ALESSANDRA SAMPAIO BASSI FRATUS

**Expressão e Reconhecimento Imune de
Alelos Conservados de Antígenos Variantes
de *Plasmodium falciparum***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação da Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2008

ALESSANDRA SAMPAIO BASSI FRATUS

**Expressão e Reconhecimento Imune de Alelos
Conservados de Antígenos Variantes de
*Plasmodium falciparum***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador:
Prof. Dr. Gerhard Wunderlich

São Paulo
2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Fratus, Alessandra.

Expressão e Reconhecimento Imune de Alelos Conservados de
Antígenos Variantes de *Plasmodium falciparum* / Alessandra Fratus.
-- São Paulo, 2008.

Orientador: Gerhard Wunderlich.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de
concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de
pesquisa: Biologia Molecular da Malária.

Versão do título para o inglês: Expression and Immune Recognition
of Conserved Alleles of *Plasmodium falciparum* Variant Antigens.

Descritores: 1. *Malária* 2. *Plasmodium falciparum* 3. Proteínas
recombinantes 4. Antígenos 5. Imunidade 6. Biologia Molecular I.
Wunderlich, Gerhard II. Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da
Relação Patógeno-Hospedeiro. III. Título.

ICB/SBIB145/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alessandra Fratus.

Título da Dissertação: Expressão e Reconhecimento Imune de Alelos
Conservados de Antígenos Variantes de *Plasmodium*
falciparum.

Orientador(a): Gerhard Wunderlich.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a 29 / 09 / 2008,

☒ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome: PROF. DR. FABIO TEINDADE MARANHÃO COSTA
Instituição: IB-UNICAMP

Examinador(a): Assinatura:
Nome: PROF. DR. MARCELO URBANO FERREIRA
Instituição: ICB-USP

Presidente: Assinatura:
Nome: GERHARD WUNDERLICH
Instituição: ICB-USP

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 38130900 - telefax: (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

Decl. CEP SH.061.08

DECLARAÇÃO

Em adendo ao parecer 742/CEP, de 13.09.06, informo que o título do Projeto foi alterado para ***"Expressão e reconhecimento imune de alelos conservados de antígenos variantes de Plasmodium falciparum"*** não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 14 de agosto de 2008.

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

*Ao meu pai Julio e minha mãe Angela,
Pelo 'tudo que me (trans) forma'
E que é impossível de se mensurar.*

*Aos meus irmãos Isabella e Gabriel,
Minhas fontes inspiração.*

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma participaram do meu processo de desenvolvimento profissional e pessoal durante este período e tornaram este trabalho possível.

Muito obrigada ao meu orientador, Professor Gerhard Wunderlich, pela oportunidade, confiança, e por ter enriquecido minha experiência com seu vasto conhecimento científico. Muito obrigada, Gerd!

Um agradecimento especial às amigas Letusa e Catarina, pela imensa ajuda e amizade. Muito obrigada às queridas colegas de laboratório, Fernanda, Márcia e Uta, por todas as discussões científicas, conversas e risadas. Aprendi muito com vocês. Ao técnico de laboratório, Wolf, muito obrigada.

Ao querido amigo e professor Arthur Gruber e às integrantes do laboratório 51, muito obrigada pela ajuda.

Aos professores, funcionários, estudantes e amigos do Departamento de Parasitologia.

Ao Professor Luiz Hildebrando Pereira da Silva e toda equipe do CEPEN de Rondônia, principalmente a Rosimeire Dalla Martha, pela hospitalidade e ajuda em Porto Velho.

A todos os doadores e coletores de sangue, anônimos e declarados.

À Sofia, pelo apoio incondicional, paciência e companheirismo em todos os momentos. Aos amigos Lopes, Fernanda, Mariana e Maria Estella, pelo incentivo e apoio.

À minha família: Angela, Júlio, Bell, Gabriel, vovó Dorinha, tia Giselle, Gabriella, Giovanna, vô Luiz, vó Amélia, Mariinha, que mesmo com a distância, sempre estavam próximos e foram os grandes incentivadores deste trabalho.

À Pagu, sem a qual, a vida seria mais sem graça.

MUITO OBRIGADA!

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

"A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original".

Albert Einstein

RESUMO

FRATUS, A. S. B. **Expressão e Reconhecimento Imune de Alelos Conservados de Antígenos Variantes de *Plasmodium falciparum***. 97 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.

Um importante fator de patogenicidade de *P. falciparum*, causador da malária, é a presença de antígenos altamente polimórficos, codificados por famílias multigênicas como *var* e *rif*. O grande polimorfismo destes genes em isolados de diferentes regiões contrasta com o fato de existirem, em diferentes isolados de campo brasileiros, alelos conservados. Respostas humorais contra estas proteínas são consideradas importantes na aquisição de proteção contra os sintomas da doença em regiões endêmicas. Portanto, medimos a resposta humoral contra antígenos recombinantes PfEMP1 e RIFIN e detectamos níveis baixos de resposta tanto em indivíduos sintomáticos quanto em indivíduos assintomáticos infectados pelo parasita. Estas respostas foram baixas quando comparadas às respostas contra MSP1₁₉ da superfície do merozoíta e parecem ser de curta duração. Com base nestes resultados, as respostas contra domínios DBL α , em situações hipoendêmicas, parecem ocorrer em função da presença do parasita circulante, e não são relacionadas à proteção contra os sintomas clínicos da doença.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium falciparum*. Proteínas recombinantes. Resposta humoral. PfEMP1.

ABSTRACT

FRATUS, A. S. B. **Recombinant Expression and immune recognition of conserved alleles of *Plasmodium falciparum* variant antigens.** 97 p. Master thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.

An important factor in the pathogenicity of *P. falciparum*, the causing agent of malaria is the expression of highly polymorphic antigens encoded by the multigene families *var* and *rif*. The extreme polymorphism of these genes in strains from different geographical regions is in contrast with the observation of a number of conserved alleles found in Amazonian isolates. The humoral response against these proteins is considered an important factor in the immunity against symptomatic infection in areas with high transmission. We measured the antibody response against recombinant PfEMP1 and RIFIN antigens and detected low responsiveness of symptomatic and asymptomatic malaria infected individuals. These responses were not only weak when compared to the anti-merozoite surface protein 1 response, but also ceased rapidly after the removal of circulating parasites. On the basis of these results, the response against DBL α seems to be dependent on the presence of parasites and not important for the observed protection against symptomatic infection in hypoendemic settings.

Key words: Malaria. *Plasmodium falciparum*. Recombinant proteins. Humoral responses. PfEMP1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i>	19
Figura 2. Mapa de risco de malária causada por <i>P. falciparum</i>	20
Figura 3. Mapas mostrando a distribuição da pobreza e de malária no mundo	21
Figura 4. Distribuição da malária no Brasil em 2006	22
Figura 5. Arquitetura de uma proteína PfEMP1 e seus domínios adesivos.....	25
Figura 6. Esquema das estruturas das famílias multigênicas <i>rif</i> e <i>stevor</i>	29
Figura 7. Resultados do teste de Solubilidade	46
Figura 8. Resultados da expressão em sistema de secreção de hemolisina A.....	47
Figura 9. Resultados da expressão de domínios DBL α freqüentes.....	48
Figura 10. Análise por SDS-Page da expressão de domínios DBL α raros.....	49
Figura 11. Análise por SDS-Page da expressão de proteínas RIFIN	49
Figura 12. Análise por SDS-Page da expressão de proteína STEVOR	50
Figura 13. Análise por SDS-Page da expressão com adição de DTT	51
Figura 14. Sororreatividade de indivíduos sintomáticos do Gabão (África).....	53
Figura 15. Sororreatividade de indivíduos primoinfectados por <i>P. falciparum</i>	54
Figura 16. Sororreatividade de sintomáticos com alta parasitemia	56
Figura 17. Sororreatividade de sintomáticos com baixa parasitemia.....	57
Figura 18. Sororreatividade de indivíduos assintomáticos	59
Figura 19. Comparações do reconhecimento de antígenos recombinantes.....	60
Figura 20. Médias dos Índices de Reatividades	61
Figura 21. Diferenças no perfil de reconhecimento de DBL α freqüentes	62
Figura 22. Diferenças no perfil de reconhecimento de DBL α raros	63
Figura 23. Diferenças no perfil de reconhecimento de proteínas RIFIN	64
Figura 24. Freqüências de reconhecimento de antígenos variantes	65
Figura 25. Perfis de cinética das respostas humorais	71
Figura 26. Análise da especificidade de oligonucleotídeos DBL α freqüentes	72
Figura 27. Resultados da amplificação dos grupos DBL α freqüentes	73
Figura 28. Alinhamento de amplicons DBL α freqüentes.....	75
Figura 29. Diferentes condições de cultura durante expressão heteróloga.....	78
Figura 30. Esquema do sistema de secreção da hemolisina A	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de sequências DBL α frequentes, raros, genes <i>rif</i> e genes <i>stevor</i> e seus respectivos números de acesso no GenBank.....	33
Tabela 2. Esquema do teste de solubilidade.	36
Tabela 3. Oligonucleotídeos para domínios DBL α frequentes.	42
Tabela 4. Estatística das respostas contra domínios DBL α frequentes baseada em testes t.	66
Tabela 5. Estatística das respostas contra domínios DBL α frequentes baseada em testes Qui-quadrado.	67
Tabela 6. Estatística das respostas contra domínios DBL α raros baseada em testes t..	68
Tabela 7. Estatística das respostas contra proteínas RIFIN baseada em testes t.....	69
Tabela 8. Estatística das respostas contra proteínas RIFIN baseada em testes Qui-quadrado.	69
Tabela 9. Frequências dos domínios DBL α conservados em gDNAs brasileiros, africanos e asiáticos.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	antes de Cristo
ATS	<i>acidic terminal segment</i>
CIDR	<i>Cysteine-rich interdomain region</i>
CSA	<i>Chondroitin sulfate A</i>
DBL	<i>Duffy binding like</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
gDNA	DNA genômico
GST	glutathione-S-adenosiltransferase
HlyA	hemolisina A
Ig	Imunoglobulina
IR	Índice de reatividade
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de base
PBS	<i>Phosphate-Buffered saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate-Buffered saline + Tween 20</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
RBM	<i>Roll Back Malaria Partnership</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SUCAM	Superintendência de Campanha de Saúde Pública
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TAE	Tampão Tris-acetato
VSA	<i>Variant surface antigens</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 HISTÓRIA DA MALÁRIA	17
1.2 O PARASITA E SEUS VETORES	18
1.3 CICLO DE VIDA DOS PARASITAS EM HUMANOS	18
1.4 SITUAÇÃO DA MALÁRIA NO MUNDO	20
1.5 A MALÁRIA NO BRASIL	21
1.6 IMUNIDADE E MALÁRIA	22
1.7 PROTEÍNAS PFEMP1 E GENES <i>VAR</i>	25
1.8 PROTEÍNAS RIFIN E GENES <i>RIF</i>	28
1.9 PROTEÍNAS STEVOR E GENES <i>STEVOR</i>	28
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 SEQÜÊNCIAS UTILIZADAS NO PROJETO	33
3.2 CLONAGEM DE DOMÍNIOS DBL α E GENES <i>RIF</i>	34
3.3 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	35
3.4 SISTEMA DE SECREÇÃO COM HEMOLISINA A	36
3.5 PROTOCOLO PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS EM SISTEMA BACTERIANO	38
3.6 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAS DE SORO/PLASMA UTILIZADAS	39
3.7 <i>IMMUNOBLOTTING</i>	40
3.8 REAÇÕES DE ELISA (ENZYME LINKED-IMMUNOSORBENT ASSAY)	40
3.9 TESTES ESTATÍSTICOS	42
3.10 AMPLIFICAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS DBL α FREQUENTEMENTE ENCONTRADAS EM ISOLADOS BRASILEIROS	42
4 RESULTADOS	44
4.1 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	45
4.2 SISTEMA DE EXPRESSÃO COM HEMOLISINA A	46
4.3 PRODUÇÃO DE DOMÍNIOS DBL α SOLÚVEIS	47
4.4 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RIFIN SOLÚVEIS	49
4.5 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS STEVOR RECOMBINANTES	50
4.6 ADIÇÃO DO AGENTE REDUTOR DTT (DITHIOTHREITOL) AO MEIO DE CULTURA DURANTE EXPRESSÃO	51
4.7 <i>ENZYME LINKED-IMMUNOSORBENT ASSAY</i> (ELISA)	51

4.7.1 Sororreatividade de Indivíduos Sintomáticos Africanos	52
4.7.2 Sororreatividade de Indivíduos Primoinfectados por <i>P. falciparum</i>	53
4.7.3 Sororreatividade de Indivíduos Sintomáticos	54
4.7.4 Sororreatividade de Indivíduos Assintomáticos	58
4.7.5 Sororeatividade de Indivíduos Saudáveis Residentes Em Área Endêmica	64
4.7.6 Cinética De Resposta de Anticorpos	70
4.8 AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIA DBL α FREQUENTES.....	72
5 DISCUSSÃO	76
5.1 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>P. FALCIPARUM</i> EM SISTEMA BACTERIANO	77
5.2 SISTEMA DE EXPRESSÃO COM HEMOLISINA A	80
5.3 AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DBL α FREQUENTEMENTE ENCONTRADAS EM ISOLADOS BRASILEIROS	81
5.4 RESPOSTA DE ANTICORPOS IGG CONTRA ANTÍGENOS VARIANTES DE <i>P. FALCIPARUM</i> ..	82
6 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA DA MALÁRIA

Chamada de '*Mal aria*', expressão italiana que significa ar ruim; paludismo, do latim pântano; impaludismo, aleita ou febres terçã e quartã, a história desta doença acompanha a história da humanidade possivelmente desde seu início na África, causando males às sociedades humanas e sendo, desde os primeiros relatos de seus sintomas clínicos, feitos por Hipócrates em 400 a.C., motivo de discussões e mistérios científicos, primeiro, e durante certo tempo, sobre sua causa e mecanismo de transmissão, depois, e ainda nos dias de hoje, sobre suas formas de controle e desenvolvimento de uma vacina eficaz.

Escritos chineses de 3000 a.C., tábuas cuneiformes mesopotâmicas de 2000 a.C., escrituras vedas na Índia de 1800 a.C.: Há relatos da doença por toda a história dos grandes impérios grego e romano. Nem figuras históricas como Petrarca, Dante Alighieri e Alexandre, o Grande, foram poupados da irredutibilidade e agressividade da malária. A guerra contra a doença se espalhou por todos os segmentos da Terra, com exceção de regiões polares e subpolares. No novo mundo, como não há qualquer relato maia, asteca ou inca sobre a doença, acredita-se que a malária foi trazida com a colonização de espanhóis e portugueses e com a vinda de escravos trazidos da África (SCHLAGENHAUF, 2004).

Até o fim do século passado acreditava-se que a malária era contraída pela aspiração de emanções de venenos e vapores venenosos de pântanos e alagadiços. Eram 3 as correntes de opinião: A doutrina climática, que atribuía a mudanças climáticas o papel de causadoras da malária; a doutrina telúrica ou miasmática, que culpava vapores venenosos pela doença e a doutrina parasitária, que considerava *animalículos invisíveis* como causadores deste mal (CAMARGO, 1995).

Em 1880, o médico francês Laveran, examinando detalhadamente o sangue de um indivíduo infectado, constatou que seus glóbulos vermelhos se rompiam e liberavam minúsculos organismos de forma filamentosa simulando pequenos flagelos. Era a descoberta do parasita da malária. Em 1897, o cientista Ronald Ross constatou, em aves, que o parasita responsável pela malária era transmitido através da picada de mosquitos. Um ano depois, pesquisadores italianos mostraram que os anofelinos eram os vetores responsáveis pela transmissão da doença em humanos.

Atualmente, a malária ainda representa um importante obstáculo no desenvolvimento social e econômico de diversos países, principalmente em áreas tropicais ou subtropicais do globo terrestre.

1.2 O PARASITA E SEUS VETORES

Plasmódios são protozoários que pertencem ao filo **Apicomplexa**, ordem **Coccidiida**, subordem **Haemosporidiidea**, família **Plasmodiidae** e gênero *Plasmodium*.

São parasitas de répteis, aves e mamíferos (primatas e roedores) e possuem formas variáveis de acordo com as fases de seu ciclo de vida. Quatro espécies de plasmódios podem infectar o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, sendo *P. falciparum* o grande responsável pela alta mortalidade associada à doença.

Os agentes transmissores da malária são os mosquitos fêmea da ordem **Díptera**, da família **Culicidae** e do gênero *Anopheles*.

No Brasil, o principal anofelino transmissor da malária humana é o *Anopheles darlingii*. Na África o principal vetor da malária é o *Anopheles gambiae*, que diferencia do vetor brasileiro por sua alta voracidade e antropofilia.

1.3 CICLO DE VIDA DOS PARASITAS EM HUMANOS

O ciclo de vida desse parasita é complexo, com reprodução assexuada (esquizogonia) no homem e sexuada no inseto vetor.

Após a picada do mosquito fêmea infectado, do gênero *Anopheles*, os esporozoítos móveis são inoculados na derme e atingem a corrente sanguínea do indivíduo. Estes esporozoítos são levados rapidamente para o fígado e lá invadem os hepatócitos, iniciando a fase hepática do ciclo do parasita. Após uma série de etapas de divisões assexuadas (esquizogonia) e diferenciação, os esquizontes hepáticos liberam os merozoítas na corrente sanguínea. A duração desta fase é espécie dependente; 6 dias no caso de *P. falciparum* e 8 dias no caso de *P. vivax*.

No caso de *P. vivax* e de *P. ovale*, podem ocorrer recaídas meses depois do primeiro ataque da doença, ou mesmo depois de tratamento eficaz. Estas recaídas se devem à presença das formas hipnozoítas, que permanecem latentes nas células do fígado.

Os merozoítas liberados invadem os eritrócitos, iniciando o ciclo intraeritrocítico.

