UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Estabelecimento de um ensaio funcional de ligação de
proteínas de merozoítas de *Plasmodium vivax* a
eritrócitos humanos por citometria de fluxo**

Kátia Sanches Françoso

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Estabelecimento de um ensaio funcional de ligação de
proteínas de merozoítas de *Plasmodium vivax* a
eritrócitos humanos por citometria de fluxo**

Kátia Sanches Françoso

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F826e Françoso, Kátia Sanches
Estabelecimento de um ensaio funcional de ligação de proteínas
de merozoítas de *Plasmodium vivax* a eritrócitos humanos por
citometria de fluxo / Kátia Sanches Françoso. -- São Paulo,
2012.
106p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Soares, Irene da Silva

1. Parasitologia clínica 2. Malária 3. Imunologia : Plasmodium
vivax 4. Citometria de fluxo : Prática I. T. II. Soares, Irene da
Silva, orientador.

616.96 CDD

Estabelecimento de um ensaio funcional de ligação de
proteínas de merozoítas de *Plasmodium vivax* a eritrócitos
humanos por citometria de fluxo

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Irene da Silva Soares
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Trabalho realizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro concedido pela FAPESP e PRONEX-Rede Malária.

“Seja a mudança que você
quer ver no mundo”

Mahatma Ghandi

Dedicatória

Aos meus pais, responsáveis pela formação do meu caráter e pelas bases da minha educação. Agradeço pelo apoio constante, pelo incentivo ao estudo e, principalmente, pelo amor incondicional.

Ao meu irmão Alexandre pelo companheirismo de uma vida toda, pela amizade e incentivo constante.

Dedicatória

Ao meu marido Denis Santos que, diariamente, me apoia e me incentiva a lutar pelos meus sonhos. Essa pessoa extraordinária, que me faz rir todos os dias e me faz acreditar que o amanhã será ainda melhor que o hoje. Obrigada por todo o companheirismo, o carinho e a compreensão. TE AMO!.

AGRADECIMENTOS

À todos meus professores e mestres, que, desde minha tenra infância, sedimentaram, cada qual, um tijolinho em minha formação.

À Profa. Dra. Irene da Silva Soares pela oportunidade de desenvolver este trabalho de mestrado sob sua orientação. Pela confiança em mim depositada, por acreditar que eu poderia desenvolver um bom trabalho. Por seus ensinamentos e sua contribuição em minha formação científica.

Ao Prof. Magnus Ake Gidlund e ao Daniel Ketelhuth que me orientaram na minha iniciação científica e plantaram a semente do encantamento pela ciência.

Ao Prof. Dr. Gerhard Wunderlich e à Profa. Karina Inácio Ladislau de Carvalho Salmazi pelas sugestões e críticas na banca de qualificação.

À Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara por sua participação em minha banca de qualificação, pela ajuda com as fenotipagens do antígeno Duffy e, principalmente, por sua disposição em me ensinar.

À empresa Fresenius Kabi pela doação do kit para fenotipagem do antígeno Duffy.

À Profa. Dra. Silvia Boscardin pelas discussões científicas, pelo apoio nas transfecções celulares e pela disposição constante em ajudar e ensinar.

À Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa, pela amizade, pela disposição em ensinar e pelos ensinamentos em citometria de fluxo.

À Profa. Dra. Luzia Helena Carvalho por ceder o plasmídeo pEGFP-*dbp*. Ao Dr. Joon-Yong Chung por ceder o plasmídeo pDisplay-EGFP e ao Prof. Chetan Chitnis por ceder a proteína PvDBP-R11. Sem estes materiais, esse trabalho nunca teria sido desenvolvido. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Bettina Malnic e seus alunos, pela atenção e por disponibilizar o microscópio de fluorescência.

Aos funcionários da Pós-graduação Ana Dantas, Jorge e Elaine pelos serviços prestados e pela disposição em ajudar.

Aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela disposição em compartilhar equipamentos, reagentes e conhecimento.

À Renata Albuquerque, pelos ensinamentos em citometria de fluxo, pelas discussões científicas, pela prontidão em ajudar, mas principalmente, pela amizade e companheirismo.

Às amigas do Laboratório de Parasitologia: Patrícia Ostermayer, Victória Simão e Mayne Pereira, pela amizade, pela compreensão e companheirismo diário.

Às alunas de iniciação científica Tatiana Dagli Hernandez, Mariana Vilela, Paula Coelho Fernandes e Montse Léon García, cujos projetos eu tive a oportunidade de acompanhar de perto e que me encham de orgulho quando mostram o que aprenderam e ainda ganham prêmios! Vocês fazem o meu trabalho valer a pena!

À Elaine Cristina Matos Vicentin, minha irmã de coração, pela amizade inabalável, pelo apoio constante em toda essa trajetória, pelo companheirismo e incentivo.

À Amanda Romagnoli Bittencourt, minha amiga e companheira, pelo incentivo, pelas risadas diárias, os momentos incríveis e a amizade sincera.

À Luciana Lima, pela amizade, companheirismo, por compartilhar momentos especiais, pela prontidão em ajudar. E claro, muito obrigada por seus “dotes informáticos”!

À Tatiana Fraga, que desde a graduação acompanha os meus passos e compartilha os sucessos e angústias nas expressões protéticas. Obrigada pelo ombro amigo, sempre presente.

À Maria Inês Quintana e Patrícia Paschoal, pelo profissionalismo, pelos conselhos e pela dedicação. Sou uma pessoa de sorte por tê-las em minha vida.

À minha família, tios, primos e avós, por acreditarem em mim, pela dedicação constante, por estarem ao meu lado, sempre. Vocês são o alicerce da minha vida.

À minha sogra Marta dos Santos pela confiança, amizade e companheirismo. À minha cunhada Ana Cláudia Santos, pela amizade e incentivo.

Ao meu avô Juan Fernando Sanches García, minha inspiração diária, pelo amor e pelos ensinamentos. Você é meu exemplo de garra e superação. O pouco tempo que convivi com você foi um curso intensivo para a vida. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao meu primo Eduardo Françoso Geloramo, que se foi tão cedo, mas deixou plantado em mim a alegria de viver e a certeza de que devemos aproveitar cada dia, cada minuto de vida.

