

## PESQUISA DE ANTÍGENO CIRCULANTE NA MALÁRIA HUMANA \*

WILLIAM BARBOSA \*\* WILLIAM FERREIRA AIRES, OSWALDO CAE-  
TANO DE SOUZA, RAUL CHAVARRIA, GIOVANNI S. CYSNEIROS DE  
OLIVEIRA \*\*\*

---

### RESUMO

Os autores observaram a presença de antígenos circulantes de *P. falciparum* ou de *P. vivax* em 14 de 153 soros de pacientes com malária. A identificação destes casos permitiu grupá-los em portadores de malária por *P. vivax* aguda — não imune — 2 casos; pacientes com malária por *P. falciparum* 6 casos — 2 com alta parasitemia, 2 com parasitemia baixa e 2 apenas com gametócitos circulantes (cuja a fase de parasitemia não foi controlada por nós), e finalmente foram observados antígenos circulantes em pacientes com quadro clínico que configura o síndrome chamado de esplenomegalia tropical. Nos dois primeiros grupos, havia parasitas circulantes. Nos casos de esplenomegalia tropical não havia parasitas circulantes. Todos os pacientes tinham altos títulos de anticorpos fluorescentes para malária, usando-se como antígeno *P. falciparum*.

Acredita-se de valor à interpretação da fisiopatologia da esplenomegalia tropical o encontro do antígeno circulante.

---

### INTRODUÇÃO

A pesquisa de anticorpos “precipitantes” na malária foi feita, pela primeira vez, por Pewny (6) em 1918, que reportou uma reação

\* Trabalho do Instituto de Patologia Tropical (Parcialmente financiado por bolsa do Conselho Coordenador de Ensino e Pesquisa — C.C.E.P. da UFGO.

\*\* Diretor do Instituto de Patologia Tropical.

\*\*\* Auxiliares de Ensino do IPT.

de precipitinas positivas, fazendo agir soro de indivíduo infectado com antígeno extraído de coágulo de sangue parasitado por *P. falciparum*.

Em 1927 Taliaferro e cols. (9) e Taliaferro e Taliaferro em 1928 (8) demonstraram que o sistema de precipitinas na Malária humana funcionava como uma reação de grupo, isto é, havia reação cruzada com pacientes infectados, indiferentemente, por qualquer plasmodio humano testado.

Em 1941 Dulaney e House (4) não foram capazes de obter reação de precipitação quando os soros de indivíduos impaludados eram expostos à antígeno obtido de extrato de parasitos maláricos preparados de diferentes maneiras.

Anticorpos precipitantes, no decurso da malária aguda e mesmo dentre os pacientes de área endêmica, livres de parasitas, tem demonstrado o valor da imuno-difusão no estudo epidemiológico da doença.

Em 1939 Eaton (5) observou em macacos infectados por *P. knowlesi* a presença de antígenos livres em seu soro, o qual produziu o aparecimento de anticorpos fixadores de complemento, quando injetados em macacos sadios.

Desde os trabalhos iniciais, em Gambia, foi demonstrado que os soros de africanos adultos, aparentemente imunizados contra malária, reagiam com antígenos preparados a partir de trofozoitos extracelulares desintegrados de *P. falciparum*, fornecendo uma linha fraca de precipitação, enquanto que os mesmos soros reagiam violentamente, formando linha múltipla de precipitação, quando em presença de antígenos preparados a partir de esquizontes intra celulares desintegrados da mesma espécie de parasita. Os soros de controle de pacientes não imunizados, representantes dos diferentes grupos sanguíneos ABO não reagiam nem ao antígeno de esquizontes e nem ao antígeno de trofozoitos.

Mais recentemente Mac Gregor e cols. (7) comunicaram ao II Congresso Internacional de Parasitologia, em Washington, em setembro de 1970, o uso de testes de imuno-difusão em agar-gel para o estudo epidemiológico da imunidade na malária. Observaram, em 6.376 gambianos examinados, 91% com anticorpos precipitantes.

