

MARCELO URBANO FERREIRA

Parasitologia

CONTEMPORÂNEA

2ª EDIÇÃO



Introdução

A malária é uma das principais doenças parasitárias da atualidade, com cerca de 216 milhões de casos e 445.000 mortes anuais. Mais de 90% dos casos ocorrem na África, especialmente nas extensas áreas de savana e floresta equatorial ao sul do Saara, onde a malária é uma das principais causas de morte entre crianças com menos de 5 anos de idade e gestantes.

Cerca de 40% da população mundial vive em áreas com transmissão de malária, distribuídas em 91 países da África, da Ásia, da Oceania e das Américas. Desses, 21 compõem a lista de países próximos de eliminar a malária, incluindo Cabo Verde e sete países latino-americanos (Belize, Costa Rica, Equador, El Salvador, México, Paraguai e Suriname). No outro extremo, mais de 80% da carga global da doença concentra-se em 15 países, dos quais 14 são africanos. Entre estes, encontram-se a Nigéria (com 27% dos casos de malária registrados no mundo), a República Democrática do Congo (10%), a Índia (6%) e Moçambique (4%). O Brasil, que contribui com 39% dos casos de malária registrados no continente americano, tem suas principais áreas endêmicas na Amazônia Legal. Registram-se no país quase 200.000 novos casos a cada ano.

Quatro espécies de plasmódios são classicamente reconhecidas como agentes etiológicos da malária humana: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. *Plasmodium falciparum* predomina na África, e é a espécie encontrada em 91% das infecções nesse continente. *Plasmodium malariae* é a segunda espécie mais comum na África, também encontrada nos demais continentes. *Plasmodium ovale* compreende duas subespécies geneticamente distintas que se separaram há mais de um milhão de anos: *P. ovale curtisi* e *P. ovale wallikeri* (Sutherland et al., 2010). O parasito é relativamente incomum, mas as duas subespécies circulam na África, em partes da Ásia e da Oceania, não sendo encontrado nas Américas. *Plasmodium vivax* é raro na África, com exceção da Mauritânia e do Mali e dos países do Chifre da África (Eritreia, Etiópia e Somália); entretanto, 36% dos casos extra-africanos de malária devem-se a essa espécie. Em termos globais, são mais de 8 milhões de casos de malária *vivax* por ano; 86% deles provêm do Afeganistão, da Etiópia, da Índia, da Indonésia e do Paquistão. Nas Américas, *P. vivax* tornou-se a espécie predominante nas últimas décadas, e corresponde hoje a 64% das infecções; as demais espécies encontradas no continente são *P. falciparum* e *P. malariae*. Uma quinta espécie, *P. knowlesi*, é um parasito típico de macacos do Velho Mundo que pode infectar

seres humanos no Sudeste Asiático (Singh; Daneshvar, 2013). Os plasmódios que infetam humanos são transmitidas exclusivamente por mosquitos (Diptera: Culicidae) do gênero *Anopheles*.

Plasmodium falciparum e *P. vivax* originaram-se na África, de onde progressivamente se disseminaram, com as migrações humanas, para os demais continentes (Tanabe et al., 2010). O primeiro tornou-se um parasito humano recentemente, adquirido mediante uma transferência lateral a partir de gorilas, enquanto o segundo parece prover de parasitos que circulavam entre chimpanzés e gorilas, embora não haja certeza a esse respeito (Loy et al., 2017). Pouco se sabe sobre a história evolutiva de *P. malariae* e *P. ovale* (Sutherland, 2016). Muito provavelmente, as Américas foram o último continente onde os plasmódios humanos se estabeleceram. *Plasmodium falciparum* foi introduzido com o tráfico de escravos africanos, entre os séculos XVI e XIX. As linhagens americanas de *P. vivax*, no entanto, parecem combinar características genéticas de parasitos de diferentes regiões do globo, podendo ter chegado ao continente em épocas pré-colombianas (Rodrigues et al., 2018). Nas Américas, *P. vivax* e *P. malariae* adaptaram-se a diversos primatas não humanos, como os bugios (*Alouatta sp.*) e outros macacos do Novo Mundo. Nesses hospedeiros, tais espécies de parasitos foram inicialmente descritas como *P. simium* e *P. brasilianum*, respectivamente. Hoje está demonstrado que, em alguns focos da América do Sul, as mesmas linhagens de *P. vivax* e *P. malariae* circulam entre seres humanos e macacos, com evidentes implicações para seu controle e a eliminação da malária no continente (Lalremruata et al., 2015; Brasil et al., 2017).

O genoma nuclear dos plasmódios que infectam o homem foi caracterizado nas duas últimas décadas. Os genomas de cada espécie, sequenciados e montados com o uso de diferentes métodos, compreendem 23 a 38 milhões de pares de bases e cerca de 5.000 a 8.000 genes anotados, distribuídos em 14 cromossomos. Os parasitos apresentam também dois genomas extranucleares: o mitocondrial, com 6.000 pares de bases, e o do apicoplasto, com 29.400 pares de bases. O apicoplasto é uma organela semelhante ao cloroplasto das plantas e proveniente de uma simbiose secundária com cianobactérias. A disponibilidade de dados genômicos de muitas centenas de parasitos de diferentes origens geográficas proporciona o estudo genético populacional em alta resolução, levando à descoberta das bases genéticas de fenótipos de importância médica, como a virulência dos parasitos e sua resistência aos antimaláricos (Neafsey; Volkman, 2017).

Aspectos biológicos

Por mais de 2.500 anos, a malária foi atribuída a miasmas emanados de regiões alagadas. O próprio nome da doença origina-se do italiano medieval “*mal aria*”, fazendo referência aos “maus ares” dos pântanos. Somente em 1880 o médico militar francês Charles Louis Alphonse Laveran viria a descobrir, em amostras de sangue de pacientes febris da Argélia, o protozoário posteriormente conhecido como *P. malariae*. Laveran examinou amostras frescas de sangue, sem fixação nem coloração, em seu microscópio rudimentar sem objetiva de imersão em óleo, com aumento máximo de 400 ×. No entanto, observou e descreveu com precisão diversos estágios evolutivos do parasito presentes no sangue, interpretando corretamente seu significado biológico. Por sua descoberta extraordinária, contrariando as teorias então vigentes sobre as causas da malária, Laveran recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1907 (Cox, 2010). As demais espécies de plasmódios humanos foram caracterizadas nos anos seguintes, com o uso de corantes apropriados e microscópios mais avançados; a última delas, *P. ovale*, foi descrita por John Stephens na África Ocidental em 1922.

Os plasmódios apresentam um ciclo vital complexo (Figura 3.1). A infecção humana inicia-se com a inoculação no tecido subcutâneo, durante o repasto sanguíneo, de 15 a 200 esporozoítos provenientes das glândulas salivares de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. Do subcutâneo, os esporozoítos atravessam diferentes tipos celulares, incluindo fibroblastos e fagócitos, até chegarem à corrente sanguínea ou linfática (Amino et al., 2006). Se alcançarem os vasos sanguíneos, chegam ao fígado cerca de 30 minutos após a inoculação, onde são capturados por células de Küpffer e atravessam as células endoteliais dos capilares hepáticos e diversos hepatócitos até se estabelecerem em um deles. Embora os mecanismos moleculares que possibilitam ao parasito atravessar diferentes tipos celulares ainda não sejam completamente conhecidos, demonstrou-se recentemente o papel essencial de duas proteínas de esporozoítos nesse processo, SPECT (do inglês, *sporozoite microneme protein essential for cell traversal*)-1 e SPECT-2, esta última também conhecida como PLP (*perforin-like protein*)-1 (Yang et al., 2017).

Concluída a fase de migração por diferentes células, o esporozoítos inicia o chamado *ciclo pré-eritrocitário* de multiplicação do parasito. Até meados da década de 1940, desconhecia-se o destino dos parasitos que, uma vez inoculados pelo vetor, somente surgem na corrente sanguínea cerca de 10 dias

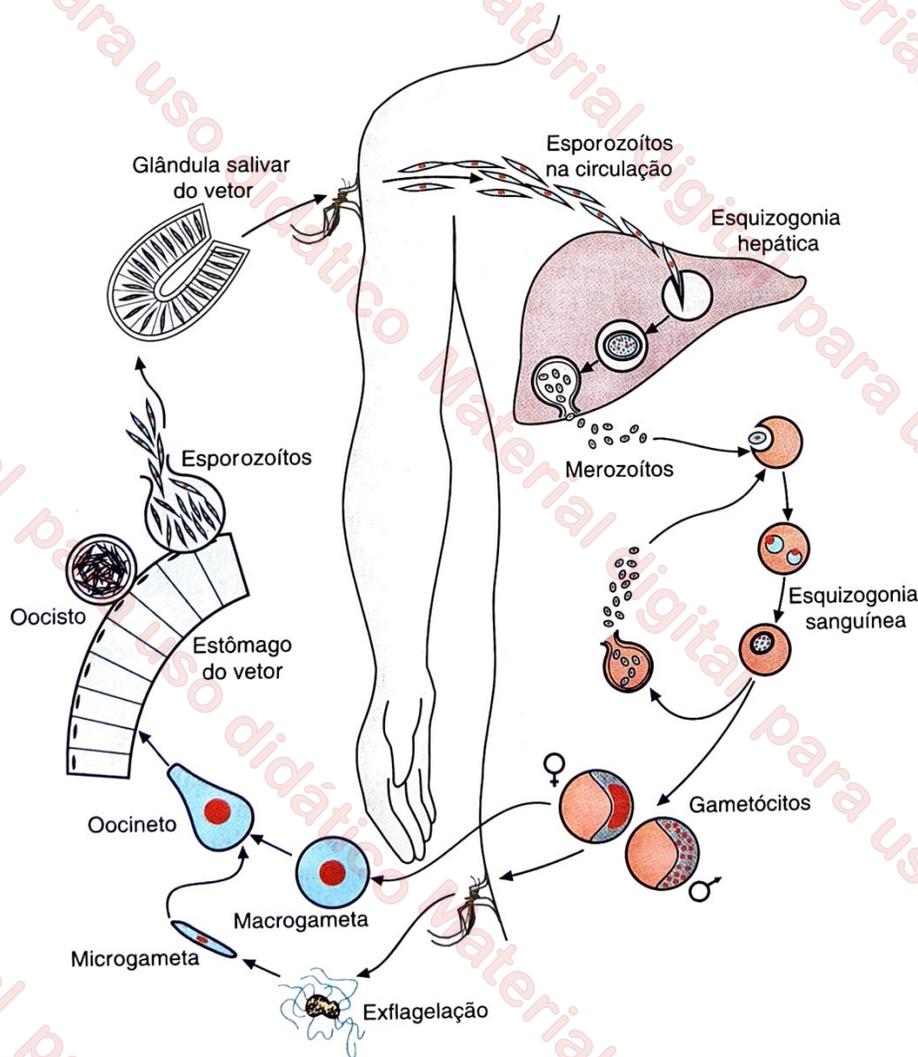


FIGURA 3.1 Ciclo vital dos plasmódios que infectam o homem. Observe que, neste ciclo genérico, não são representados os hipnozoítos que ocorrem em *P. vivax* e *P. ovale*. As etapas de desenvolvimento do parasito no vetor estão simplificadas.

depois. A hipótese mais aceita durante 40 anos, conhecida posteriormente como *falácia de Schaudinn*, baseava-se na observação relatada pelo conhecido parasitologista alemão Fritz Schaudinn em 1903, mas nunca confirmada de modo independente, de penetração direta de esporozoítos de *P. vivax* em hemácias humanas. Henry Shortt e Cyril Garnham basearam-se em trabalhos prévios com protozoários sanguíneos filogeneticamente próximos a plasmódios, que infectam aves, para refutar a falácia de Schaudinn. Demonstraram de modo inequívoco, em 1947, que os plasmódios humanos passam por uma fase de multiplicação no fígado antes de infectarem as hemácias (Cox, 2010). Entre as evidências prévias havia as publicações do parasitologista brasileiro Henrique Aragão, de 1908, descrevendo o ciclo pré-eritrocitário de *Haemoproteus columbae* no pulmão de pombos experimentalmente infectados (Sá, 2011).

No interior do hepatócito, os esporozoítos originam estágios esféricos uninucleares conhecidos como *criptozoítos*. Se caírem em vasos linfáticos, os esporozoítos deixam de sofrer desenvolvimento ulterior, mas podem induzir resposta imune do hospedeiro ao chegarem aos linfonodos (Amino et al., 2006). Demonstrou-se recentemente, em modelos experimentais, que alguns parasitos podem permanecer na derme e lá desenvolver-se. No fígado, a divisão nuclear dos criptozoítos origina uma célula multinucleada conhecida como *esquizonte*. Ao final de 8 a 15 dias, o hepatócito parasitado libera milhares de *merozoítos* (Figura 3.2), envoltos em uma vesícula

conhecida como *merossomo*, na luz de sinusoides hepáticos. *Esquizogonia* é o processo de reprodução assexuada que resulta na formação do esquizonte, que, por sua vez, dará origem aos merozoítos. A esquizogonia que ocorre em hepatócitos é conhecida como esquizogonia hepática, tecidual, pré-eritrocitária ou exoeritrocitária, para distingui-la dos ciclos esquizogônicos que posteriormente ocorrem nas hemácias.

Em *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos originam formas dormentes intra-hepáticas conhecidas como *hipnozoítos* (ver Figura 3.2). Semanas ou meses depois da infecção primária, os hipnozoítos podem reativar-se, resultando nas *recadas tardias* típicas da infecção humana por *P. vivax* e *P. ovale* (Tabela 3.1). Os mecanismos que levam à reativação dos hipnozoítos são desconhecidos; especula-se que a febre, causada pela própria malária ou infecções bacterianas, possa estimular a reativação (Shanks; White, 2013). Não está claro se os merozoítos originados de hipnozoítos são geneticamente idênticos aos produzidos durante a infecção primária, logo após a inoculação dos esporozoítos. Os dados disponíveis sugerem que subpopulações distintas de esporozoítos de *P. vivax*, presentes no mesmo inóculo, podem passar ou não pelo estágio de hipnozoítos antes de sofrerem a esquizogonia hepática. Além disso, diferentes gerações de hipnozoítos, provenientes de infecções independentes, podem reativar-se simultaneamente, aumentando a complexidade genética da população de parasitos presentes na corrente sanguínea.

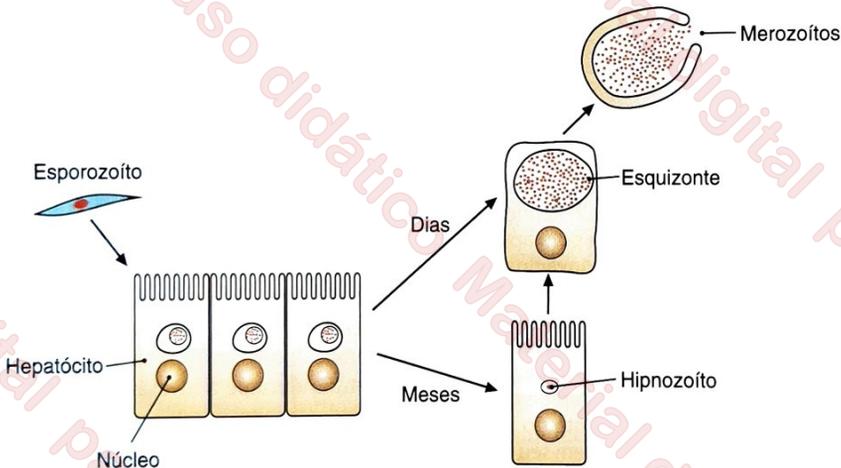


FIGURA 3.2 Hipnozoítos e a esquizogonia exoeritrocitária em *Plasmodium vivax* e *P. ovale*. Os esporozoítos que penetram hepatócitos podem multiplicar-se intensamente ao longo dos próximos 8 a 15 dias, originando milhares de merozoítos a serem liberados na corrente sanguínea (esquizogonia exoeritrocitária), ou podem permanecer dormentes no interior da célula hospedeira, por semanas ou meses, sob a forma de hipnozoítos.

TABELA 3.1 Características biológicas dos plasmódios humanos.

	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. ovale</i>
Período de incubação	8 a 27 dias	15 a 30 dias	8 a 25 dias	9 a 17 dias
Presença de hipnozoítos	Sim	Não	Não	Sim
Duração do ciclo eritrocitário	48 h	72 h	48 h	48 h
Número de merozoítos por esquizonte tecidual	10.000	2.000	40.000	15.000
Parasitemia (mm ³)				
• Média	• 20.000	• 6.000	• 50.000 a 500.000	• 9.000
• Máxima	• 50.000	• 20.000	• 2.500.000	• 30.000
Duração máxima da infecção não tratada (anos)	Até 4	Até 50	Até 2	Até 4

Os merozoítos são estágios extracelulares de formato ovoide, com 1 a 3 μm de comprimento, que invadem exclusivamente hemácias. O processo de invasão dessa célula hospedeira por merozoítos de *P. falciparum*, que leva 1 a 2 minutos, envolve as cinco etapas representadas na Figura 3.3.