A todos os meus amigos que encham a minha vida de alegria e paz.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Epidemiologia da malária.....	02
1.2. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	03
1.3. Processo de invasão de eritrócitos por merozoítas de <i>Plasmodium</i>	05
1.3.1. Proteína 1 da Superfície de Merozoítas (MSP1).....	08
1.3.2. Proteína Ligante de Duffy (DBP).....	11
1.3.3. Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1).....	13
1.4. Papel dos anticorpos contra proteínas de merozoítas na imunidade contra malária.....	18
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	25
3.1.1. Expressão e purificação da proteína recombinante correspondente à PvMSP1 ₁₉	25
3.1.2. Expressão e purificação da proteína recombinante correspondente ao domínio II de PvAMA-1 (PvAMA-1 _{DII}).....	26
3.1.3. Expressão e purificação da proteína recombinante correspondente ao ectodomínio de PvAMA-1 (PvAMA-1 _E).....	27
3.1.4. Expressão e purificação da proteína recombinante correspondente aos domínio I-II de PvAMA-1 em <i>Pichia pastoris</i> (yPvAMA-1 _{D-I-II}).....	29
3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio.....	32

3.3. Ensaio de <i>immunoblotting</i>	39
3.4. Obtenção de soros policlonais de camundongos.....	33
3.5. Fenotipagem do antígeno Duffy.....	34
3.6. Ensaio de ligação das proteínas recombinantes a eritrócitos humanos utilizando citometria de fluxo.....	35
3.7. Plasmídeos recombinantes para transfecção celular.....	36
3.8. Transfecção de células COS-7.....	37
3.9. Avaliação da expressão de proteínas na superfície de células COS-7 transfectadas.....	38
3.10. Ensaio de citoaderência para avaliação da ligação de proteínas a eritrócitos.....	39
3.11. Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes de <i>P. vivax</i>	42
4.2. Ensaio de ligação das proteínas recombinantes a eritrócitos humanos utilizando citometria de fluxo.....	43
4.3. Ensaio de ligação das proteínas de merozoítas de <i>P. vivax</i> a eritrócitos humanos por citoaderência.....	50
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÕES.....	68
7. BIBLIOGRAFIA.....	70
8. ANEXOS.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida do <i>Plasmodium sp.</i>	04
Figura 2.	Representação esquemática do processo de invasão do merozoíta ao eritrócito.....	06
Figura 3.	Processamento da MSP1.....	09
Figura 4.	Representação esquemática da Proteína Ligante de Duffy (DBP).....	12
Figura 5.	Representação esquemática do Antígeno 1 de Membrana Apical.....	14
Figura 6.	Representação esquemática do modelo de interação das proteínas AMA-1 e RON2 no momento da invasão.....	17
Figura 7.	Representação esquemática da construção do gene <i>pvama-1_E</i> clonado no vetor pPIC9K para expressão em <i>Pichia pastoris</i>	28
Figura 8.	Representação esquemática da construção do gene <i>pvama-1_{di-ii}</i> clonado no vetor pPIC9K para expressão em <i>Pichia pastoris</i>	30
Figura 9.	Análise em SDS-PAGE 15% das proteínas recombinantes produzidas após purificação.....	42
Figura 10.	Análise em SDS-PAGE 12% da proteína recombinante baseada nos domínios I-II de <i>PvAMA-1</i> produzida em <i>P. pastoris</i> (<i>yPvAMA-1_{DI-II}</i>)...	43
Figura 11.	Estratégia de análise adotada para avaliar a ligação de proteínas a eritrócitos por citometria de fluxo.....	44
Figura 12.	Curvas dose-resposta da ligação de proteínas a eritrócitos humanos	45
Figura 13.	Curvas dose-resposta da ligação de <i>PvAMA-1</i> e seus domínios a eritrócitos humanos.....	47
Figura 14.	Ligação da proteína <i>PvDBP-RII</i> a eritrócitos humanos.....	48
Figura 15.	Inibição da ligação da proteína <i>PvDBP-RII</i> a eritrócitos humanos.....	49
Figura 16.	Ligação de proteínas de merozoítas de <i>P. vivax</i> a eritrócitos humanos.....	49
Figura 17.	Estratégia de análise adotada para avaliar a expressão de proteínas na superfície de células transfectadas.....	51
Figura 18.	Análise da ligação de eritrócitos a células transfectadas com o plasmídeo recombinante pEGFP- <i>dbp</i>	54

Figura 19.	Análise da ligação de eritrócitos a células transfectadas com plasmídeo recombinante pDEGFP- <i>dbp</i>	55
Figura 20.	Análise da inibição da ligação de eritrócitos a células transfectadas com os plasmídeos recombinantes pEGFP- <i>dbp</i> e pDEGFP- <i>dbp</i> por anticorpos policlonais.....	56
Figura 21.	Imagens da inibição da ligação de eritrócitos a células transfectadas com o plasmídeo recombinante pEGFP- <i>dbp</i> por anticorpos policlonais.....	57
Figura 22.	Imagens da inibição da ligação de eritrócitos a células transfectadas com o plasmídeo recombinante pDEGFP- <i>dbp</i> por anticorpos policlonais.....	58
Figura 23.	Análise da ligação de eritrócitos a células transfectadas expressando <i>PvMSP1</i> ₁₉	59
Figura 24.	Análise da ligação de eritrócitos a células transfectadas expressando <i>PvAMA-1</i> _{DI-II} ou <i>PvAMA-1</i> _{DIII}	60
Figura 25.	Análise da ligação de eritrócitos a células transfectadas com plasmídeos sem inserto.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Proteínas envolvidas na ligação a eritrócitos	7
Tabela 2.	Sequências de oligonucleotídeos utilizados para construção de plasmídeos recombinantes para transfecção celular.....	35
Tabela 3.	Análise da expressão de proteínas na superfície de células transfectadas.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Adjuvante Incompleto De Freund
AMA-1	Apical Membrane Antigen 1
AMA-1 _{DI-II}	Domínios Contíguos I-II de AMA-1
AMA-1 _{DII}	Domínio II de AMA-1
AMA-1 _{DIII}	Domínio III de AMA-1
AMA-1 _E	Ectodomínio de AMA-1
Anti-His	Anticorpo Monoclonal contra a Cauda de Histidina
Anti-IgG	Anticorpo Monoclonal contra Imunoglobulina G
BSA	Bovine Serum Albumin
DARC	Duffy Antigen Receptor for Chemokines
DBL	Duffy Binding Like
DBP	Duffy Binding Protein
D.O.	Densidade Óptica
EBA	Erythrocyte Binding Antigen
EBL	Erythrocyte Binding Ligands
EGF	Epidermal Growth Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
His ₆	Cauda de 6 Histidinas
IFN _γ	Interferon Gama
IPTG	Isopropil-β-D Tiogalactosídeo
LB	Luria Broth
MIF	Média Geométrica da Intensidade de Fluorescência