Dentro dos eritrócitos, os parasitas se localizam dentro de um vacúolo parasitóforo, passando pelas etapas de anel (trofozoíta jovem), trofozoíta maduro e esquizonte. Estas etapas de diferenciação, crescimento e multiplicação dão origem a outros merozoítas.

Com o rompimento da hemácia infectada, estes merozoítas são liberados e invadem novos eritrócitos propagando o ciclo do parasita, e é durante esta etapa do desenvolvimento do parasita que aparecem, no hospedeiro, os sintomas característicos da malária. Porém, alguns merozoítas seguem um caminho alternativo de desenvolvimento, e formam os gametócitos masculinos e femininos, as formas transmissíveis para o mosquito.

Se ingeridos pelo mosquito susceptível durante o repasto sanguíneo, estes gametócitos originarão os gametas e o ciclo sexuado ou esporogônico.

Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*

A fêmea infectada do mosquito *Anopheles* inocula os esporozoítas no hospedeiro humano. Os esporozoítas infectam as células hepáticas iniciando a fase hepática da doença. Após esquizogonia eles se transformam em esquizontes hepáticos. Os merozoítas são liberados na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos (fase eritrocítica). Estes merozoítas se desenvolvem em estágio anel, trofozoíta e esquizonte. Com a ruptura das hemácias, há a liberação de novos merozoítas, que continuarão o ciclo eritrocítico. Alguns parasitas se diferenciam em gametócitos, que podem ser ingeridos pela fêmea do mosquito durante a alimentação iniciando a fase sexuada do ciclo que culmina na esporogonia.

1.4 SITUAÇÃO DA MALÁRIA NO MUNDO

A malária é endêmica em cerca de 100 países e territórios distribuídos pelas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006), colocando em risco 2,37 bilhões de pessoas, 35% da população mundial (GUERRA et al., 2008).

90% dos casos de malária ocorrem na África, e mais da metade destes casos acontecem em faixas de regiões onde há presença do vetor *Anopheles gambiae*. Uma em cinco mortes de crianças africanas é também de responsabilidade da doença. Anualmente provoca entre 330 e 660 milhões episódios clínicos (SNOW et al., 2005), e leva a óbito cerca de 1 milhão de indivíduos (WHO, 2006) em decorrência de complicações em órgãos vitais como o cérebro, rins e pulmões ou por anemia.

Figura 2. Mapa de risco de malária causada por *P. falciparum*
Indicação da incidência anual do parasita em 2007 (GUERRA et al., 2008).

A erradicação da malária em regiões economicamente desenvolvidas do globo como Estados Unidos e Europa, só reafirma a íntima ligação entre a doença e a pobreza. Considerada como causa e consequência da péssima situação econômica de diversos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, a doença causa, só ao continente africano, um prejuízo de cerca de 12 bilhões de dólares anuais, em custos diretos e indiretos e tem sido apontada como uma das principais barreiras no desenvolvimento econômico destas nações. Para economias em desenvolvimento, isso significa um abismo ainda maior entre as economias de países pobres e países ricos (RBM, 1999).

Figura 3. Mapas mostrando a distribuição da pobreza e de malária no mundo
 FONTE: RBM, 1999.

São diversos os fatores associados a atual situação da malária em áreas tropicais e subtropicais, como: resistência do parasita *P. falciparum* a drogas anti-maláricas, resistência dos anofelinos vetores a inseticidas, mudanças climáticas, mudanças ambientais provocadas pelo homem, crescimento populacional descontrolado em áreas endêmicas para malária, pouca iniciativa de países desenvolvidos na pesquisa de possíveis vacinas e novos alvos anti-maláricos e falta de campanhas educacionais de saúde pública.

1.5 A MALÁRIA NO BRASIL

No Brasil, 99,5% dos casos de malária ocorrem na Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão (fonte: Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, 2005).

Figura 4. Distribuição da malária no Brasil em 2006

FONTE: Sivep-Malária, Sinan/SVS/MS.

Em estimativa feita pelo Ministério da saúde em 2006, foram registrados 540.000 casos de malária. Valores estes, provavelmente subestimados, devido à grande área e conseqüente dificuldade de acesso à região Norte. Estes dados revelam que 73,4% das infecções são causadas por *P. vivax* e 24,9% por *P. falciparum*.

1.6 IMUNIDADE E MALÁRIA

Diferente da imunidade a infecções virais, geralmente adquirida após uma só infecção, e geralmente de longa duração, a imunidade adquirida à malária causada pelo *P. falciparum* é um processo bem mais complexo e ainda não compreendido, possivelmente dependente de fatores como: Frequência e intensidade de transmissão, idade, e tempo de exposição ao parasita (STRUICK et al., 2004).

A imunidade adquirida contra o parasita da malária parece depender tanto de mecanismos inatos quanto de mecanismos adquiridos, desenvolvidos através da adaptação do indivíduo à infecção precedente. Entretanto, estes mecanismos, apesar de capazes de limitar o pico de parasitemia no indivíduo infectado, prevenindo doença severa e reduzindo a carga de eritrócitos infectados circulantes, não são capazes de desenvolver uma imunidade estéril contra o parasita (STEVENSON et al., 2004).

Indivíduos adultos residentes em áreas endêmicas para malária podem se tornar assintomáticos através de exposição natural ao parasita. Ou seja, podem se tornar imune aos sintomas da doença e apresentar parasitemia baixa e persistente, freqüentemente abaixo do limite de detecção da microscopia, mas que pode persistir por meses e até mesmo anos.

A condição de assintomático parece estar ligada à necessidade de várias infecções até que a proteção clínica seja alcançada, e mesmo assim, quando o indivíduo se afasta de área endêmica por um período longo, a perda de imunidade adquirida é comum (STRUİK et al., 2004).

Tanto resposta imune humoral quanto celular estão envolvidas no processo de aquisição de imunidade contra malária, tendo como principais componentes: macrófagos, células natural killer (NK), células dendríticas, células $T\gamma\delta$, anticorpos, neutrófilos, linfócitos e monócitos (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2003).

Os anticorpos são as principais moléculas envolvidas na aquisição de imunidade contra antígenos sanguíneos da malária (MARSH et al., 2006). Eles são produzidos por linfócitos B ativados e sua atuação pode ser através de diversos mecanismos como bloqueio da transmissão do parasita, através do impedimento da invasão dos eritrócitos pelos merozoítas ou mesmo pela fagocitose do eritrócito infectado (BOUJAROUN-TAYOUN, 1995; O'DONNELL, 2001).

A ruptura dos eritrócitos infectados e a exposição de antígenos deste parasita ao sistema imune do hospedeiro é geralmente acompanhada por períodos de febre, náusea, cefaléia e outros sintomas, que caracterizam resposta sistêmica à liberação de citocinas pró-inflamatórias por células do próprio sistema imune do indivíduo (HEDDINI, 2002).

As formas específicas do parasita: estágios hepáticos, gametócitos, esporozoítos e principalmente estágios intraeritrocíticos, representam grupos de importantes antígenos-alvo para o sistema imune do hospedeiro. Anticorpos específicos contra vários destes antígenos têm sido relacionados como potenciais alvos para a criação de uma vacina ou mesmo para uma terapia alternativa contra a forma severa da malária (PLEASS et al., 2005).

Durante seu ciclo intraeritrocítico, o *P. falciparum* promove uma série de modificações nos eritrócitos infectados, como a expressão dos VSA (*variant surface antigens*), antígenos ligantes e variantes, na superfície da hemácia infectada. Estes antígenos apresentam repertórios muito variáveis entre cepas de parasitas diferentes em diversas regiões do mundo (GUPTA et al., 1994).

Estas proteínas ficam expostas na membrana do eritrócito e a aquisição de anticorpos contra um repertório variado de VSAs tem sido considerada componente importante para o desenvolvimento de imunidade ao *P. falciparum* (BULL et al., 2002; MARSH, 1992) .

Exemplo disso é desenvolvimento de imunidade à forma malária grave após um pequeno número de infecções mais rapidamente que a imunidade à forma moderada da doença, provavelmente devido à diversidade restrita dos antígenos responsáveis pelo quadro da forma grave da doença (GUPTA et al., 1999). Outro exemplo ligado à aparente restrição na diversidade antigênica é uma particularidade da malária placentária: Mulheres primigrávidas são particularmente susceptíveis a este tipo de malária. Susceptibilidade esta que diminui nas gestações subseqüentes, indicando uma baixa diversidade e alta especificidade dos antígenos, neste caso PfEMP1_{CSA}, dos parasitas presentes aderidos na placenta (BEESON et al., 2001).

Estudos têm sido feitos no intuito de caracterizar a resposta anti-VSA de indivíduos assintomáticos, infectados, mas sem sintomas clínicos, e tentar, correlacionar a condição de assintomático com respostas a um repertório de antígenos específicos tanto de cepas de laboratório quanto de isolados de campo (BULL et al., 1998; GIHA et al., 1999; HVIID et al., 2004; LUSINGU et al., 2006; STAALSO et al., 1998). Porém, estes estudos têm se concentrado nos continentes africano e asiático em regiões de alta transmissão de *Plasmodium*, e com poucos resultados para áreas com menor taxa de transmissão (hipoendêmicas) como encontrado no Brasil.

1.7 PROTEÍNAS PfEMP1 E GENES VAR

As PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1) são importantes proteínas variantes de alto peso molecular (200 – 400 KDa), presentes em estruturas elétron-densas (*knobs*) na membrana dos eritrócitos parasitados por *P. falciparum* (LEECH et al., 1984).

Estas proteínas são codificadas por genes da família *var*, presentes de 50 a 60 cópias no genoma haplóide (BARUCH et al., 1995); (SU et al., 1995), encontrados, em regiões subteloméricas e centrais da maioria dos 14 cromossomos do parasita *P. falciparum* da cepa 3D7 (GARDNER et al., 2002).

São codificadas por dois *exons*: O primeiro codificando uma porção extracelular, formada por domínios diferentes : DBL (Duffy binding like, tipos $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$), CIDRs (Cysteine rich interdomain, tipos α, β, γ) e C2 (constant 2), além de uma pequena região transmembrana (TM) e o segundo, codificando a porção C-terminal da proteína, formada pelo domínio citoplasmático ATS (*acidic terminal segment*) (KRAEMER et al., 2003). Além disso, todas as PfEMP1 apresentam em sua estrutura um domínio N-terminal (NTS) que apresenta um motivo conservado PEXEL, indicando que esta proteína é exportada para a membrana (MARTI et al., 2005); (HILLER et al., 2004).

A maioria das PfEMP1, que podem ser classificadas em 31 subtipos levando-se em conta o tipo de sua arquitetura em relação aos domínios DBL, CIDRs e C2, possui uma ‘*estrutura-cabeça*’ conservada, formada pelos domínios NTS, DBL1 α e CIDR α , sendo que na maioria destas proteínas pode-se observar a presença de domínios DBL1 α , com exceção do gene *var2csa* (GARDNER et al., 2002).

Figura 5. Arquitetura de uma proteína PfEMP1 e seus domínios adesivos
Adaptado de (CHEN, 2007).

Estas proteínas são responsáveis pelo fenômeno de citoaderência, observado como o seqüestro dos eritrócitos infectados da circulação periférica (MILLER et al., 1969). Elas são capazes de aderir a uma série de receptores endoteliais, acumulando-se na microvasculatura de órgãos vitais, provocando danos que podem causar desde doença severa até a morte do indivíduo infectado (revisado em (MILLER et al., 2002). Além disso, parecem ter um importante papel no desenvolvimento de uma resposta imunológica variante-específica no hospedeiro (MARSH et al., 1986), sendo consideradas importantes alvos da imunidade adquirida a malária (BULL et al., 1998; DEITSCH et al., 2004).

Além disso, também é amplamente conhecida a capacidade de ligação destas proteínas a eritrócitos não-infectados, levando à formação de rosetas (UDOMSANGPETCH et al., 1989), fenótipo este, comumente associado ao risco de doença grave. Mais recentemente, foi descoberto que alguns isolados de *P. falciparum* podem se ligar *in vitro* a células dendríticas, inibindo sua ativação e capacidade de apresentação de antígenos (URBAN et al., 1999). Outros tipos celulares também apresentaram ligação com estas proteínas ligantes e variantes, como plaquetas (OCKENHOUSE et al., 1991), monócitos, neutrófilos, linfócitos e componentes do plasma (RUANGJIRACHUPORN et al., 1992).

O controle da transcrição por exclusão alélica de genes *var* é particularmente interessante (SCHERF et al., 1998). Apenas uma PfEMP1 funcional é expressa por vez, podendo haver, de uma geração para a outra, após reinfecção, um *switching* da transcrição em uma parte dos parasitas, resultando na mudança do fenótipo antigênico em torno de 2,4% (ROBERTS et al., 1992), mudando assim o perfil antigênico expresso na superfície do eritrócito infectado, caracterizando o processo de evasão imune do hospedeiro.

Os genes *var*, e conseqüentemente seus antígenos resultantes são muito variáveis entre cepas diferentes: O repertório de genes *var* da cepa 3D7, por exemplo, compartilha muito poucos genes *var* com a cepa Dd2 (FOWLER et al., 2002). Ao mesmo tempo, a cepa Dd2 compartilha muito poucos genes *var* com a cepa HB3, o que indica que diferentes cepas de *P. falciparum* contêm repertórios completamente diferentes.

O aparente repertório global infinito de *var*-genótipos se origina de um mecanismo específico que promove a recombinação ectópica de genes localizados em região subtelomérica de cromossomos do *Plasmodium* (FREITAS-JUNIOR et al., 2000). No estudo citado, os autores especulam que também ocorreria recombinação ectópica durante as divisões mitóticas, o que levaria a uma instabilidade dos telômeros e dos genes *var* ali presentes. Porém, estudos em nosso laboratório mostraram que a redistribuição de genes *var* depois de múltiplos ciclos eritrocíticos aparentemente não ocorre ou ocorre em uma frequência pouco significativa (Castiñeiras, C., dados não publicados). Provavelmente, a recombinação ectópica ocorre somente em formas sexuais do parasita, e talvez esteja associada a processos meióticos.

Em outros estudos, foi descoberto que existem determinados genes *var* que são conservados em várias cepas (TUIKUE NDAM et al., 2005; WINTER et al., 2003), com destaque para o gene *var2csa*, cuja proteína (PfEMP1_{CSA}) está claramente associada a citoaderência de parasitas a Heparansulfato e condroitina sulfato presentes em sincitiotrofoblastos. O motivo porque estes genes são mais conservados reside, provavelmente, no fato da orientação deles ser inversa a orientação dos demais genes *var* subteloméricos (GARDNER et al., 2002) e uma limitada possibilidade de mudança estrutural sem perder sua funcionalidade.

Por outro lado, um estudo recente mostrou que na Amazônia brasileira e possivelmente em toda América do Sul, circulam cepas de *P. falciparum* com repertórios de genes *var* altamente redundantes (ALBRECHT et al., 2006), muito mais que em qualquer localidade até agora analisada, mesmo analisando isolados de regiões limitadas obtidas em um curto prazo de tempo (BARRY et al., 2007).

No Brasil, a redundância ocorre independente de tempo e localidade. Foram encontrados isolados de 1986 e 2004 que continham vários genes *var* compartilhados. Dentre os isolados analisados, foram identificadas várias seqüências parciais de genes *var* (domínios codificadores para DBL α), e de duas outras famílias multigênicas *rif* e *stevor* que foram encontrados na maioria dos isolados (ALBRECHT et al. manuscrito em preparação).

1.8 PROTEÍNAS RIFIN E GENES *RIF*

O genoma de *P. falciparum* (cepa 3D7) é formado por 23 milhões de pares de bases, organizados em 14 cromossomos (GARDNER et al., 2002). Foi constatado, que grande parte deste genoma é formada por famílias multigênicas, geralmente localizadas em regiões subteloméricas destes cromossomos (CHENG et al., 1998).

A família multigênica *rif* (*Repetitive Interspersed Family*) é considerada a maior família multigênica presente em *Plasmodium*, com 181 genes por genoma haplóide da cepa 3D7, sendo 163 cópias diferentes e funcionais (não pseudo-genes). Estes genes, diferente dos genes *var*, parecem ser simultaneamente expressos em trofozoítas e esquizontes, pelo menos alguns (PETTER et al., 2007). Porém, pouco se sabe sobre regulação destes genes.

Os genes *rif* codificam proteínas RIFIN de 60 KDa, expressas na superfície dos eritrócitos infectados ou no sistema secretor da hemácia infectada, os Maurer's clefts (PETTER et al., 2007).

Estas proteínas são capazes de induzir respostas imunes naturais e uma associação entre estas respostas e proteção contra a doença observada (ABDEL-LATIF et al., 2004; ABDEL-LATIF et al., 2003; ABDEL-LATIF et al., 2002).

1.9 PROTEÍNAS STEVOR E GENES *STEVOR*

Os genes *stevor* (*subtelomeric open reading frame*) codificam as proteínas STEVOR, e inicialmente, haviam sido descritos como parte da família multigênica *rif* devido à semelhança de suas seqüências (CHENG et al., 1998) e de fato são entendidas como membros da superfamília *rif* (JANSSEN et al., 2004). Porém, estas famílias, aparentemente, possuem funções diferentes.

Esta família multigênica é constituída de 30 variantes por genoma haplóide, número menor que o encontrado nas famílias *rif* e *var*. Além disso, as proteínas STEVOR, codificadas por estes genes são expressas em vários estágios do parasita, geralmente associadas aos Maurer's clefts (MCROBERT et al., 2004) e, também, na superfície dos gametócitos circulantes (SUTHERLAND, 2001).

Cada gene *stevor* codifica uma proteína de 30 - 40 KDa e, como os genes *rif* possuem uma estrutura com dois éxons, o primeiro com um *start códon* e uma seqüência sinal e o segundo com uma região altamente polimórfica entre dois domínios transmembrana (Figura 06).

Anticorpos contra proteínas STEVORs parecem não estar relacionados à proteção contra a doença (SCHREIBER et al., 2008).