Nesse processo desempenham papel fundamental as estruturas que formam o chamado *complexo apical*, as roptrias, os micronemas, os grânulos densos e o anel polar, representadas na Figura 3.4. Ocorre inicialmente o reconhecimento de receptores da superfície da hemácia. Acredita-se que essa interação inicial seja mediada por componentes da superfície dos merozoítos, as *merozoite surface proteins* (MSPs). Algumas MSPs são ancoradas na membrana do parasito por uma estrutura de glicosilfosfatidilinositol (GPI), como MSP-1, 2, 4, 5, 8 e 10; outras são solúveis, como MSP-3, 6, 7 e 9. A MSP-1 parece interagir com a banda 3, uma proteína abundante na membrana da hemácia, mas o papel dessa interação no processo de invasão não está plenamente estabelecido. A etapa seguinte consiste na reorientação do merozoíto. O parasito posiciona seu polo apical em contato com a membrana da hemácia. No interior de roptrias e micronemas, encontram-se diversas

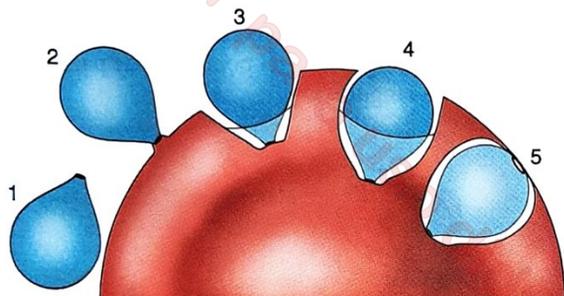


FIGURA 3.3 Representação esquemática do processo de invasão de hemácias por merozoítos de plasmódios. 1. Reconhecimento, a distância, de receptores da superfície da hemácia. 2. Reorientação da posição do merozoíto, de modo a colocar seu polo apical em contato direto com a membrana da hemácia. 3. Invaginação da membrana da hemácia. 4. Interações de alta afinidade de moléculas do merozoíto com receptores da hemácia, inicialmente em seu polo apical e estendendo-se até seu polo posterior, facilitando a penetração do merozoíto, que forma um vacúolo à medida que penetra célula. 5. Descarte das moléculas que interagem com a membrana da hemácia, possibilitando o fechamento do vacúolo que se formou durante a invasão, com o merozoíto em seu interior. Adaptada de Cowman et al., 2017.

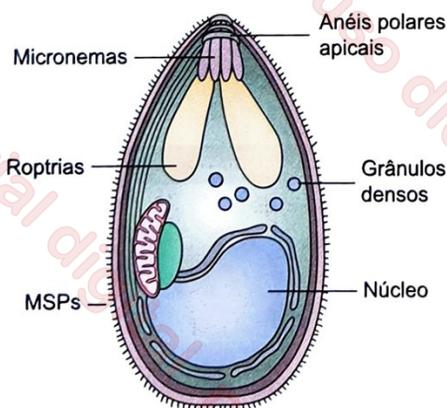


FIGURA 3.4 Representação esquemática da estrutura de um merozoíto de plasmódio. Adaptada de Cowman et al., 2017.

outras moléculas, especialmente proteases, que serão secretadas durante o processo de invasão celular, facilitando a formação de um poro entre o merozoíto e a hemácia e a invaginação da membrana da hemácia.

Para sua entrada na célula, *P. falciparum* estabelece interações de alta afinidade com receptores da hemácia, a partir de seu polo apical. As primeiras interações envolvem duas famílias de adesinas, liberadas pelos micronemas em resposta a uma sinalização intracelular dependente de cálcio: a família *Duffy binding-like* (DBL) ou *erythrocyte-binding-like* (EBL) e a família *reticulocyte-binding-like protein homolog* (RBL ou Rh). Os receptores de algumas adesinas na superfície das hemácias são conhecidos: *Erythrocyte-binding antigen* (EBA)-175, da família EBL, liga-se à glicoforina A; EBA-140 liga-se à glicoforina C; EBL-1 liga-se à glicoforina B. Não se conhece, no entanto, o receptor de EBA-181. As interações entre membros da família DBL/EBL e as hemácias são redundantes; por exemplo, os merozoítos de *P. falciparum* invadem hemácias deficientes em glicoforina A, de fenótipo En(a-), utilizando a glicoforina B ou C como receptor. Das proteínas da família RBL/Rh, conhecidas como Rh1, Rh2a, Rh2b, Rh4 e Rh5, só se conhecem os receptores eritrocitários das duas últimas: Rh4 liga-se ao receptor de complemento CR1, enquanto Rh5 forma um complexo com duas outras proteínas do parasito (Ripr e CyRPA) e se liga à basigina, antígeno que define o grupo sanguíneo Ok na superfície da hemácia. A formação de uma *junção apertada* (*tight junction*), que possibilita o contato íntimo entre as membranas celulares do merozoíto e da hemácia, completa-se ao final desse processo de múltiplas interações.

Inicia-se então a etapa de entrada do merozoíto na hemácia, dependente da interação de uma proteína integral da membrana, a *apical membrane protein* (AMA)-1, produzida pelos micronemas, com proteínas de roptrias da família RON, especialmente RON-2. Segundo a hipótese mais aceita, RON-2 é translocada para a membrana da célula hospedeira e serve como ponto de ancoragem de AMA-1, que se conecta aos feixes de actina e miosina do parasito. Deste modo, o merozoíto é impulsionado para a frente, formando um vacúolo à medida que penetra a célula. Finalmente, o merozoíto descarta suas moléculas liberadas durante sua interação com a membrana da hemácia, tornando possível o fechamento do vacúolo que se formou durante a invasão. Conhecer as diversas moléculas envolvidas na invasão de hemácias tem possibilitado desenvolver estratégias para inibi-la com o uso de anticorpos específicos. Em particular, anticorpos que bloqueiam a interação entre Rh5 têm grande capacidade inibitória, sugerindo um possível alvo para o desenvolvimento de vacinas contra os estágios sanguíneos de *P. falciparum*. A combinação de anticorpos contra diferentes ligantes, incluindo EBA-175 e Rh4, parece ter efeito protetor ainda mais pronunciado (Cowman et al., 2017).

Plasmodium vivax parasita exclusivamente reticulócitos, hemácias jovens que ainda expressam o receptor de transferrina-1 (TfR-1), também conhecido como CD71. Em contraste, *P. falciparum* invade hemácias de todas as idades, ainda que apresente preferência por hemácias jovens. *P. malariae* não mostra preferência por algum tipo de hemácia. A literatura clássica refere-se a uma preferência de *P. malariae* por hemácias mais velhas, mas sem evidência clara a esse respeito. As bases moleculares da preferência de *P. vivax* por reticulócitos foram recentemente elucidadas. RBP2b, uma proteína da família das RBPs (*reticulocyte-binding proteins*), correspondente em *P. vivax* à família RBL/Rh de *P. falciparum*, é o ligante de TfR-1 (CD71) durante o reconhecimento inicial da célula

hospedeira. O parasita não invade hemácias incapazes de expressar TFR1. Além disso, anticorpos contra RBP2b, ao bloquearem essa interação, reduzem drasticamente o sucesso de entrada do parasito na hemácia (Gruszczyk et al., 2018). A preferência de merozoítos de *P. vivax* por reticulócitos favorece seu acúmulo no parênquima da *medula óssea*, onde as células sanguíneas imaturas que expressam CD71 são produzidas, formando um amplo reservatório para o desenvolvimento e a proliferação dos parasitos (Obadia et al., 2018).

A entrada de *P. vivax* depende ainda de outras interações receptor-ligante com as hemácias. Em geral, seus merozoítos penetram somente em hemácias que expressam o grupo sanguíneo Duffy, também conhecido como *Duffy antigen receptor for chemokines* (DARC) na literatura de língua inglesa. DARC serve como receptor para uma molécula que os merozoítos expressam em sua superfície, conhecida como *Duffy binding protein* (DBP). Os indivíduos Duffy-negativos, frequentemente encontrados na África Ocidental, não expressam DARC em seus eritrócitos, e por isso são geralmente refratários à infecção sanguínea por *P. vivax* (Zimmerman et al., 2013). Portanto, DBP constitui-se em um excelente alvo potencial para o desenvolvimento de vacinas contra esse parasito (Chitnis; Sharma, 2008). A interação entre DBP e DARC é essencial para a formação da *tight junction* entre o merozoito e o reticulócito, que se segue à interação inicial entre RBP2b e TFR1. Anticorpos naturalmente adquiridos contra a DBP são capazes de inibir a interação entre o parasito e a DARC, reduzindo o risco de infecção (King et al., 2008) e de doença (Nicolette et al., 2016). Entretanto, há relatos de infecções por *P. vivax* em indivíduos Duffy-negativos da África Oriental (Ménard et al., 2010) e do Brasil (Cavasini et al., 2007), sugerindo que esse parasito utilize receptores alternativos, ainda desconhecidos, para a sua penetração em hemácias.

Os primeiros estágios intraeritrocitários dos plasmódios são os *trofozoítos*. No interior das hemácias ocorre nova esquizogonia; os esquizontes eritrocitários maduros apresentam entre 6 e 32 núcleos, cada um deles originando um merozoito. Ao fim da esquizogonia, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, coincidindo temporalmente com os picos febris periódicos característicos da malária. Em geral, a febre e os demais sinais e sintomas típicos da malária surgem quando se ultrapassa certo limiar de parasitemia, em torno de 10 a 100 formas sanguíneas por microlitro de sangue. Por isso, os primeiros ciclos eritrocitários podem deixar de despertar

sintomas. A saída dos merozoítos da hemácia exige a ruptura do vacúolo parasitóforo em que o parasito se instalou e da membrana celular da célula hospedeira (Figura 3.5). Primeiro rompe-se o vacúolo parasitóforo, como resultado da ação de proteases do parasito. Consequentemente, os merozoítos ficam livres no citosol da hemácia ainda intacta. A seguir, eleva-se subitamente a pressão intracelular e ocorre degradação do citoesqueleto da hemácia. Sua membrana celular rompe-se, liberando os merozoítos.

O intervalo entre os picos febris corresponde à duração da esquizogonia sanguínea em cada espécie (ver Tabela 3.1). Os merozoítos que invadem novas hemácias podem transformar-se em trofozoítos e posteriormente em esquizontes, ou alternativamente podem diferenciar-se em formas de reprodução sexuada, os *gametócitos*, infectantes para os mosquitos vetores. Os gametócitos de *P. falciparum* começam a ser produzidos depois de alguns ciclos de esquizogonia sanguínea; são encontrados gametócitos maduros na circulação periférica somente 8 a 10 dias depois do início dos sintomas e eles persistem viáveis por muitas semanas. Em contraste, os gametócitos de *P. vivax* são produzidos logo no início do ciclo sanguíneo; encontram-se gametócitos maduros no sangue periférico 3 a 5 dias depois de surgirem os primeiros estágios assexuados sanguíneos. Em geral, todos os indivíduos com malária *vivax* apresentam gametócitos circulantes, mas que sobrevivem por poucos dias no sangue periférico (Adams; Mueller, 2017). Os gametócitos imaturos das espécies acumulam-se na medula óssea, seu provável sítio de maturação, até chegarem à corrente sanguínea.

A próxima fase do ciclo vital, conhecida como *esporogonia*, ocorre no mosquito. Os gametócitos ingeridos durante o repasto sanguíneo, diferentemente dos demais estágios eritrocitários do parasito, não são digeridos no estômago dos mosquitos. Em poucos minutos o gametócito masculino sofre a *exflagelação*, desencadeada pela mudança de temperatura na passagem do ser humano para o mosquito, que resulta na formação de seis a oito gametas masculinos ou *microgametas*, enquanto os gametócitos femininos transformam-se em *macrogametas*. A exflagelação dos gametócitos masculinos foi inicialmente observada em 1897, em um hematozoário de pássaros, *Haemoproteus columbae*, por William MacCallum, um estudante de medicina canadense. MacCallum logo concluiu que um processo semelhante poderia ocorrer também em plasmódios humanos, mas não previa a participação de mosquitos no restante do ciclo do parasito. O zigoto formado

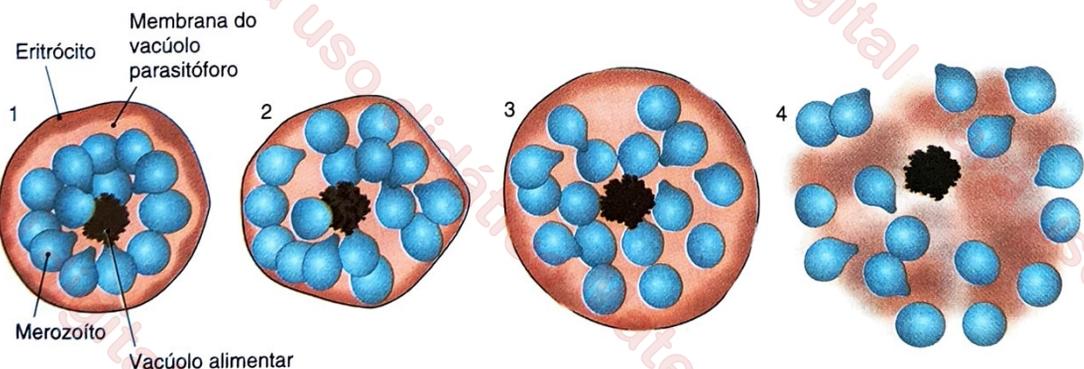


FIGURA 3.5 Representação esquemática do processo de saída dos merozoítos da hemácia infectada. **1.** Esquizonte maduro com merozoítos já formados. **2.** Ruptura do vacúolo parasitóforo, com liberação dos merozoítos no citosol da hemácia intacta. **3.** Aumento do diâmetro da hemácia como resultado da elevação da pressão intracelular e da degradação de seu citoesqueleto. **4.** Ruptura da membrana celular da hemácia liberando os merozoítos.

pela fusão de microgametas e macrogametas transforma-se, em poucas horas, em um estágio móvel chamado *oocineto*. Ao penetrar a parede do estômago do mosquito, o oocineto transforma-se em *oocisto*, uma estrutura esférica que se aloja entre o epitélio e a membrana basal, em cujo interior se formam *esporozoítos*. Com a ruptura do oocisto, milhares de esporozoítos liberam-se e migram para as glândulas salivares dos mosquitos. A cada repasto sanguíneo, dezenas de esporozoítos são inoculadas no hospedeiro vertebrado. O ciclo esporogônico, que dura de 10 a 17 dias, foi elucidado por Ronald Ross, um médico militar britânico agraciado em 1902 com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina. Em 1898, Ross encontrou oocistos em culicíneos alimentados com sangue de pássaros infectados com *P. relictum*; nos anos seguintes, a participação de anofelinos na transmissão da malária humana foi confirmada por Giovanni Battista Grassi e Amico Bignami, na Itália, e pelo próprio Ronald Ross, em Serra Leoa (Cox, 2010).

Aspectos clínicos

Diversas infecções bacterianas e virais resultam em imunidade completa e duradoura após um único contato com o agente etiológico. Em contrapartida, a malária só induz imunidade parcial e de curta duração depois de vários anos de exposição contínua ao parasito. Por exemplo, as crianças de áreas rurais da África Subsaariana são geralmente expostas à malária desde o nascimento e passam a adoecer quando desaparece a proteção conferida pelos anticorpos maternos, adquiridos por passagem transplacentária e pela elevada concentração de hemoglobina fetal. Anticorpos adquiridos naturalmente também se mostram eficientes no controle da infecção, quando transferidos passivamente do soro de indivíduos imunes para sujeitos em fase aguda da doença. Muitas dessas crianças pequenas desenvolvem malária grave quando expostas a *P. falciparum*. A partir dos 5 anos de idade, entretanto, a malária grave raramente é observada nessas crianças, que parecem ter desenvolvido certo grau de imunidade contra a doença (*imunidade clínica*), ainda que permaneçam suscetíveis à infecção e eventualmente a episódios clínicos leves. Adolescentes e adultos dessas comunidades rurais africanas, mesmo que frequentemente alberguem baixas cargas parasitárias, raramente apresentam doença clinicamente manifesta. Gestantes são exceção, especialmente as primigestas, que podem desenvolver malária grave. Outra exceção conhecida são os africanos que permanecem por longos períodos de tempo fora de áreas endêmicas, com perda parcial ou completa da imunidade adquirida. No Brasil, há evidência de aquisição de imunidade clínica em populações da Amazônia, após vários anos de exposição ao parasito, embora os níveis de transmissão de malária sejam substancialmente inferiores aos observados na África (Alves et al., 2002).