MSPs	Merozoite Surface Proteins
MSP1	Merozoite Surface Protein 1
MSP1 ₁₉	Fragmento C-Terminal de 19 kDa da MSP1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Polimerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethanesulfonyl Fluoride
RBL	Reticulocyte Binding Like Proteins
RONs	Roptry Neck Proteins
SDS	Dodecil-Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS
T. A.	Temperatura Ambiente

RESUMO

FRANCOSO, K. S. **Estabelecimento de um ensaio funcional de ligação de proteínas de merozoítas de *Plasmodium vivax* a eritrócitos humanos por citometria de fluxo.** 78 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A invasão de eritrócitos por merozoítas de *Plasmodium* é um processo bastante complexo em que várias proteínas do parasita interagem com receptores presentes na célula hospedeira. É nossa hipótese que o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) e a Proteína 1 da Superfície do Merozoíta (MSP1) estejam envolvidas na adesão ao eritrócito, no momento da invasão. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de ligação de proteínas de merozoítas de *P. vivax* a eritrócitos humanos utilizando um novo ensaio de citometria de fluxo e o clássico ensaio de citoaderência. Para tanto, a ligação das proteínas recombinantes correspondentes à região C-terminal de 19 kDa da MSP1 ($PvMSP1_{19}$), ao ectodomínio ($PvAMA-1_E$) e aos domínios I-II e II de AMA-1 ($PvAMA-1_{DI-II}$ e $PvAMA-1_{DII}$) foi avaliada por citometria de fluxo utilizando anticorpo fluorescente contra cauda de histidina. A proteína recombinante baseada na região II da Proteína Ligante de Duffy ($PvDBP-RII$) foi utilizada como controle positivo e a tioredoxina humana como controle negativo. Os dados foram expressos pela média da intensidade de fluorescência (MIF). Os resultados dos ensaios de citometria de fluxo confirmaram a ligação de $PvDBP-RII$ a eritrocitos Duffy A ($MIF=1997\pm405$) e Duffy B ($MIF=5760\pm303$). No entanto, não foi possível detectar a ligação de $PvMSP1_{19}$ ($MIF=201\pm47$), de $PvAMA-1_E$ ($MIF=536\pm99$) e dos domínios $PvAMA-1_{DI-II}$ ($MIF=120\pm12$) e $PvAMA-1_{DII}$ ($MIF=179\pm30$). Soro policlonal de camundongos BALB/c imunizados com $PvDBP-RII$ foi capaz de inibir a ligação da proteína aos eritrócitos em até 66%. Tais resultados foram confirmados pelo ensaio clássico de citoaderência. Para tanto, células COS-7 foram transfectadas com plasmídeos recombinantes codificando as proteínas $PvDBP-RII$, $PvMSP1_{19}$, $PvAMA-1_{DI-II}$ e $PvAMA-1_{DIII}$ em fusão com GFP. A eficiência de transfecção e a expressão destas proteínas na superfície das células foram confirmadas por citometria de fluxo, utilizando anticorpos policlonais produzidos em camundongos. A ligação foi avaliada pela formação de rosetas entre as células transfectadas e eritrócitos humanos por microscopia de fluorescência. Observamos que as células transfectadas expressando $PvDBP-RII$ foram capazes de se ligar a eritrócitos humanos Duffy A (274 ± 144 rosetas/25 campos) e Duffy B (356 ± 129 rosetas/25 campos). No entanto, não foram visualizadas rosetas nos ensaios realizados com células expressando $PvMSP1_{19}$, $PvAMA-1_E$, $PvAMA-1_{DI-II}$ e $PvAMA-1_{DIII}$, indicando a ausência de ligação destas proteínas a eritrócitos humanos. Soro de camundongos imunizados com $PvDBP-RII$ foi capaz de inibir a ligação aos eritrócitos em até 99%. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que fomos capazes de desenvolver um ensaio baseado em citometria de fluxo para avaliação da ligação de proteínas a eritrócitos humanos, cujos resultados foram confirmados pelo ensaio clássico de citoaderência. No entanto, não foi possível detectar a ligação das proteínas $PvMSP1_{19}$ e $PvAMA-1$ a eritrócitos humanos.

Palavras-chave: Parasitologia, malária, *Plasmodium vivax*, citometria de fluxo.

ABSTRACT

FRANCOSO, K. S. **Establishment of a functional binding assay of *Plasmodium vivax* merozoite proteins to human erythrocytes by flow cytometry.** 78 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

The invasion of erythrocytes is a complex process in which the Merozoite Surface Proteins (MSPs) are responsible for initial adhesion and the *P. vivax* Duffy Binding Protein (PvDBP) is involved on junction formation. In addition, there are evidences that the Apical Membrane Antigen (AMA-1) plays a fundamental role on invasion; however, the exact mechanism is still being investigated. The aim of the present study was to evaluate the ability of *P. vivax* merozoite antigens to bind to human erythrocytes using a new flow cytometry assay and the classical cytoadherence assay. The binding assay was performed by flow cytometry using fluorescent antibody against histidine tag present on recombinant proteins based on 19 kDa C-terminal fragment of MSP1 (PvMSP1₁₉), the ectodomain (PvAMA-1_E) and domains I-II and II of AMA-1 (PvAMA-1_{DI-II} and PvAMA-1_{DII}). The recombinant protein based on the region II of DBP (PvDBP-RII) was used as positive control and human thioredoxin as negative control. Data were expressed as mean of fluorescent intensity (MFI). The results of flow cytometry assays confirmed the binding of PvDBP-RII to human Duffy A (MFI=1997±405) and Duffy B (MFI= 5760±303) erythrocytes. However, we were not able to detect the binding of PvMSP1₁₉ (MFI=201±47), PvAMA-1_E (MFI=536±99), PvAMA-1_{DI-II} (MFI=120±12) or PvAMA-1_{DII} (MFI=179±30). Sera from BALB/c mice immunized with PvDBP-RII inhibited binding up to 66%. These results were confirmed by classic cytoadherence assay. COS-7 cells were transfected with plasmids encoding the proteins PvDBP-RII, PvMSP1₁₉, PvAMA-1_{DI-II} or PvAMA-1_{DIII} fused to GFP. The transfection efficiency and expression of proteins on cell surface were confirmed by flow cytometry using polyclonal antibodies raised on mice. The binding was evaluated by the number of rosettes formed between transfected cells and human erythrocytes using fluorescent microscope. The cells expressing PvDBP-RII were able to bind Duffy A (274±144 rosettes/25 fields) and Duffy B (356±129 rosettes/25 fields) human erythrocytes. On the other hand, PvMSP1₁₉, PvAMA1_E, PvAMA-1_{DI-II} and PvAMA-1_{DIII} failed to bind human erythrocytes and specific rosettes were not observed. Sera from immunized mice inhibited binding of PvDBP-RII up to 99%. In conclusion, we developed a binding assay using flow cytometry which can be extremely useful to evaluate the binding of proteins to erythrocytes whose results were confirmed by classic cytoadherence assays, as observed the binding of PvDBP-RII to human erythrocytes. Using both biding assays, we were not able to determine the binding of PvMSP1₁₉, nor PvAMA-1 and their domains to human erythrocytes.