Segundo os autores, estes anticorpos são universalmente presentes no recém-nato e a prevalência diminui temporariamente depois, todavia após o sexto ano de vida, o teste de precipitinas é positivo em 95% dos examinados e seu padrão assemelha-se aos de anticorpos fluorescentes.

A presença de precipitinas pôde ser correlacionadas com índices séricos de IgG e IgM, mas, não com os de IgA e IgD da população observada.

Precipitinas estão associadas com altos índices de IgG em todas as idades e mais com a elevação de IgM dos cinco anos em diante.

Em 1966 Cox (2) verificou também a presença de antígenos circulantes em macacos na fase aguda da infecção.

Em 1968, Mc Gregor & cols. (7) observaram n'uma população do Oeste da África, em Gambia, a presença de antígenos circulantes em pacientes com alta parasitemia por *P. falciparum*. Posteriormente verificaram que esse antígeno era relativamente frequente na população acima de 6 anos daquela região. Observaram ainda que, esse antígeno era idêntico ao obtido de placenta humana altamente parasitados com esquizontes de *P. falciparum*.

Os antígenos de *P. falciparum* podem ser classificados em três grupos: lábil ao calor, resistente ao calor e estável.

O primeiro compreende dois sub-grupos: La e Lb; o grupo resistente (R) tem também dois grupos e o estável (S) cerca de 20; estes últimos são encontrados no soro de infecção malárica severa por *P. falciparum*.

Anticorpos, para o antígeno La, estão associados com IgG, cruzam facilmente a barreira placentária e são prevalentes em todas as idades.

Neste mesmo ano, em 1970, Wilson e Voller (12) referem-se ao encontro de antígeno (S) no soro de macaco sul americano "Aotus trivirgatus" infectado com *P. falciparum* num teste de imuno-difusão em gel, em que o anti-soro humano, de Gambia foi usado.

O antígeno (S) foi detectado no sangue durante o pique parasitêmico e anticorpos para este antígeno foram subsequentemente encontrados em soros de macacos que sobreviveram à infecção.

O "Aotus trivirgatus" foi infectado com cepa "Malay Camp" e o antígeno detectado foi, aparentemente idêntico a certos antígenos solúveis, presentes no soro de crianças gambienses agudamente infectados por *P. falciparum*.

Desde 1969, em trabalhos iniciais, observamos o aparecimento de reação da precipitina cruzada entre os soros de pacientes com malária.

A incapacidade de conseguirmos antígenos precipitantes extraídos dos parasitos, a partir do sangue de pacientes altamente infectados e preparados de variadas maneiras para comparação, nos impediram de confirmar estas observações iniciais.

Apesar de, neste sentido, não termos progredido, faltando ainda condições para obter o antígeno solúvel, capaz de funcionar na imuno-difusão a partir do parasita, resolvemos, baseados em dados estatísticos, já que a frequência das reações com os soros que contem o antígeno circulante anti-malárico contra imuno-soro de malária

(soro de pacientes com malária) é significativamente elevado, enquanto totalmente negativo contra soros de pacientes não imunes, trazer à luz agora nossas observações preliminares.

### MATERIAL E MÉTODOS

Soros de 153 pacientes com malária por *P. falciparum* ou *vivax*, em várias fases de infecção e de diversas formas clínicas foram usados.

A técnica de exame foi a dupla difusão em Ion-agar a 1% com azida sódica, segundo Outcherlony.

Em alguns soros repetimos a reação pela técnica de imunoeletro-difusão em acetato de celulose. Paralelamente a isto, todos os soros que demonstraram positividade ao teste de imunodifusão, agindo como antígeno, foram submetidos às seguintes reações: dosagem de proteínas totais pelo biureto, eletroferese em acetato de celulose, pesquisa de aglutinina heterófila, análise imunoeletroforética, dosagem de imunoglobulinas, bem como a pesquisa de anticorpos fluorescentes e pesquisa de antígeno e anticorpo Austrália (Au e anti-Au).