Entre indivíduos não imunes, como viajantes e migrantes provenientes de áreas não endêmicas, é comum a ocorrência de paroxismos característicos da malária, também chamados de *acessos palúdicos*. Os paroxismos iniciam-se com calafrios, acompanhados de mal-estar, cefaleia e dores musculares e articulares. Náuseas e vômitos são sintomas frequentes, podendo também ocorrer dor abdominal intensa. Em algumas horas inicia-se febre alta, que produz adinamia e prostração. A essa fase segue-se um período de sudorese profusa, com melhora progressiva do estado geral. Via de regra, pacientes com

infecção por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* têm paroxismos febris a cada 48 h (*febre terçã*), enquanto aqueles infectados por *P. malariae* têm paroxismos a cada 72 h (*febre quartã*). Na prática, esse quadro clássico é pouco frequente em indivíduos continuamente expostos à malária; nesse caso, os sintomas tendem a ser mais brandos. A infecção pode ser completamente assintomática em indivíduos semi-imunes com baixas parasitemias. Há geralmente anemia, esplenomegalia e hepatomegalia. O diagnóstico diferencial da malária não complicada inclui quadros febris agudos comuns em regiões tropicais, como dengue, febre amarela e outras arboviroses, bem como diversas doenças bacterianas acompanhadas de bacteriemia, como septicemias, febre tifoide e pielonefrite aguda.

Do ponto de vista clínico, a diferença mais importante entre *P. falciparum* e as demais espécies está em sua maior capacidade de produzir doença potencialmente grave e de desenvolver rapidamente resistência a diversos antimaláricos de uso corrente. *Malária grave ou complicada* (Tabela 3.2) é um conceito operacional originalmente proposto para identificar pacientes com malária *falciparum* que requerem cuidados médicos de maior complexidade, mas hoje é amplamente reconhecida a capacidade de *P. vivax* produzir doença grave, eventualmente fatal, e adquirir resistência a diversos antimaláricos de uso corrente, especialmente à cloroquina (Price et al., 2009).

TABELA 3.2 Manifestações e complicações da malária grave por *Plasmodium falciparum*.

Complicação	Definição
Malária cerebral	Coma profundo na ausência de outra encefalopatia infecciosa ou metabólica.
Convulsões generalizadas	Mais de duas crises convulsivas em 24 h.
Anemia grave	Concentração de hemoglobina sanguínea abaixo de 5 g/100 ml ou hematócrito inferior a 15% geralmente requerem hemotransfusão.
Hipoglicemia	Concentração de glicose sanguínea inferior a 40 mg/100 ml.
Insuficiência renal aguda	Concentração de creatinina plasmática superior a 3 mg/100 ml com débito urinário inferior a 400 ml em 24 h (12 ml/kg/dia em crianças).
Edema pulmonar e síndrome da angústia respiratória do adulto	Se possível, com comprovação radiológica do edema pulmonar e monitoramento de pressão capilar pulmonar ou venosa central.
"Malária algida"	Choque circulatório.
Acidose metabólica	Níveis sanguíneos de bicarbonato abaixo de 15 mmol/l e pH sanguíneo abaixo de 7,35.
Alterações de hemostasia	Hemorragias retinianas e gengivais, trombocitopenia.
Febre hemoglobinúrica (<i>blackwater fever</i>)	Hemólise intravascular maciça.
Hipertermia	Temperatura retal acima de 39°C.
Hiperparasitemia	Parasitemia acima de 100.000 parasitos por microlitro de sangue.
Disfunção hepática e icterícia	
Ruptura esplênica	

Adaptada de Brasil, 2020.

Todos os pacientes incapazes de ingerir antimaláricos, que apresentam disfunção de órgãos vitais ou que têm altas parasitemias requerem hospitalização. Também devem ser hospitalizadas as gestantes com malária *falciparum*, em função do alto risco de abortamento e de complicações maternas; embora a transmissão congênita seja rara, as crianças de mães com malária gestacional por *P. falciparum* ou *P. vivax* frequentemente apresentam retardo de crescimento intrauterino.

A definição clássica de *malária cerebral* restringe-se aos pacientes com malária *falciparum* em coma profundo, incapazes de localizar estímulos dolorosos, nos quais outras encefalopatias (infecciosas e metabólicas) tenham sido excluídas. Os adultos que se recuperam de malária cerebral raramente apresentam sequelas neurológicas, mas até 10% das crianças podem apresentar algum tipo de seqüela. Existem, entretanto, graus intermediários de comprometimento neurológico, como sonolência e prostração intensa, que não definem a malária cerebral. O estado pós-ictal em pacientes com convulsões pode simular coma profundo; por isso, sugere-se reexaminar o paciente pelo menos uma hora após a última crise convulsiva antes de diagnosticar-se malária cerebral. No Brasil, a maior parte dos pacientes com malária grave apresenta, à admissão ou durante a evolução, um comprometimento de múltiplos órgãos em que o quadro cerebral, se presente, é um componente adicional. A malária cerebral é geralmente considerada uma complicação exclusiva da malária *falciparum*, em função de sua clara associação com o fenômeno de citoaderência descrito a seguir. Entretanto, há diversos relatos recentes de complicações neurológicas, incluindo coma, em infecções por *P. vivax*. A confirmação desses achados e a elucidação de sua fisiopatogenia estão entre as áreas prioritárias de pesquisa clínica sobre a malária.

A *anemia* produzida pela hemólise intravascular que ocorre frequentemente em pacientes com malária é grave apenas em alguns pacientes infectados por *P. falciparum*. Resulta tanto da ruptura de hemácias parasitadas como da destruição de hemácias não parasitadas pelo sistema imune do hospedeiro. Algumas citocinas pró-inflamatórias também parecem contribuir para o agravamento da anemia, por suprimirem a atividade de hematopoética da medula óssea.

A *insuficiência renal* é uma complicação particularmente comum na malária grave em adultos. Resulta de alterações da perfusão renal, decorrentes da desidratação (especialmente em pacientes com febre alta, vômitos e alterações do nível de consciência) e de eventual hipotensão, e agravadas pela hemólise intravascular e conseqüente lesão tubular. A diálise precoce é essencial para reduzir a letalidade do quadro.

A *insuficiência respiratória* decorre de edema pulmonar, com apresentação clínica frequentemente idêntica à da síndrome da angústia respiratória do adulto observada nas septicemias. Alguns pacientes, entretanto, apresentam pressão capilar pulmonar elevada, em função de excesso de hidratação parenteral na vigência de débito urinário reduzido. É um quadro comum entre pacientes adultos, com elevada letalidade. Não é exclusivo de malária *falciparum*; recentemente, numerosos relatos de casos de insuficiência respiratória, com diferentes níveis de gravidade, foram descritos na malária *vivax*, mas a sua fisiopatogenia permanece obscura.

A *icterícia* na malária decorre tanto de hemólise intravascular como de alterações funcionais dos hepatócitos, com aumento dos níveis de bilirrubina indireta (predominantemente) e direta. As concentrações séricas de enzimas hepáticas

elevam-se em geral até 2 a 10 vezes acima dos valores normais, sem alcançar os níveis encontrados nas hepatites virais. As lesões hepáticas são discretas e reversíveis, sem expressão anatomopatológica significativa. Uma situação extrema de hemólise intravascular, com intensa hemoglobinúria, recebe o nome de *febre hemoglobinúrica* ou *blackwater fever*, na literatura de língua inglesa. Esse quadro está geralmente associado ao uso irregular de quinina (e, mais recentemente, de derivados da artemisinina ou de mefloquina), embora não se conheça o papel exato desses medicamentos na fisiopatologia desta complicação. O exame de amostras de urina indica a presença de hemoglobina ou mioglobina. A maior parte dos pacientes apresenta função renal normal, desde que a reposição de sangue seja feita adequadamente.

Os *distúrbios da hemostasia* resultam geralmente de trombocitopenia, muitas vezes associada a um quadro de coagulação intravascular disseminada. Existem relatos recentes de trombocitopenia em malária *vivax*. As hemorragias retinianas são relativamente comuns e têm valor como indicador de prognóstico.

A *ruptura esplênica*, espontânea ou após trauma abdominal, é uma complicação rara da malária por *P. falciparum* e também aquela causada por outras espécies. O quadro requer diagnóstico rápido e tratamento (habitualmente cirúrgico) imediato.

As *gestantes* tendem a ser mais suscetíveis à infecção pelos plasmódios e, uma vez infectadas, são mais propensas a desenvolverem quadros graves, com sérias conseqüências para a sua saúde e a de seu feto (Rogerson et al., 2018). O aumento de suscetibilidade à infecção pode dever-se à maior atratividade de mosquitos pela gestante, comparada com os demais membros da comunidade. Trata-se de fenômeno descrito para os vetores da malária na África Subsaariana, porém ainda não comprovado em outros contextos. Ao longo de décadas, a maior suscetibilidade à doença que se segue à infecção foi atribuída a alterações imunológicas que caracterizam a gestação, com o predomínio de respostas regulatórias que poderiam favorecer a multiplicação do parasito. No entanto, não se explica desse modo por que as primigestas, comparadas às multigestas, tendem a apresentar episódios mais graves, potencialmente fatais, de malária por *P. falciparum*. Hoje atribui-se a maior gravidade da infecção por *P. falciparum* durante a gestação ao sequestro maciço de parasitos no espaço intervilloso da placenta, onde eles encontram um território favorável a sua multiplicação (Fried; Duffy, 2017). As primigestas, em particular, não têm imunidade contra as linhagens de parasitos com maior adesividade à placenta; já as multigestas têm maior probabilidade de apresentar certa imunidade especificamente contra essas linhagens, adquirida durante as infecções em suas gestações prévias. As gestantes podem apresentar baixas parasitemias no sangue periférico, dificultando o diagnóstico laboratorial da malária, mesmo na vigência de intensa infecção placentária. A malária *falciparum* durante a gestação aumenta o risco de óbito fetal, abortamento e parto prematuro e de retardo de crescimento intrauterino e baixo peso ao nascer, bem como de anemia e malária cerebral materna. As infecções congênitas são relativamente raras e muitas vezes assintomáticas, mas podem levar a óbito neonatal se não identificadas e tratadas. Embora a infecção por *P. vivax* durante a gestação raramente tenha a mesma gravidade observada na malária *falciparum*, seu efeito adverso para a saúde materno-fetal está bem demonstrado, mesmo em áreas de baixa endemicidade do Brasil (Bardaji et al., 2017; Pincelli et al., 2018).

Fisiopatologia da malária grave

O principal fator de virulência de *P. falciparum* é a capacidade de adesão das hemácias parasitadas por estágios maduros do parasito ao endotélio de pequenos vasos sanguíneos, particularmente de vênulas pós-capilares, um fenômeno conhecido como *citoadereência*. A citoadereência deve-se à produção, pelos trofozoítos maduros e esquizontes sanguíneos de *P. falciparum*, de moléculas exportadas para a membrana das hemácias parasitadas. Essas proteínas do parasito formam protuberâncias (conhecidas como *knobs* na literatura de língua inglesa), vistas à microscopia eletrônica na membrana das hemácias, que medeiam o processo de aderência a receptores endoteliais (Figura 3.6). A principal molécula do parasito envolvida na aderência ao endotélio vascular é uma proteína variável de alta massa molecular (250-350 kDa) conhecida como *PfEMP-1* (proteína 1 da membrana do eritrócito), codificada pela família de genes *var*. Há cerca de 60 cópias de genes *var* por genoma de *P. falciparum*, mas somente uma é expressa pelos trofozoítos maduros e esquizontes. No entanto, o mesmo clone de *P. falciparum* pode expressar sequencialmente diferentes alelos de genes *var* durante o ciclo eritrocitário, fenômeno conhecido como *variação antigênica*, que lhe garante a sobrevivência em face da imunidade variante-específica despertada no hospedeiro.

Os diversos domínios de *PfEMP-1* ligam-se a diferentes receptores presentes no endotélio vascular (Wahlgren et al., 2017). Os principais receptores são moléculas sulfatadas como o sulfato de condroitina A (CSA), CD36, o receptor endotelial de proteína C reativa (EPCR, *endothelial protein C receptor*) e a molécula de adesão intercelular do tipo 1 (ICAM-1, *intracellular adhesion molecule 1*). CD36, uma glicoproteína integral de membrana na forma de monômero, está presente na superfície

de monócitos, plaquetas, células dendríticas, células endoteliais e uma ampla variedade de linhagens de células cultivadas. Trata-se de um receptor amplamente distribuído no endotélio vascular de vários órgãos. Os subtipos do domínio CDIR capazes de ligar-se a CD36 são CDIR1 α 2 a CDIR1 α 6. A adesão a dois receptores endoteliais está associada à malária cerebral: ICAM-1 e EPCR. *PfEMP-1* liga-se a ICAM-1, que é muito abundante no endotélio dos vasos cerebrais, por meio de um dos domínios DBL, conhecido como DBL β 3. As variantes de *PfEMP-1* que contêm os domínios DC8 e DC13 ligam-se ao receptor EPCR, levando à ativação da célula endotelial, com a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e piora da disfunção endotelial. A integridade do endotélio deve-se, em parte, à ligação entre EPCR e a proteína C, que leva à produção de proteína C ativada, uma molécula capaz de regular a resposta inflamatória endotelial; com a ligação de *PfEMP-1*, perde-se esse efeito citoprotetor (Bernabeu; Smith, 2017). Os espaços intervilosos placentários proporcionam um ambiente favorável à adesão de hemácias parasitadas por parasitos que expressam variantes de *PfEMP-1* capazes de aderir a CSA, receptor presente em grande quantidade pelo sincitiotrofoblasto. As hemácias contendo parasitos que expressam variantes de *PfEMP-1* com alta especificidade para CSA, conhecidas como VAR2CSA, não aderem a CD36 ou ICAM-1. Durante a gestação, os parasitos que expressam VAR2CSA apresentam vantagem seletiva sobre os demais, multiplicando-se intensamente na placenta e produzindo forte inflamação local, que leva à disfunção placentária, com evidentes consequências para o feto. VAR2CSA constitui-se, portanto, em um potencial alvo para o desenvolvimento de vacinas a fim de proteger gestantes contra as complicações da malária *falciparum* (Fried; Duffy, 2017).

Além da aderência de hemácias infectadas a receptores do endotélio vascular, a *PfEMP-1* e outras moléculas do parasito

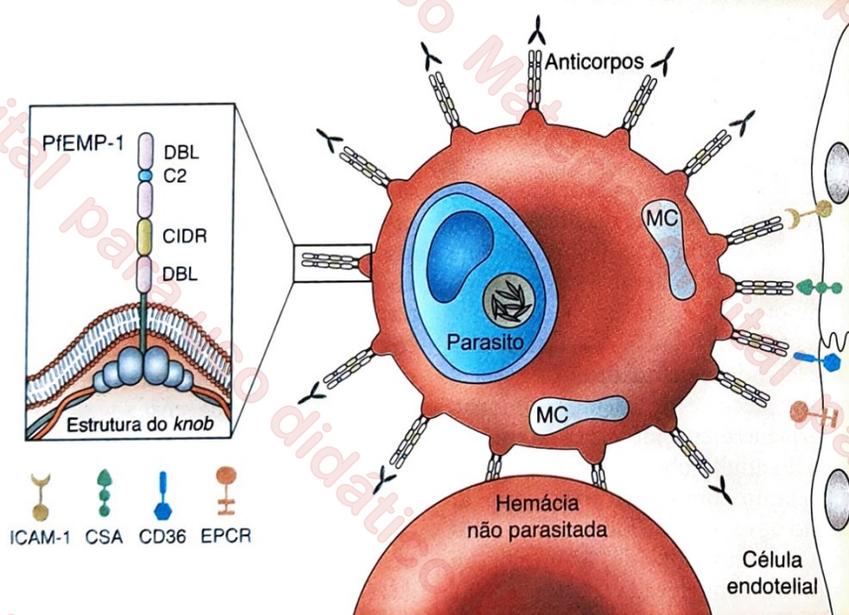


FIGURA 3.6 Moléculas envolvidas na adesão de hemácias infectadas por *P. falciparum* ao endotélio vascular. No painel da esquerda, são representados os principais domínios que compõem uma molécula de *PfEMP-1* presente na superfície da hemácia parasitada, em uma estrutura que forma uma protuberância (*knob*) em sua membrana. A molécula compreende domínios DBL (*Duffy binding-like domains*), CIDR (*cystein-rich interdomain regions*) e C2. No painel da direita, são representadas as interações entre *PfEMP-1* e quatro tipos de receptores (ICAM-1, CSA, CD36 e EPCR), que levam ao fenômeno de citoadereência da hemácia parasitada ao endotélio vascular, bem como as interações entre *PfEMP-1* e hemácias não parasitadas, levando à formação de rosetas. Adaptada de Deitsch; Dzikowski, 2017. MC: fendas de Maurer (em inglês, Maurer clefts), que correspondem a uma rede tubulovesicular exportada pelo parasito ao citoplasma da hemácia parasitada, responsável pelo processamento de proteínas.

expostas na superfície da célula hospedeira medeiam a *formação de rosetas* (aglomerados de hemácias não parasitadas que se ligam a hemácias parasitadas) (ver Figura 3.6). As hemácias parasitadas aderidas ao endotélio e a outras hemácias podem obstruir pequenos vasos, com consequente hipoxia tecidual. Simultaneamente, moléculas do parasito liberadas localmente ao final da esquizogonia eritrocitária podem estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias. A expressão, pelo endotélio vascular, de alguns receptores endoteliais, como ICAM-1, é estimulada por citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α), produzido por macrófagos e monócitos, e, em alguns casos, inibida por óxido nítrico. Anticorpos contra PfEMP-1 podem facilitar a fagocitose de hemácias infectadas e impedir ou reverter a citoaderência, especialmente em vasos placentários. Outras adesinas importantes na formação de rosetas são as proteínas conhecidas como rifinas (*repetitive interspersed families of polypeptides* ou RIFIN), com massa molecular de 20 a 45 kDa, que aderem ao grupo sanguíneo A (sistema ABO) e ao ácido siálico de glicoforina A, e a família de proteínas STEVOR (*subtemoleric variant open reading frame*), que se ligam ao ácido siálico de glicoforina C (Wahlgren et al., 2017).