Keywords: Parasitology, malaria, *Plasmodium vivax*, flow cytometry.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da malária

A malária é uma doença parasitária endêmica em 106 países, sendo que aproximadamente 50% da população mundial (3,3 bilhões) vive em áreas de risco de transmissão (OMS, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2010, ocorreram 216 milhões de casos e 655 mil mortes em todo o mundo (OMS, 2011), porém, uma revisão recente indica que este cenário pode ser ainda pior, com o número de mortes no ano de 2010 estimado em aproximadamente 1,24 milhões (MURRAY *et al.*, 2012). A África é a região mais afetada, representando 81% dos casos, seguida do Sudeste da Ásia (13% dos casos) (OMS, 2011). Nas Américas, 20% da população reside em áreas de risco de transmissão de malária distribuídas em 21 países, sendo que no ano de 2010, ocorreram, aproximadamente, 675 mil casos e 1.000 mortes (OMS, 2011).

Dentre as espécies de *Plasmodium* que infectam o homem (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*), o *P. falciparum* é o mais prevalente (91% do total de casos) e o responsável pela maioria das mortes (OMS, 2011). O *P. vivax* é amplamente distribuído em todo o mundo, responsável por 70% das infecções nas Américas (OMS, 2011) e, apesar da malária *vivax* ter sido considerada benigna por muito tempo, as tecnologias de diagnóstico moleculares por PCR, permitiram a exclusão de infecções mistas e, desta forma, foi possível identificar diversos casos graves e de morte associados à infecção exclusiva por *P. vivax* (TAN *et al.*, 2008; TJITRA *et al.*, 2008; MUELLER *et al.*, 2009).

No Brasil, a malária ocorre predominantemente na Região Amazônica e se mantém como um grave problema de saúde pública. No ano de 2011 foram

reportados 263.326 casos (SVS, 2011) e, segundo a OMS 84,7% dos casos registrados em 2010 foram causados por *P. vivax* (OMS, 2011). Assim como no cenário mundial, têm sido relatados casos de malária *vivax* grave na região amazônica, sendo que no período de 1998 a 2008, foram oficialmente reportadas 234 mortes (revisto por OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). Estudos recentes em Manaus demonstram aumento no número de casos de hospitalização em decorrência de malária *vivax* (SANTOS-CIMINERA *et al.*, 2007) associados, principalmente, a anemia grave, trombocitopenia, síndrome neurológica, insuficiência renal e icterícia (revisto por LACERDA *et al.*, 2012). Neste sentido, a malária causada pelo *P. vivax* representa um grave problema de saúde pública, com elevado custo para o sistema de saúde, além de ser um entrave para o desenvolvimento econômico local, uma vez que o paciente debilitado se torna incapaz de exercer seu trabalho em sua plenitude.

1.2 Ciclo de vida do *Plasmodium*

O ciclo biológico do *Plasmodium* é bastante complexo, caracterizado por uma fase sexuada (esporogonia) que ocorre nas fêmeas do mosquito *Anopheles* e duas fases assexuadas no hospedeiro secundário (pré-eritrocítica e eritrocítica, Figura 1).

A infecção se inicia com o inóculo de 15 a 123 esporozoítas na derme do mamífero através da picada de uma fêmea do mosquito *Anopheles* infectada (revisto por PRUDÊNCIO *et al.*, 2006). Após o inóculo, os esporozoítas começam a se mover, parecendo deslizar pela derme, até atingirem um vaso sanguíneo e entrarem na corrente circulatória (VANDERBERG; FREVERT, 2004; AMINO *et al.*, 2005). Alternativamente, alguns esporozoítas podem invadir o sistema linfático, chegando

aos linfonodos, onde interagem com células dendríticas e se desenvolvem em formas exo-eritrocíticas, similares às formas hepáticas (AMINO *et al.*, 2005). Dentre o total de esporozoítas inoculados, aproximadamente metade se mantém na derme por até 7 horas e de 15 a 20% atinge o sistema linfático (ALY *et al.*, 2009).

Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium sp* (revisto por JONES; GOOD, 2006).

Os esporozoítas que entram na corrente sanguínea, seguem para os sinusóides hepáticos, atravessando-os. Há evidências de que os esporozoítas invadem as células de Kupffer, cruzam o espaço de Disse e invadem os hepatócitos, formando um vacúolo parasitóforo, que promove uma barreira entre o parasita e a célula hospedeira (revisto por PRUDÊNCIO *et al.*, 2006; ALY *et al.*, 2009). No hepatócito, os esporozoítas se reproduzem por esquizogonia e são gerados milhares de merozoítas. Os merozoítas formados saem do vacúolo parasitóforo para o lúmen da célula e após a morte celular, são liberados na corrente sanguínea, envoltos pela membrana da célula hospedeira, sendo denominados merossomos (PRUDÊNCIO *et*

al., 2006). Dessa forma, são protegidos do reconhecimento por células dendríticas e de Kupffer. No caso do *P. vivax* e do *P. ovale*, há o desenvolvimento de formas hepáticas dormentes, denominadas hipnozoítos, que podem ser reativadas após meses ou anos, sendo possível que a pessoa volte a desenvolver a doença após o tratamento, mesmo sem ter sido re-infectada (revisto por MUELLER *et al.*, 2009).