O padrão de imunoglobulinas se baseou na determinação de 80 soros normais de doadores de sangue — cujo o "pool" forneceu como termo médio: 1.000 mg para IgG, 64 mg para IgM e 200 mg para IgA. As variações admitidas como normais foram para IgG de 600 a 1.600; IgM de 60 a 200 e IgA de 20 a 500 mg/100 ml.

Os soros com anticorpos, futuramente serão submetidos aos mesmos exames e serão motivo de comunicação posterior.

### RESULTADOS

Dentre os 153 soros testados, observamos em 14, a presença de antígenos precipitantes. Destes, quatro soros, os de n.º 1, 2, 3, e 4 deram reações contra todos os soros examinados. Os dez soros restantes reagiram contra 60 a 70% dos soros com que foram testados. As faixas de precipitação foram fracas e variaram em número de 1 a 3.

Os resultados do perfil eletroforético, dosagem de imunoglobulinas e demais exames, bem como a identificação a "posteriori" dos soros contendo antígenos circulantes, acham-se resumidos nas tabelas I, II, III e IV.

Ao analisar os casos com antígeno circulante, podemos grupá-los em três grupos:

Grupo A) — Pacientes com malária aguda, recaída de primoinfecção por *P. vivax*.

Constituído de dois casos (6 e 10), ambos com parasitemia média entre 10 a 50.000 trofozoitos/mm<sup>3</sup>. O caso de n.º 6 era

associado a esquistossomose mansônica: Os títulos de anticorpos imuno fluorescentes anti-maláricos foram respectivamente de 1/320 e 1/640 com antígeno de *P. falciparum*. A capacidade de detectar precipitinas observou-se em 60 e 70% respectivamente de soros imunes de pacientes com malária. O primeiro (soro n.º 6) dando uma faixa de precipitação e o segundo (soro 10) dando três faixas de precipitação.

TABELA I

ANTÍGENO CIRCULANTE NA MALÁRIA POR *P. vivax*  
I.P.T. — 71 — GRUPO A

N.º Soro	Exames I.F.	Pp		IMUNEGLOBULINA			Ant.** Het.
		Faixas	%	IgG	IgA	IgM	
6	1/320	1	60	2 800	70	85	0
10	1/640	3	70	1 500	210	400	1/7

\* — Percentagem de positividade

\*\* — Absorvido totalmente por H.B. e R.C.

Grupo B) — Pacientes com malária por *P. falciparum*. A este grupo pertencem seis casos (2 e 8, 12 e 13, 3 e 11), subdivididos em três sub-grupos:

Sub-grupo a) — pacientes com parasitemia alta (50.000 trofozoitos/mm<sup>3</sup>).

Dêste sub-grupo, fazem parte os casos 2 e 8, o primeiro de um paciente com intensa esquizogonia periférica (que morreu duas horas após a internação), o soro tinha título de 1/1.280 de anticorpos imuno fluorescentes (AF) para o antígeno específico e reagiu com uma faixa a imunodifusão contra todos os soros imunes com que foi testado; o outro tinha um título de anticorpos fluorescentes de 1/640 e dava uma faixa de precipitação contra 60% dos mesmos soros imunes do caso anterior.

Sub-grupo b) — pacientes com parasitemia baixa (10.000 trofozoitos/mm<sup>3</sup>):

Constituído também de dois casos (3 e 11), o primeiro deles estava associado a *S. mansoni*, tinha título AF 1/320, contra antígeno específico, dava duas faixas de precipitação contra 100% dos soros contra os quais era posto a reagir; segundo (caso 11), dava uma faixa de precipitação contra 60% dos soros imunes e tinha título de anticorpos fluorescentes 1/640.

Sub-grupo c) — pacientes que apresentavam apenas gametócitos no sangue circulante:

Constituído de dois soros (12 e 13), com títulos de AF respectivamente de 1/320 e 1/640, ambos reagiam com uma faixa de precipitação, contra 60 e 70%, respectivamente dos soros com que se fazia reagir.