Figura 6. Esquema das estruturas das famílias multigênicas *rif* e *stevor*

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Estudos recentes mostram, que, no Brasil, a situação da malária parece ser muito diferente da situação africana. Em conjunto com a observação que o repertório de genes variantes é menor no Brasil, nos perguntamos se haveria ou não o mesmo reconhecimento de alelos de antígenos variantes PfEMP1, RIFIN e STEVOR em populações com infecções assintomáticas (“protegidas”) e sintomáticas (“susceptíveis”) como em áreas endêmicas da África.

Portanto, os objetivos deste trabalho foram:

01. Determinar características de respostas imunológicas humorais de pacientes brasileiros residentes em área endêmica para malária contra antígenos recombinantes PfEMP1 (DBL α), RIFIN e STEVOR. Detectar se existem diferenças entre as respostas a proteínas recombinantes derivadas de seqüências DBL α conservadas e raramente encontradas em isolados amazônicos.
02. Verificar através de reações de PCR com oligonucleotídeos específicos para genes *var* “conservados” (DBL α), se eles de fato estão presentes nos genomas de isolados brasileiros, africanos e asiáticos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SEQÜÊNCIAS UTILIZADAS NO PROJETO

Para a realização deste projeto foram escolhidos domínios DBL α , genes *rif* e genes *stevor* freqüentemente e raramente encontrados em isolados de campo brasileiros. A escolha dos domínios DBL α foi baseada na análise feita com 52 isolados de campo brasileiros (Albrecht et al., manuscrito em preparação). Para genes *rif* e *stevor*, a análise foi baseada em 9 isolados de campo (ALBRECHT et al., 2006).

Foram escolhidas 11 seqüências DBL α freqüentes, encontradas em cerca de 16 isolados de campo (Tabela 1: V1-V11), 7 domínios DBL α raros, encontrados em apenas 1 isolado (Tabela 1: VRaro 1 – VRaro 7), 4 genes *rif*, 2 deles freqüentes, encontrados em cerca de 7 isolados e 4 genes *stevor*.

Tabela 1. Grupos de seqüências DBL α freqüentes, DBL α raros, genes *rif* e genes *stevor* e seus respectivos números de acesso no GenBank.

Grupo	Número de Acesso Gene Bank	Grupo	Número de Acesso Gene Bank
DBL α Freqüentes		DBL α Raros	
V1	DQ265547	VRaro 1	112_28*
V2	1233_7	Vraro 2	112.33*
V3	DQ265567	Vraro 3	DQ265456
V4	DQ265572	Vraro 4	112.04*
V5	DQ265498	Vraro 5	42.33*
V6	DQ265435	Vraro 6	113.8*
V7	DQ265559	Vraro 7	<u>DQ265537</u>
V8	DQ265552		
V9	1535_106*		
V10	DQ265479		
V11	1238_57*		

Continua

Tabela 1. (Continuação)

Grupo	Número de Acesso Gene Bank	Grupo	Número de Acesso Gene Bank
RIFIN Comuns		STEVR	
R1	115.50*	S1	DQ265689
R2	DQ265186	S2	DQ265610
		S3	DQ265623
RIFIN Raros		S4	DQ265641
R3	DQ265281		
R4	DQ265360		
Conclusão			

*Algumas seqüências ainda não foram submetidas para o GenBank e são mencionadas com seu código interno.

3.2 CLONAGEM DE DOMÍNIOS DBL α E GENES *RIF*

As seqüências DBL α foram reamplificadas através de PCR utilizando um par de oligonucleotídeos degenerados para domínios DBL α (PETERS et al., 2002) e com a adição de um sítio *Bam*H1 no oligonucleotídeo *forward*. Os produtos de PCR foram clonados em pTZ57R/T e subclonados no vetor pGEX2T para expressão da fusão com GST.

Seqüências *rif* específicas foram amplificadas usando uma combinação de oligonucleotídeos *forward* degenerados com um sítio de *Bam*H1 e oligonucleotídeos *reverse* específicos para cada seqüência amplificada. Os oligos *reverse* foram desenhados para excluir o domínio transmembrana 3'. Seqüências *rif* truncadas foram, então, amplificadas utilizando os seguintes pares de oligonucleotídeos: (1) RifB_FF (5'- GGA TCC AGA TYA TTA TGY GAR TGY SA- 3') e RifRR/115.50 (5'- ATG TTG TTG GCG TTG TTG); (2) RifB_FF (5'- GGA TCC AGA TYA TTA TGY GAR TGY SA - 3') e RifRR/115.54 (5'- AAA AGC ATA TTT AGC GTC T - 3'); (3) RifD_FF (5'- GGA TCC AAT AAA CMA TMC ATY ACA C - 3') e RifRR/1544_10 (5'- CAC CAT ATG TAG CTT TTA - 3')(onde R corresponde a G ou A, Y a C ou T e S a C ou G).

Os fragmentos purificados do gel foram clonados em pTZ57R/T e subclonados no vetor de expressão pGEX2T. A presença das seqüências específicas foi confirmada através de análise por restrição e sequenciamento.

3.3 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Devido a uma série de dificuldades na obtenção de proteínas solúveis utilizando o sistema de expressão bacteriano, conduzimos um teste de diferentes condições de expressão como tentativa de melhorar o desempenho do sistema.

As seqüências clonadas em vetor pGEX2T foram re-transformadas em bactérias BL21-RIL e uma colônia foi inoculada em 5 ml LB suplementado com 100 µg/ml de ampicilina e 1% de glicose.

O cultivo principal de 100 ml de meio *Luria broth* (LB) foi obtido a partir do pré-inóculo e a cultura foi acompanhado até que fosse atingida uma DO_{600nm} maior que 0,6, indicado para produção das proteínas DBLα (FLICK et al., 2004).

Foram feitas 9 alíquotas de 10 ml do inóculo principal para testar diferentes condições de crescimento. Na primeira delas foi realizado um teste sem agente indutor do sistema (IPTG) (A). Em seguida (B), foi testada a adição de uma concentração baixa de IPTG (0,1 mM). Nos testes seguintes (C e D) foram adicionados à cultura 1% de sorbitol (PICAUD et al., 2007) e 1% etanol (VANBOGELEN et al., 1987), respectivamente.

Para testar a interferência da concentração de IPTG na produção de antígenos solúveis, realizamos testes com concentrações mais altas de IPTG (0,5 mM). Realizamos um teste com 0,5 mM de IPTG (E), e com adição de sorbitol e etanol nesta concentração de IPTG (F e G). Como controle, realizamos também testes sem a presença de IPTG, mas com a adição de 1% de sorbitol e 1% de etanol (H, I).

Todos os testes foram feitos da mesma forma, com tempos de indução variando de 3 a 12 horas de indução em duas temperaturas: 28 °C e 37 °C.

Além disso, testamos também dois tipos de meio de cultura: LB e 2YT.

Tabela 2. Esquema do teste de solubilidade.

Tubo	Condição
A	Sem Indução
B	0,1 mM IPTG
C	0,1 mM IPTG + 1% Sorbitol
D	0,1 mM IPTG + 1% Etanol
E	0,5 mM IPTG
F	0,5 mM IPTG + 1% Sorbitol
G	0,5 mM IPTG + 1% Etanol
H	Sem IPTG + 1% Sorbitol
I	Sem IPTG + 1% Etanol

Diferentes condições de crescimento da cultura bacteriana durante o processo de expressão de proteínas de *P. falciparum*.

Após 3 horas de indução, 2 ml de cada uma das amostras foram recolhidos e centrifugados a 12.000 rpm por 20 minutos. Os pellet foram ressuspensos em tampão de lise contendo 25 mM TRIS-Cl pH 7,5, 50 mM NaCl e 0,2 µg/ml de lisozima. Após 30 minutos em gelo, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante recolhido foi considerado a fração solúvel. Os resultados foram analisados em gel de SDS-Page 12,5%.

3.4 SISTEMA DE SECREÇÃO COM HEMOLISINA A

Outra forma de driblar as dificuldades de obtenção de proteínas solúveis foi a tentativa de expressão dos domínios escolhidos fusionados a hemolisina A, secretada, em bactérias *Escherichia coli* através de um sistema de secreção sem intermediários periplasmáticos.

O fragmento C-terminal da hemolisina A foi amplificado a partir do vetor pLG612-1B (TZSCHASCHEL et al., 1996). Como o vetor pLG612-1B possui apenas o sítio EcoR1 para a clonagem de fragmentos diferentes, para aumentar sua flexibilidade, desenvolvemos 9 vetores para permitir a clonagem de fragmentos em qualquer fase de leitura.

Para a amplificação da fração C-terminal da hemolisina A, a partir do vetor pLG612-1B, foram desenhados três oligonucleotídeos, um para cada possível fase de leitura em relação ao sítio EcoR1 na posição 5', e na posição 3' um sítio HindIII foi adicionado.

Estes fragmentos amplificados foram clonados via EcoR1 e HindIII nos vetores pRSETA, B, e C (Invitrogen). Desta forma, criamos 9 plasmídeos : pRSETA1 - pRSETC3, nomeados de acordo com a fase de leitura 5' (do pRSET) e 3' (C-terminal da hemolisina A).

Para completar a construção destes novos plasmídeos, um fragmento incluindo o 6x-His, o polilinker e o C-terminal da hemolisina A foi amplificado e digerido utilizando EcoR5 (introduzido via oligonucleotídeo específico em 5') e HindIII.

Este fragmento foi ligado em um pUC18 previamente cortado com EcoR1 (*blunted* com Klenow polimerase) e HindIII. Os plasmídeos resultantes foram denominados pUCSETA1 - pUCSETC3.

Para a expressão de proteínas utilizando este sistema, preparamos duas cepas de bactéria *E. coli* TolC⁺, BL21 e HB2151 para a expressão de proteínas recombinantes neste sistema. Estas bactérias foram previamente transformadas com o plasmídeo pVLD9.3 (TZSCHASCHEL et al., 1996), que codifica as proteínas HlyB e HlyD, essenciais para a secreção de fusões com HlyA.

A partir daí, os domínios escolhidos foram clonados em um de nossos vetores (pUCSET). A expressão foi conduzida em ambas as cepas bacterianas BL21 e HB2151 (TolC⁺). O sistema foi induzido com 0,1 mM de IPTG durante 5 horas a 37 °C. As culturas foram recolhidas e centrifugadas por 15 minutos a 2800 rpm. Os sobrenadantes foram então purificados através de resina Ni²⁺-Sepharose, de acordo com instruções do fabricante.

3.5 PROTOCOLO PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS EM SISTEMA BACTERIANO

Após diversas tentativas e testes, conseguimos desenvolver um protocolo padrão de expressão heteróloga em bactérias.

Bactérias *E. coli* competentes da linhagem *Rosetta-gami* (Novagen) foram transformadas com plasmídeos pGEX2T contendo as respectivas sequências na orientação e fase de leitura correta.

Uma colônia isolada da bactéria cresceu a 37 °C durante a noite em um pré-inóculo de 5 ml de LB (*Luria broth*) suplementado com 100 µg/ml de ampicilina, 34 µg/ml de cloranfenicol, 50 µg/ml de kanamicina, 50 µg/ml de tetraciclina e 1% de glicose.

A cultura principal foi incubada a 37°C em 100 mL de LB com todos os antibióticos presentes até atingir DO_{600nm} maior que 1. A cultura foi, então, pré-indução, acondicionada por 20 minutos a 4 °C. Após 3 horas de indução com 0,1 mM de isopropil-thio-β-galactopyranoside (IPTG) a 37°C, as bactérias foram recolhidas por centrifugação a 2800 rpm. O pellet foi, então, ressuspedido e congelado durante a noite em tampão de lise, contendo 25 mM TRIS pH 7,5, 100mM NaCl, 1% Triton e lisozima a 20 µg/ml.

As células bacterianas foram rompidas por sonicação (5 pulsos de 30 segundos a 40% de eficiência) e após 30 minutos de centrifugação a 13.000 rpm as frações solúveis foram purificadas por afinidade com a resina glutathione-sepharose 4b (Amersham Biosciences) de acordo com as descrições do fabricante.

A expressão da proteína STEVOR foi realizada com a adição de 1mM do agente redutor dithiothreitol (DTT) à cultura principal.

As proteínas expressas/purificadas foram analisadas em gel de poliacrilamida (10 ou 12,5%) contendo SDS (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) e detectadas com o corante Coomassie Blue (segundo protocolos estabelecidos) (SAMBROOK et al., 1989).

3.6 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAS DE SORO/PLASMA UTILIZADAS

Utilizamos neste estudo, amostras de soros coletadas de indivíduos residentes do estado de Rondônia (FAPESP processos 00/11136-0 e 01/09401-0), região norte do Brasil. A prevalência de infecções causadas por plasmódios caracteriza nossa área de estudo como região hipoendêmica para malária. Nesta região, o parasita *P. falciparum* é responsável por 25% das infecções (Sivep-Malária, Sinan/SVS/MS, 2006), e a taxa de inoculação entomológica é de 2-5 infectivas por pessoa por ano, valores correspondentes a algumas áreas endêmicas na África (GIL et al., 2007).

Analizamos 159 amostras de soro/plasma: 8 soros de indivíduos sintomáticos do Gabão (amostras gentilmente cedidas pelo Dr. Michael Ramharter), 14 amostras de indivíduos primoinfectados por *Plasmodium falciparum*, 36 soros de indivíduos sintomáticos com alta parasitemia de Porto Velho, capital de Rondônia, 101 soros de moradores de Santo Antônio, Engenho Velho, Bate Estaca e Vila Candelária, comunidades ribeirinhas às margens do rio Madeira em Rondônia, dentre eles, 37 soros de indivíduos assintomáticos, 25 soros de indivíduos sintomáticos com baixa parasitemia e 39 soros de indivíduos ribeirinhos saudáveis sem infecção malárica.

O diagnóstico de malária foi realizado através de microscopia ótica e reações de *nested* PCR pela equipe do CEPEM em Rondônia. Indivíduos que apresentaram pelo menos um sintoma clínico da doença e tiveram a presença do parasita confirmada por PCR foram considerados sintomáticos. Indivíduos com lâmina e/ou reação de PCR positivos e não apresentaram sintomas por 30 dias foram considerados assintomáticos.

Tanto os indivíduos sintomáticos quanto os assintomáticos foram tratados e os ribeirinhos foram acompanhados 30 e 60 dias após coleta inicial.

Todos os participantes foram entrevistados e examinados clinicamente.

Todos os plasmas/soros utilizados nas análises foram aprovados na comissão de ética do ICB para estudos envolvendo humanos.

Utilizamos, também, soros de indivíduos residentes no vilarejo de Portuchuelo, RO, fornecidos pela Dra. Fabiana Alves. Estas amostras são procedentes de um corte feito na área em 1998.

3.7 IMMUNOBLOTTING

Para a confirmação dos antígenos produzidos, 9 seqüências DBL α “frequentes”, 3 antígenos DBL α raros, 4 proteínas RIFIN e 1 proteína STEVOR foram testadas através de *western blot*. As proteínas resolvidas por SDS-PAGE foram transferidas por eletroforese para membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham-Pharmacia, NJ, EUA) e bloqueadas durante 1 hora em temperatura ambiente com 5% leite e PBS-Tween 0,1% (PBS-T). Após 4 lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas durante uma hora, em temperatura ambiente com soro murino anti-GST diluído a 1:5000 em PBS-T 1% e soros de indivíduos com infecção malárica em diluição de 1:100 em PBS-T 1%. Após cinco lavagens com PBS-T, a membrana previamente incubada com soro humano foi incubada com anticorpo de carneiro anti-IgG humano (Amersham-Pharmacia) diluído em 1:2500 e a membrana incubada com soro anti-GST foi incubada com anticorpo de carneiro anti-IgG de camundongo (Amersham-Pharmacia,) diluído em 1:2500. Estas incubações foram realizadas por 1 hora em temperatura ambiente sob leve agitação. As membranas foram, então, lavadas 5 vezes com PBS-T, reveladas por quimioluminescência (kit SuperSignal, Pierce), e expostas ao filme *Hyperfilm*, seguindo as instruções do fabricante.

3.8 REAÇÕES DE ELISA (*ENZYME LINKED-IMMUNOSORBENT ASSAY*)

Realizamos imunoensaios (ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para detecção de anticorpos IgG em soros de indivíduos residentes em área endêmica contra 9 domínios DBL α frequentes, 3 antígenos DBL α raros, 3 proteínas RIFIN, 1 proteína STEVOR e antígenos MSP1₁₉ (fusão de GST ao C-terminal da proteína de merozoita 1) de *P. falciparum* e *P. vivax*.

Para determinar a concentração de antígeno e diluição de anticorpo para serem usadas nos testes, realizamos ensaios para a construção de uma curva-padrão de diluição com concentrações de proteína variando entre 6,25 a 200 ng e soros diluídos de 1:200 a 1:1600.

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 ng/poço da placa de antígenos DBL α , RIFIN e STEVOR diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (TBS) 50 mM pH 9,6 em um volume final de 50 μ l/poço da placa.

A sensibilização ocorreu durante a noite a 4 °C. Após 3 lavagens com PBS + Tween 0,05% (PBS-T), as placas foram bloqueadas com 4% PBS-T-Leite por 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-T, foram depositados, poço da placa, 50 μ l de soro humanos diluídos a 1:200 em 1% PBS-T-Leite, permanecendo em temperatura ambiente por uma hora. Após 4 lavagens com PBS-T, procedeu-se a incubação com soro anti-IgG humano conjugado com peroxidase (NA933 Amersham) diluído à 1:2500 em 1% PBS-T-Leite por 1 hora. Após 4 lavagens, as reações foram reveladas adicionando-se 50 μ l/poço na placa de substrato TMB (Pierce) segundo as indicações do fabricante. As reações foram interrompidas por adição de 50 μ l /poço na placa de solução de HCl 1M. As absorbâncias foram obtidas por leitura a 450 nm com referência em 595 nm em leitor de microplacas BIO-RAD 3550.