Os merozoítas liberados na corrente sanguínea invadem os eritrócitos. Este processo é extremamente eficaz e ocorre em aproximadamente 27,6 segundos, (GILSON; CRABB, 2009). Dentro dos eritrócitos, os parasitas sofrem um novo ciclo de reprodução assexuada, gerando esquizontes repletos de merozoítas. Após a ruptura das células, os merozoítas invadem novos eritrócitos, perpetuando o ciclo eritrocítico. No caso do *P. vivax*, apenas os eritrócitos jovens (reticulócitos) são infectados, justificando a menor parasitemia observada na infecção por essa espécie (MUELLER *et al.*, 2009).

No interior dos eritrócitos, alguns parasitas se desenvolvem em gametócitos masculino e feminino. Após a ingestão pela fêmea do mosquito *Anopheles*, estes gametócitos se fundem, dando origem ao zigoto que, por sua vez, transforma-se em um oocineto móvel. O oocineto maduro atravessa a matriz peritrófica e o epitélio do intestino médio e, então, diferencia-se em oocisto. O oocisto desenvolve-se durante, aproximadamente, 10 dias e quando atinge a maturidade libera esporozoítas na circulação (revisto por GHOSH; JACOBS-LORENA, 2009). Os esporozoítas circulantes invadem as glândulas salivares do mosquito e a inoculação destes durante o repasto sanguíneo no mamífero completa o ciclo de vida do parasita.

1.3 Processo de invasão de eritrócitos por merozoítas de *Plasmodium*

A invasão dos eritrócitos é um processo complexo, no qual inúmeras moléculas do parasita interagem com receptores da célula hospedeira (Tabela 1). Esta invasão ocorre em três etapas: i) adesão do parasita ao eritrócito; ii) reorientação do parasita, direcionando o pólo apical para a membrana da célula hospedeira e iii) formação da junção e invasão (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática do processo de invasão do merozoíta ao eritrócito. (figura adaptada de SRINIVASAN *et al.*, 2011).

O primeiro contato do merozoíta com o eritrócito, mediado pelas Proteínas da Superfície do Merozoíta (MSPs), é de baixa afinidade, reversível e ocorre em qualquer orientação (Figura 2) (revisto por GAUR *et al.*, 2004). Dentre essas proteínas de superfície, algumas (MSP 1, 2, 4, 5, 8 e 10) se mantêm ancoradas na membrana pela cauda de GPI (glicosilfosfatidilinositol), enquanto outras (MSP 3, 6, 7 e 9) são solúveis e estão apenas associadas à superfície do merozoíta (revisto por GAUR *et al.*, 2004; COWMAN; CRABB, 2006). Além das âncoras de GPI, essas proteínas possuem domínios ricos em cisteína, dentre estes, domínios do tipo EGF, fundamentais para que ocorram interações proteicas necessárias para a adesão (revisto por COWMAN; CRABB, 2006).

A segunda etapa no processo de invasão do merozoíta ao eritrócito consiste na reorientação deste, a fim de direcionar o polo apical para a membrana da célula alvo (Figura 2). Os mecanismos moleculares que promovem essa reorientação não são bem conhecidos, porém, há indícios de que o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) possa ser a proteína chave dessa fase, uma vez que anticorpos contra AMA-1 bloqueiam a reorientação, mas não interferem com a adesão inicial (MITCHELL *et al.*, 2004).

Tabela 1. Proteínas envolvidas na ligação a eritrócitos (IYER *et al.*, 2007; revisto por GAUR; CHITNIS, 2011).

	Proteína Ligante	Receptor eritrocitário
<i>P. falciparum</i>	EBA175	Glicoforina A
	EBA140	Glicoforina C
	EBA165	Desconhecido
	EBA181	Banda 4.1
	EBL1	Glicoforina B
	<i>PF</i> MSP1 ₁₉	Desconhecido
	RH1	Receptor Y ^b
	RH2a	Desconhecido
	RH2b	Receptor Z ^b
	RH3	Desconhecido
	RH4	Receptor complementar 1
	RH5	Receptor W ^b
	<i>Pf</i> AMA-1	Desconhecido
<i>P. vivax</i>	<i>Pv</i> DBP	Antígeno sangüíneo Duffy
	<i>Pv</i> RBP 1 & 2	Desconhecidos
	<i>Pv</i> MSP1 ₁₉	Desconhecido
<i>P. knowlesi</i>	<i>Pk</i> DBP α	Antígeno sangüíneo Duffy
	<i>Pk</i> DBP β e <i>Pk</i> DBP γ	Desconhecidos
<i>P. yoelii</i>	<i>Py</i> 235 (RBP like)	Receptor sensível à tripsina e quimiotripsina
	EBL	Desconhecido
	Proteína 135 kDa	Antígeno Sangüíneo Duffy

Após a reorientação ocorre a formação do complexo de junção entre as membranas do parasita e das hemácias (Figura 2). Esta junção irreversível é formada por interações proteicas de alta afinidade e, após sua formação, inicia-se o processo de invasão. As moléculas que participam da formação dessa junção são melhor caracterizadas e localizam-se nas roptrias e nos micronemas dos merozoítas (revisto por GAUR *et al.*, 2004).

Sabe-se que duas famílias de proteínas estão envolvidas nesse processo de junção: i) as proteínas ligantes tipo “Duffy” (DBL) e ii) as proteínas do tipo ligantes de reticulócitos (RBL) (GAUR *et al.*, 2004; revisto por COWMAN; CRABB, 2006). A primeira família é composta pela proteína ligante de Duffy (DBP) e proteínas homólogas a esta, representadas pela MAEBL e pelos Antígenos Ligantes de Eritrócito (EBA-175, EBA-140 e EBA-81), as quais se ligam a resíduos de ácido siálico de glicoforinas (revisto por GAUR *et al.*, 2004). A segunda família inclui a Proteína Ligante de Reticulócito (RBP) de *P. vivax* e suas homólogas nas demais espécies. No caso de *P. falciparum*, esta família é representada pelas proteínas *PfRh1*, *PfRh2*, *PfRh2b* e *PfRh4* (revisto por COWMAN; CRABB, 2006). Além destas, trabalhos recentes apontam que o complexo de AMA-1 com as proteínas RONs 2, 4 e 5 está localizado na junção e seria fundamental para a invasão do eritrócito (revisto por GAUR; CHITNIS, 2011).