TABELA II

ANTÍGENO CIRCULANTE NA MALÁRIA POR *P. falciparum*  
I.P.T. — 71 — GRUPO B

N.º Soro	Exames I.F.	Pp		IMUNEGLOBULINA			Ant. ** Het.
		Faixas	%*	IgG	IgA	IgM	
(Gametócitos)							
12	1/320	1	60	3 200	115	150	1/14
13	1/640	1	70	1.500	70	120	0
(Paras. alta)							
2	1/1280	1	100	620	105	120	0
8	1/640	1	60	2 800	85	120	1/14
(Paras. baixa)							
3	1/320	2	100	4 000	105	240	1/14
11	1/640	1	60	1 700	70	175	0

\* — Percentagem de positividade contra soros de malária

\*\* — Totalmente absorvidos por R.C. e H.B.

Grupo C) — Este grupo foi formado por quatro pacientes, soros 1, 4, 7 e 14, e se caracteriza pela ausência de parasitas no sangue circulante, exaustivamente procurado, todos tinham hepato-esplenomegalia, com esplenomegalia volumosa; eram de área endêmica de malária, com história de ataques repetidos e tinham na história atual, queixa de febre elevada.

O paciente 1, não tinha nenhuma parasitose associada. Apresentava síndrome de hipertensão portal — foi submetido a esplenectomia: A biópsia hepática revelou cirrose (tipo indeterminado).

O paciente 4, sem outra associação parasitária, manteve inalterada sua esplenomegalia de grau 4, com a terapêutica de corticoste-

róides e anti-maláricos e continua em observação no ambulatório, com o diagnóstico de síndrome de esplenomegalia tropical.

O paciente 7, com grande hepato-esplenomegalia teve biópsia de fígado com diagnóstico de hepatite crônica inespecífica e seu diagnóstico é de síndrome de esplenomegalia tropical.

O paciente 14 não apresentava qualquer infecção parasitária importante. Era possuidor de esplenomegalia e "fibrose" pulmonar. A lesão pulmonar evoluiu durante suas duas internações. Toracotomia exploradora revelou a presença de carcinoma de células alveolares. Continua em observação.

Todos os pacientes apresentavam títulos de anticorpos fluorescentes elevados, com antígeno de *P. falciparum*, respectivamente 1/320, 1/640, 1/640 e 1/320. Em dois dos pacientes (1 e 4) os soros continham antígeno contra 100% dos imune-soros de malária, dando uma e duas faixas de precipitação respectivamente, os dois outros soros dos pacientes (7 e 14) davam 70 e 60% de reação de precipitinas com os anti-soros contra os quais reagiam.

TABELA III

ANTÍGENO CIRCULANTE DE PLASMODIUM NA ESPLENOMEGALIA TROPICAL (sem parasitas presentes) — IPT — 1971

N.º Soro	Exames I.F.	Pp		IMUNEGLOBULINAS			Ant. ** Het.
		Faixas	%*	IgG	IgA	IgM	
1	1/320	1	100	1 500	140	250	0
4	1/640	2	100	3 200	155	1 042	0
7	1/640	1	70	3 200	155	400	0
14	1/320	1	60	4 000	200	290	1/28

\* — Percentagem de positividade contra soros de malária

\*\* — 50% absorvidos por R.C. e H.B.

Aglutininas heterófilas encontravam-se em títulos baixos nos grupos A,B,C: em 5 (cinco) soros com títulos variando de 1/7 a 1/28.

As imunoglobulinas IgG e IgM, apresentavam-se aumentadas nos soros 3, 4, 7 e 14 ou só uma dela IgG, soros 6, 8 e 12 ou IgM, nos soros 1 e 10.