Os valores de reatividade específicos para cada par soro/antígeno a 450 nm (DO_{450}) foram obtidos subtraindo os valores de DO_{450} da proteína GST dos valores de DO_{450} das fusões GST-DBL α e GST-RIFIN. Em alguns soros, altos níveis de reatividade contra a proteína GST purificada resultaram em valores de DO_{450} negativos. Para análises estatísticas, estes valores foram considerados zero.

Os limiares de reatividade ('*cut-off*') para cada antígeno analisado foram calculados à partir da média das absorbâncias de 20 doadores saudáveis sem histórico de exposição a *P. falciparum* mais 3 desvios padrão.

Os índices de reatividade foram determinados através do valor da absorbância da amostra / valor do '*cut-off*' da proteína analisada.

Além de controles negativos, de indivíduos sem contato com o parasita da malária, uma resposta global contra *Plasmodium* foi também testada através da adição de proteínas recombinantes GST fusionadas ao C-terminal da proteína de merozoita 1 (MSP1₁₉), tanto de *P. falciparum* quanto de *P. vivax*.

3.9 TESTES ESTATÍSTICOS

Para comparação de resultados individuais (DO_{450} ou Índices de reatividade) entre grupos usamos o teste *Student* bicaudal. Para comparações de resultados entre grupos, foi utilizado o teste Qui-quadrado. Resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3.10 AMPLIFICAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS DBL α FREQUENTEMENTE ENCONTRADAS EM ISOLADOS BRASILEIROS

Para a identificação das seqüências DBL α freqüentes nos genomas de isolados coletados durante o projeto temático concluído, desenhamos um par de oligonucleotídeos específicos para cada um dos grupos analisados.

As seqüências (Tabela 2) foram escolhidas manualmente e testadas contra um banco de 250 seqüências brasileiras e amplificam apenas o alelo desejado, assegurado por colocar um *mismatch* específico de cada seqüência em posição 3' de cada oligonucleotídeo.

Tabela 3. Oligonucleotídeos específicos para grupos DBL α freqüentes

Grupos DBL α Freqüentes	Oligonucleotídeo FF (Forward)	Oligonucleotídeo RR (Reverse)
DQ265547	Atgacgtgacgaggacgg	Tccaccaatacaatggca
DQ265552	Ataaattggatccagaag	Tcaccaccaatacaatggca
DQ265572	Cggatctaaaggatccaa	Ttggatccttagatccg
1238_57*	Aggacgtgatgaagacga	Atctcaaattattgtggca
DQ265479	Agaattgtcgacgacga	Aagatactgcggcacata
DQ265435	Gtggattgtcgaacaatg	Ccagcgaagatactgcggca
DQ265498	Aaggattgtcgaacaatg	Catctcaaattattgagga
1233_7*	Atggattgtcgaacgaga	Ccaacgaagaaactgtggca
DQ265559	Atgaaaatgcagaactta	Aacgtaaattattgaggaa
DQ265567	Agaaatataaggagaccg	Caacgaaaaaattgaggg
1535_106*	Attatcagaggtaaagat	Accaccaatacaatggca

* Seqüências que ainda não foram submetidas para o GenBank são mencionadas com seu código interno (Clone/Isolado.número do clone plasmídeo).

Para garantir a especificidade dos pares de oligonucleotídeos, realizamos reações de PCR utilizando plasmídeos controle, contendo seqüências correspondentes a cada um dos grupos DBL α analisados. Além disso os DNAs genômicos utilizados foram testados em reação de PCR com oligonucleotídeos DBL α degenerados (PETERS et al., 2002). Estes oligonucleotídeos permitem a amplificação dos domínios DBL1 α da maioria do repertório de genes *var* da cepa 3D7 e de isolados de campo.

Em seqüência, os DNAs genômicos foram testados para a presença dos alelos estimados freqüentes na população de parasitas brasileiros. Estes testes foram feitos com *primers* específicos para cada alelo.

Em todos os ensaios foram incluídas amostras controle de DNA humano sem parasitas, um controle negativo (tubo com todos os reagentes menos DNA) e um controle positivo com plasmídeos contendo seqüências correspondentes ao grupo DBL α analisado.

As amplificações de diferentes domínios DBL α frequentes foram conduzidas sob condições individuais, dependendo das propriedades de cada par de oligonucleotídeos usados nas reações. Para a amplificação destas seqüências frequentes em plasmídeos, utilizamos 20 ciclos nas reações de PCR e para DNA genômico 35. Polimerases, tampões e DNA foram utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes de cada componente.

Produtos de PCR foram analisados em géis de TAE-agarose, corados com brometo de etídio (10 μ g/ml), purificados utilizando NaI/Silica (método “*Glassmilk*” (BOYLE et al., 1995) ou kit para purificação de fragmentos em gel de agarose (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Estes fragmentos foram então clonados em vetor pTZ57/T (Fermentas) e analisados através de sequenciamento utilizando *BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit* (PerkinElmer, MA, USA), em um volume final de 6 μ l, contendo 200-300 ng de plasmídeo, 5 pmol de oligonucleotídeo *sense* e/ou *antisense* (de acordo com cada plasmídeo utilizado), 4 μ l de *Big Dye Mix*. As reações foram submetidas a 25 ciclos de: 10s a 96 °C, 5s a 50 °C e 4 min a 60 °C. Após a reação de *Cycle Sequencing*, as amostras foram precipitadas com isopropanol 75%, lavadas com etanol 70%, ressuspendidas em formamida e aplicadas em um seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems, CA, USA). A análise e o alinhamento das seqüências foram conduzidos utilizando-se os *softwares* DNASTar (v4.0), ClustalX1.83 e BLAST.

4 RESULTADOS

4.1 OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Como a produção de proteínas de *P. falciparum* em sistema bacteriano é tarefa complexa, desenvolvemos um teste de solubilidade, levando em consideração alguns fatores que podem influenciar na obtenção de proteínas solúveis neste sistema, como: mudanças na temperatura de incubação da cultura bacteriana, utilização de diferentes meios de cultura, alterações nas concentrações do agente indutor do sistema (IPTG) e adição de substâncias como etanol e sorbitol, conhecidas por aumentar a solubilidade de proteínas expressas em sistemas heterólogos (PICAUD et al., 2007; VANBOGELEN et al., 1987).

Testamos, em princípio, a expressão da proteína DBL α do grupo 7 (DQ265559) utilizando dois meios de cultura diferentes: LB e 2YT (Figura 7, itens 1 e 2, respectivamente) e percebemos uma maior quantidade de produtos inespecíficos como resultado do uso do meio de cultura 2YT. A adição de 1% de sorbitol ao meio de cultura parece aumentar a expressão da fusão de tamanho esperado de aproximadamente 46kDa (Figura 7, coluna C).

Durante testes posteriores com a proteína DBL α do grupo 5 (DQ265498), não observamos, porém, nenhuma alteração na produção da proteína recombinante, apesar das diferentes condições testadas (Figura 7, item 3). Testes com outras proteínas também indicaram que a obtenção de uma proteína solúvel provavelmente depende de características individuais de cada antígeno.

Figura 7. Resultados do teste de Solubilidade

Análise por SDS-Page 12,5% corado com Coomassie das frações solúveis de domínios DBL α frequentes. **1 e 2:** Expressão da proteína do grupo 7 (DQ265559). **1.** Cultura em LB. **2.** Cultura em 2YT. **3.** Teste de solubilidade da proteína do grupo 5 (DQ265498). As condições testadas foram: (A) Sem presença de agente indutor (IPTG). (B) 0,1 mM de IPTG. (C) 0,1 mM de IPTG mais 1% Sorbitol. (D) 0,1 mM de IPTG mais 1% Etanol. (E) 0,5 mM de IPTG. (F) 0,5 mM IPTG mais 1% Sorbitol. (G) 0,5 mM IPTG mais 1% Etanol. (H) Sem presença de IPTG mais 1% Sorbitol. (I) Sem presença de IPTG mais 1% Etanol. As flechas indicam GST (abaixo) ou o tamanho esperado da proteína de fusão.

4.2 SISTEMA DE EXPRESSÃO COM HEMOLISINA A

Levando em consideração que as PfEMP1s são proteínas secretadas, passando por várias membranas até chegar à superfície da hemácia, hipotetizamos que seria possível secretar os domínios DBL α para fora de uma bactéria *E. coli* produtora deste antígeno. Para verificar esta possibilidade adaptamos o sistema de expressão de proteínas fusionadas a hemolisina A, toxina secretada por bactéria *E. coli* enteropatogênicas.

Após o desenvolvimento de 9 vetores pUCSET, realizamos os primeiros testes: Bactérias HB2151 transformadas com o vetor pLG612-1B produziram a parte C-terminal da hemolisina A (Figura 8, coluna 4). Ao serem transformadas com vetor

pUCSETA3 produziram o C-terminal da hemolisina A mais a cauda de histidina para a purificação (Figura 8, colunas 2 e 3). A fusão de um domínio DBL α (PFD1000c) a parte C-terminal da hemolisina A também foi produzida diretamente para o meio de cultura (Figura 8, coluna 6). Bactérias BL21 também se mostraram eficientes na produção destas proteínas (Figura 8, colunas 5 e 7).

Apesar do sucesso inicial, estes resultados não foram reprodutíveis. Apesar de diversas tentativas e modificações nas condições de crescimento da cultura, como aumento e diminuição na temperatura de crescimento das culturas, aumento na concentração de IPTG e no tempo de indução das culturas, não conseguimos reproduzir o resultado mostrado na Figura 8.

Figura 8. Resultados da expressão em sistema de secreção de hemolisina A

Produção de Hemolisina A com 6X HIS ou fusionado a domínio DBL α . **1.** 20 μ l de sobrenadante de cultivo de bactérias *E. coli* HB2151 expressando o C-terminal de HlyA **2.** HlyA mais 6xHis **3.** 15 μ l de material purificado com sepharose Ni²⁺ (HlyA mais 6xHis) **4.** Sobrenadante de cultura de *E. coli* HB2151 com C-terminal da hemolisina A produzido com o vetor pLG612-1B. **5.** Sobrenadante de cultura de *E. coli* BL21 com C-terminal da hemolisina A produzido com o vetor pLG612-1B. **6.** Sobrenadante de *E. coli* HB2151 : DBL α (PFD1000c) fusionado a HlyA e **7.** sobrenadantes de *E. coli* BL21 : DBL α (PFD1000c) fusionado a HlyA. As flechas indicam a altura da banda de GST e da única banda detectada no sobrenadante, coincidindo com o tamanho esperado da fusão.

4.3 PRODUÇÃO DE DOMÍNIOS DBL α SOLÚVEIS

Apesar das dificuldades, desenvolvemos um protocolo padrão funcional, em bactérias *E. coli* BL21 *Rosetta gami*, para a expressão dos antígenos escolhidos, na forma solúvel. Produzimos 9 domínios DBL α frequentemente encontrados em parasitas brasileiros e 3 domínios DBL α raros. Estes antígenos foram expressos em fusão com GST, sendo que o peso molecular predito da proteína é de aproximadamente 20 kDa, e quando adicionado a GST resulta em uma proteína recombinante de aproximadamente 46 kDa.

Todos os antígenos produzidos foram testados através de *western blot*, para detectar a presença da proteína testada a partir da cauda de GST e ainda para verificar se estes são reconhecidos pelo soro de pacientes infectados (Figura 09). Foi utilizado soro murino anti-GST (Figura 9B e 8B), um soro de paciente negativo para malária (Figura 9C, -), soro de um paciente sintomático para malária falciparum (Figura 9C, colunas A) e soro de um paciente assintomático (Figura 9C, colunas B).

Os resultados observados indicam que todas as proteínas foram identificadas quando testadas para a presença de GST. Porém, apenas os antígenos DBL α do grupo 1 (V1), 4 (V4) e 6 (V6) foram reconhecidos por soros de pacientes infectados. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que foram testados, por *western-blot* apenas um soro de paciente sintomático e um soro de paciente assintomático, o que não significa dizer que estes antígenos não possam ser reconhecidos por outros plasmas de indivíduos de áreas endêmicas. Além disso, o reconhecimento de alguns destes domínios, indica viabilidade no uso destas proteínas nos testes de ELISA.

Figura 9. Resultados da expressão de domínios DBL α freqüentes

A. Gel SDS-Page 12,5% corado com Coomassie de domínios DBL α freqüentes dos grupos 1 (V1), 2 (V2), 3 (V3), 5 (V5), 6 (V6), 7 (V7), 9 (V9), 10 (V10) e 11 (V11) produzidos em sistema bacteriano. **B.** Western Blot utilizando soro anti-GST murino e domínios DBL α freqüentes. **C.** Western Blot utilizando soro humano de indivíduos negativos para malária (-) e de residentes de área endêmica (A e B).

Figura 10. Análise por SDS-Page da expressão de domínios DBL α raros

Gel SDS-Page 12,5% corado com Coomassie de domínios DBL α raros dos grupos 12 (V12), 13 (V13), 14 (V14).

4.4 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RIFIN SOLÚVEIS

Produzimos, também, com o mesmo protocolo utilizando bactérias *E. coli* *Rosetta gami*, 3 proteínas RIFIN na forma solúvel. Um alelo é freqüentemente encontrado em isolados brasileiros (115.50) e dois foram encontrados em um único isolado: DQ265281 (R3) e DQ265360 (R4). As proteínas RIFIN produzidas foram testadas posteriormente através de ensaios de western blot com soro anti-GST murino.

Figura 11. Análise por SDS-Page da expressão de proteínas RIFIN

A. Gel de SDS-Page 12,5% corado com Coomassie de proteínas RIFIN dos grupos 1 (R1), 3 (R3) e 4 (R4) produzidas em sistema bacteriano. **B.** Western Blot utilizando soro anti-GST murino e proteínas RIFIN.

4.5 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS STEVOR RECOMBINANTES

A expressão solúvel de proteínas STEVOR apresentou algumas complicações iniciais. A clonagem destes domínios foi tarefa difícil e apenas uma proteína (DQ265623) foi produzida.

Em um dos testes realizados, obtivemos um resultado que pareceu promissor: A adição do agente redutor DTT à cultura de bactérias durante o processo de expressão, diminui consideravelmente a quantidade de produtos truncados da proteína STEVOR. Na figura 12, coluna A, podemos observar a fração solúvel da proteína STEVOR expressa sem a presença de DTT. A coluna B mostra a mesma proteína expressa na presença de 1 mM de DTT. As colunas C e D mostram a fração solúvel desta proteína, resultado da expressão utilizando 4 mM de DTT. Em D é mostrado o resultado da expressão de STEVOR com troca de meio de cultura (LB) antes da indução por IPTG.

Os produtos da expressão com DTT não apresentaram nenhuma forma truncada, como foi o caso da proteína expressa sem a adição do agente redutor.

Figura 12. Análise por SDS-Page da expressão de proteína STEVOR

Gel SDS-Page 12,5% corado com Coomassie de proteína STEVOR produzidas em sistema bacteriano. **A.** Fração solúvel produto da expressão da proteína STEVOR DQ265623. **B.** Proteína STEVOR derivada de expressão realizada com adição de 1 mM de DTT. **C.** Proteína STEVOR derivada da expressão com adição de 4 mM de DTT no meio de cultura. **D.** Proteína STEVOR derivada da expressão com adição de 4 mM de DTT no meio de cultura e renovação do meio anterior a indução.

4.6 ADIÇÃO DO AGENTE REDUTOR DITHIOTHREITOL (DTT) AO MEIO DE CULTURA DURANTE EXPRESSÃO

A adição de DTT durante a expressão da proteína STEVOR, mostraram diminuição na formação de produtos truncados. Para testar este efeito na expressão de outras proteínas, realizamos testes durante a expressão de domínios DBL α e DBL β na ausência e na presença de DTT.

Pudemos observar melhorias na expressão solúvel dos três domínios testados (Figura 13, colunas 2, 4 e 6).

Figura 13. Análise por SDS-Page da expressão com adição de DTT

Resultados comparativos de expressão de domínios DBL β (1 e 2) e domínios DBL α raro (3 e 4) e freqüente (5 e 6). 2, 4 e 6 são proteínas resultantes de expressão com adição de DTT. 1, 3 e 5 são proteínas resultantes de expressão sem DTT. Gel SDS Page 12,5% corado com Coomassie.

4.7 ENZYME LINKED-IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Domínios recombinantes DBL α freqüentes e raros e proteínas RIFIN foram testadas em ensaios de ELISA para análise dos níveis de anticorpos IgG específicos em soros de indivíduos residentes em região endêmica para malária.

O reconhecimento destas proteínas foi testado contra 159 soros, divididos em 7 grupos: (1) 8 soros de indivíduos sintomáticos do Gabão (África), (2) 14 soros de indivíduos primoinfectados por *P. falciparum*, (3) 36 soros de indivíduos sintomáticos com alta parasitemia, (4) 25 soros de indivíduos sintomáticos ribeirinhos com baixa parasitemia, (5) 37 soros de indivíduos assintomáticos ribeirinhos, (6) 29 soros de indivíduos saudáveis, sem infecção, residentes em área endêmica há mais de dez anos e (7) 10 soros de indivíduos saudáveis, sem infecção, residentes em área endêmica há menos de dez anos.

Além disso, foi feita uma análise da cinética das respostas humorais contra os antígenos recombinantes produzidos com a coleta de 13 soros de indivíduos infectados por *P. falciparum* em 3 tempos: 0, 30 dias e 60 dias. A primeira amostra foi coletada durante um corte feito nas regiões de Santo Antônio, Engenho Velho, Bate Estaca e Vila Candelária, comunidades ribeirinhas às margens do rio Madeira, Rondônia. Durante a coleta inicial (tempo 0) indivíduos infectados apresentando ou não sintomas foram tratados com mefloquina/primaquina e acompanhados após 30 e 60 dias.

Como controles negativos das reações de ELISA, utilizamos amostras de plasmas de 20 doadores negativos sem histórico de contato com o parasita *P. falciparum*, residentes em São Paulo, SP.

4.7.1 Sororreatividade de Indivíduos Sintomáticos Africanos

Analizamos soros de 8 crianças do Gabão, sintomáticas para malária e infectadas por *P. falciparum*.