1.3.1 Proteína 1 da Superfície de Merozoítas (MSP1)

A MSP1 é sintetizada durante a esquizogonia, como um precursor de 195 kDa e se associa às proteínas MSP6 e MSP7 (Figura 3) formando um complexo que se ancora à membrana pela âncora de GPI (HOLDER; FREEMAN, 1982; KAUTH *et al.*,

2006; PACHEBAT *et al.*, 2007). No momento da liberação dos merozoítas, as proteínas que formam este complexo sofrem um processamento primário pela protease Sub1, o qual é fundamental para que ocorra a invasão, uma vez que a inibição dessa enzima impede a invasão dos merozoítas aos eritrócitos (KOUSSIS *et al.*, 2009). O primeiro processamento cliva a MSP1 em 4 fragmentos (Figura 3), um fragmento N-terminal de 83kDa (MSP1₈₃), dois fragmentos internos de 30 e 38kDa (MSP1₃₀ e MSP1₃₈) e um fragmento C-terminal de 42kDa (MSP1₄₂) (KOUSSIS *et al.*, 2009). No momento da invasão do eritrócito, ocorre um segundo processamento (Figura 3), mediado pela protease Sub2, em que a MSP1₄₂ é clivada, gerando um fragmento solúvel de 33kDa (MSP1₃₃) e outro de 19kDa (MSP1₁₉) (HACKETT *et al.*, 1999; HARRIS *et al.*, 2005). O fragmento C-terminal de 19kDa possui 2 domínios do tipo EGF e é o único que permanece ancorado à membrana no momento da invasão (BLACKMAN *et al.*, 1990; MORGAN *et al.*, 1999) indicando que deve exercer um papel importante nessa fase.

Figura 3. Processamento da MSP1 (figura adaptada de HOLDER, 2009).

A função exata da MSP1 ainda é desconhecida, mas há evidências que apontam para seu envolvimento na invasão de eritrócitos, pois anticorpos anti-MSP1₁₉ presentes no soro humano são capazes de inibir a invasão (O'DONNELL *et al.*, 2001). Sabe-se que anticorpos que bloqueiam o processamento secundário da MSP1 também impedem que ocorra a invasão (LAZAROU *et al.*, 2009; WOHLBIER *et al.*, 2010) e, uma vez que a MSP1₁₉ permanece intacta e persiste por todo o ciclo intracelular, sugere-se que a esta proteína exerça alguma função nessa fase do desenvolvimento do parasita (DLUZEWSKI *et al.*, 2008).

Tendo em vista as evidências de que a MSP1 pode estar envolvida na invasão de eritrócitos, alguns estudos avaliaram se ela é capaz de se ligar aos eritrócitos. Na década de 80, um estudo identificou que a MSP1 poderia estar envolvida na adesão inicial do merozoíta ao eritrócito e que esta adesão seria dependente de ácido siálico (PERKINS; ROCCO, 1988). No ano de 2000, identificou-se por ensaio de “immunoblotting”, um domínio antigênico de 115 aminoácidos, presente no fragmento de 38kDa (MPS1₃₈), capaz de se ligar a eritrócitos humanos. Este domínio é reconhecido por soro de indivíduos de região endêmica africana e anticorpos policlonais contra essa região foram capazes de inibir a invasão do parasita, “in vitro”, em até 90% (NIKODEM; DAVIDSON, 2000). Outro estudo avaliou 88 peptídeos sintéticos que cobriam toda a sequência da MSP1 de *P. vivax* (PvMSP1), dos quais 14 foram identificados com elevada atividade de ligação específica a reticulócitos, sendo que alguns estão localizados próximo ao sítio de clivagem dos fragmentos de 42 e 19kDa e um destes está localizado na região N-terminal da MSP1₁₉ (RODRÍGUEZ *et al.*, 2002).

Em relação à MSP1₁₉, identificou-se que peptídeos do receptor eritrocítico humano, denominado banda 3, foi capaz de se ligar à essa proteína e essa ligação foi sensível à quimiotripsina. Este estudo também mostrou que a MSP1₁₉ recombinante, de *P. falciparum*, foi capaz de se ligar a eritrócitos (GOEL *et al.*, 2003). No ano seguinte, utilizando-se ensaio de citoaderência com células transfectadas, avaliou-se que a PvMSP1₁₉ é capaz de se ligar a eritrócitos e que um “pool” de soros de pacientes com malária *vivax* foi capaz de inibir essa ligação em até 89% (HAN *et al.*, 2004).

1.3.2 Proteína Ligante de Duffy (DBP)

As proteínas ligantes de Duffy de *P. vivax* e *P. knowlesi* (PvDBP e PkDBP) estão localizadas nos micronemas e são fundamentais para a invasão de eritrócitos por estas espécies. A observação da importância destas proteínas para a invasão ocorreu na década de 70, quando se identificou que indivíduos refratários à infecção não possuíam o receptor sanguíneo Duffy (MILLER *et al.*, 1975; MILLER *et al.*, 1976). Esta constatação explicava a baixa incidência de malária no Oeste da África em função da elevada prevalência do fenótipo Duffy negativo na população desta região (GAUR *et al.*, 2004). Estudos posteriores “in-vitro” confirmaram que merozoítas de *P. vivax* e *P. knowlesi* eram incapazes de invadir eritrócitos Duffy negativos (MILLER *et al.*, 1979; BARNWELL *et al.*, 1989).

A proteína DBP é caracterizada por uma região rica em cisteína, próxima ao N-terminal, uma região intermediária de baixa complexidade, seguida de outra região rica em cisteína, uma porção transmembrânica e uma porção C-terminal intracitoplasmática (Figura 4). Esta proteína se liga ao antígeno Duffy, receptor para

quimiocinas (DARC), presente nos eritrócitos, através da região II da DBP (DBP-RII), correspondente à região N-terminal conservada, rica em cisteínas (Figura 4) (CHITNIS; MILLER, 1994; CHITNIS *et al.*, 1996).

Figura 4. Representação esquemática da Proteína Ligante de Duffy (DBP). A região II se liga ao receptor DARC presente nos eritrócitos (GAUR *et al.*, 2004; VANBUSKIRK, KELLEY *et al.*, 2004).