A maioria das complicações clínicas que caracterizam a malária grave por *P. falciparum* é consequência direta ou indireta dos fenômenos de citoaderência e, possivelmente, da formação de rosetas, bem como da produção de citocinas pró-inflamatórias estimuladas por moléculas liberadas pelo

parasito (Figura 3.7). Entre essas moléculas, encontram-se GPI, um glicoconjugado que ancora proteínas de superfície à membrana do parasito, e a hemozoína, um cristal insolúvel castanho formado pelos parasitos como subproduto da degradação de hemoglobina. A hemozoína quimicamente pura é imunologicamente inerte; no entanto, em condições naturais, a hemozoína liberada pelos esquizontes de *P. falciparum* no plasma vem recoberta pelo DNA do parasito, que estimula a resposta inflamatória mediante a ativação de receptores de tipo Toll (TLR)-9 (Parroche et al., 2007).

Hemácias infectadas por *P. vivax* são classicamente consideradas incapazes de aderir ao endotélio vascular, mas esse conceito vem sendo progressivamente revisto (Totino; Lopes, 2017). Moléculas derivadas desse parasito, expressas na superfície de hemácias infectadas, podem mediar a adesão a ICAM-1 e CSA (Carvalho et al., 2010), fornecendo uma base fisiopatológica para as alterações pulmonares e cerebrais ocasionalmente observadas na malária vivax (Price et al., 2009). O parasito, no entanto, não parece aderir ao sincitiotrofoblasto; ao contrário do observado na malária falciparum, a placenta de gestantes com malária vivax não apresenta sequestro maciço de hemácias parasitárias no espaço intervilloso (Souza et al., 2013). As hemácias parasitadas por diferentes estágios assexuados sanguíneos de *P. vivax* são também capazes de formar rosetas, ainda que seu significado fisiopatológico não esteja claro. As adesinas de *P. vivax* não estão caracterizadas ao nível molecular.

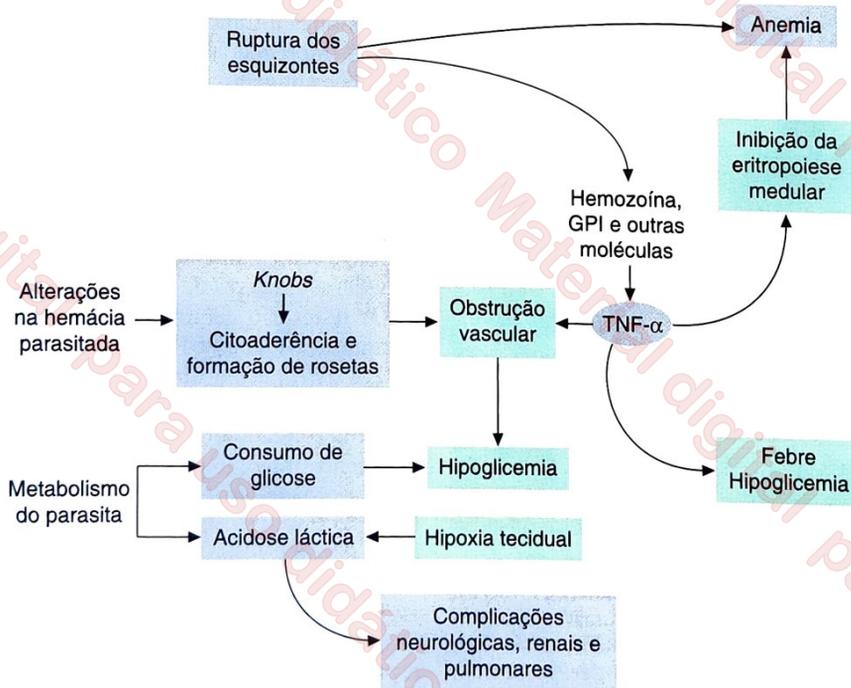


FIGURA 3.7 Fisiopatologia da malária grave e complicada por *Plasmodium falciparum*. O evento central é a aderência das hemácias infectadas ao endotélio de pequenos vasos (especialmente vênulas pós-capilares) e a hemácias não infectadas (formando rosetas), fenômenos mediados por antígenos (PfEMP-1) expressos na superfície da célula hospedeira. A produção de citocinas pró-inflamatórias por células do hospedeiro, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), é estimulada por produtos como a hemozoína e o glicosilfosfatidilinositol (GPI), ambos liberados pelo parasito ao final da esquizogonia sanguínea. Os níveis elevados de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias induzem a expressão de alguns receptores endoteliais como ICAM-1, promovendo a citoaderência e agravando a inflamação e a lesão endotelial. Além disso, estão associados à febre, à hipoglicemia e à anemia. Por outro lado, o próprio metabolismo do parasito sequestrado nos pequenos vasos contribui para a hipoglicemia e a acidose metabólica. A obstrução microvascular, combinada a alterações inflamatórias e metabólicas, pode explicar o acometimento de diversos órgãos e sistemas observado na malária grave.

Diagnóstico laboratorial da malária

O diagnóstico laboratorial da malária baseia-se no encontro de estágios intraeritrocitários do parasito em amostras de sangue periférico examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão. O corante mais usado é o de Giemsa. A gota espessa representa a melhor alternativa para obter-se alta sensibilidade, pois um volume relativamente grande de sangue é examinado em cada campo microscópico. No entanto, seu preparo envolve uma etapa de lise das hemácias para a remoção de hemoglobina, o que resulta em grande distorção da forma dos parasitos. Um microscopista experiente detecta parasitemias da ordem de 10 parasitos por μl de sangue, mas em condições de campo, onde nem sempre a coloração e os microscópios são ideais, o limiar de sensibilidade do método situa-se entre 50 e 100 parasitos por μl de sangue. Os esfregaços sanguíneos são a melhor alternativa para a distinção entre as espécies de plasmódios, já que possibilitam a avaliação da forma e do diâmetro relativo das hemácias, parâmetros essenciais para a definição da espécie infectante (Figura 3.8). No entanto, a sensibilidade diagnóstica do exame de esfregaços tende a ser inferior à da gota espessa. As principais características morfológicas dos parasitos da malária humana, observados ao microscópio óptico depois de corados com o corante de Giemsa, são descritas no Capítulo 20, *Diagnóstico Parasitológico*.

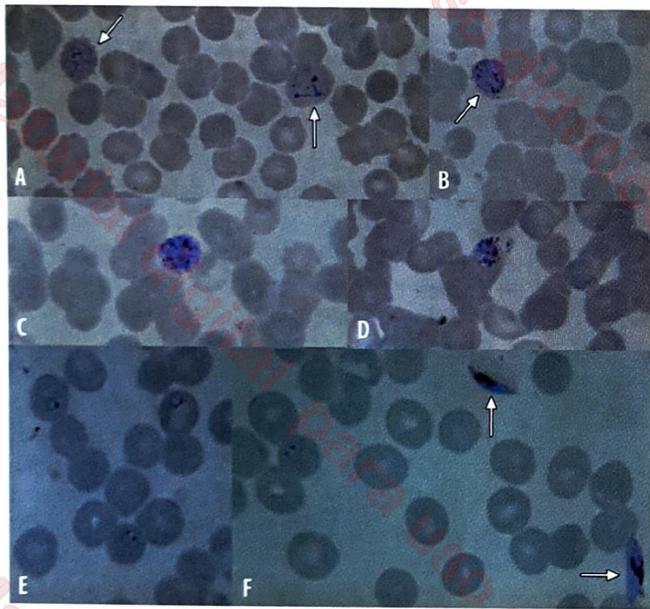


FIGURA 3.8 Características morfológicas de estágios sanguíneos de *Plasmodium vivax* (A a D) e de *Plasmodium falciparum* (E e F) em esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa. Nas figuras A e B, observam-se trofozoítos maduros, de aspecto irregular (ameboide) (A) e um gametócito feminino (macrogametócito) (B) de *Plasmodium vivax*, indicados por setas. Observe a granulação de Schüffner (uma granulação fina e avermelhada) recobrimdo toda a hemácia parasitada. Em C e D, observam-se esquizontes de *Plasmodium vivax*. O esquizonte maduro, mostrado em C, é também conhecido como rosácea. Em E e F, observam-se trofozoítos jovens; em F, são vistos dois gametócitos (um imaturo e um maduro) de *Plasmodium falciparum* (setas). Observe que os gametócitos têm formato de meia-lua. As características morfológicas dos estágios sanguíneos dos plasmódios são descritas com mais pormenores no Capítulo 20. Fotografias de Marcelo Urbano Ferreira.

Existem várias alternativas à microscopia tradicional, mas nenhuma apresenta vantagens suficientes para justificar seu emprego em larga escala. As técnicas sorológicas de detecção de anticorpos podem ser úteis em estudos epidemiológicos e em triagem de doadores de sangue, mas não se aplicam ao diagnóstico individual por não distinguirem infecções atuais de pregressas. A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a detecção de parasitos com elevada sensibilidade, bem como sua especificação precisa, mas seu alto custo e a relativa complexidade limitam seu emprego a contextos de pesquisa. O recente desenvolvimento de métodos ultrasensíveis com base em PCR, tendo como alvo sequências repetitivas do parasito, torna possível a detecção de portadores de baixas parasitemias, muitas vezes completamente assintomáticos, que potencialmente contribuem com a manutenção da transmissão de malária nas comunidades endêmicas (Hofmann et al., 2018).

Atualmente, um novo método chamado LAMP (do inglês, *loop mediated isothermal amplification*) vem sendo testado visando à sua aplicação em campo. Derivado da PCR, trata-se de uma técnica simples, com base na amplificação de ácidos nucleicos em uma faixa estável de temperatura (60 a 65°C), usando uma enzima com propriedades de deslocamento e iniciadores específicos para alvos distintos na sequência de interesse. Durante a amplificação do DNA, originam-se precipitados de pirofosfato de magnésio; a turbidez decorrente da formação dos precipitados é interpretada como sinal de resultado positivo do teste. A LAMP é considerada eficiente para a amplificação de DNA partindo-se de pequeno número de cópias; quando comparada a outras técnicas, tais como PCR convencional e testes rápidos, tem demonstrado sensibilidade e especificidade em torno de 100% e 77%, respectivamente.

Nas duas últimas décadas, tem-se tornado comum o uso de fitas impregnadas com anticorpos monoclonais para a detecção de antígenos de plasmódios; são os testes imunocromatográficos, conhecidos com o nome genérico de testes diagnósticos rápidos. Os principais alvos utilizados nos produtos comercialmente disponíveis são proteínas solúveis como a *histidin-rich protein* (HRP)-2 de *P. falciparum* e a desidrogenase láctica (pDHL) de *P. falciparum* e *P. vivax* (Wilson, 2012). O teste é semelhante àqueles utilizados para o diagnóstico de gravidez e usa cerca de 5 μl de sangue.

Os testes são geralmente apresentados em dois formatos distintos: Pf/Pan e Pf/Pv. O primeiro formato tem como alvo HRP-2 de *P. falciparum* e um domínio de pDHL conservado no gênero *Plasmodium*. O resultado é obtido em 15 a 20 minutos e interpretado do seguinte modo: (a) linha Pan presente e Pf ausente: infecção por espécie diferente de *P. falciparum* (no Brasil, *P. vivax* ou *P. malariae*); (b) linhas Pan e Pf presentes: infecção por *P. falciparum*. Os testes Pf/Pan não distinguem entre *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* nem entre infecções mistas incluindo *P. falciparum* e uma segunda espécie e aquelas exclusivamente por *P. falciparum*. O formato Pf/Pv tem três alvos: (a) HRP-2 de *P. falciparum*, (b) pDHL de *P. falciparum* e (c) pDHL de *P. vivax*, possibilitando confirmar o diagnóstico específico de infecção por *P. vivax*. Com pouco treinamento e sem necessidade de equipamento especial ou fonte de energia elétrica, agentes de saúde podem utilizar esse teste em áreas remotas. Estima-se o limiar de sensibilidade em 40 formas asexuadas sanguíneas de *P. falciparum* por μl de sangue (detecção de HRP-2) e a partir de 100 parasitos por μl de sangue para *P. vivax* (detecção de pDHL). Como a HRP-2 é mais abundante que a pDHL, o teste tende a ser mais sensível para o diagnóstico da malária falciparum.

Um problema emergente está na deleção do gene que codifica HRP-2 em isolados de *P. falciparum* de diversas regiões do mundo, incluindo o Brasil. Nesses parasitos, a expressão de HRP-2 está ausente, podendo produzir resultados falso-negativos no diagnóstico de malária *falciparum*. Isso ocorre no formato Pf/Pan, em que o único alvo específico desse parasito é HRP-2. Nos testes tipo Pf/Pv, a detecção de *P. falciparum* continua possível apesar da deleção do gene de HRP-2, por haver um segundo alvo específico (pDHL), mas o limiar de sensibilidade passa a 100 parasitos por μl de sangue. Entre as limitações adicionais estão a natureza exclusivamente qualitativa dos testes (não permitem quantificar as parasitemias), seu custo elevado e o longo tempo de clareamento de HRP-2, podendo levar a resultados falso-positivos até algumas semanas após o tratamento.

Tratamento da malária

Utilizam-se no tratamento da malária medicamentos que atuam em diferentes fases do ciclo do parasito, classificados como esquizotocidas sanguíneos, hipnozoitocidas ou gametocitocidas. Os regimes terapêuticos estão em constante revisão, diante do desenvolvimento de resistência aos antimaláricos; portanto, devem-se seguir as recomendações mais recentes das autoridades sanitárias de cada país, bem como os manuais publicados periodicamente pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015). Os medicamentos disponíveis são esquizotocidas clássicos, como a quinina e a cloroquina; antibióticos, como a doxiciclina e a clindamicina; esquizotocidas sanguíneos rápidos derivados da artemisinina, como o artesunato e o arteméter; esquizotocidas sanguíneos de ação mais lenta e meia-vida longa, como a mefloquina e a lumefantrina; e hipnozoitocidas, como a primaquina e a tafenoquina.

O Ministério da Saúde do Brasil fornece atualmente, para uso rotineiro, os seguintes medicamentos: cloroquina, primaquina, quinina, doxiciclina, clindamicina, arteméter e artesunato, bem como combinações à base de derivados de artemisinina (*artemisinin-based combination therapy* [ACT], na literatura de língua inglesa), arteméter-lumefantrina e artesunato-mefloquina (Brasil, 2020). Três outras ACTs são utilizadas em outros países: artesunato-amodiaquina, dihidroartemisinina-piperquina e artesunato-sulfadoxina-pirimetamina. Em todos os casos, os derivados de artemisinina são administrados por 3 dias consecutivos. As infecções por *P. vivax* e *P. ovale* são tratadas com uma dose total de 25 mg de cloroquina (base) por kg de peso, administrada ao longo de 3 dias; associa-se 0,5 mg de primaquina (base) por kg, diariamente, por 7 dias, para a eliminação de hipnozoítos hepáticos. Neste caso, a primaquina é usada como hipnozoitocida. Esse medicamento é contra-indicado em gestantes e crianças com menos de 6 meses de idade, bem como em indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6 PD), que podem ter episódios graves de hemólise se expostos à primaquina. Nas infecções por *P. malariae*, utiliza-se apenas a cloroquina, na dose anteriormente indicada; não é necessário o uso de primaquina como hipnozoitocida, pois essa espécie não produz hipnozoítos.

Os derivados da artemisinina são os principais medicamentos utilizados no tratamento da malária *falciparum*. Foram caracterizados a partir da triagem de mais de 2.000 substâncias naturais extraídas de plantas empregadas pela

medicina tradicional chinesa no tratamento de febres. Em 1972, o grupo liderado por Youyou Tu, da Academia de Medicina Tradicional Chinesa em Pequim, demonstrou a ação antimalárica de extratos da planta *Artemisia annua*, posteriormente caracterizando quimicamente seus componentes. Por esta descoberta, Youyou Tu foi agraciada com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2015. O mecanismo de ação das artemisininas não está plenamente estabelecido, mas parece envolver simultaneamente dois tipos de alvos. Estudos proteômicos mostraram que a di-hidroartemisinina, o principal composto ativo das artemisininas, se liga a numerosas proteínas do parasito, afetando simultaneamente diversos processos celulares. Essas proteínas modificadas pela ligação com di-hidroartemisinina seriam normalmente processadas pelo proteossoma do parasito, um complexo de enzimas proteolíticas que degradam proteínas danificadas ou desnecessárias no citoplasma da célula. Entretanto, a própria di-hidroartemisinina simultaneamente inibe o proteossoma, resultando no acúmulo de proteínas danificadas no citoplasma do parasito, levando à sua morte (Bridgford et al., 2018).