50% destes soros reagiram positivamente contra pelo menos um antígeno DBL α freqüente, diferente dos domínios DBL α raros, que não foram reconhecidos por nenhum dos soros. Em relação as proteínas RIFIN, 75% dos soros foram positivos para pelo menos um antígeno e 50% apresentou reatividade contra as três variantes RIFIN analisadas (Figura 14).

Todos os soros africanos analisados apresentaram reatividade contra a proteína MSP1₁₉ de *P. falciparum*, sendo que a média dos índices de reatividade contra estas proteínas foi de 8,3, cerca de 4 vezes maior do que a média dos índices de reatividade contra as proteínas RIFIN, reconhecidas pela maioria dos soros analisados.

Figura 14. Sororreatividade de indivíduos sintomáticos do Gabão (África)

Reatividade de anticorpos contra domínios DBLα e proteínas RIFIN entre indivíduos sintomáticos do Gabão (África). Sororreatividade de 8 indivíduos sintomáticos do Gabão (1-8) contra 9 antígenos recombinaantes DBLα frequentes, 3 antígenos DBLα raros, 3 proteínas RIFIN (a primeira coluna representando um antígeno comum e as duas outras, antígenos raros) e antígenos MSP1₁₉ de *P. falciparum* (P.f.) e de *P. vivax* (P.v.). Quadrados cinza claros indicam valores maiores que 1, quadrados cinza escuro índices de reatividade maiores que 3 e quadrados pretos indicam índices de reatividade maiores de 10.

4.7.2 Sororreatividade de Indivíduos Primoinfectados por *P. falciparum*

Analizamos soros de 14 indivíduos sintomáticos primoinfectados por *P. falciparum*.

64% dos soros apresentaram resposta contra pelo menos um antígeno DBLα freqüente e apenas um dos soros reagiu contra pelo menos uma das proteínas DBLα raras. Em relação às RIFIN, 21% dos soros apresentaram reatividade contra pelo menos um antígeno (Figura 15).

A proteína MSP1₁₉ foi reconhecida por 71% dos indivíduos e o valor médio do índice de reatividade contra estas proteínas foi de 6,78 para MSP1₁₉ contra 1,81 contra o antígeno DBLα freqüente do Grupo 10, reconhecido por 43% dos indivíduos.

Figura 15. Sororreatividade de indivíduos primoinfectados por *P. falciparum*

Sororreatividade de 14 indivíduos primoinfectados por *P. falciparum* (1-14) contra 9 antígenos recombinantes DBLα frequentes, 3 antígenos DBLα raros, 3 proteínas RIFIN e antígenos MSP1₁₉ de *P. falciparum* (P.f.) e de *P. vivax* (P.v.). Indivíduos 1-9 são residentes há mais de dez anos em área endêmica e 10-14 são residentes há menos de 10 anos. Quadrados cinza indicam valores maiores que 1, quadrados pretos significam índices de reatividade maiores que 5.

Tanto indivíduos residentes em área endêmica há mais de 10 anos, quanto os indivíduos residentes em área endêmica há menos de 10 anos apresentaram médias de reatividades semelhantes para os antígenos analisados. Alguns dos indivíduos já experimentaram infecção por *P. vivax*, já que possuem anticorpos contra PvMSP1₁₉.

4.7.3 Sororreatividade de Indivíduos Sintomáticos

Foram analisados soros de 61 indivíduos com infecção sintomática causada por *P. falciparum*.

Estes soros foram divididos em dois grupos: O primeiro formado por 36 amostras de indivíduos do município de Porto Velho, RO, sintomáticos com alta parasitemia, e o segundo grupo formado por 25 soros de indivíduos sintomáticos residentes em Santo Antônio, Engenho Velho, Bate Estaca e Vila Candelária, comunidades ribeirinhas às margens do rio Madeira em Rondônia.

80% dos soros do Grupo 1 (indivíduos com alta parasitemia) e 68% dos soros do Grupo 2 reconheceram pelo menos 1 antígeno DBL α freqüente. Em relação aos antígenos DBL α raros, este número foi menor: Apenas 40% dos soros de ambos os grupos, reconheceram pelo menos 1 antígeno DBL α raro. Analisando as proteínas RIFIN, 44% dos indivíduos com alta parasitemia e 28% dos ribeirinhos apresentaram reatividade contra pelo menos um antígeno (Figuras 16 e 17).

As respostas contra antígenos MSP1₁₉ mostram que 100% dos indivíduos sintomáticos com alta parasitemia apresentaram reatividade contra pelo menos uma das formas de MSP1₁₉. No grupo dos indivíduos ribeirinhos com baixa parasitemia apenas 1 não apresentou resposta contra nenhuma das proteínas MSP1₁₉ testadas (Figuras 16 e 17).

Além disso, constatamos que entre os indivíduos sintomáticos do grupo 1, houve um reconhecimento preferencial, por 56% dos soros, da proteína DBL α freqüente do grupo 9. Destes, 65% foram positivos para no mínimo 3 variantes DBL α freqüente. A proteína DBL α freqüente do grupo 2 foi reconhecida por 50% dos soros de indivíduos ribeirinhos, sendo que 83% destes soros apresentaram reatividade contra no mínimo 3 variantes DBL α freqüentes.

Figura 16. Sororreatividade de sintomáticos com alta parasitemia

Reatividade de anticorpos contra domínios DBLα e proteínas RIFIN entre indivíduos sintomáticos com alta parasitemia de Porto Velho, RO. Sororreatividade de 36 indivíduos infectados por *P. falciparum* (1 - 36) contra 9 antígenos recombinantes DBLα freqüentes, 3 antígenos DBLα raros, 3 proteínas RIFIN e antígenos MSP1₁₉ de *P. falciparum* (P.f.) e de *P. vivax* (P.v.). Quadrados em cinza claro indicam índices de reatividade maiores que 1, em cinza escuro indicam índices de reatividade maiores de 5 e em preto significam índices de reatividade maiores que 10.

Figura 17. Sororreatividade de sintomáticos com baixa parasitemia

Reatividade de anticorpos contra domínios DBLα e proteínas RIFIN entre indivíduos ribeirinhos sintomáticos com baixa parasitemia. Sororreatividade de 25 indivíduos infectados por *P. falciparum* (1 - 25) contra 9 antígenos recombinantes DBLα frequentes, 3 antígenos DBLα raros, 3 proteínas RIFIN e antígenos MSP1₁₉ de *P. falciparum* (P.f.) e de *P. vivax* (P.v.). Quadrados em cinza claro indicam índices de reatividade maiores que 1, quadrados em cinza escuro indicam índices de reatividade maiores de 5 e em preto significam índices de reatividade maiores que 10.

4.7.4 Sororreatividade de Indivíduos Assintomáticos

Analisamos 37 soros de indivíduos assintomáticos, residentes nas comunidades ribeirinhas de Santo Antônio, Engenho Velho, Bate Estaca e Vila Candelária em Rondônia.

87% dos soros de indivíduos assintomáticos apresentaram reatividade contra pelo menos um antígeno DBL α freqüente, 46% apresentaram reatividade contra pelo menos um grupo DBL α raro e 59% dos soros reagiram positivamente contra pelo menos um antígeno RIFIN (Figura 18).

Em relação à proteína MSP1₁₉, observamos novamente que a grande maioria dos indivíduos, 87%, possuem anticorpos contra pelo menos uma variante desta proteína (proteína de *P. vivax* ou de *P. falciparum*) (Figura 18).

Pudemos observar que 70% dos soros mostraram reconhecimento contra a proteína DBL α frequente do grupo 2, 66% dos quais apresentaram reatividade contra, no mínimo 3 outros grupos de antígenos DBL α freqüentes.

Figura 18. Sororreatividade de indivíduos assintomáticos

Reatividade de anticorpos contra domínios DBLα e proteínas RIFIN entre indivíduos assintomáticos de Rondônia. Sororreatividade de 37 indivíduos assintomáticos infectados por *P. falciparum* (1 - 37) contra 9 antígenos recombinantes DBLα frequentes, 3 antígenos DBLα raros, 3 proteínas RIFIN e antígenos MSP_{1.19} de *P. falciparum* (P.f.) e de *P. vivax* (P.v.). Quadrados em cinza claro indicam índices de reatividade maiores que 1, em cinza escuro indicam índices de reatividade maiores de 5 e quadrados pretos significam índices de reatividade maiores que 10.

As freqüências de reconhecimento dos diferentes antígenos expressos apresentaram um perfil bastante heterogêneo de resposta entre os diferentes grupos analisados: O antígeno RIFIN do grupo 1, por exemplo, é reconhecido por 75% dos soros africanos, porém, apenas 43% dos soros assintomáticos, 30% dos soros sintomáticos com alta parasitemia e 20% dos indivíduos com baixa parasitemia apresentaram reatividade contra este antígeno. O mesmo acontece com o antígeno DBL α freqüente do grupo 2, reconhecido por 70% dos soros de indivíduos assintomáticos, porém reconhecido apenas por 41% dos soros de indivíduos sintomáticos ribeirinhos com baixa parasitemia e por menos da metade dos soros de indivíduos sintomáticos com alta parasitemia. Nenhum dos soros de indivíduos africanos apresentou reatividade contra este antígeno (Figura 19).

Antígenos MSP1₁₉, tanto de *P. falciparum* quanto de *P. vivax* foram freqüentemente reconhecidos por soros de indivíduos de todos os grupos analisados, com exceção dos soros africanos, cujo reconhecimento da variante MSP1₁₉ de *P. vivax* aconteceu apenas por 17,5% dos soros, diferente do 100% de reconhecimento obtido contra a variante de *P. falciparum* (Figura 19).

Figura 19. Comparações do reconhecimento de antígenos recombinantes

Freqüência de reconhecimento de antígenos recombinantes DBL α freqüentes (Var 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10 e 11) DBL α raros (V Raro 1, 2 e 3), RIFIN (RIFIN 1, 2 e 3) e MSP1₁₉ de *P. falciparum* (P.f.) e *P. vivax*, medidos através dos níveis de IgG em ensaios de ELISA.

Em relação às intensidades de resposta contra os diversos antígenos analisados, observamos que as médias dos índices de reatividade dos soros africanos, sintomáticos e assintomáticos são muito próximas, tanto para domínios DBL α freqüentes e raros quanto para proteínas RIFIN. Estas médias são cerca de 4 vezes menor que as médias dos índices de reatividade contra o antígeno do merozoita MSP1₁₉. (Figura 20).

Figura 20. Médias dos Índices de Reatividades

Médias dos Índices de Reatividades de soros de indivíduos africanos, sintomáticos com alta parasitemia (Sintomáticos 1), sintomáticos com baixa parasitemia (Sintomáticos 2) e assintomáticos contra os grupos de antígenos DBL α freqüentes, raros, proteínas RIFIN e MSP1₁₉ de *P. falciparum* (P.f) e *P. vivax* (P.v.).

Podemos observar na figura 21 o reconhecimento de diversos domínios DBL α freqüentes tanto em indivíduos sintomáticos (B e C) quanto assintomáticos (D). Alguns soros apresentaram reatividade contra todos os 9 domínios analisados, enquanto outros não apresentam reconhecimento de nenhum antígeno. Não observamos discrepâncias em relação ao número médio de domínios reconhecidos tanto por sintomáticos quanto por sintomáticos. Indivíduos sintomáticos com alta parasitemia reconhecem em média 3,4 ($\pm$ 3,02) domínios DBL α freqüentes, seguidos pelos assintomáticos com média de reconhecimento de 3,1 ($\pm$ 2,5). Soros sintomáticos com baixa parasitemia reconhecem em média 2,6 ($\pm$ 2,6) domínios freqüentes e soros africanos positivos 1,3 ($\pm$ 1,5).

Valores altos de desvio indicam uma resposta bastante heterogênea entre indivíduos do mesmo grupo.

Figura 21. Diferenças no perfil de reconhecimento de DBLα frequentes

Diferenças nos padrões de reconhecimento de domínios DBLα frequentes por soros de indivíduos residentes em área endêmica. Porcentagem de soros de indivíduos africanos (A), indivíduos sintomáticos com alta parasitemia (B), indivíduos ribeirinhos com baixa parasitemia (C) e indivíduos assintomáticos (D) capazes de reagir contra domínios DBLα frequentes.

Em relação aos domínios DBLα raros podemos constatar um aumento na proporção de soros que não reagem contra nenhum dos antígenos produzidos (Figura 22). Tal fato pode ser observado em indivíduos sintomáticos com alta e baixa parasitemia e assintomáticos. Seguindo a tendência, a média de reconhecimento de proteínas DBLα raras foi de 1,55 ($\pm 1,13$) para indivíduos assintomáticos, 1,66 ($\pm 1,16$) para indivíduos sintomáticos com alta parasitemia e 1,28 ($\pm 1,13$) para indivíduos sintomáticos com baixa parasitemia. Nenhum dos indivíduos africanos apresentou reatividade contra nenhum dos domínios raros.

Figura 22. Diferenças no perfil de reconhecimento de DBLα raros

Diferenças nos padrões de reconhecimento de domínios DBLα raros por soros de indivíduos residentes em área endêmica. Porcentagem de soros de indivíduos africanos (A), indivíduos sintomáticos com alta parasitemia (B), indivíduos ribeirinhos com baixa parasitemia (C) e indivíduos assintomáticos (D) capazes de reagir contra domínios DBLα raros.

Analisando proteínas RIFIN, observamos que metade dos soros africanos e 40% dos soros assintomáticos reagem contra os três antígenos RIFIN produzidos (Figura 23). Em média os soros e indivíduos africanos reagem contra 2,5 ($\pm 1,39$) proteínas, indivíduos assintomáticos 2 ($\pm 1,3$), sintomáticos com baixa parasitemia 1,2 (± 1) e sintomáticos com alta parasitemia 2,3 ($\pm 1,15$).

Figura 23. Diferenças no perfil de reconhecimento de proteínas RIFIN

Diferenças nos padrões de reconhecimento de proteínas *RIFIN* recombinantes por soros de indivíduos residentes em área endêmica. Porcentagem de soros de indivíduos africanos (A), indivíduos sintomáticos com alta parasitemia (B), indivíduos ribeirinhos com baixa parasitemia (C) e indivíduos assintomáticos (D) capazes de reagir contra proteínas *RIFIN*.

4.7.5 Sororreatividade de Indivíduos Saudáveis Residentes Em Área Endêmica

Além das análises feitas com soros de indivíduos infectados por *P. falciparum*, utilizamos soros de indivíduos residentes nas comunidades ribeirinhas de Santo Antônio, Engenho Velho, Bate Estaca e Vila Candelária em Rondônia, saudáveis, sem infecção.

A avaliação do perfil de resposta destes indivíduos saudáveis, porém, expostos aos antígenos variantes da mesma população de parasitas dos indivíduos infectados, pode adicionar informações úteis sobre a importância da aquisição de um repertório de anticorpos contra estas proteínas de superfície da hemácia infectada.

Analizamos dois grupos de indivíduos saudáveis: O primeiro grupo com 29 amostras de soro de indivíduos residentes em área endêmica há mais de dez anos e com histórico anterior de pelo menos um episódio de malária, e o segundo grupo formado por soros de 10 crianças, com no máximo 11 anos de idade e residentes em área endêmica há menos de 10. Apenas 2 indivíduos deste grupo apresentaram episódio anterior de malária.

Comparando estes resultados às análises feitas com soros de indivíduos infectados por *P. falciparum* da mesma região, observamos que 58% dos soros dos indivíduos saudáveis residentes em área endêmica há mais de dez anos e 50% dos soros de crianças saudáveis residentes em área endêmica há menos de 10 anos reagiram contra pelo menos um antígeno DBL α freqüente. Esta freqüência de reconhecimento aumenta nos casos de indivíduos infectados pelo parasita da malária: 87% no caso de indivíduos assintomáticos e 68% de indivíduos sintomáticos (Figura 24).

Seguindo a tendência das análises anteriores, os antígenos DBL α raro foram menos reconhecidos: Apenas 14% dos soros do grupo de adultos saudáveis reconheceu pelo menos 1 antígeno DBL α raro. No grupo das crianças, esta a freqüência de reconhecimento baixa para 10%, bem inferior comparada aos 46% de assintomáticos e 40% de sintomáticos com baixa parasitemia.

Apenas 10% dos soros de indivíduos saudáveis do grupo 1 apresentaram níveis de IgG acima dos limiares de reatividade contra antígenos RIFIN. Nenhuma das amostras de soro de crianças apresentou reatividade contra proteínas RIFIN.

Figura 24. Freqüências de reconhecimento de antígenos variantes

Freqüência de reconhecimento de pelo menos um antígeno DBL α freqüentes, DBL α raro e *RIFIN* por soros de indivíduos saudáveis residentes em área endêmica há mais de dez anos (Saudáveis 1), há menos de dez anos (Saudáveis 2), indivíduos sintomáticos e assintomáticos infectados por *P. falciparum*. As amostras são derivadas das comunidades ribeirinhas de Santo Antônio, Engenho Velho, Bate Estaca e Vila Candelária, às margens do rio Madeira em Rondônia.

Indivíduos adultos saudáveis sem infecção reconheceram, em média, 1,3 domínios DBL α freqüentes. O grupo formado por crianças saudáveis reconheceu, em média, menos que uma proteína (0,7). Em relação aos domínios DBL α raros, a média de reconhecimento também foi baixa, cerca de 0,84 entre os adultos e 0,41 entre as crianças.

Analisando os índices de reatividades dos diversos grupos contra domínios DBL α freqüentes através de testes t (Tabela 4), não encontramos diferenças entre as respostas de indivíduos assintomáticos ($p=0,15$), sintomáticos com alta parasitemia ($p=0,53$) sintomáticos com baixa parasitemia ($p=0,39$) e africanos ($p=0,54$). Indivíduos não infectados residentes em área endêmica apresentaram reatividades mais baixas em relação a indivíduos sintomáticos de alta parasitemia ($p=0,01$), sintomáticos de baixa parasitemia ($p=0,006$) e assintomáticos ($p=0,018$). Indivíduos primoinfectados apresentaram respostas inferiores quando comparadas a indivíduos assintomáticos ($p=0,014$) e indivíduos sintomáticos com alta parasitemia ($p=0,003$). Porém, tais diferenças não puderam ser observadas quando comparamos estes indivíduos com residentes de área endêmica sem infecção ($p=0,68$), africanos ($p=0,76$) e indivíduos sintomáticos com baixa parasitemia ($p=0,12$).