O receptor DARC é uma proteína transmembrânica com 7 α -hélices que funciona como receptor de várias quimiocinas e a ligação da região II da DBP ocorre na região extracelular N-terminal de 35 aminoácidos deste receptor (revisto por CHITNIS; SHARMA, 2008). Este receptor apresenta dois polimorfismos importantes. O primeiro promove a substituição do aminoácido aspartato por uma glicina (códon 42) na região N-terminal, que estão relacionados com os grupos sanguíneos Duffy A e Duffy B, respectivamente (KING *et al.*, 2011). O segundo polimorfismo é a troca de T por C no nucleotídeo 33 no promotor do gene Duffy que promove o silenciamento deste gene, impedindo a expressão do antígeno Duffy (KING *et al.*, 2011).

Aparentemente, a ligação da proteína DBP ao antígeno Duffy seria essencial para a infecção por *P. vivax*, porém, recentemente, têm sido relatados casos de

pacientes Duffy negativos infectados por *P. vivax* (CAVASINI *et al.*, 2007; CULLETON *et al.*, 2009; MERCEREAU-PUIJALON; MÉNARD, 2010; MENDES *et al.*, 2011; WURTZ *et al.*, 2011). Estas constatações nos levam a hipotetizar que haveriam vias alternativas para a invasão por *P. vivax*, assim como ocorre em *P. falciparum*. Estas vias, no entanto, ainda são desconhecidas.

Além da ausência do antígeno, há evidências de que o fenótipo do antígeno Duffy poderia influenciar na ligação da proteína DBP ao seu receptor e, conseqüentemente, modular a susceptibilidade à infecção (KING *et al.*, 2011). De fato, um estudo recente demonstrou que a ligação de DBP à eritrócitos Duffy A foi 41-50% menor em relação à Duffy B e que indivíduos Duffy A apresentavam redução de 30 a 80% no risco de desenvolver malária *vivax* (KING *et al.*, 2011).

1.3.3 Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1)

A proteína AMA-1 foi identificada na década de 80 como um antígeno presente na superfície de merozoítas de *P. knowlesi*, o qual era reconhecido por anticorpos capazes de inibir a invasão de merozoítas (DEANS *et al.*, 1982; DEANS *et al.*, 1984). Estudos subseqüentes identificaram que AMA-1 está presente em todas as espécies de *Plasmodium* e possui ortólogos em outros membros do filo *Apicomplexa*, tais como *Babesia bovis* e *Toxoplasma gondii* (revisto por REMARQUE *et al.*, 2007). A partir destas constatações, iniciaram-se estudos a fim de se caracterizar este antígeno quanto a sua estrutura, expressão, função e imunogenicidade nas diversas espécies de *Plasmodium*.

AMA-1 é uma proteína transmembrana altamente conservada, formada por um ectodomínio rico em cisteínas, uma região transmembrana e uma região C-terminal

(Figura 5). As pontes dissulfeto formadas pelas 16 cisteínas sugerem o dobramento do ectodomínio em uma região N-terminal e três domínios (DI, DII e DIII) (revisto por REMARQUE *et al.*, 2007). Em 2005, confirmou-se a presença destes domínios (Figura 5) através de análise da estrutura cristalográfica da proteína recombinante expressa em *Pichia pastoris* (PIZARRO *et al.*, 2005).

Figura 5. Representação esquemática do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) (PIZARRO *et al.*, 2005; revisto por REMARQUE *et al.*, 2007).

Na fase final da reprodução assexuada nos eritrócitos, ocorre expressão elevada de AMA-1, que é translocada para os micronemas no pólo apical (BANNISTER *et al.*, 2003). Este processo é acompanhado pela clivagem do pró-domínio presente na região N-terminal sendo que, em *P. falciparum*, a proteína precursora de 83kDa, é convertida em uma proteína de 66kDa (HOWELL *et al.*, 2001). Assim como a MSP1, no momento da invasão de eritrócitos, AMA-1 sofre nova clivagem mediada pela protease Sub2 (HARRIS *et al.*, 2005) gerando fragmentos de 48 e 44 kDa (HOWELL *et al.*, 2005).

Tentativas de inativar o gene *ama-1* em *Plasmodium sp* e *T. gondii* não foram bem sucedidas, sugerindo que AMA-1 possui um papel vital para a sobrevivência destes parasitas (HEHL *et al.*, 2000; TRIGLIA *et al.*, 2000), além disso, o

conhecimento adquirido até o momento reforça a hipótese de que AMA-1 está envolvida na invasão de eritrócitos. No entanto, os mecanismos pelos quais a proteína AMA-1 está envolvida na invasão aos eritrócitos são pouco conhecidos. Há evidências de que AMA-1 participa da reorientação dos merozoítas, pois na presença de um anticorpo inibidor da invasão, merozoítas de *P. knowlesi* foram capazes de aderir a eritrócitos, mas não sofreram reorientação (MITCHELL *et al.*, 2004). Também é provável que AMA-1 esteja envolvida na formação da junção, provavelmente, associando-se a outras proteínas.

Nesse sentido, estudos em *T. gondii* demonstraram que, no momento da invasão, a proteína AMA-1 está localizada na junção em associação às proteínas TgRon 2, 4, 5 e 8 (TYLER *et al.*, 2011). Baseado nessas observações postulou-se a hipótese de que o mesmo possa acontecer em *Plasmodium*. Estudos recentes demonstraram que AMA-1 de *P. falciparum* também está localizada na junção (RIGLAR *et al.*, 2011) e ensaios de imunoprecipitação evidenciaram interação entre PfAMA-1, PfRON2 e PfRON4 (CAO *et al.*, 2009). No ano seguinte, foi demonstrado que um peptídeo inibidor da invasão se liga à região hidrofóbica de PfAMA-1 impedindo a interação com o complexo de proteínas PfRON (RICHARD *et al.*, 2010). Esta região hidrofóbica também foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal 4G2, cujo epítipo conformacional está localizado no “loop” do domínio II de AMA-1 (PIZARRO *et al.*, 2005; COLLINS *et al.*, 2007). Assim como o peptídeo, este anticorpo também foi capaz de inibir a invasão ao impedir a formação do complexo entre AMA-1 e as proteínas RONS (COLLINS *et al.*, 2009). Tais constatações sugerem que esse domínio deve desempenhar um papel crítico durante a invasão a eritrócitos.