Os derivados da artemisinina não são administrados isoladamente; sempre são combinados com esquizotocidas de eliminação lenta, como a mefloquina e a lumefantrina, sob a forma de ACTs. O objetivo é reduzir o risco de desenvolvimento de resistência. Na América do Sul, a malária *falciparum* não complicada é tratada com dois tipos de ACTs: as combinações arteméter-lumefantrina e artesunato-mefloquina. No primeiro caso, utilizam-se 2 a 4 mg/kg/dia de arteméter e 12 a 24 mg/kg/dia de lumefantrina, divididos em duas tomadas diárias, por 3 dias consecutivos; este também é o regime mais frequentemente utilizado na África Subsaariana. O tratamento com uma combinação de dose fixa de artesunato-mefloquina, altamente eficaz no Brasil (Ladeia-Andrade et al., 2016) e também utilizado na Ásia, baseia-se em faixas etárias. Administram-se um (crianças entre 6 e 11 anos, 18 a 29 kg) ou dois (pacientes com mais de 12 anos ou mais de 29 kg) comprimidos contendo 100 mg de artesunato e 200 mg de mefloquina por dia, por 3 dias. Formulações especiais (50 mg de artesunato e 100 mg de mefloquina) para menores de 6 anos de idade também são distribuídas pelo Ministério da Saúde. Crianças entre 6 e 11 meses de idade (5 a 8 kg) recebem um comprimido por dia, enquanto aquelas entre 1 e 5 anos de idade (9 a 17 kg) recebem dois comprimidos diários; em ambos os casos, o tratamento dura 3 dias. Administra-se também uma dose única de primaquina (0,25 mg/kg) como gametocitocida, com o objetivo de interromper a transmissão. Esquemas alternativos de tratamento são geralmente utilizados durante o primeiro trimestre de gestação; entretanto, esta é uma área com intensa investigação, em que novas diretrizes podem surgir no futuro próximo (D'Alessandro et al., 2018).

Nos casos de malária grave ou complicada, utilizam-se principalmente derivados da artemisinina e clindamicina para uso parenteral. O artesunato é administrado por via intravenosa, com uma dose de ataque de 2,4 mg/kg, seguida de duas doses de 1,2 mg/kg, 12 h e 24 h após a dose inicial. Posteriormente, mantém-se uma dose diária de 1,2 mg/kg de artesunato por 6 dias; quando o paciente puder deglutir, o tratamento pode ser completado com artesunato por via oral. A clindamicina é utilizada na dose de 20 mg/kg/dia, dividida em três infusões ao dia, durante 7 dias. Quando o paciente estiver em condições de deglutir, a dose diária pode ser administrada em comprimidos, por via oral. O quinino representa uma alternativa, disponível para uso intravenoso e oral.

Resistência aos antimaláricos

O desenvolvimento de novos medicamentos antimaláricos é um processo dispendioso e lento. Portanto, a emergência de parasitos resistentes a antimaláricos disponíveis para uso clínico gera intensa preocupação. Os plasmódios adquirem rapidamente resistência aos antimaláricos a que são expostos; *P. falciparum*, por exemplo, tornou-se amplamente resistente à cloroquina menos de duas décadas após a sua introdução. Os primeiros relatos convincentes de falha terapêutica, no início da década de 1960, provêm da América do Sul e do Sudeste Asiático; nas décadas seguintes, a resistência espalhou-se por todo o mundo, com exceção da América Central.

Mais recentemente, linhagens de *P. falciparum* desenvolveram resistência aos derivados da artemisinina. A situação é mais preocupante no Camboja, Laos, Mianmar, Tailândia e Vietnã, mas também já ocorreu um registro de resistência aos derivados de artemisinina na África (Lu et al., 2017). Nesse contexto, os medicamentos parceiros utilizados nos ACTs expõem-se a maior pressão seletiva, como se estivessem sendo utilizados isoladamente, o que facilita a emergência de resistência também a eles (Martin et al., 2018). No Camboja, nenhum ACT tem atualmente eficácia superior a 90%. Após a introdução do ACT mais recente, di-hidroartemisinina-piperquina, os parasitos locais desenvolveram resistência à piperquina. Os parasitos resistentes aos derivados da artemisinina geralmente apresentam mutações em um domínio (*propeller*) do gene *kelch 13*, que servem como um marcador molecular de resistência (Ariey et al., 2014), mas o mecanismo preciso de aquisição desse fenótipo permanece incerto. Não há atualmente, no entanto, evidência de resistência disseminada de *P. falciparum* aos derivados de artemisinina nas Américas e na África (Ménard; Dondorp, 2017).

Plasmodium vivax tornou-se amplamente resistente à cloroquina em diversas regiões do mundo, especialmente na Oceania e em algumas ilhas da Indonésia e no Timor-Leste. Há relatos de resistência adequadamente documentada em diversos outros países, mas a cloroquina mantém-se como o medicamento de escolha para o tratamento da malária *vivax*, exceto na Oceania e em alguns países do Sudeste Asiático (Price et al., 2014). Os ACTs são a alternativa disponível quando há resistência à cloroquina. Nas Américas, há resistência de *P. vivax* à cloroquina documentada em ensaios clínicos em localidades do Brasil, do Peru, da Colômbia e da Bolívia; no Brasil, há relatos de resistência nos estados do Amazonas e do Acre (Gonçalves et al., 2014; Ladeia-Andrade et al., 2019).

Vetores da malária

A malária humana é transmitida exclusivamente por mosquitos do gênero *Anopheles*, que também são capazes de transmitir a filariose linfática em certas regiões do mundo, em particular na África Ocidental (ver Capítulo 15, *As Filárias e as Filarioses*), bem como algumas arboviroses (p. ex., o vírus O'Nyong-Nyong). O gênero *Anopheles* pertence à ordem Diptera, família Culicidae. Os culicídeos, ou mosquitos, são o grupo de artrópodes com maior importância em saúde humana, uma vez que incluem vetores de doenças como malária, filarioses linfáticas e diversas arboviroses, como a febre do Nilo Ocidental, febre amarela, dengue, chikungunya e Zika. A família Culicidae está dividida em três subfamílias: Anophelinae,

Culicinae e Toxorhynchitinae. A subfamília Toxorhynchitinae não inclui espécies hematófagas; assim, não apresenta importância médica. Os mosquitos adultos desta família caracterizam-se por apresentarem a probóscida curvada sob a região ventral, e as larvas são predadoras de outras espécies de mosquitos, tendo assim interesse na luta biológica. As subfamílias Anophelinae e Culicinae compreendem todas as espécies de mosquitos vetores, uma vez que as fêmeas destes culicídeos são hematófagas. É possível diferenciar os mosquitos dessas subfamílias nas várias fases do seu ciclo de vida, por meio de características morfológicas e comportamentais (Figuras 3.9 e 3.10).

O gênero *Anopheles* pertence à subfamília Anophelinae e apresenta oito subgêneros, dos quais quatro incluem vetores de malária. São estes: *Anopheles*, que apresenta distribuição cosmopolita, contando com 185 espécies; *Cellia*, com 224 espécies e distribuição em regiões subtropicais e tropicais do Velho Mundo; *Nyssorhynchus*, com 40 espécies neotropicais; e *Kerteszia*, com 12 espécies também exclusivamente neotropicais. Não são conhecidos vetores de malária humana pertencentes aos subgêneros *Baimaia* (região Asiática, Tailândia/Mianmar), *Lophopodomys* (neotropical) e *Stethomyia* (neotropical) e *Christya* (África Subsaariana).

Tal como os demais culicídeos, os anofelinos são insetos holometabólicos, isto é, desenvolvem-se por meio de metamorfoses completas. Durante o seu ciclo vital, passam por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto – as três primeiras aquáticas e a última terrestre/aérea. Os ovos de *Anopheles* são oblongos e, em geral, apresentam flutuadores laterais preenchidos com ar. A oviposição de *Anopheles* ocorre à superfície da água, e uma fêmea pode depositar até 200 ovos por oviposição. Os biótopos larvares dos anofelinos são muito diversos; variam segundo a espécie ou mesmo entre populações da mesma espécie. Podem ser de natureza temporária (poças, charcos, pegadas) ou permanente (pântanos, arrozais, canais de irrigação, margens de rios), a maioria de água-doce e com pouca matéria orgânica.

Dos ovos eclodem as larvas, que apresentam uma cabeça distinta, um tórax largo e achatado e um abdome composto por 10 segmentos. Os primeiros sete segmentos são semelhantes. Os segmentos oito e nove são fundidos e têm um par de espiráculos (*i. e.*, aberturas respiratórias), e o segmento 10 apresenta apêndices designados por papilas anais. A larva passa por quatro estádios de desenvolvimento (L_1 a L_4), que correspondem a aumentos de tamanho, separados por mudas. No final do estado L_4 , a larva sofre uma metamorfose, originando a pupa, que apresenta uma forma em vírgula, com um cefalotórax alargado e um abdome com oito segmentos. É da pupa que vai emergir o adulto, após nova metamorfose.

No adulto, a cabeça conta com dois olhos compostos, duas antenas (plumosas nos machos e pilosas nas fêmeas), dois palpos maxilares e uma probóscida picadora-sugadora (Figura 3.10). A cabeça do mosquito, além de um marcado dimorfismo sexual, apresenta também características que permitem diferenciar as subfamílias Anophelinae e Culicinae (Figura 3.10). O tórax é composto por três segmentos pouco definidos – protórax, mesotórax e metatórax – cada um com um par de pernas. O mesotórax apresenta um par de asas, e o metatórax, um par de balanceiros (asas modificadas, também conhecidas como balancins ou halteres). Espiráculos pares estão presentes lateralmente no mesotórax e no metatórax. O abdome conta com oito segmentos semelhantes, e os dois segmentos terminais estão modificados para constituir a genitália masculina ou feminina.

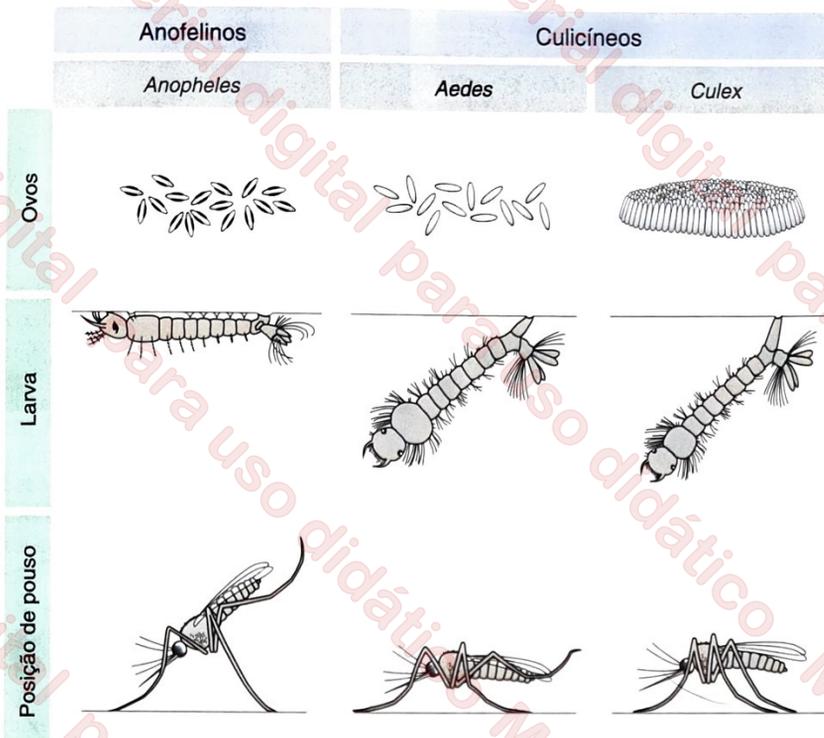


FIGURA 3.9 Principais características morfológicas para a distinção entre mosquitos anofelinos e culicíneos. Observe as diferenças nos ovos (que, nos anofelinos, têm flutuadores laterais), no modo como as larvas respiram (dependendo da presença ou ausência de sifão respiratório) e na posição de pouso dos insetos adultos.

Os machos emergem cerca de 24 horas antes das fêmeas e, nesse período, a genitália externa masculina sofre uma rotação de 180° de modo a ficar apta para a cópula. O acasalamento nos mosquitos anofelinos ocorre geralmente em enxames ao anoitecer. Os machos alimentam-se exclusivamente de néctares vegetais, e apenas as fêmeas se alimentam de sangue, cujas proteínas são necessárias à maturação dos ovos, em um processo que se designa por *ciclo gonotrófico*. Quando emergem, as fêmeas poderão acasalar de imediato ou procurar uma primeira refeição sanguínea, dependendo do seu estado nutricional pós-emergência, o que poderá implicar a realização de duas refeições sanguíneas para a conclusão do primeiro ciclo gonotrófico (Charlwood et al., 2003). Existem também algumas espécies que são autogênicas, isto é, conseguem maturar a primeira postura de ovos sem realizar uma refeição sanguínea. Após a primeira oviposição, as fêmeas entram em concordância gonotrófica, efetuando uma postura de ovos por cada refeição sanguínea.

A maioria das espécies de *Anopheles* alimenta-se, durante a noite, de animais de sangue quente, mamíferos em particular, designando-se por espécies antropofílicas quando se alimentam preferencialmente de hospedeiros humanos, ou zoofílicas no caso de se alimentarem majoritariamente em outros animais. Os estímulos que determinam a atração ao hospedeiro não estão completamente elucidados, mas incluem temperatura, umidade, dióxido de carbono, ácido láctico e odores específicos dos hospedeiros (McBride, 2016). Os anofelinos podem ainda ser designados por *endofágicos* ou *exofágicos*, consoante efetuem a refeição sanguínea no interior ou exterior das habitações. De igual modo, as espécies de *Anopheles* são consideradas *endofílicas* ou *exofílicas* se, respectivamente, repousarem no interior ou exterior das habitações durante a

maior parte do ciclo gonotrófico. Os comportamentos de picada e repouso são de importância epidemiológica, dado que as principais medidas de controle de vetores de malária baseadas em inseticidas (*i. e.*, mosquiteiros tratados com inseticida e borrifação com inseticida residual) são de aplicação intradomiciliar.

A longevidade dos anofelinos varia conforme a espécie e depende de fatores ambientais, umidade e temperatura em particular. Nas regiões tropicais, os anofelinos vivem em média 2 semanas, enquanto nas regiões temperadas sua sobrevivência tende a ser mais longa; em espécies que hibernam durante o inverno, as fêmeas podem viver durante meses. Também existem casos de estivação durante a estação seca no Saara (Huestis; Lehmann, 2014).

Das mais de 540 espécies conhecidas de anofelinos, somente cerca de 70 têm importância como vetores de malária. Entre os fatores que tornam um anofelino um bom vetor de malária humana encontra-se a suscetibilidade natural ao parasito, a preferência pelo sangue humano (*antropofilia*), a longevidade e a abundância em relação à população humana. Em áreas de simpatria, as espécies vetorais podem ser denominadas *primárias* ou *secundárias* de acordo com sua contribuição relativa na transmissão da malária. No entanto, como a capacidade vetorial pode variar geograficamente, uma espécie pode ser vetor primário em uma determinada região, mas ter pouca importância em outra.