Tabela 4. Estatística das respostas contra domínios DBL α freqüentes baseada em teste t

	Primoinfectados	Sintomáticos Alta Parasitemia	Sintomáticos Baixa Parasitemia	Assintomáticos	Africanos	Negativos
Primoinfectados						
Sintomáticos Alta Parasitemia	0,003					
Sintomáticos Baixa Parasitemia	0,12	0,23				
Assintomáticos	0,014	0,78	0,39			
Africanos	0,76	0,19	0,54	0,25		
Residentes em Área Endêmica Sem Infecção	0,68	3,3813E-06	0,005	0,021		

Comparação de valores p calculados através teste t a partir dos valores de sororreatividade de indivíduos residentes em área endêmica para malária contra 9 antígenos DBL α freqüentes. O valor é considerado significativo quando $p<0,05$.

Observando a quantidade de soros reativos contra pelo menos 1 antígeno DBL α freqüente e utilizando testes qui-quadrado (Tabela 5), observamos uma frequência maior de indivíduos indivíduos assintomáticos e sintomáticos com alta parasitemia positivos em relação a indivíduos sintomáticos com baixa parasitemia ($p=0,03$ e $p=0,05$). O número de soros reativos contras estes domínios do grupo de indivíduos sem infecção, residentes em área endêmica foi estatisticamente menor quando comparado à resposta em sintomáticos de alta parasitemia ($p=0,01$), baixa parasitemia ($p=0,006$), assintomáticos ($p=0,018$) e indivíduos africanos ($p=0,008$).

Soros de indivíduos residentes em área endêmica sem infecção apresentaram menor frequência de resposta contra antígenos DBL α frequentes quando comparados aos indivíduos sintomáticos com alta e baixa parasitemia ($p=0,01$ e $p=0,006$), assintomáticos ($p=0,018$), africanos ($p=0,008$) e primoinfectados ($p=0,009$).

Tabela 5. Estatística das respostas contra domínios DBL α frequentes baseada em testes Qui-quadrado

	Primoinfectados	Sintomáticos Alta Parasitemia	Sintomáticos Baixa Parasitemia	Assintomáticos	Africanos	Negativos
Primoinfectados						
Sintomáticos Alta Parasitemia	0,076					
Sintomáticos Baixa Parasitemia	0,037	0,05				
Assintomáticos	0,117	0,15	0,033			
Africanos	0,052	0,076	0,033	0,102		
Residentes em Área Endêmica Sem Infecção	0,009	0,01	0,006	0,018	0,008	

Comparação de valores p calculados através de teste qui-quadrado à partir das frequências de reatividade de soros de indivíduos residentes em área endêmica para malária contra pelo menos 1 antígeno DBL α frequente. O valor é considerado significativo quando $p<0,05$.

Em relação aos domínios DBL α raros, observamos uma menor reatividade de indivíduos sintomáticos com baixa parasitemia e indivíduos negativos residentes em área endêmica quando comparados a indivíduos com alta parasitemia ($p=0,0075$ e $p<0,0001$) e assintomáticos ($p=0,02$ e $p=0,003032$).

Tabela 6. Estatística das respostas contra domínios DBL α raros baseada em testes t.

	Primoinfectados	Sintomáticos Alta Parasitemia	Sintomáticos Baixa Parasitemia	Assintomáticos	Africanos	Negativos
Primoinfectados						
Sintomáticos Alta Parasitemia	0,731445					
Sintomáticos Baixa Parasitemia	0,294339	0,0075174				
Assintomáticos	0,671645	0,5396175	0,029465			
Africanos	-	-	-	-		
Residentes em Área Endêmica Sem Infecção	0,211831	8,0000E-03	0,432985	0,003032	-	

Comparação de valores p calculados através teste t a partir dos valores de sororreatividade de indivíduos residentes em área endêmica para malária contra 3 antígenos DBL α raros. O valor é considerado significativo quando $p < 0,05$.

Em análises feitas através de testes qui-quadrado (dados não mostrados), podemos observar valores muito baixos de p, pela baixa frequência de indivíduos reativos em todos os grupos. Nenhum dos indivíduos africanos apresentou reatividade contra os antígenos analisados e apenas um dos indivíduos primoinfectados reagiu contra um dos antígenos DBL α raros.

Utilizando testes t, em relação às respostas contra proteínas RIFIN, não encontramos diferenças entre indivíduos assintomáticos e sintomáticos com alta parasitemia ($p=0,30$). Porém, a resposta do grupo de indivíduos sintomáticos com baixa parasitemia mostrou-se menor quando comparada a ambos os grupos ($p=0,00015$ e $p<0,0001$). A resposta contra estes antígenos RIFIN em indivíduos africanos também não mostrou diferenças em relação a sintomáticos de alta parasitemia ($p=0,51$) e assintomáticos ($p=0,13$). Indivíduos primoinfectados apresentaram respostas menores quando comparados a indivíduos sintomáticos com alta parasitemia e indivíduos africanos. Porém, não foram encontradas diferenças entre sua resposta e respostas de indivíduos assintomáticos e sintomáticos com baixa parasitemia (Tabela 7).

Tabela 7. Estatística das respostas contra proteínas RIFIN baseada em testes t

	Primoinfectados	Sintomáticos Alta Parasitemia	Sintomáticos Baixa Parasitemia	Assintomáticos	Africanos	Negativos
Primoinfectados						
Sintomáticos Alta Parasitemia	0,03					
Sintomáticos Baixa Parasitemia	0,18	7,53E-05				
Assintomáticos	0,16	0,3	0,00015			
Africanos	0,018	0,5	0,0008	0,13		
Residentes em Área Endêmica Sem Infecção	0,07	8,39E-06	0,0085	4,92E-06	0,0002	

Comparação de valores p calculados através teste t a partir dos valores de sororreatividade de indivíduos residentes em área endêmica para malária contra 3 antígenos RIFIN recombinantes. O valor é considerado significativo quando $p < 0,05$.

Utilizando o teste qui-quadrado, uma quantidade menor de soros de indivíduos primoinfectados foi reativa contra pelo menos um antígeno RIFIN quando comparados aos grupos de indivíduos assintomáticos ($p=0,0001$), sintomáticos com alta parasitemia ($p < 0,0001$), sintomáticos com baixa parasitemia ($p < 0,0001$) e africanos ($p=0,0025$). Indivíduos residentes em área endêmica sem infecção também apresentaram menores quantidades de soros reativos quando comparados a sintomáticos com alta parasitemia ($p=0,0006$), sintomáticos com baixa parasitemia ($p=0,0002$), assintomáticos ($p=0,010$)(Tabela 8).

Tabela 8. Estatística Comparada das respostas contra proteínas RIFIN baseada em testes Qui-quadrado

	Primoinfectados	Sintomáticos Alta Parasitemia	Sintomáticos Baixa Parasitemia	Assintomáticos	Africanos	Negativos
Primoinfectados						
Sintomáticos Alta Parasitemia	8,81E-06					
Sintomáticos Baixa Parasitemia	3,35E-06	9,28E-07				
Assintomáticos	0,000124	3,38E-05	1,28E-05			
Africanos	0,002497	0,000656	0,000244	0,010306828		
Residentes em Área Endêmica Sem Infecção	1,58E-08	4,44E-09	1,72E-09	5,91387E-08	1,06E-06	

4.7.6 Cinética de Resposta de Anticorpos

Analizamos a cinética das respostas humorais contra antígenos recombinantes DBL α freqüentes, raros e proteínas *RIFIN* de 13 indivíduos infectados por *P. falciparum* residentes nas comunidades ribeirinhas de Santo Antônio, Engenho Velho, Bate Estaca e Vila Candelária às margens do rio Madeira em Rondônia. Foram realizadas 3 coletas em tempos diferentes (0, 30 e 60 dias) de 11 amostras de indivíduos assintomáticos e duas de indivíduos sintomáticos no momento da coleta inicial (tempo 0). Todos os indivíduos foram tratados com mefloquina/primaquina com acompanhamento médico em todas as visitas.

Soros de quatro indivíduos, incluindo os dois sintomáticos, não apresentaram reatividade contra nenhum dos antígenos DBL α e proteínas *RIFIN* em nenhum dos três pontos analisados. Porém, apresentaram reatividade contra proteínas MSP1₁₉ tanto de *P. vivax* quanto de *P. falciparum* nas três coletas realizadas.

Cinco indivíduos assintomáticos apresentaram, na amostra 0, reatividade contra múltiplos antígenos DBL α freqüentes. Porém, depois de 30 e 60 dias, observou-se, em todas as amostras, perda de reatividade contra todos os antígenos DBL α .

Outros 4 indivíduos apresentaram um padrão misto, com manutenção de reatividade contra alguns antígenos até sessenta dias após coleta inicial, ausência de reatividade contra determinados antígenos DBL α freqüentes em tempo 0 e aquisição de anticorpos contra estes mesmos antígenos após 30 dias (Figura 25).

Figura 25. Perfis de cinética das respostas humorais

Sororreatividade de 13 indivíduos infectados por *P. falciparum* (1 - 13) contra 9 antígenos recombinantes DBLα frequentes, 3 antígenos DBLα raros, 3 proteínas RIFIN e antígenos MSP_{1.19} de *P. falciparum* (P.f.) e de *P. vivax* (P.v.) em três tempos diferentes: 0 (Coleta inicial e tratamento com mefloquina/primaquina), 30 e 60 dias após coleta inicial. Quadrados em cinza claro indicam índices de reatividade maiores que 1, em cinza escuro indicam índices de reatividade maiores de 5 e quadrados em pretos significam índices de reatividade maiores que 10.

4.8 AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DBL α FREQUENTES

No próximo teste avaliamos se as seqüências inicialmente encontradas em muitos isolados de fato foram encontrados na maioria dos isolados. Para isso, desenhamos um par de oligonucleotídeos específicos para cada um dos domínios DBL α freqüentes analisados. Os oligonucleotídeos foram testados e para que sua especificidade fosse constatada, apenas o alelo desejado deveria ser amplificado em reações de PCR utilizando plasmídeos contendo seqüências correspondentes a cada um dos domínios.

Na figura 26 podemos observar o resultado dos testes de especificidade dos pares de oligonucleotídeos específicos para 4 domínios DBL α freqüentemente encontrados em isolados brasileiros.

Figura 26. Análise da especificidade de oligonucleotídeos DBL α freqüentes

Gel 1,5% de agarose com produtos de PCR. Os números de 1-11 indicam os resultados de PCRs com plasmídeos contendo a correspondente seqüência DBL α como substrato. **A.** Resultado de PCR com oligonucleotídeos correspondentes ao Grupo 1. **B.** Resultado de PCR com oligonucleotídeos correspondentes ao Grupo 5. **C.** Resultado de PCR com oligonucleotídeos correspondentes ao Grupo 7. **D.** Resultado de PCR com oligonucleotídeos correspondentes ao Grupo 9. **E.** Resultado de PCR com oligonucleotídeos correspondentes ao Grupo 11.

Além disso, a qualidade dos DNAs genômicos utilizados nas análises foram testados em reação de PCR com oligonucleotídeos degenerados (PETERS et al., 2002) que permitem a amplificação dos domínios DBL1 α da maioria do repertório de genes *var* da cepa 3D7 e de isolados de campo.

Na figura 27 podemos observar os resultados das reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada um dos grupos DBL α analisados e DNAs genômicos de 17 isolados de campo brasileiros, 7 isolados africanos e 4 isolados provenientes da Ásia e América Central. Em todos os ensaios foram incluídas amostras controle de DNA humano não infectado (H), um controle negativo (tubo com todos os reagentes menos DNA) e um controle positivo com plasmídeos contendo seqüências correspondentes ao grupo DBL α analisado (+).

Figura 27. Resultados da amplificação dos grupos DBL α freqüentes

Gel TAE 1,5% de agarose com produtos de PCR utilizando amostras de gDNA. **A.** Oligonucleotídeos correspondentes ao grupo 1. **B.** Oligonucleotídeos correspondentes ao grupo 7. **C.** Oligonucleotídeos correspondentes ao grupo 9. **D.** Oligonucleotídeos correspondentes ao grupo 11. O controle positivo foi feito com o plasmídeo do respectivo grupo. Além disso, foi utilizado DNA humano (H) como controle negativo da reação.

A tabela 9 mostra as freqüências de 4 grupos de domínios DBL α encontrados em amostras de DNAs genômicos divididas por região geográfica : Brasil, África e outros (incluindo Ásia e América central).

Tabela 9. Freqüências dos domínios DBL α conservados em gDNAs brasileiros, africanos e asiáticos

Grupo	gDNA brasileiros	gDNA africanos	Outros (Ásia e América central)	Quantidade de Isolados Analisados que Contêm a Seqüência Específica
1 <i>DQ265547</i>	13/17	1/7	1/4	16
7 <i>DQ265559</i>	10/17	5/7	1/4	6
9 <i>1535_106*</i>	16/17	7/7	3/4	7
11 <i>1238_57*</i>	12/17	5/7	3/4	12

Resultados da amplificação de gDNAs através de reação de PCR com oligonucleotídeos específicos para cada grupo DBL α freqüente.

Após análise da amplificação destes produtos de PCR através de gel de agarose, 5 bandas de tamanho esperado (250 – 400 Bp) foram cortadas do gel aleatoriamente, purificadas, clonadas em pTZ e seqüenciadas para a confirmação de sua seqüência.

A figura 27 mostra o resultado dos alinhamentos das seqüências dos 4 grupos DBL α freqüentes analisados utilizando o programa ClustalX 1.83. Foi analisado um clone de cada ligação, assim testando se a seqüência amplificada de isolados diferentes correspondia a seqüência inicialmente identificada. Como mostrado em Figura 28, após seqüenciamento de vários clones de isolados diferentes, não foi detectado nenhum polimorfismo nas seqüências oriundas de diferentes isolados.

Figura 28. Alinhamento de amplicons DBL α frequentes

Alinhamento feito no ClustalX 1.83 com seqüências dos amplicons dos grupo 1 (A), 7 (B), 9 (C) e 11 (D) junto com a seqüência original do clone de cada um dos grupos, confirmando a especificidade do produto amplificado por par de oligonucleotídeos específicos.

5 DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *P. FALCIPARUM* EM SISTEMA BACTERIANO

P. falciparum é conhecido por possuir um alto conteúdo de bases AT em seu genoma e também nas regiões codificadoras. Isto resulta em uma representação acima da média de aminoácidos com codons ricos em AT (Lisina, leucina, isoleucina, fenilalanina). Além disso, os organismos comumente utilizados para expressão de proteínas possuem um ‘*codon usage*’ diferente, o que leva a dificuldades na expressão de proteínas de *P. falciparum*. Em estudo recente, Mehlin e colaboradores conseguiram produzir apenas 65 das 1000 proteínas de *P. falciparum* propostas, de forma solúvel, em sistema bacteriano (MEHLIN et al., 2006). Em outro estudo, (AHUJA et al., 2006) desenvolveram uma predição de solubilidade para produção em bactéria de proteínas de *P. falciparum*. Essa predição foi baseada no modelo de (WILKINSON et al., 1991), e para domínios DBL α , a média de seqüências supostamente solúveis foi de apenas 24,9%.

Vários fatores têm sido relacionados a tais dificuldades de expressão: O parasita possui códons raros para *E. coli*, como AGA e ACG e um genoma com alto conteúdo de A/T, cerca de 80%, o quê torna comum a presença, em seu genoma, de “domínios perturbadores”, longas inserções repetitivas e de baixa complexidade separando blocos protéicos conservados, adjacentes, em proteínas homólogas de outros organismos (PIZZI et al., 2001).

A presença de códons raros para *E. coli* pode causar o término precoce do processo de tradução destas proteínas pelas bactérias, dando origem a formas truncadas destas proteínas. Além disso, os domínios perturbadores, presentes por todo o genoma de *P. falciparum* podem favorecer a formação de corpos de inclusão e proteínas com dobramento incorreto (formação de fibrilas), tornando insolúveis os produtos da expressão.

Além disso, existem, no genoma de *P. falciparum*, sítios crípticos de iniciação para *E. coli*, resultando em múltiplos produtos truncados quando estes genes são expressos em sistema bacteriano (TURGUT-BALIK et al., 2004).

Outros sistemas usando leveduras e células de inseto têm sido utilizados na tentativa de produzir, principalmente, proteínas que necessitam de um dobramento correto de domínios com cisteínas. Porém, o uso da bactéria *E. coli* para expressão heteróloga de proteínas tem muitas vantagens: como a simplicidade e rapidez dos procedimentos, o conhecimento amplo da genética de *E. coli*, a disponibilidade de diversas ferramentas moleculares, além da produção de altos níveis de proteína por unidade de biomassa, e, portanto, o baixo custo de procedimento. Estes fatores, além do sucesso de produção de antígenos DBL α em sistema bacteriano (FLICK et al., 2004) foram fatores decisivos na nossa escolha de usar a bactéria *E. coli* na produção de nossas proteínas.

Tivemos algumas dificuldades na expressão dos domínios selecionados. Proteínas insolúveis eram comumente obtidas, e apesar das diversas tentativas de ressolubilização através de protocolos de *refolding* como descrito em (OGUARIRI et al., 2001) não tivemos sucesso. Conduzimos, então, um '*teste de solubilidade*', com variações na concentração do agente indutor IPTG, temperatura, tempo de indução e adição de substâncias como etanol (VANBOGELEN et al., 1987) e sorbitol (PICAUD et al., 2007), conhecidas de incrementar a produção de proteínas recombinantes solúveis neste sistema. Além disso, testamos a expressão usando dois meios de cultura: 2YT, um meio mais rico e LB.