A eletroforese em acetato de celulose demonstrou as seguintes características:

Além da hipo-albuminemia verificou-se a detecção de pré-albumina. Proteínas totais dentro da faixa da normalidade, apenas

TABELA IV

ELETROFORESE EM ACETATO DE CELULOSE DOS SOROS COM ANTÍGENO CIRCULANTE - IPT - 71

Soros N.º	P. To- tais	PRÉ ALBUMINA		ALBUMINA		GLOBULINAS							
		gr%	%	gr%	%	ALFA I		ALFA 2		BETA		GAMA	
						gr%	%	gr%	%	gr%	%	gr%	%
6	6,40	0,10	1,65	2,02	31,66	0,43	6,74	0,78	12,20	1,18	18,42	1,89	29,33
10	8,75	0,11	1,22	3,16	36,08	0,64	7,34	1,13	12,93	1,45	16,52	2,26	25,91
2	4,60	0,04	0,81	2,03	44,34	0,49	10,73	0,43	9,40	0,39	8,55	1,22	26,17
8	6,60	0,07	1,12	1,94	29,53	0,62	9,38	0,61	9,35	1,08	16,46	2,28	34,16
3	6,10	0,07	1,22	3,23	53,02	0,28	4,70	0,43	7,10	0,71	11,64	1,38	22,32
11	7,60	0,13	1,77	1,97	25,99	0,47	6,20	0,72	9,50	1,22	16,10	3,09	40,44
12	7,95	0,07	0,97	2,09	26,30	0,38	4,88	0,95	11,95	1,02	12,87	3,44	43,03
13	6,75	0,11	1,70	3,04	45,16	0,46	6,94	0,73	10,83	0,90	13,46	1,70	21,91
1	6,20	0,04	0,69	1,66	26,70	0,44	7,10	0,70	11,90	1,05	16,69	2,29	36,92
4	6,40	0,11	1,56	3,39	45,82	0,45	6,10	0,55	7,42	0,72	10,08	2,16	29,02
7	7,15	0,08	0,90	4,04	56,64	0,23	3,35	0,33	4,65	0,59	8,26	1,88	26,20
14	7,60	0,08	1,04	2,25	29,56	0,46	6,14	0,48	6,32	0,84	11,10	3,49	45,84

em um caso agudo, fatal, havia hipoproteinemia. Alfa 1 e Alfa 2 aumentado em alguns casos; Beta quase sempre aumentado e aumento de gama-globulina considerável em mais de 60% dos casos (Tabela IV).

Em um soro (4) havia um perfil eletroforético monoclonal.

## COMENTARIOS

Neste estudo preliminar sobre a pesquisa de antígenos circulantes em malária humana, podemos verificar a existência de antígenos, interpretados como específicos para malária, baseados no percentual de positividade contra imune-soros específicos, paralelamente aos dados clínicos, parasitológicos e imunológicos em 14 de 153 soros testados. Dois dos quais foram excluídos da análise por falta de prontuário.

Os resultados obtidos pela identificação dos soros contendo antígenos circulantes nos levam à suposição de que não só a malária por *P. falciparum* com elevada parasitemia, como até agora tinha sido demonstrado, Mc Gregor & cols. (7), Wilson & cols. (13), como também com baixa parasitemia (doentes não imunes, medicados com doses ineficazes de anti-maláricos) e mesmo no período de pós-parasitemia assexuada, em presença exclusiva de gametas, podem apresentar anticorpos circulantes.

Parece-nos, também em nossas observações ter ficado claro que os componentes de precipitinas produzidas pelos diferentes sistemas antígeno-anticorpo são relacionados a grupos de parasita e não específico a espécie, aliás, observação antiga de Taliaferro & col. (9) e Taliaferro e Taliaferro (8) em 1927 e 1928, já assim demonstrava. Dentre os soros com antígeno circulante, dois eram de pacientes com malária por *P. vivax*.