Muitos anofelinos pertencem a *complexos* de espécies gêmeas, isto é, espécies morfológicamente indistintas porém reprodutivamente isoladas. Estas podem ocorrer em simpatria e sincronia, mas apresentar diferenciação genética, bioecológica e comportamental suficiente para diferirem na capacidade vetorial. A identificação correta dessas espécies torna-se,

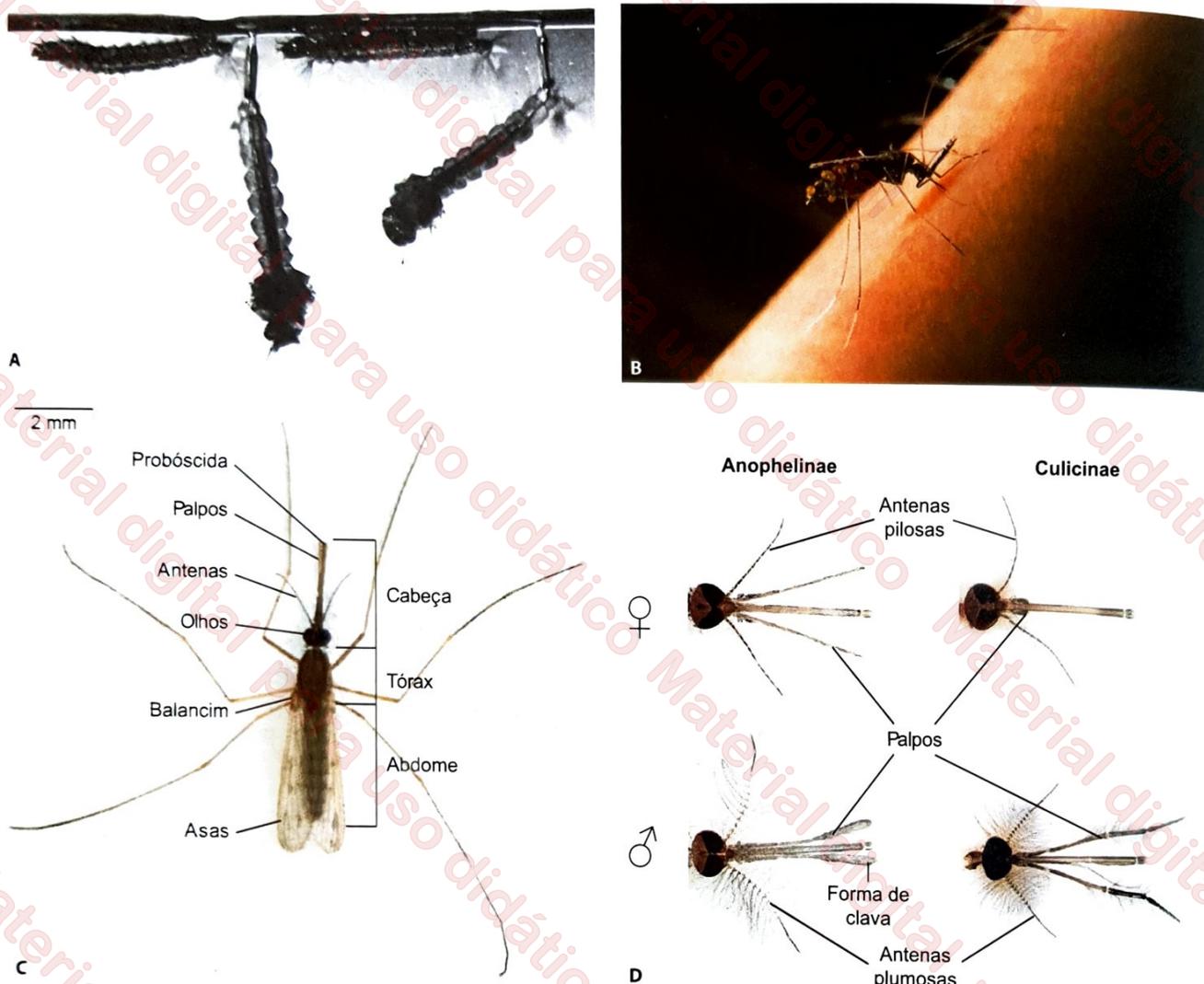


FIGURA 3.10 Características morfológicas para a distinção entre mosquitos anofelinos e culicíneos. **A.** Larvas de anofelino (sem sífão respiratório) e de culicíneo (com sífão respiratório) ao respirar na superfície da água. Fotografia de Cláudio Santos Ferreira. **B.** Posição de repouso de anofelino adulto. Fotografia de Guilherme Gomes. **C.** Morfologia geral de um mosquito (Diptera: Culicidae) adulto. **D.** Detalhe da cabeça de um mosquito, onde se destacam o dimorfismo sexual e as características morfológicas que possibilitam diferenciar as subfamílias Anophelinae e Culicinae. Fotografias de João Pinto.

assim, um requisito essencial para um melhor conhecimento da epidemiologia da malária em regiões onde ocorrem. Foi a descoberta do complexo *Anopheles maculipennis* na Europa que levou à resolução do paradoxo “anofelismo sem malária” na Europa em meados do século XX (Fantini, 1994). Na impossibilidade de se recorrer a caracteres morfológicos para a identificação inequívoca de espécies gêmeas, tem se recorrido a métodos alternativos baseados na análise de isoenzimas, citogenética e, mais recentemente, em ensaios moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase, que detectam polimorfismos genéticos específicos de espécie.

No Brasil, os vetores da malária pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* do gênero *Anopheles*. Três espécies do subgênero *Nyssorhynchus* são consideradas vetores primários da malária no Brasil: *An. darlingi*, *An. aquasalis* e *An. albipennis*. *Anopheles darlingi* é o principal vetor da malária no Brasil: existe em todo o território nacional, com exceção das regiões áridas do Nordeste e do extremo Sul do país. *Anopheles aquasalis* tem importância restrita a algumas áreas

litorâneas. Já *An. albipennis* é um complexo de espécies amplamente distribuído na América do Sul, com pelo menos oito espécies gêmeas que, em geral, apresentam elevada antropofilia. No Brasil, três membros do complexo foram implicados na transmissão de malária: *An. deaneorum*, *An. marajoara* e *An. janconnae*. No entanto, seu papel como vetores primários de malária permanece incerto. Dentre as espécies do subgênero *Kerteszia*, *An. cruzii* e *An. bellator* são reconhecidas como vetores primários em áreas residuais de Mata Atlântica, no litoral do Sudeste e do sul do país. Outros anofelinos são apontados como vetores secundários ou potenciais de malária na região Amazônica; essa lista inclui, entre outros, *An. braziliensis*, *An. nuneztovari*, *An. oswaldoi*, *An. triannulatus*, *An. strodei*, *An. evansae* e *An. galvaoi*.

Na África, a transmissão da malária é majoritariamente sustentada por membros do complexo *An. gambiae* e do grupo *An. funestus*. O complexo *An. gambiae* compreende oito espécies gêmeas que apresentam diferenças bioecológicas e de importâncias médica (Tabela 3.3). *Anopheles gambiae* e

An. arabiensis apresentam distribuição continental ao sul do deserto do Saara e são considerados os principais vetores de malária deste complexo. *Anopheles coluzzii* está presente em toda a África Ocidental, onde partilha extensas áreas de simpatria com as duas espécies anteriores. Esta espécie foi recentemente descrita (Coetzee et al., 2013), como resultado de mais de duas décadas de estudos genéticos que revelaram intrincados padrões de subestrutura populacional em *An. gambiae*. Apesar das evidências de isolamento reprodutivo entre *An. gambiae* e *An. coluzzii* em praticamente toda a sua distribuição, existe pelo menos uma zona de hibridação entre essas espécies, localizada no extremo ocidental da África (Vicente et al., 2017). A quebra do isolamento reprodutivo entre espécies gêmeas pode ter relevância epidemiológica, como terá sido o caso da introgressão genética em *An. coluzzii* de mutações associadas à resistência aos inseticidas que terão originalmente ocorrido em *An. gambiae* (Weill et al., 2000).

O complexo *An. gambiae* tem ainda duas espécies alopatricas com distribuição continental costeira, caracterizadas pela adaptação a biótopos larvares de água salobra: *An. melas* (África Ocidental) e *An. merus* (África Oriental). *Anopheles bwambae* é um vetor local de malária, descoberto na floresta Semliki do distrito de Bwamba, Uganda, associado a fontes geotermiais. *Anopheles quadriannulatus* apresenta uma distribuição esparsa e irregular, principalmente na África do Sul e na parte insular da Tanzânia (Pemba e Zanzibar). A oitava espécie do complexo, *An. amharicus*, foi descrita a partir de exemplares coletados na região de Jimma, Etiópia. As duas últimas espécies são zoofílicas, e por isso não são consideradas vetores de malária.

O grupo *An. funestus* é composto por pelo menos 11 espécies morfológicamente semelhantes. *Anopheles funestus*, *An. vaneedeni*, *An. parensis* e *An. aruni* são espécies morfológicamente similares em todas as fases do ciclo de vida, enquanto *An. confusus*, *An. rivulorum*, *An. brucei*, *An. fuscivenosus* e *An. leesoni* apresentam algumas diferenças morfológicas, em particular nas formas imaturas. Mais recentemente, foram incluídas neste grupo duas novas espécies ainda não formalmente designadas, descobertas a partir de achados realizados em Burquina Faso (*An. rivulorum*-símile) e no Maláui

(*An. funestus*-símile) (Coetzee; Koekemoer, 2013). Desses, apenas *An. funestus* é vetor principal de malária. Esse vetor está amplamente distribuído na África Subsaariana, tipicamente ocupando biótopos larvares permanentes e semipermanentes de alguma dimensão, tais como pântanos, lagoas e margens de lagos. É uma espécie altamente antropofílica, endofágica e endofílica. As espécies restantes são majoritariamente zoofílicas, e por isso não são consideradas vetores na maior parte da sua distribuição.

Para além dos membros do complexo *An. gambiae*, a malária na África é transmitida por outras espécies de vetores eficientes embora considerados secundários ou de importância local, entre os quais se destaca *An. moucheti*, em áreas de floresta, e os membros do complexo *An. nili*, em particular *An. carnevalei*, *An. ovengensis* e a espécie nominal *An. nili* (Sinka et al., 2010).

Prevenção e controle da malária

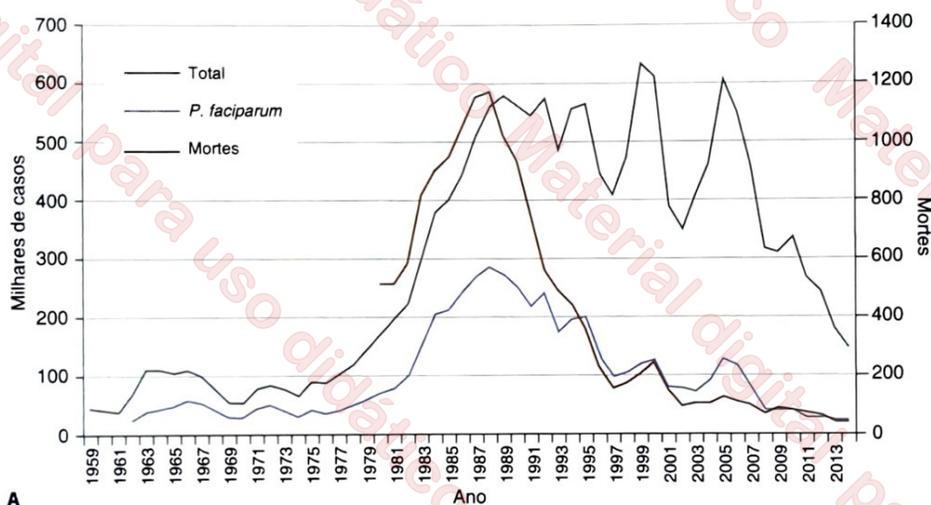
A Estratégia Técnica Global para a Malária 2016-2030, da Organização Mundial da Saúde (OMS), tem os seguintes pilares: (i) assegurar o acesso à prevenção, ao diagnóstico e ao tratamento; (ii) acelerar os esforços voltados à eliminação da malária; e (iii) tornar a vigilância da malária uma atividade central das políticas de saúde. Tem-se como objetivo reduzir a incidência global de malária em pelo menos 90% até 2030, com a sua completa eliminação em pelo menos 35 países onde atualmente ocorre transmissão. A eficiência dessa estratégia depende de características biológicas, ambientais e culturais que variam entre as regiões endêmicas. Entre os principais obstáculos para o controle da malária estão os grandes movimentos populacionais entre regiões não endêmicas e endêmicas e o desenvolvimento de resistência dos plasmódios aos antimaláricos disponíveis para uso clínico, bem como dos mosquitos anofelinos, vetores da malária, aos inseticidas de efeito residual habitualmente empregados. A experiência recente no Brasil ilustra esses desafios (Ferreira; Castro, 2016).

TABELA 3.3 Características bioecológicas gerais dos membros do complexo *Anopheles gambiae*.

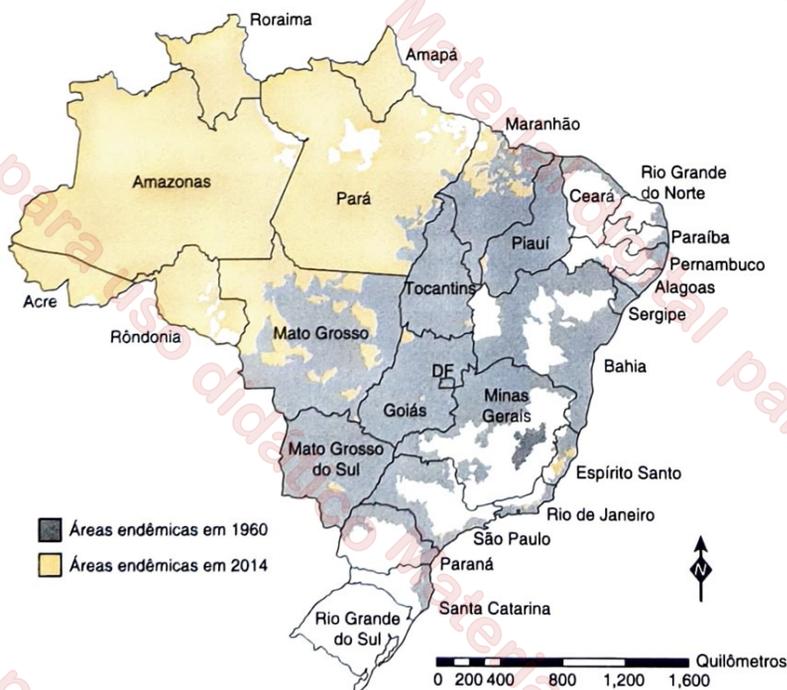
Espécie	Distribuição geográfica	Biótopo larvar típico	Habitat preferencial	Antropofilia (+ a +++)	Endofagia	Hábito de repouso
<i>An. gambiae</i>	Continental	Água doce, temporário	Savana úmida e floresta	+++++	Indiferente	Endofílico
<i>An. coluzzii</i>	África Ocidental	Água doce, semipermanente (arrozais)	Savana seca, savana úmida e floresta	+++++	Indiferente	Endofílico
<i>An. arabiensis</i>	Continental	Água doce, temporário	Savana seca, estepes	++++	Variável	Variável
<i>An. bwambae</i>	Bwamba, Uganda	Água doce, nascentes termais (33 a 36°C)	Floresta de Semliki	+++	Exofágico	Exofágico
<i>An. melas</i>	África Ocidental	Água salobra (manguezal)	Áreas costeiras, estuarinas e ribeirinhas	+++	Indiferente	Indiferente
<i>An. merus</i>	África Oriental	Água salobra (manguezal)	Áreas costeiras, estuarinas e ribeirinhas	++	Exofágico	Exofágico
<i>An. quadriannulatus</i>	Etiópia, ilhas de Zanzibar e Pemba e África Austral	Água doce, temporário	Regiões temperadas úmidas	- (zoofílico)	Exofágico	Exofágico
<i>An. amharicus</i>	Jimma, Etiópia	?	Regiões montanhosas (> 1.000 m)	- (zoofílico)	Exofágico	Endofílico

No início da década de 1940, a população de áreas com transmissão de malária no Brasil chegava a 40 milhões, distribuídos por quase todo o território nacional. A cada ano, estimava-se a ocorrência de 6 a 8 milhões de casos, com 80.000 mortes. Em 1958, iniciaram-se os esforços coordenados para a eliminação da malária em vastas porções do país. Até 1970, em resposta a esses esforços, observou-se no Brasil uma drástica redução na incidência de malária e, particularmente, na área do território brasileiro com transmissão ativa (Figura 3.11). Pouco mais de 50.000 casos de malária foram notificados em 1970, contrastando com os milhões de casos anuais registrados três décadas antes. Esse sucesso no controle da malária no Brasil deveu-se ao uso de um inseticida de ação residual, o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), para o combate dos vetores nos domicílios humanos, e ao diagnóstico e ao tratamento das infecções humanas, geralmente com a cloroquina. Por tratar-se de uma doença sem reservatório animal significativo, a malária humana tende a extinguir-se com

o tratamento maciço dos indivíduos portadores da infecção. A partir da década de 1970, no entanto, a intensa migração de indivíduos para a região Norte do país, atraídos pelos projetos de colonização agrícola da Amazônia, levou a um sério agravamento do quadro epidemiológico. Em meados da década de 1980, ainda que a transmissão de malária no Brasil continuasse virtualmente restrita à Amazônia, registravam-se 500.000 casos anuais de malária, com equilíbrio entre *P. falciparum* e *P. vivax*. Nas décadas de 1970 e 1980, houve também um grande aumento da mortalidade pela malária no Brasil, que coincide com a exposição de vastos contingentes de indivíduos não imunes a uma doença relativamente desconhecida. A incidência de malária vem sendo reduzida desde 2005 até 2016, ano em que se registraram 130.000 casos. Desde o início da década de 1990, *P. vivax* é a espécie predominante, hoje responsável por cerca de 88% dos casos registrados no país. Mais de 99% das infecções são adquiridas na Amazônia Legal (Figura 3.11).



A



B

FIGURA 3.11 A. Número anual de casos de malária registrados pelo Ministério da Saúde do Brasil entre 1960 e 2014. B. Áreas de transmissão de malária no Brasil em 1960 e em 2014. Adaptada de Ferreira; Castro, 2016.