Figura 29. Diferentes condições de cultura durante expressão heteróloga

Diferentes condições de crescimento da cultura bacteriana durante expressão de antígenos variantes de *P. falciparum*.

Os testes de solubilidade realizados nos forneceram um panorama dos fatores que provavelmente influenciariam a obtenção de proteínas de *P. falciparum* solúveis: Baixa concentração (0,1 mM) de IPTG, 3 horas de indução a 37 °C e 'stress' da cultura bacteriana pré-indução. Porém, somente com o uso de uma cepa bacteriana enriquecida de *tRNAs* de códon raros e com mutações *trxb/gor*, chamada Rosetta gami (Novagen) e adição de DTT na cultura, tivemos sucesso decisivo na expressão solúvel da maioria dos domínios propostos.

O citoplasma de bactérias é ambiente muito reduzido para a formação de pontes dissulfeto (GILBERT et al., 1990). Algumas proteínas que, normalmente formariam pontes dissulfeto, quando expressas em citoplasma bacteriano, não são capazes de formar estas pontes (DERMAN et al., 1991). Porém, as bactérias *Rosetta gami* possuem mutações nas enzimas tioredoxina redutase e glutathione redutase que alteram o potencial redox de seu citoplasma, favorecendo a formação das pontes dissulfeto, aumentando a solubilidade das proteínas expressas neste sistema e diminuindo a presença de formas truncadas destes domínios. Além disso, a adição de um agente redutor no meio de cultura, como o DTT (dithiothreitol), promove um aumento no efeito dessas mutações (PRINZ et al., 1997).

As proteínas produzidas com a adição de DTT no meio de cultura apresentaram uma melhoria em sua expressão solúvel, alcançando os efeitos esperados.

Utilizamos o protocolo estabelecido, para uma expressar uma variedade de antígenos de *P. falciparum*: 12 domínios DBL α , três proteínas RIFIN e uma STEVOR, além de 4 domínios DBL β (dados não mostrados).

Todos os antígenos produzidos fusionados a GST foram reconhecidos através de ensaios de Western Blot utilizando soro murino anti-GST. Além disso, alguns domínios DBL α apresentaram reconhecimento quando confrontados com soros de indivíduos sintomáticos para *P. falciparum* da região de Porto Velho, RO, mostrando, portanto, a viabilidade do uso das proteínas produzidas neste sistema nos ensaios de ELISA. Cabe ressaltar que apesar de não serem capazes de gerar uma resposta contra a proteína nativa, proteínas DBL produzidas em sistema bacteriano tinham o mesmo desempenho em ELISAs (BARFOD et al., 2006).

5.2 SISTEMA DE EXPRESSÃO COM HEMOLISINA A

A hemolisina A é uma toxina secretada por bactérias *E. coli* enteropatogênicas através de um sistema de secreção tipo 1, sem intermediários periplasmáticos.

O C-terminal da hemolisina A (HlyA) da *E. coli* e proteínas fusionadas a ele em posição N-terminal são exportadas através do citoplasma pela membrana celular através de um mecanismo de transporte envolvendo um sinal de secreção específico, localizado nos últimos 50 aminoácidos do HlyA e as proteínas HlyB e HlyD (na citomembrana da bactéria) e TolC (na membrana periplasmática) para fora da bactéria (Figura 30).

Figura 30. Esquema do sistema de secreção da hemolisina A

Sistema de secreção da hemolisina A (adaptado de (THANABALU et al., 1998). Dois grupos de proteínas formam canais na membrana interna (oligômeros de hemolisina B e D) e na membrana externa (Trímeros de TolC) da bactéria. A presença de ATP e do C-terminal de hemolisina A leva a secreção de hemolisina e dos domínios heterólogos fusionados a ela, sem clivagem de peptídeos.

Como as PfEMP1s também são proteínas secretadas, resolvemos testar se haveria melhora na expressão de proteínas DBL α solúveis através do uso deste sistema de secreção.

O sistema de expressão utilizando os 9 vetores pUCSET apresentou funcionalidade somente em um primeiro teste, onde bactérias HB2151 transformadas com o vetor pUCA3 ou pLG612-1B produziram 6XHis-HlyA e HlyA, respectivamente.

Para tentar estabilizar o sistema, fizemos uma série de testes, como: Aumento e diminuição na temperatura de crescimento das culturas, aumento na concentração de IPTG e no tempo de indução das culturas. Além disso, refizemos as células bacterianas em meio mínimo M9 para garantir que não houvesse perda de TolC, envolvida no processo de exportação destas fusões para o meio.

Porém, os motivos pelos quais os resultados não foram reproduzíveis ainda continuam um mistério. Na literatura, o sistema foi descrito como robusto e mais que 400 proteínas diferentes foram expressas em fusão com HlyA (MOLLENKOPF et al., 1996). É notável que nenhuma proteína testada (2 domínios DBL α , PvMSP1₁₉ e PfMSP1₁₉) podia ser expressa em quantidades significativas (dados não mostrados). Potencialmente, a riqueza de pontes de dissulfeto de todas as proteínas testadas ou o *codon usage* pouco favorável são fatores críticos para expressão neste sistema.

5.3 AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DBL α FREQUENTEMENTE ENCONTRADAS EM ISOLADOS BRASILEIROS

Verificamos a presença dos genes *var* “*conservados*” (DBL α) em genomas de isolados brasileiros, latino americanos, africanos e asiáticos, através de reações de PCR com oligonucleotídeos específicos para cada sequência. Os testes só foram realizados após confirmação da especificidade dos oligonucleotídeos e da qualidade dos DNA genômicos utilizados.

Infelizmente, devido à alta identidade entre as sequências, alguns dos oligonucleotídeos apresentaram amplificação não-específica e tiveram que ser descartados. Porém, realizamos testes com 4 grupos de domínios DBL α frequentes que se mostraram específicos e tiveram sua presença confirmada em diversos isolados pelo mundo. Analisando a tabela 10 podemos observar que a sequência do grupo 1 foi amplificada em 13 dos 17 gDNAs brasileiros analisados e em 1 dos 7 africanos. A sequência do grupo 7 que é parte de *var1csa*, foi amplificada em 10 dos 17 gDNAs brasileiros e 5 dos 7 africanos. A sequência do grupo 9 foi encontrada em 16 dos 17 gDNAs brasileiros e nos 7 africanos utilizados. E, por último, a sequência do grupo 11 foi encontrada em 12 dos 17 gDNAs brasileiros e 5 dos 7 DNAs africanos.

Fora a seqüência do grupo 7, esperava-se encontrar estas seqüências em freqüências maiores entre gDNAs de parasitas brasileiros e menores em gDNAs de parasitas africanos. Porém, além do grupo 7, os grupos 9 e 11 foram encontrados, na maioria dos gDNAs africanos. Isto aponta para a existência de mais genes *var* (ou domínios DBL α) conservados entre isolados de origens geograficamente diferentes. No caso do grupo 7, esta alta freqüência era esperada devido ao fato deste domínio representar o gene *var1csa*, conservado independente da localização geográfica do isolado (FOWLER et al., 2002).

Assim como *var1csa*, outro gene amplamente conservado e envolvido na malária gestacional é o *var2csa*. É provável que estes genes inesperadamente conservados possuam algum papel biológico importante, se não, não os encontraríamos de forma tão consistente. Isto nos leva à nossa segunda hipótese: Os domínios analisados, e freqüentemente encontrados em isolados africanos, asiáticos e asiáticos, podem ser, também, 'arquétipos DBL α ', e portanto, serem conservados independentemente da região geográfica.

5.4 RESPOSTA DE ANTICORPOS IGG CONTRA ANTÍGENOS VARIANTES DE *P. FALCIPARUM*

Anticorpos específicos contra proteínas PfEMP1s expressas pelo parasita na superfície dos eritrócitos infectados foram muitas vezes associados à proteção aos sintomas clínicos causados pela doença (BULL et al., 1998; GIHA et al., 1999; HVIID et al., 2004; LUSINGU et al., 2006; STAALSO et al., 1998), porém, todos os estudos até agora foram conduzidos em regiões de alta endemicidade, diferente da situação das áreas brasileiras.

É importante salientar que diferenças nos padrões epidemiológicos africanos e brasileiros podem determinar diferenças nos perfis de resposta contra estes antígenos variantes, uma vez que a associação entre presença de anticorpos contra antígenos variantes e proteção contra a doença foi comprovada apenas em áreas com alta transmissão de malária. Já em áreas de transmissão baixa e instável, indivíduos adultos parecem não desenvolver um repertório completo de anticorpos contra antígenos variantes, apresentando baixos níveis de anticorpo contra estas

proteínas e, mesmo depois de adultos, ainda apresentando susceptibilidade a episódios clínicos da doença (VESTERGAARD et al., 2008).

A observação da freqüente presença de indivíduos assintomáticos em populações ribeirinhas da Amazônia (ALVES et al., 2002; DA SILVA-NUNES et al., 2007; FERREIRA et al., 2007) poderia significar títulos significantes de anticorpos contra antígenos variantes nos indivíduos destas populações ainda mais considerando a restrição na diversidade de genes variantes de *P. falciparum* em populações de parasitas brasileiros (ALBRECHT et al., 2006).

Assim, após algumas infecções o indivíduo residente em área endêmica entraria em contato com todo o repertório de parasitas circulantes, e deveria, portanto, apresentar anticorpos contra todos, ou pelo menos a maioria dos antígenos da população local de parasitas. Isto seria diferente da situação africana, onde o acúmulo de anticorpos contra variantes de PfEMP1 é lento, porque a probabilidade de contato repetido (reforço da resposta) do indivíduo com determinada variante é baixa, sendo que o repertório de antígenos é muito maior (BULL et al., 2005; FORSYTH et al., 1989; MARSH et al., 1986).

Adicionalmente, estudos mostram que a aquisição de imunidade aos sintomas clínicos agudos da doença, está intimamente ligada à associação de dois fatores: (1) presença de infecção assintomática e (2) presença de anticorpos IgG específicos contra o repertório de antígenos variantes circulantes (BULL et al., 2002; KINYANJUI et al., 2004). A presença de apenas uma destas condições parece não ter muita relevância, uma vez que estes fatores, independentemente, estão envolvidos com susceptibilidade de desenvolvimento de episódio clínico subsequente.

Realizamos, pela primeira vez, um estudo sobre o perfil de resposta de indivíduos brasileiros contra antígenos de superfície variantes de *P. falciparum* freqüentemente e raramente encontrados em isolados de parasitas brasileiros. As respostas obtidas neste trabalho poderão esclarecer dúvidas existentes sobre a importância destes antígenos no desenvolvimento de uma vacina contra a malária e confirmar, de fato, fortes diferenças entre as situações brasileira e africana em relação a esta doença.

Analisamos respostas contra 9 domínios DBL α freqüentemente encontrados, 3 antígenos DBL α raros, 3 proteínas recombinantes *RIFIN* e variantes da proteína MSP1₁₉ tanto de *P. vivax* quanto de *P. falciparum*.

Inicialmente, a resposta humoral parece estar direcionada a antígenos conservados como MSP1₁₉, uma vez que imunidade contra estes antígenos parece ser desenvolvida rapidamente devido a restrição na diversidade destes antígenos, porém, a associação entre respostas anti-MSP e proteção contra a malária tem sido uma controvérsia (DODOO et al., 1999; EGAN et al., 1996; LUSINGU et al., 2006; RILEY et al., 1992). Nossos dados corroboram com esta ambigüidade de resposta anti-MSP1₁₉, já que há vários indivíduos que não possuem resposta contra esta molécula e são assintomáticos (Figura 17).

Para desvendar possíveis diferenças nos perfis de resposta de indivíduos brasileiros vivendo em região endêmica para malária, analisamos os níveis de IgG específicos contra os antígenos recombinantes produzidos nos soros destes indivíduos através de reações de ELISA.

Em geral, obtivemos respostas muito baixas contra os diferentes domínios DBL α freqüentes e raros e proteínas RIFIN, fato observado em alguns indivíduos vivendo em área endêmica (GIHA et al., 1999; KINYANJUI et al., 2003; OFORI et al., 2002; OGUARIRI et al., 2001). Observamos também grande heterogeneidade nos perfis de resposta tanto de sintomáticos quanto de assintomáticos, com alguns indivíduos apresentando reatividade contra todos os antígenos analisados e outros não apresentando reatividade contra nenhuma das proteínas produzidas (Figuras 15, 16 e 17), fato observado anteriormente na literatura (BULL et al., 1999; LINDENTHAL et al., 2003; STAALSOE et al., 1999).

Não observamos reconhecimento preferencial de nenhum dos domínios DBL α freqüentes pelos soros analisados. Porém, analisando os índices de identidade das seqüências DBL α freqüentes, observamos através da correlação não-paramétrica de *Spearman* uma associação índices de identidade e reatividade, ou seja, domínios DBL α com índices de identidade maiores são geralmente reconhecidos pelos mesmos soros, o que poderia indicar reatividade cruzada entre os grupos DBL α com alta identidade (MOLL et al., 2007).

Estudos anteriores apontaram um maior reconhecimento de antígenos DBL α por soros de indivíduos africanos assintomáticos (OGUARIRI et al., 2001), porém, utilizando o teste t, não encontramos diferenças significativas entre reatividades contra domínios DBL α freqüentes entre indivíduos assintomáticos, sintomáticos com alta parasitemia e sintomáticos com baixa parasitemia (Tabela 4), o que pode indicar que as respostas contra estes antígenos estão mais associadas a presença do

parasita ou mesmo infecção aguda do que proteção contra sintomas clínicos. Apesar de terem sido medidos em sistemas e com antígenos diferentes, as respostas (número médio de antígenos diferentes reconhecidos) em indivíduos brasileiros considerados assintomáticos foram muito mais baixas que em indivíduos assintomáticos africanos (OGUARIRI et al., 2001), enfraquecendo a hipótese que anticorpos contra antígenos variantes possam de fato exercer um papel protetor e não meramente um indicador de infecção freqüente.

É possível que a escolha dos antígenos seja fator importante nas respostas obtidas. Pensava-se que peptídeos produzidos a partir de genes *var* freqüentemente encontrados fossem menos imunogênicos que antígenos derivados de seqüências com menor freqüência, explicando assim um suposto sucesso evolutivo dos alelos freqüentes. Esta possibilidade, porém, nos parece muito distante, já que as seqüências mais raras, de fato, não são mais reconhecidas.

Ao testar os soros de indivíduos primoinfectados por *P. falciparum* (informado pelo paciente) com os antígenos recombinantes produzidos, observamos que 72% dos soros apresentaram reatividade contra no mínimo um domínio DBL α freqüente. Dos soros positivos, 60% apresentaram reatividade contra múltiplos antígenos DBL α freqüentes que pode ser um indício que existe a indução de anticorpos com reação cruzada como sugerido antes (KRAUSE et al., 2007; MOLL et al., 2007). Por outro lado, foi mostrado anteriormente que no início da infecção o parasita sofre altas taxas de switching dos antígenos variantes PfEMP1, expondo o organismo hospedeiro a várias variantes PfEMP1, contra quais o organismo de fato reage (KRAUSE et al., 2007). Estes resultados também estão de acordo com estudo realizado anteriormente com soros de turistas australianos primoinfectados (ELLIOTT et al., 2007).

Foram testadas também séries de soros consecutivos após uma infecção aguda em pacientes ribeirinhos com baixa parasitemia. Analisando a meia-vida de anticorpos contra antígenos variantes de superfície, percebemos uma heterogeneidade em relação à duração da resposta humoral contra os diversos antígenos analisados. Tal característica também foi observada na literatura, com prevalência de anticorpos contra antígenos variantes de superfície em crianças quenianas foi de até 12 semanas após episódio clínico (KINYANJUI et al., 2003). Outros autores observaram anticorpos ainda depois 100 dias (KRAUSE et al., 2007). Em nossas análises, realizamos apenas dois acompanhamentos: 4 e 8 semanas

após coleta inicial e observamos, em diversos indivíduos, que a resposta a certos antígenos DBL α era perdida já na quarta semana. Em outros, observou-se resposta contra alguns antígenos apenas depois de 4 ou 8 semanas, sem um padrão determinado. Todavia, respostas contra proteínas MSP1₁₉ se mantiveram, na maioria dos indivíduos, presentes durante as 8 semanas, sofrendo, em alguns indivíduos, uma pequena redução de intensidade. Estas variações na cinética das respostas humorais contra estes antígenos podem depender de características genéticas de cada indivíduo ou podem, também, refletir diferenças no grau de exposição prévia a malária ou no *priming* diferencial de linfócitos por antígenos diferentes. Em um estudo conduzido com crianças africanas sem parasita circulante, foi observado que estas também apresentaram níveis menores de anticorpos contra antígenos variantes de superfície quando comparadas a crianças assintomáticas com baixa parasitemia, porém com parasita circulante (KINYANJUI et al., 2004), indicando um rápido decaimento da resposta.

Em relação às respostas contra proteínas recombinantes RIFIN, não encontramos diferenças estatísticas, utilizando o teste t, entre as respostas de indivíduos assintomáticos, sintomáticos com alta parasitemia e africanos. Porém, os grupos de indivíduos sintomáticos com baixa parasitemia e residentes em área endêmica não infectados tiveram respostas menores (Tabela 8) quando comparados a todos os outros grupos.

Utilizando o teste qui-quadrado, indivíduos africanos apresentaram um número maior de soros positivos contra proteínas RIFIN recombinantes quando comparados a todos os outros grupos (Tabela 9). Entretanto, o número de soros analisados é muito pequeno para conclusões.

As respostas e o número de indivíduos não infectados, porém residentes em área endêmica reativos contra proteínas RIFIN foram significativamente menores, quando comparadas a todos os outros grupos, indicando, mais uma vez, que a presença do parasita circulante tem uma forte ligação com a presença de anticorpos contra estas proteínas. Tal fato foi previamente relatado na literatura (ABDEL-LATIF et al., 2004), e os níveis de respostas parecem depender de características individuais e da presença ou ausência do parasita *P. falciparum* nos indivíduos analisados.