Achamos de grande interesse o fato insuspeitado de que pacientes com a chamada síndrome de esplenomegalia tropical, podem apresentar antígenos livres maláricos. Sabe-se da pretendida ilação entre este síndrome e a malária, em várias áreas do globo; correlação com anticorpos fluorescentes específicos e alterações proteicas tem sido apontada como demonstrativo desta conotação (1, 3, 10). Todavia os que argumentam contrariamente em face a qualquer outra patologia que, mesmo de longe justifique o síndrome, ou realmente possa ser uma co-causa, discutem a validade da presença de anticorpos imunofluorescentes específicos, de vez que eles podem permanecer por longo tempo na ausência de re-infecção. O achado de antígenos específicos livres, circulantes, parecem atestar uma "atividade" do parasita, ou demonstrar sua presença — o que dificilmente se consegue ao exame direto. Assim, quando presente outra patologia, a demonstração do antígeno circulante merece ser levado em conta na fisiopatologia deste quadro mórbido. Pensando assim,

achamos que esta observação abrirá nova senda na investigação da etiopatogenia da esplenomegalia tropical.

Os dados agora apresentados, longe de serem conclusivos, nos sugerem a continuar esta investigação que deverá ser partilhada por todos aqueles que tem interesse sobre o assunto.

#### SUMMARY

#### INVESTIGATIONS ON CIRCULATING ANTIGENS IN HUMAN MALARIA

The presence circulating antigens of *P. falciparum* or *P. vivax* was demonstrated in 14 out of 153 sera of patients with malaria. The identification of these permitted to group them into: carriers of acute non-immune *P. vivax* malaria — 2 cases; patients with *P. falciparum* malaria, 6 cases — 2 with high parasitemia, 2 with low parasitemia and 2 with circulating gametocytes only (whose stage of parasitemia was not controlled by us) and finally there were observed circulating antigens in patients presenting the clinical picture of tropical splenomegaly. In the first two groups there were circulating parasites. In the cases with tropical splenomegaly no circulating parasites were found. All patients showed high titers of fluorescent antimalarial antibodies, *P. falciparum* being used as antigen.

The finding of circulating antigen is believed to be of great importance in the interpretation of the physiopathology of tropical splenomegaly.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COWELL, E.J.; LEGTERS, L.J. & LIFE, E.H. Jr., — Splenomegaly and malaria in the central highlands of South Vietnam Am. J. Trop. Med. Hyg. 5: 741-746, 1970.
2. COX, H.W. — A factor Associated with Anemia and immunity in Plasmodium knowlesi infections. Milit. Med. 131:1195-1200, 1965/66.
3. CRANE, G.G. & PRYOR, D.S. — Malarial and the Tropical splenomegaly syndrome in New Guinea. Trans. R. Soc. Trop. Med. Med. Hyg. 65:315-324, 1971.
4. DULANEY, A.D.; HOUSE, V. — Precipitative Tests in Malaria Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 48:620-623, 1941.
5. EATON, M.D. — The soluble malarial antigen in the serum of monkeys infected with Plasmodium knowlesi. J. Exp. Med. 68:517-532, 1939.
6. PEWNY, W.W. — Wein Clin. Wschr, 91: 205, 1918 — Citado por 8.
7. MCGREGOR, I.A.; TURNER, M.W.; WILLIAM, K. & HALL, P. — Soluble antigens in the blood of African patients with severe. — Plasmodium falciparum malaria — Lancet, 27:881-884, 1968.
8. TALIAFERRO, W.H. & TALIAFERRO, L.G. — A precipitin test in malaria. J. Prev. Med. 2:147-167, 1928.
9. TALIAFERRO, W.H.; TALIAFERRO, L.G. & FISHER, A.B. — A precipitin test in malaria. J. Prev. Med. 1(5): 343-357, 1927.
10. WELLS, J.V. — SERUM immunoglobulins levels tropical splenomegaly syndrome in New Guinea. Clin. Exp. Immunol. 9: 943-951, 1968.

11. WILSON, R.J.U. — Antigens and antibodies associated with Plasmodium falciparum infections in west Africa. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 6:547-554, 1970.
12. WILSON, R. J. U. & VOLLER, A. — Malarial S — antigens from man and owl monkeys infected with Plasmodium falciparum. Parasit. 61:461-464, 1970.
13. WILSON, R. J. U.; MCGREGOR, I. A.; HALL, P.; WILLIAMS, K. & BARTHOLOMEW, R. — Antigens associated with Plasmodium falciparum infections in man, Lancet, 26:201-205, 1969.