Outro desafio enfrentado pelo programa de controle no Brasil são os portadores de *infecções assintomáticas*, que formam um reservatório de infecção invisível ao sistema de saúde. Ao longo das duas últimas décadas, diversos estudos de coorte prospectiva revelaram a existência, em comunidades rurais amazônicas, de indivíduos que mantêm baixas parasitemias, muitas vezes não detectáveis pelas técnicas diagnósticas rotineiras, sem qualquer sintoma (Alves et al., 2002). Essas infecções subclínicas deixam de ser diagnosticadas quando as estratégias de busca de casos são restritas a indivíduos com febre e outros sintomas, e contribuem potencialmente para a manutenção da transmissão de malária. Em resposta a essa situação, diversas estratégias de *busca ativa* de indivíduos infectados, independentemente de sintomas, vêm sendo desenvolvidas e avaliadas quanto ao impacto.

As medidas de prevenção da malária podem ser aplicadas em diversos contextos. Há duas situações mais comuns: o viajante que permanecerá por um curto período de tempo em área endêmica e uma comunidade que vive em uma área de transmissão contínua. A Tabela 3.4 resume os princípios gerais da profilaxia da malária nesses dois contextos, o *individual* e o *coletivo*. Embora os alvos de intervenção sejam essencialmente os mesmos (combate ao vetor e ao parasito), a aplicabilidade de algumas medidas (como o uso de repelentes ou de quimioprofilaxia) depende da duração prevista para a exposição.

Os *mosquiteiros impregnados com inseticidas piretroides* estão entre as medidas de prevenção da malária mais eficazes, particularmente na África. Estima-se em 50% a redução média de incidência de malária, em diferentes contextos epidemiológicos, atribuível ao uso de mosquiteiros impregnados (Lengeler, 2004), com impacto significativo na mortalidade de crianças com menos de 5 anos de idade na África Subsaariana. O impacto dos mosquiteiros depende de vários fatores: (i) as características comportamentais dos mosquitos (aqueles que picam no interior das habitações humanas, preferencialmente à noite, são os mais afetados), (ii) a eficácia do inseticida utilizado (a resistência aos piretroides tem se disseminado em praticamente todas as áreas endêmicas de malária), (iii) a

disponibilidade de mosquiteiros para todos os indivíduos expostos (na África, somente 43% dos domicílios têm mosquiteiros para todos os seus ocupantes), e (IV) o seu uso efetivo pelo indivíduo exposto (na África, somente 54% dos indivíduos dormem sob mosquiteiros impregnados com inseticidas). No Brasil, onde a distribuição de mosquiteiros impregnados com inseticidas prioriza as localidades com maior transmissão, estima-se que somente 3% da população da Amazônia Legal os utilize regularmente.

O uso do DDT como inseticida de ação residual, em ciclos semestrais de *borrifação intradomiciliar*, foi uma das medidas básicas que possibilitaram o controle da malária em boa parte do mundo, a partir do lançamento do Programa Global de Erradicação da Malária lançado pela OMS em 1955. No Brasil, a borrifação com DDT, iniciada em pequena escala em 1947, foi amplamente utilizada nas décadas de 1960 e 1970, e foi gradativamente abandonada ao longo da década de 1980, inicialmente por dificuldades operacionais (Ferreira; Castro, 2016). Mais recentemente, alguns países baniram o uso do DDT em saúde pública, incluindo o Brasil (1998), ainda que a OMS continue endossando seu uso no controle da malária (Attaran; Maharaj, 2000; Liroff, 2000). Os inseticidas alternativos ao DDT, como os piretroides, são de alto custo, têm menor ação residual e selecionam rapidamente mosquitos resistentes. Outras opções para uso em borrifação domiciliar são os carbamatos e os organofosforados. Atualmente, menos de 2% dos indivíduos que habitam áreas de risco de malária nas Américas têm seus domicílios borrifados regularmente; na África, a proporção chega a quase 5% (WHO, 2019). Em geral, a borrifação domiciliar restringe-se a situações de epidemia; são tratados seletivamente os domicílios de pacientes com malária recente.

Há diversas outras medidas de controle vetorial aplicáveis a contextos epidemiológicos específicos. Os *larvicidas*, por exemplo, têm papel no controle da malária em comunidades onde os criadouros de anofelinos são bem conhecidos e acessíveis, em geral em áreas urbanas e periurbanas. Atualmente, utilizam-se larvicidas biológicos ou *biolarvicidas*, que matam seletivamente as formas imaturas aquáticas de mosquitos sem afetar a qualidade da água para consumo humano. Os biolarvicidas mais utilizados são formulações em grânulos ou micropartículas que contêm as toxinas de *Lysinibacillus sphaericus* ou *Bacillus thuringiensis israelensis*, que devem ser aplicados a intervalos de 3 a 4 semanas. Predadores naturais de larvas de mosquitos, como os *peixes larvívoros*, constituem outra alternativa para o controle biológico de vetores.

A *quimioprofilaxia* geralmente não é indicada para indivíduos que vão expor-se à malária por curtos períodos na Amazônia brasileira, na falta de um medicamento de alta eficácia e isento de efeitos colaterais potencialmente graves. No entanto, os viajantes que se dirigem a áreas rurais da África e do Sudeste Asiático, por exemplo, devem procurar orientação em serviços especializados, que levará em conta o risco de adquirir malária de acordo com o estilo de viagem e as destinações previstas, bem como o perfil de resistência dos parasitos locais aos fármacos disponíveis. Entre as opções, podem ser mencionadas cloroquina, mefloquina, doxiciclina, primaquina, azitromicina e a combinação de atovaquona e proguanil.

Na África, utilizam-se esquemas quimioprofiláticos em grupos de risco mais vulneráveis, como gestantes e crianças (WHO, 2015). Em gestantes, essa estratégia é conhecida como tratamento intermitente preventivo na gravidez (IPTp, do inglês *intermittent preventive treatment in pregnancy*). Em sua

TABELA 3.4 Medidas profiláticas contra a malária.

- Medidas de proteção individual
 - Prevenção do contato com o vetor: uso de mosquiteiros (preferencialmente impregnados com inseticidas piretroides), de repelentes e de telas nas janelas e portas dos domicílios
 - Combate aos mosquitos adultos: uso de inseticidas domésticos
 - Combate às formas aquáticas dos vetores: saneamento do peridomicílio
 - Medidas contra o parasito: diagnóstico e tratamento precoces; quimioprofilaxia, quando indicada
 - Educação sanitária
- Medidas de proteção coletiva
 - Prevenção do contato com o vetor: escolha de locais adequados para a construção das casas, proteção dos domicílios contra a entrada dos mosquitos (telas) e uso de mosquiteiros
 - Combate aos insetos adultos: uso de inseticidas de efeito residual nos domicílios e de nebulização espacial
 - Combate às formas aquáticas dos vetores: saneamento de criadouros, uso de larvicidas, controle biológico das larvas
 - Medidas contra o parasito: diagnóstico e tratamento precoces; quimioprofilaxia seletiva
 - Educação sanitária: treinamento de agentes comunitários de saúde no diagnóstico e tratamento da malária.

modalidade mais comum, utiliza-se a sulfadoxina-pirimetamina. O objetivo é fornecer pelo menos três doses da combinação sulfadoxina-pirimetamina a todas as gestantes durante as consultas rotineiras de pré-natal. A primeira dose é administrada no segundo semestre, e as demais são fornecidas com intervalos de 1 mês. A controvérsia em torno dessa estratégia vem do fato de usar-se um medicamento que perdeu progressivamente parte de sua eficácia, em função do desenvolvimento de resistência por *P. falciparum*. Na África, cerca de 19% das gestantes elegíveis recebem atualmente pelo menos três doses de sulfadoxina-pirimetamina no contexto de IPTp; 56% delas receberam pelo menos uma dose. A medida tem impacto documentado na incidência de anemia materna e de baixo peso ao nascer, com redução significativa da mortalidade perinatal. No Brasil, a IPTp não é utilizada, mas o Ministério da Saúde preconiza que todas as gestantes que morem em áreas endêmicas de malária sejam submetidas a triagem diagnóstica, por microscopia ou teste diagnóstico rápido, em cada consulta de pré-natal; o tratamento das infecções deve ser feito independentemente de haver sintomas.

Nas áreas de média e alta transmissão da África em que a combinação sulfadoxina-pirimetamina mantém-se eficaz, preconiza-se seu uso em outra modalidade de tratamento intermitente preventivo, direcionado a crianças com idade inferior a 1 ano (*intermittent preventive treatment in infants*, IPTi). São oferecidas duas doses do medicamento, durante as vacinações rotineiras contra difteria-coqueluxe-tétano (DPT) e sarampo.

Em áreas endêmicas de malária, a transfusão de hemoderivados é uma modalidade de transmissão plausível, mas raramente diagnosticada de maneira correta. Na Amazônia brasileira, preconiza-se que os hemocentros usem exames microscópicos, como o exame de gota espessa, para excluir portadores de infecções assintomáticas. Em áreas endêmicas, são excluídos, durante a entrevista, os candidatos a doador com história de malária nos últimos 12 meses ou de febre nos últimos 30 dias, bem como aqueles provenientes de áreas com incidência superior a 50 casos anuais de malária por 1.000 habitantes. Em áreas não endêmicas, excluem-se doadores que relatam viagem a áreas endêmicas há menos de 30 dias (caso seja possível examinar uma amostra sanguínea do doador para o diagnóstico de malária) ou 12 meses (na ausência de teste diagnóstico), bem como aqueles que referem ter tido uma ou mais infecções prévias por *P. malariae* (Brasil, 2016).

A vacinação proporcionaria um meio adicional de controle da malária. O uso de uma vacina de baixo custo, segura, eficaz e fácil de administrar, destinada a populações continuamente expostas ao risco de infecção em áreas endêmicas, pode tornar-se uma medida com grande impacto em saúde pública. Por outro lado, uma vacina mais cara e complexa, que proporcione proteção parcial e por tempo limitado, pode ainda ser útil para viajantes que serão expostos ao risco por curtos períodos. Entretanto, cinco décadas de intensa pesquisa de vacinas contra a malária e numerosos ensaios pré-clínicos e clínicos de diferentes protótipos não resultaram em um produto disponível para uso em larga escala.

PARASITOLOGIA EM FOCO

Vacinas antimaláricas direcionadas a estágios hepáticos e sanguíneos dos plasmódios

A obtenção de uma vacina antimalárica segura e eficaz para uso em humanos tem, há longos anos, motivado estudos ao redor do mundo. No entanto, vários fatores, incluindo a complexidade biológica dos parasitos, têm contribuído para o insucesso dos protótipos testados até o momento. Especificamente, as vacinas antimaláricas podem ser direcionadas ao estágio pré-eritrocitário, ao estágio eritrocitário e às formas sexuadas (vacinas bloqueadoras da transmissão) dos parasitos. A seguir, discutiremos alguns resultados relevantes obtidos com os dois primeiros modelos.

As vacinas contra os estágios pré-eritrocitários podem agir de duas maneiras distintas: (1) induzindo, com a ativação de linfócitos B, a produção de anticorpos neutralizantes que impediriam a interação entre esporozoítos e hepatócitos e (2) induzindo respostas de células T CD4+ e CD8+ contra os estágios intra-hepáticos do parasito. Nesta fase do ciclo de vida, o número de parasitos a serem eliminados é pequeno, certamente abaixo de uma centena. A vantagem de uma vacina eficaz contra parasitos intra-hepáticos é o bloqueio da infecção antes da ocorrência de manifestações clínicas decorrentes do ciclo sanguíneo do parasito.

A primeira evidência sobre a viabilidade de uma vacina contra os estágios pré-eritrocitários dos plasmódios data do final da década de 1960. Naquela época, a pesquisadora brasileira Ruth Nussenzweig demonstrou que camundongos imunizados com esporozoítos atenuados por irradiação, porém ainda vivos, eram protegidos contra o desafio subsequente com esporozoítos viáveis de *Plasmodium berghei*, um plasmódio de roedores (Nussenzweig et al., 1967). Parasitos mortos por irradiação, entretanto, não eram capazes de induzir imunidade protetora. Alguns anos depois, esses achados foram confirmados em voluntários humanos, que se tornaram protegidos contra o desafio experimental com esporozoítos de *P. falciparum*.

Os resultados animadores obtidos com esses estudos motivaram o desenvolvimento de várias outras estratégias de atenuação de parasitos com propósito vacinal. Dentre esses se destacam o uso de quimioatenuação e atenuação genética dos parasitos (Belnoue et al., 2004; Roestenberg et al., 2009). As imunizações com esporozoítos vivos seguidas de tratamento com medicações antimaláricas (quimioatenuação) (Belnoue et al., 2004; Raja et al., 2016; Raja et al., 2017) mostram-se mais eficientes na indução de imunidade do que o uso de esporozoítos atenuados por irradiação (Lyke et al., 2017; Mordmüller et al., 2017). Assim, especula-se que a quimioatenuação possibilite uma maior proliferação dos esporozoítos, transformando-se em esquizontes teciduais e liberando maiores quantidades de antígenos na corrente sanguínea. A consequência seria uma maior ativação do sistema imunológico em relação à verificada quando se utilizam esporozoítos atenuados por irradiação. Demonstrou-se recentemente que seres humanos desafiados com esporozoítos de *P. falciparum* e tratados desenvolvem imunidade capaz de protegê-los contra novo desafio por até 10 semanas após a 3ª dose da vacina (Mordmüller et al., 2017).

Embora o nível de proteção induzido com uso de esporozoítos atenuados seja animador (em torno de 100%), as limitações ao seu uso se devem ao fato de a proteção diminuir com o tempo e à dificuldade de obtenção de grande número de formas esporozoítas do parasito. Normalmente, o número de esporozoítos necessários para induzir imunidade é da ordem de $5,12 \times 10^4$ (Mordmüller et al., 2017) a 9×10^5 (Lyke et al., 2017); não é possível obtê-los por meio de cultivo *in vitro*, como ocorre para as formas sanguíneas de *P. falciparum*. O uso de parasitos quimioatenuados tem, ainda, outros obstáculos, entre os quais a necessidade de administração por via intravenosa. Além disso, não é descartada a possibilidade de reversão da quimioatenuação, o que possibilitaria o desenvolvimento da infecção nos indivíduos imunizados.

PARASITOLOGIA EM FOCO (continuação)

Uma forma de atenuação considerada mais segura para uso tem sido a atenuação genética, no qual genes específicos do parasito envolvidos no seu processo de desenvolvimento são deletados do genoma (Kreutzfeld et al., 2017). Já foi demonstrado, por exemplo, que o silenciamento dos genes UIS3 e UIS4, expressos na membrana do vacúolo parasitóforo de esporozoítos, e/ou sua completa deleção impede o desenvolvimento do plasmódio dentro dos hepatócitos de roedores (Mueller et al., 2005). Entretanto, os parasitos geneticamente modificados ainda podem escapar da atenuação genética, levando ao desenvolvimento do ciclo sanguíneo do parasito (Kumar et al., 2016). Nesse sentido, dois estudos clínicos utilizando dessa estratégia tiveram que ser suspensos devido ao surgimento de formas sanguíneas do parasito após os processos de imunização (Vaughan; Kappe, 2017). Em outro estudo pré-clínico, a atenuação dos esporozoítos de *P. falciparum* foi obtida com a deleção de três genes (p36-/p52-/sap1-), um modelo conhecido como PfGAP3 KO (Mikolajczak et al., 2014). Essa tripla atenuação inibiu o desenvolvimento dos parasitos durante a fase hepática, sendo considerado um modelo seguro para uso em humanos (Kublin et al., 2017).

Enquanto as vacinas com esporozoítos visam ao bloqueio da transmissão da malária, aquelas que utilizam formas sanguíneas assexuadas ou proteínas expressas pelos parasitos durante essa fase do ciclo são conhecidas como vacinas antidoença, pois seu objetivo é impedir ou amenizar os sintomas clínicos exibidos pelos indivíduos durante o desenvolvimento da infecção. Tais protótipos têm utilizado parasitos inteiros de fase sanguínea (vivos ou mortos) ou extrato proteico derivado da lise desses parasitos (Elliott et al., 2005; Pinzon-Charry et al., 2010; Pombo et al., 2002). Considerando-se as dificuldades no uso de parasitos inteiros vivos para indução de imunidade, como a possibilidade de escape da atenuação e o desenvolvimento da doença após as imunizações, o uso de parasitos inteiros, porém mortos por descongelamento e congelamento rápido ou ruptura de membrana também tem sido avaliado em ensaios de imunização antimalárica (Giddam et al., 2016; Pinzon-Charry et al., 2010; Zhu et al., 2016; Lu et al., 2017). Essa estratégia tem como principal vantagem a ampla exposição de diversos alvos antigênicos do parasito ao sistema imunológico do hospedeiro, fazendo com que haja um maior estímulo de resposta imune àquele parasito (Pinzon-Charry et al., 2010). Nesse sentido, demonstrou-se a eficácia do extrato proteico de parasitos de fase sanguínea, quando administrado com adjuvante, na ativação de células T CD4+ e T CD8+ mesmo quando utilizado em doses ultrabaixas (Pinzon-Charry et al., 2010; Lu et al., 2017). Esses estudos ainda demonstram que, além da imunidade celular, o uso de antígeno total também é capaz de estimular linfócitos B a produzirem anticorpos específicos que também contribuem para o controle da infecção (Lu et al., 2017). Atualmente, alguns estudos já visam ao desenvolvimento de novos meios de entrega do extrato do parasito ao sistema imunológico, como o uso de vesículas lipossomais, que são tão eficazes quanto o uso de adjuvante. Esse sistema de entrega, formado por uma membrana composta por uma camada dupla de lipídios, reduz a possibilidade de ocorrência de resposta contra antígenos próprios do hospedeiro, e é ainda considerado um sistema ideal para estimulação de células T (Giddam et al., 2016).