Em resumo, nosso estudo apontou diferenças claras entre os padrões de respostas de indivíduos brasileiros e africanos contra domínios DBL α , com maior irregularidade de reconhecimento destes antígenos entre indivíduos brasileiros.

Esperávamos encontrar maior reconhecimento destes antígenos entre os soros de indivíduos assintomáticos, uma vez que a manutenção da infecção crônica, possibilita o contato do sistema imune do hospedeiro com diversas variantes protéicas, expressas pelo parasita através do mecanismo de variação antigênica. Porém, não encontramos uma relação clara entre o reconhecimento de antígenos PfEMP1-DBL α e o status de assintomático, uma vez que algumas amostras de soro de indivíduos assintomáticos não apresentaram reatividade contra nenhum dos antígenos testados, incluindo variantes da proteína MSP1₁₉. Adicionalmente, o perfil de resposta de indivíduos sintomáticos com alta parasitemia contra estes antígenos sugere que uma resposta forte parece ocorrer em função de uma alta carga parasitária.

Acreditamos que a medição da resposta de diversos grupos de indivíduos expostos contra antígenos variantes potencialmente em circulação em área hipoendêmica como a situação brasileira traz novos dados importantes, não exatamente favoráveis, em relação à importância da resposta anti-PfEMP1 na proteção contra malária. Se a resposta protetora é fundada na resposta humoral, antígenos essenciais para proteção teriam que ser reconhecidos por 100% dos indivíduos assintomáticos, protegidos dos sintomas clínicos da malária. Isto não é o caso para nenhum dos antígenos testados neste estudo, e desconsiderado a especificidade-fina de anticorpos contidos nos soros/plasmas, tanto as respostas anti-PfEMP1, anti-RIFIN, quanto anti-MSP1₁₉ parecem ocorrer muito mais em função da resposta particular de cada indivíduo e de exposição ao parasita.

6 CONCLUSÕES

1. A resposta humoral contra antígenos variantes é mais irregular em populações brasileiras que em indivíduos africanos.
2. Não existe uma clara relação entre reconhecimento de antígenos variantes PfEMP1-DBL α e RIFIN e proteção contra sintomas clínicos da malária em situação hipoendêmica. A presença de anticorpos contra estes antígenos parece estar muito mais associada à presença do parasita circulante.
3. Encontramos outros alelos DBL α conservados em diversas regiões geográficas do mundo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATIF, M. S. et al. Antibodies to rifin: a component of naturally acquired responses to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens on infected erythrocytes. Am J Trop Med Hyg, v. 71, n. 2, Aug, p.179-86. 2004.

_____. Antibodies to *Plasmodium falciparum* rifin proteins are associated with rapid parasite clearance and asymptomatic infections. Infect Immun, v. 71, n. 11, Nov, p.6229-33. 2003.

_____. Recognition of variant Rifin antigens by human antibodies induced during natural *Plasmodium falciparum* infections. Infect Immun, v. 70, n. 12, Dec, p.7013-21. 2002.

AHUJA, S. et al. Prediction of solubility on recombinant expression of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domains in *Escherichia coli*. Malar J, v. 5, n., p.52. 2006.

ALBRECHT, L. et al. Extense variant gene family repertoire overlap in Western Amazon *Plasmodium falciparum* isolates. Mol Biochem Parasitol, v. 150, n. 2, Dec, p.157-65. 2006.

ALVES, F. P. et al. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. Am J Trop Med Hyg, v. 66, n. 6, Jun, p.641-8. 2002.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K. et al. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. Clin Exp Immunol, v. 133, n. 2, Aug, p.145-52. 2003.

BARFOD, L. et al. Baculovirus-expressed constructs induce immunoglobulin G that recognizes VAR2CSA on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Infect Immun, v. 74, n. 7, Jul, p.4357-60. 2006.

BARRY, A. E. et al. Population genomics of the immune evasion (var) genes of *Plasmodium falciparum*. PLoS Pathog, v. 3, n. 3, Mar, p.e34. 2007.

BARUCH, D. I. et al. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. Cell, v. 82, n. 1, Jul 14, p.77-87. 1995.

BEESON, J. G. et al. Parasite adhesion and immune evasion in placental malaria. Trends Parasitol, v. 17, n. 7, Jul, p.331-7. 2001.

BOYLE, J. S. e LEW, A. M. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. Trends Genet, v. 11, n. 1, Jan, p.8. 1995.

BULL, P. C. et al. Antibody recognition of *Plasmodium falciparum* erythrocyte surface antigens in Kenya: evidence for rare and prevalent variants. Infect Immun, v. 67, n. 2, Feb, p.733-9. 1999.

_____. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. Nat Med, v. 4, n. 3, Mar, p.358-60. 1998.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BULL, P. C. e MARSH, K. The role of antibodies to Plasmodium falciparum-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. Trends Microbiol, v. 10, n. 2, Feb, p.55-8. 2002.

BULL, P. C. et al. Plasmodium falciparum antigenic variation: relationships between in vivo selection, acquired antibody response, and disease severity. J Infect Dis, v. 192, n. 6, Sep 15, p.1119-26. 2005.

CAMARGO, E. P. A malária encenada no grande teatro social. Revista do Instituto de Estudos Avançados da USP, v. 24, n. 24, p. 211-230, 1995.

CHEN, Q. The naturally acquired immunity in severe malaria and its implication for a PfEMP-1 based vaccine. Microbes Infect, v. 9, n. 6, May, p.777-83. 2007.

CHENG, Q. et al. stevor and rif are Plasmodium falciparum multicopy gene families which potentially encode variant antigens. Mol Biochem Parasitol, v. 97, n. 1-2, Nov 30, p.161-76. 1998.

DA SILVA-NUNES, M. e FERREIRA, M. U. Clinical spectrum of uncomplicated malaria in semi-immune Amazonians: beyond the " symptomatic " vs " asymptomatic " dichotomy. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 102, n. 3, Jun, p.341-7. 2007.

DEITSCH, K. W. e HVIID, L. Variant surface antigens, virulence genes and the pathogenesis of malaria. Trends Parasitol, v. 20, n. 12, Dec, p.562-6. 2004.

DERMAN, A. I. e BECKWITH, J. Escherichia coli alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. J Bacteriol, v. 173, n. 23, Dec, p.7719-22. 1991.

DODOO, D. et al. Levels of antibody to conserved parts of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 in Ghanaian children are not associated with protection from clinical malaria. Infect Immun, v. 67, n. 5, May, p.2131-7. 1999.

EGAN, A. F. et al. Clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. J Infect Dis, v. 173, n. 3, Mar, p.765-9. 1996.

ELLIOTT, S. R. et al. Antibody recognition of heterologous variant surface antigens after a single Plasmodium falciparum infection in previously naive adults. Am J Trop Med Hyg, v. 76, n. 5, May, p.860-4. 2007.

FERREIRA, M. U. et al. Anemia and iron deficiency in school children, adolescents, and adults: a community-based study in rural Amazonia. Am J Public Health, v. 97, n. 2, Feb, p.237-9. 2007.

FLICK, K. et al. Optimized expression of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains in Escherichia coli. Malar J, v. 3, n. 1, Dec 15, p.50. 2004.

FORSYTH, K. P. et al. Diversity of antigens expressed on the surface of erythrocytes infected with mature Plasmodium falciparum parasites in Papua New Guinea. Am J Trop Med Hyg, v. 41, n. 3, Sep, p.259-65. 1989.

FOWLER, E. V. et al. Genetic diversity of the DBLalpha region in Plasmodium falciparum var genes among Asia-Pacific isolates. Mol Biochem Parasitol, v. 120, n. 1, Mar, p.117-26. 2002.

FREITAS-JUNIOR, L. H. et al. Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. Nature, v. 407, n. 6807, Oct 26, p.1018-22. 2000.

GARDNER, M. J. et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nature, v. 419, n. 6906, Oct 3, p.498-511. 2002.

GIHA, H. A. et al. Nine-year longitudinal study of antibodies to variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Infect Immun, v. 67, n. 8, Aug, p.4092-8. 1999.

GIL, L. H. et al. Urban and suburban malaria in Rondonia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmissions with high anopheline densities are associated with human environmental changes. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 102, n. 3, Jun, p.271-6. 2007.

GILBERT, H. J. et al. The N-terminal region of an endoglucanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa* constitutes a cellulose-binding domain that is distinct from the catalytic centre. Mol Microbiol, v. 4, n. 5, May, p.759-67. 1990.

GUERRA, C. A. et al. The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. PLoS Med, v. 5, n. 2, Feb, p.e38. 2008.

GUPTA, S. et al. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. Nat Med, v. 5, n. 3, Mar, p.340-3. 1999.

_____. Theoretical studies of the effects of heterogeneity in the parasite population on the transmission dynamics of malaria. Proc Biol Sci, v. 256, n. 1347, Jun 22, p.231-8. 1994.

HEDDINI, A. Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces. Int J Parasitol, v. 32, n. 13, Dec 4, p.1587-98. 2002.

HILLER, N. L. et al. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. Science, v. 306, n. 5703, Dec 10, p.1934-7. 2004.

HVIID, L. e STAALSOE, T. Malaria immunity in infants: a special case of a general phenomenon? Trends Parasitol, v. 20, n. 2, Feb, p.66-72. 2004.

JANSSEN, C. S. et al. *Plasmodium* interspersed repeats: the major multigene superfamily of malaria parasites. Nucleic Acids Res, v. 32, n. 19, p.5712-20. 2004.

KINYANJUI, S. M. et al. Kinetics of antibody responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte variant surface antigens. J Infect Dis, v. 187, n. 4, Feb 15, p.667-74. 2003.

_____. Protection against clinical malaria by heterologous immunoglobulin G antibodies against malaria-infected erythrocyte variant surface antigens requires interaction with asymptomatic infections. J Infect Dis, v. 190, n. 9, Nov 1, p.1527-33. 2004.

KRAEMER, S. M. e SMITH, J. D. Evidence for the importance of genetic structuring to the structural and functional specialization of the *Plasmodium falciparum* var gene family. Mol Microbiol, v. 50, n. 5, Dec, p.1527-38. 2003.

KRAUSE, D. R. et al. Characterization of the antibody response against *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 in human volunteers. Infect Immun, v. 75, n. 12, Dec, p.5967-73. 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v. 227, n. 5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

LEECH, J. H. et al. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J Exp Med, v. 159, n. 6, Jun 1, p.1567-75. 1984.

LINDENTHAL, C. et al. Commonly recognised Plasmodium falciparum parasites cause cerebral malaria. Parasitol Res, v. 91, n. 5, Nov, p.363-8. 2003.

LUSINGU, J. P. et al. Levels of plasma immunoglobulin G with specificity against the cysteine-rich interdomain regions of a semiconserved Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1, VAR4, predict protection against malarial anemia and febrile episodes. Infect Immun, v. 74, n. 5, May, p.2867-75. 2006.

MARSH, K. Malaria--a neglected disease? Parasitology, v. 104 Suppl, n., p.S53-69. 1992.

MARSH, K. e HOWARD, R. J. Antigens induced on erythrocytes by P. falciparum: expression of diverse and conserved determinants. Science, v. 231, n. 4734, Jan 10, p.150-3. 1986.

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

MARTI, M. et al. Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte. J Cell Biol, v. 171, n. 4, Nov 21, p.587-92. 2005.

MCCROBERT, L. et al. Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the Plasmodium falciparum life cycle. Infect Immun, v. 72, n. 11, Nov, p.6597-602. 2004.

MEHLIN, C. et al. Heterologous expression of proteins from Plasmodium falciparum: results from 1000 genes. Mol Biochem Parasitol, v. 148, n. 2, Aug, p.144-60. 2006.

MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. Nature, v. 415, n. 6872, Feb 7, p.673-9. 2002.

MILLER, L. H. e FREMOUNT, H. N. The sites of deep vascular schizogony in chloroquine-resistant Plasmodium berghei in mice. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 63, n. 2, p.195-7. 1969.

MOLL, K. et al. Generation of cross-protective antibodies against Plasmodium falciparum sequestration by immunization with an erythrocyte membrane protein 1-duffy binding-like 1 alpha domain. Infect Immun, v. 75, n. 1, Jan, p.211-9. 2007.

MOLLENKOPF, H. J. et al. Conversion of bacterial gene products to secretion-competent fusion proteins. Biotechniques, v. 21, n. 5, Nov, p.854, 6-60. 1996.

OCKENHOUSE, C. F. et al. Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria: differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1. J Infect Dis, v. 164, n. 1, Jul, p.163-9. 1991.

OFORI, M. F. et al. Malaria-induced acquisition of antibodies to Plasmodium falciparum variant surface antigens. Infect Immun, v. 70, n. 6, Jun, p.2982-8. 2002.

OGUARIRI, R. M. et al. High prevalence of human antibodies to recombinant Duffy binding-like alpha domains of the Plasmodium falciparum-infected erythrocyte membrane protein 1 in semi-immune adults compared to that in nonimmune children. Infect Immun, v. 69, n. 12, Dec, p.7603-9. 2001.

PETERS, J. et al. High diversity and rapid changeover of expressed var genes during the acute phase of Plasmodium falciparum infections in human volunteers. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 99, n. 16, Aug 6, p.10689-94. 2002.

PETTER, M. et al. Variant proteins of the Plasmodium falciparum RIFIN family show distinct subcellular localization and developmental expression patterns. Mol Biochem Parasitol, v. 156, n. 1, Nov, p.51-61. 2007.

PICAUD, S. et al. Improved conditions for production of recombinant plant sesquiterpene synthases in Escherichia coli. Protein Expr Purif, v. 51, n. 1, Jan, p.71-9. 2007.

PIZZI, E. e FRONTALI, C. Low-complexity regions in Plasmodium falciparum proteins. Genome Res, v. 11, n. 2, Feb, p.218-29. 2001.

PLEASS, R. J. e HOLDER, A. A. Opinion: antibody-based therapies for malaria. Nat Rev Microbiol, v. 3, n. 11, Nov, p.893-9. 2005.

PRINZ, W. A. et al. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. J Biol Chem, v. 272, n. 25, Jun 20, p.15661-7. 1997.

RILEY, E. M. et al. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of Plasmodium falciparum are associated with reduced malaria morbidity. Parasite Immunol, v. 14, n. 3, May, p.321-37. 1992.

ROBERTS, D. J. et al. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. Nature, v. 357, n. 6380, Jun 25, p.689-92. 1992.

RUANGJIRACHUPORN, W. et al. Ultrastructural analysis of fresh Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and their cytoadherence to human leukocytes. Am J Trop Med Hyg, v. 46, n. 5, May, p.511-9. 1992.

SAMBROOK, J. et al. Molecular cloning: A laboratory manual. v., n. 1989.

SCHERF, A. et al. Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in Plasmodium falciparum. Embo J, v. 17, n. 18, Sep 15, p.5418-26. 1998.

SCHLAGENHAUF, P. Malaria: from prehistory to present. Infect Dis Clin North Am, v. 18, n. 2, Jun, p.189-205, table of contents. 2004.

SCHREIBER, N. et al. Expression of Plasmodium falciparum 3D7 STEVOR proteins for evaluation of antibody responses following malaria infections in naive infants. Parasitology, v. 135, n. 2, Feb, p.155-67. 2008.

SNOW, R. W. et al. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. Nature, v. 434, n. 7030, Mar 10, p.214-7. 2005.

STAALSO, T. et al. Antibody reactivity to conserved linear epitopes of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). Immunol Lett, v. 60, n. 2-3, Feb, p.121-6. 1998.

STAALSOE, T. et al. Detection of antibodies to variant antigens on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by flow cytometry. Cytometry, v. 35, n. 4, Apr 1, p.329-36. 1999.

STEVENSON, M. M. e RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. Nat Rev Immunol, v. 4, n. 3, Mar, p.169-80. 2004.

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

SU, X. Z. et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Cell, v. 82, n. 1, Jul 14, p.89-100. 1995.

SUTHERLAND, C. J. Stevor transcripts from Plasmodium falciparum gametocytes encode truncated polypeptides. Mol Biochem Parasitol, v. 113, n. 2, Apr 6, p.331-5. 2001.

THANABALU, T. et al. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from E.coli: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. Embo J, v. 17, n. 22, Nov 16, p.6487-96. 1998.

TUIKUE NDAM, N. G. et al. High level of var2csa transcription by Plasmodium falciparum isolated from the placenta. J Infect Dis, v. 192, n. 2, Jul 15, p.331-5. 2005.

TURGUT-BALIK, D. et al. Cloning, sequence and expression of the lactate dehydrogenase gene from the human malaria parasite, Plasmodium vivax. Biotechnol Lett, v. 26, n. 13, Jul, p.1051-5. 2004.

TZSCHASCHEL, B. D. et al. An Escherichia coli hemolysin transport system-based vector for the export of polypeptides: export of Shiga-like toxin IIeB subunit by Salmonella typhimurium aroA. Nat Biotechnol, v. 14, n. 6, Jun, p.765-9. 1996.

UDOMSANGPETCH, R. et al. Cytoadherence of knobless Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and its inhibition by a human monoclonal antibody. Nature, v. 338, n. 6218, Apr 27, p.763-5. 1989.

URBAN, B. C. et al. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. Nature, v. 400, n. 6739, Jul 1, p.73-7. 1999.

VANBOGELEN, R. A. et al. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in Escherichia coli. J Bacteriol, v. 169, n. 1, Jan, p.26-32. 1987.

VESTERGAARD, L. S. et al. Differences in human antibody reactivity to Plasmodium falciparum variant surface antigens are dependent on age and malaria transmission intensity in northeastern Tanzania. Infect Immun, v. 76, n. 6, Jun, p.2706-14. 2008.

WILKINSON, D. L. e HARRISON, R. G. Predicting the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli. Biotechnology (N Y), v. 9, n. 5, May, p.443-8. 1991.

WINTER, G. et al. The 3D7var5.2 (var COMMON) type var gene family is commonly expressed in non-placental *Plasmodium falciparum* malaria. Mol Biochem Parasitol, v. 127, n. 2, Apr 3, p.179-91. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO guidelines for the treatment of malaria. In: Press W, editor.; 2006.