren M, Perlmann H, Berzins K, et al. Characterization of the human immune response in *Plasmodium falciparum* malaria III. Factors influencing the co-expression of antibody isotypes (IgM and IgG1 to 4). Clin Experimental Immunol 1986; 63:343-53.
22. Spiegelberg HL. Biological activities of the immunoglobulins of different classes and subclasses. Adv Immunol 1974; 19:259-94.
23. Borharoun-Tayoun H, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* malaria: Evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. Infect Immun 1992; 60:1473-81.
24. Soares IS, Levitus G, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. Infect Immun 1997; 65:1606-14.

Endereço para correspondência:

Dra. Ana Yecê das Neves Pinto

Instituto Evandro Chagas

Av. Almirante Barroso, 492 – Marco

CEP 66090-000 - Belém, PA

Fones: (91) 211.4439/ 211.4457 – Fax: (91) 226.1284

E-mail: ayece@iec.pa.gov.br / anayece@uol.com.br