Apesar dos níveis de proteção animadores alcançados com o uso de parasitos inteiros de fase hepática ou sanguínea, as dificuldades na obtenção dos parasitos e/ou o risco de desenvolvimento da doença durante o processo de imunização impulsionam a busca de vacinas de subunidades – formulações contendo antígenos específicos bem definidos, sob a forma de proteínas recombinantes ou peptídios sintéticos. O protótipo vacinal RTS'S/ASO2A é o principal exemplo bem-sucedido de uma vacina de subunidade (baseada em uma molécula bem definida) contra os estágios pré-eritrocitários da malária. Composta pela proteína circunsporozoíta (região central repetitiva e a região C-terminal) de *P. falciparum* associada ao antígeno de superfície de vírus da hepatite B (HBV-Ag)

e ao adjuvante ASO2, esse protótipo gerou proteção em torno de 58% contra o desenvolvimento de malária grave ao final de 6 meses de seguimento (Alonso et al., 2004). Estudos sequenciais demonstraram que a vacina era capaz de conferir certo grau de proteção contra a malária clínica (em torno de 30%) por até 21 meses decorridos da imunização (Alonso et al., 2005). A hipótese formulada para explicar tal proteção é que, ao se induzir imunidade capaz de limitar o número de esporozoítos que alcançam o fígado, reduz-se o número de merozoítos que iniciam o ciclo eritrocitário. Consequentemente, a exposição prolongada do indivíduo a uma baixa carga parasitária possibilita a aquisição de imunidade contra a fase sanguínea da infecção (Guinovart et al., 2009), como proposto originalmente por Pombo et al. (2002).

Na tentativa de aumentar a imunogenicidade da RTS'S, o adjuvante ASO2 foi, subsequentemente, substituído pelo ASO1, o qual é baseado em lipossomos contendo a mesma quantidade de monofosfolipídio e QS21 que ASO2. A partir de estudos conduzidos em crianças e adultos imunizados com a RTS'S/ASO1, pode-se concluir que o protótipo é seguro, porém mais imunogênico quando comparado a RTS'S/ASO2 (Lell et al., 2009; Kester et al., 2009; Polhemus et al., 2009; Asante et al., 2011). Comercialmente produzida pela companhia farmacêutica multinacional britânica GlaxoSmithKline (GSK) sob o nome de Mosquirix, essa tornou-se a única vacina antimalárica aprovada para estudos clínicos de fase 4 a serem iniciados a partir de 2018 na África. Em janeiro de 2016, a Organização Mundial da Saúde recomendou pela primeira vez a implementação em larga escala de uma vacina antimalárica, a RTS'S/ASO1 (WHO, 2016). Contudo, os níveis de proteção induzidos pela RTS'S/ASO1 em sua fase 3 ainda são considerados baixos. Especificamente, 18 meses após administração de três doses da RTS'S, o número de casos graves da doença em crianças com os sintomas clínicos foi reduzido em 35 a 47% em crianças com idade de 5 a 17 meses e em 15 a 38% em crianças com idade de 6 a 12 semanas (RTS'S Clinical Trials Partnership, 2015). Portanto, ainda há espaço para busca de vacinas que tenham índices mais elevados de proteção.

Referências bibliográficas

- Alonso PL, Sacaral J, Aponte JJ et al. Efficacy of the RTS'S/ASO2A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;364:1411-20.
- Alonso PL, Sacaral J, Aponte JJ et al. Duration of protection with RTS'S/ASO2A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet*. 2005;366:2012-8.
- Asante KP, Abdulla S, Agnandji S et al. Safety and efficacy of the RTS'S/ASO1E candidate malaria vaccine given with expanded-programme-on-immunisation vaccines: 19-month follow-up of a randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2011;11:741-9.
- Belnoue E, Costa FTM, Frankenberg T et al. Protective T cell immunity against malaria liver stage after vaccination with live sporozoites under chloroquine treatment. *J Immunol*. 2004;172:2487-95.
- Elliott SR, Kuns RD, Good MF. Heterologous immunity in the absence of variant-specific antibodies after exposure to subpatent infection with blood-stage malaria. *Infect Immun*. 2005;73:2478-85.
- Giddam AK, Reiman JM, Zaman M et al. A semi-synthetic whole parasite vaccine designed to protect against blood stage malaria. *Acta Biomater*. 2016;44:295-303.
- Guinovart C, Aponte JJ, Sacaral J et al. Insights into long-lasting protection induced by RTS'S/ASO2A malaria vaccine: further results from a phase IIb trial in Mozambican children. *PLoS One*. 2009;4:e5165.
- Kester KE, Cummings JF, Ofori-Anyinam O et al. Randomized, double-blind, phase 2 trial of falciparum malaria vaccines RTS'S/ASO1B and RTS'S/ASO2A in malaria-naïve adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *J Infect Dis*. 2009;200:337-46.
- Kreutzfeld O, Müller K, Matuschewski K. Engineering of genetically arrested parasites (GAPs) for a precision malaria vaccine. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:1-13.

PARASITOLOGIA EM FOCO (continuação)

- Kublin JG, Mikolajczak SA, Sack BK et al. Complete attenuation of genetically engineered *Plasmodium falciparum* sporozoites in human subjects. *Sci Transl Med*. 2017;9:eaad9099.
- Kumar H, Sattler JM, Singer M et al. Protective efficacy and safety of liver stage attenuated malaria parasites. *Sci Rep*. 2016;6:e26824.
- Lell B, Agnandji S, Glasenapp IV et al. A randomized trial assessing the safety and immunogenicity of AS01 and AS02 adjuvanted RTS,S malaria vaccine candidates in children in Gabon. *PLoS One*. 2009;4: e7611.
- Lu X, Liu T, Zhu F, Chen L, Xu W. A whole-killed, blood-stage lysate vaccine protects against the malaria liver stage. *Parasite Immunol*. 2017;39:e12386.
- Lyke KE, Ishizuka AS, Berry AA et al. Attenuated PfSPZ vaccine induces strain-transcending T cells and durable protection against heterologous controlled human malaria infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114:2711-6.
- Mikolajczak SA, Lakshmanan V, Fishbaugh M et al. A next-generation genetically attenuated *Plasmodium falciparum* parasite created by triple gene deletion. *Mol Ther*. 2014;22:1707-5.
- Mordmüller B, Surat G, Lagler H et al. Sterile protection against human malaria by chemically attenuated PfSPZ vaccine. *Nature*. 2017;542:445-9.
- Mueller AK, Labaied M, Kappe SH, Matuschewski K. Genetically modified *Plasmodium* parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature*. 2005;433:164-7.
- Nussenzeig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*. 1967;216:160-2.
- Pinzon-Charry A, McPhun V, Kienle V et al. Low doses of killed parasite in CpG elicit vigorous CD4+ T cell responses against blood-stage malaria in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:2967-8.
- Polhemus ME, Remich SA, Ogutu BR et al. Evaluation of RTS,S/AS02A and RTS,S/AS01B in adults in a high malaria transmission area. *PLoS One*. 2009;4:e6465.
- Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M. Immunity to malaria after administration of ultralow doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet*. 2002;360:610-7.
- Raja AI, Cai Y, Reiman JM et al. Chemically attenuated blood-stage *Plasmodium yoelii* parasites induce long-lived and strain-transcending protection. *Infect Immun*. 2016;84:2274-8.
- Raja AI, Stanisic DJ, Good MF. Chemical attenuation in the development of a whole-organism malaria vaccine. *Infect Immun*. 2017;85:e00062-17.
- RTS,S Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet*. 2015;386:31-5.
- Vaughan AM, Kappe SH. Genetically attenuated malaria parasites as vaccines. *Exp Rev Vaccines*. 2017;16:765-7.
- World Health Organization, 2016. Malaria vaccine: WHO position paper – January 2016. *WER*. 2016;91:33-52.
- Zhu F, Liu T, Zhao C, Lu X, Zhang J, Xu W. Whole-killed blood-stage vaccine-induced immunity suppresses the development of malaria parasites in mosquitoes. *J Immunol*. 2017;198:300-7.
- Chitnis CE, Sharma A. Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Trends Parasitol*. 2008;24:29-34.
- Coetzee M, Koekemoer LL. Molecular systematics and insecticide resistance in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. *Annu Rev Entomol*. 2013;58:393-412.
- Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Torre AD, Coulibaly MB, Besansky NJ. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*. 2013;3619:246-74.
- Cowman AF, Tonkin CJ, Tham W-H, Duraisingh MT. The molecular basis of erythrocyte invasion by malaria parasites. *Cell Host Microbe*. 2017;22:232-45.
- Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors*. 2010;3:5.
- D'Alessandro U, Hill J, Tarning J et al. Treatment of uncomplicated and severe malaria during pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:e133-46.
- Deitsch KW, Dzikowski R. Variant gene expression and antigenic variation by malaria parasites. *Annu Rev Microbiol*. 2017;71:625-41.
- Fantini B. Anophelism without malaria: an ecological and epidemiological puzzle. *Parasitologia*. 1994;36:83-106.
- Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016;15:284.
- Fried M, Duffy PE. Malaria during pregnancy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7:a025551.
- Gonçalves LA, Cravo P, Ferreira MU. Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109:534-9.
- Gruszczyk J, Kanjee U, Chan L-J et al. Transferin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for *Plasmodium vivax*. *Science*. 2018;359:48-55.
- Hofmann NE, Gruenberg M, Nate E et al. Assessment of ultra-sensitive malaria diagnosis versus standard molecular diagnosis for malaria elimination: an in-depth molecular cross-sectional study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:1108-16.
- Huestis DL, Lehmann T. Ecophysiology of *Anopheles gambiae* s.l.: persistence in the Sahel. *Infect Genet Evol*. 2014;28:648-61.
- King CL, Michon P, Shakri AR et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:8363-8.
- Ladeia-Andrade S, de Melo GN, Souza-Lima RC et al. No clinical or molecular evidence of *Plasmodium falciparum* resistance to artesunate-mefloquine in Northwestern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95:148-54.
- Adams JH, Mueller I. The biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7:a025585.
- Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66:641-8.
- Amino R, Thiberge S, Martin B et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*. 2006;12:220-4.
- Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C et al. A molecular marker for artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014;505: 50-5.
- Attaran A, Maharaj R. DDT for malaria control should not be banned. *BMJ*. 2000;321:1403-5.
- Bardaji A, Martinez-Espinosa FE, Arévalo-Herrera M et al. Burden and impact of *Plasmodium vivax* in pregnancy: a multi-centre prospective observational study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11:e0005606.
- Bernabeu M, Smith JD. EPCR and malaria severity: the center of a perfect storm. *Trends Parasitol*. 2017;33:295-308.
- Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2020. Guia de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 76 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 158, 4 de fevereiro de 2016. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0158_04_02_2016.html. Acesso em: maio 2020.
- Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health*. 2017;5:e1038-46.
- Bridgford JL, Xie SC, Cobbold SA et al. Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nat Commun*. 2018;9:3801.
- Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA et al. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis*. 2010;202:638-47.
- Cavasini CE, Mattos LC, Couto AA et al. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101:1042-4.
- Charlwood JD, Pinto J, Sousa CA, Ferreira C, Petrarca V, Rosario VE. 'A mate or a meal'--pre-gravid behaviour of female *Anopheles gambiae* from the islands of São Tomé and Príncipe, West Africa. *Malar J*. 2003;2:9.

- Ladeira-Andrade S, Menezes MJ, Sousa TN et al. Monitoring the efficacy of chloroquine-primaquine therapy for uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria in the main transmission hot spot of Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63:e01965-18.
- Lalremruata A, Magris M, Vivas-Martínez S et al. Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine*. 2015; 2:1186-92.
- Lengeler C. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;2:CD000363.
- Liroff R. Commentary: Reduction and elimination of DDT should proceed slowly. *BMJ*. 2000;321:1404-5.
- Loy DE, Liu W, Li Y et al. Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Int J Parasitol*. 2017;47:87-97.
- Lu F, Culleton R, Zhang M et al. Emergence of indigenous artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. *New Engl J Med*. 2017;376:991-3.
- Martin RM, Shafik SH, Richards SN. Mechanisms of resistance to the partner drugs of artemisinin in the malaria parasite. *Curr Opin Pharmacol*. 2018;42:71-80.
- McBride CS. Genes and odors underlying the recent evolution of mosquito preference for humans. *Curr Biol*. 2016;26:R41-6.
- Ménard D, Dondorp A. Antimalarial drug resistance: a threat to malaria elimination. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7:a025619.
- Ménard D, Barnadas C, Bouchier C et al. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:5967-71.
- Neafsey DE, Volkman SK. Malaria genomics in the era of eradication. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7:a025544.
- Nicolette VC, Frischmann S, Barbosa S, King CL, Ferreira MU. Naturally acquired binding-inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein and clinical immunity to malaria in rural Amazonians. *J Infect Dis*. 2016;214:1539-46.
- Obaldia 3rd N, Meibalan E, Sá JM et al. Bone marrow is a major parasite reservoir in *Plasmodium vivax* infection. *mBio*. 2018;9:e00625-18.
- Parroche P, Lauw FN, Goutagny N et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:1919-24.
- Pincelli A, Neves PAR, Lourenço BH et al. The hidden burden of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy in the Amazon: an observational study in Northwestern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;99: 73-83.
- Price RN, Douglas NM, Anstey NM. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis*. 2009;22:430-5.
- Price RN, von Seidlein L, Valecha N, Nosten F, Baird JK, White NJ. Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014;14:982-91.
- Rodrigues PT, Valdivia HO, Oliveira TC et al. Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. *Sci Rep*. 2018; 8:1993.
- Rogerson SJ, Desai M, Mayor A, Sicuri E, Taylor SM, van Eijk AM. Burden, pathology, and costs of malaria in pregnancy: new developments for an old problem. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:e107-18.
- Sá MR. Studies of avian malaria and Brazil in the international scientific context (1907-1945). *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2011;18: 499-518.
- Shanks GD, White NJ. The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:900-6.
- Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:165-84.
- Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors*. 2010;3:117.
- Souza RM, Ataíde R, Dombrowski JG et al. Placental histopathological changes associated with *Plasmodium vivax* infection during pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2071.
- Sutherland CJ. Persistent parasitism: the adaptative biology of malariae and ovale malaria. *Trends Parasitol*. 2016;32:808-19.
- Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J Infect Dis*. 2010;201:1544-50.
- Tanabe K, Mita T, Jombart T et al. *Plasmodium falciparum* accompanied the human expansion out of Africa. *Curr Biol*. 2010;20:1283-9.
- Totino PR, Lopes SC. Insights into the cytoadherence phenomenon of *Plasmodium vivax*: the putative role of phosphatidylserine. *Front Immunol*. 2017;8:1148.
- Vicente JL, Clarkson CS, Caputo B et al. Massive introgression drives species radiation at the range limit of *Anopheles gambiae*. *Sci Rep*. 2017;7:46451.
- Wahlgren M, Goel S, Akhouri RR. Variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* and their roles in severe malaria. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15:479-91.
- Weill M, Chandre F, Brengues C et al. The kdr mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Mol Biol*. 2000;9:451-5.
- Wilson ML. Malaria rapid diagnostic tests. *Clin Infect Dis*. 2012;54: 1637-41.
- World Health Organization, 2015. Guidelines for the treatment of malaria. 3. ed. Geneva: World Health Organization, 2015. 316p.
- World Health Organization, 2019. World Malaria Report 2019. Geneva: World Health Organization, 2019. 232p.
- Yang AS, O'Neill MT, Jennison C et al. Cell transversal activity is important for *Plasmodium falciparum* liver infection in humanized mice. *Cell Rep*. 2017;18:3105-16.
- Zimmerman PA, Ferreira MU, Howes RE, Mercereau-Pujalon O. Red blood cell polymorphism and susceptibility to *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol*. 2013;81:27-76.

Leitura sugerida

- Ashley EA, Phyto AP, Woodrow CJ. Malaria. *Lancet*. 2018;391:1608-21.
- Cowman AE, Tonkin CJ, Tham W-H, Duraisingh MT. The molecular basis of erythrocyte invasion by malaria parasites. *Cell Host Microbe*. 2017;22:232-45.
- Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016;15:284.