Estudos posteriores se focaram em refinar a ligação de AMA-1 às RONS e observou-se que a proteína AMA-1 está associada à RON2 (LAMARQUE, M. *et al.*, 2011; TYLER; BOOTHROYD, 2011). Em *T. gondii*, identificou-se uma região localizada entre duas hélices hidrofóbicas de *TgRON2* capaz de se ligar à *TgAMA-1* (LAMARQUE *et al.*, 2011; TYLER; BOOTHROYD, 2011), posteriormente, foi feita a co-cristalização de *TgAMA-1* com um peptídeo sintético de *TgRON2*, correspondente àquela região previamente mapeada e verificou-se que este se liga à região hidrofóbica de *TgAMA-1* (TONKIN *et al.*, 2011). Em seguida, demonstrou-se que em *P. falciparum*, a mesma região localizada entre as hélices hidrofóbicas de *PfRON2* foi capaz de se ligar à região hidrofóbica de *PfAMA-1* presente no domínio II desta proteína (SRINIVASAN *et al.*, 2011).

Outra observação interessante foi o fato da região citoplasmática de AMA-1 ser capaz de se ligar à aldolase, molécula que serve como ponte entre as proteínas de superfície e o motor actina-miosina do parasita (SRINIVASAN *et al.*, 2011). Todas essas constatações reforçam a hipótese que AMA-1 age como uma ponte que ligaria o complexo RON2, o qual se insere no citoplasma da célula hospedeira, ao motor actina-miosina do parasita, promovendo a invasão (Figura 6).

No entanto, alguns dados contradizem o modelo acima (Figura 6). Ensaio de imunolocalização mostram que as proteínas RONS estão sempre localizadas na junção, enquanto AMA-1 está distribuída por toda a superfície extracelular do parasita e que, apesar do peptídeo inibitório romper o complexo, o parasita ainda apresenta tração (revisto por BARGIERI *et al.*, 2012). Sendo assim, é possível que a proteína AMA-1 exerça sua função ao se ligar diretamente aos eritrócitos.

Figura 6. Representação esquemática do modelo de interação das proteínas AMA-1 e RON2 no momento da invasão. O complexo RON2 se insere no citoplasma da célula hospedeira, enquanto a proteína AMA-1, ligada à RON2, seria a ponte entre esse complexo e o motor actina-miosina do parasita.

De fato, demonstrou-se que peptídeos sintéticos derivados de *Pf*AMA-1 foram capazes de se ligar a eritrócitos humanos (URQUIZA *et al.*, 2000) e que células COS-7 expressando os domínios I-II de AMA1 de *P. yoelii* em sua superfície foram capazes de se ligar a eritrócitos de camundongos e ratos e que esta ligação foi sensível a tripsina e quimiotripsina (FRASER *et al.*, 2001). Além dos domínios I-II, mostrou-se que o domínio III de AMA-1 de *P. falciparum* também foi capaz de se ligar a eritrócitos quando expresso em células CHO-K1 e que essa ligação se dá através da proteína Kx presente na superfície de eritrócitos (KATO *et al.*, 2005). Recentemente, nosso grupo avaliou a capacidade dos domínios I-II e III de *Pv*AMA-1 de se ligarem a eritrócitos humano, utilizando “immunoblotting” e citoaderência com

células COS-7 expressando os domínios ligantes na sua superfície. Este estudo mostrou indícios de ligação dos domínios I-II aos eritrócitos, porém, a eficiência de transfecção das células foi baixa (BARBEDO, 2007). Estes resultados suportam a hipótese de que AMA-1 age como uma molécula de adesão durante a invasão aos eritrócitos.

1.4 Papel dos anticorpos contra proteínas de merozoítas na imunidade contra malária

A resposta imune contra a malária é bastante complexa, em função do ciclo de vida do parasita e do grande número de antígenos parasitários. Sabe-se que a exposição constante promove imunidade clínica, capaz de controlar a parasitemia e reduzir a sintomatologia (PERSSON, 2010) e que a presença de anticorpos é essencial, apesar de a imunidade efetiva requerer a cooperação entre respostas celular e humoral.

A importância dos anticorpos na imunidade contra malária foi bem evidenciada por estudos que demonstraram que a transferência passiva de imunoglobulinas de pacientes é capaz de diminuir a parasitemia em voluntários humanos (MCGREGOR, 1964; SABCHAREON *et al.*, 1991). Acredita-se que os anticorpos bloqueiam a invasão da célula hospedeira e, conseqüentemente, inibem o desenvolvimento do parasita (PERSSON, 2010). Na fase eritrocítica, os antígenos de merozoítas são alvos de anticorpos e a inibição da invasão ao eritrócito pode ocorrer por agregação dos merozoítas previamente à adesão (GILSON *et al.*, 2008), inibição do processamento de antígenos (DUTTA *et al.*, 2005; MOSS *et al.*, 2012) ou bloqueio da ligação entre proteínas necessárias para a invasão (GRIMBERG *et al.*, 2007;

BEESON *et al.*, 2008). Dentre os antígenos alvos de anticorpos inibitórios, destacam-se a MSP1, DBP e AMA-1.

Sabe-se que anticorpos anti-MSP1 estão associados com a diminuição do risco de infecção por malária (EGAN *et al.*, 1996). Um estudo conduzido na Indonésia demonstrou que, apesar de a presença de anticorpos anti-MSP1₁₉ ocorrer desde a primeira infecção, eram necessárias duas ou mais infecções por *P. falciparum* para que houvesse a aquisição de anticorpos inibitórios de invasão (MURHANDARWATI *et al.*, 2008), o que está de acordo com a observação de que são necessárias múltiplas infecções para que ocorra a aquisição da imunidade clínica. Além disso, muitos estudos demonstraram que os anticorpos anti-MSP1 são capazes de inibir a invasão ao eritrócito e o crescimento de parasitas (EGAN *et al.*, 1999; O'DONNELL *et al.*, 2001; PERRAUT *et al.*, 2005).

Os mecanismos de ação propostos para estes anticorpos inibitórios são: aglutinação dos merozoítas previamente à adesão (GILSON *et al.*, 2008; GREEN *et al.*, 1981), inibição da interação entre a MSP1 com proteínas do parasita, tais como a MSP7 (PACHEBAT *et al.*, 2007), inibição de interação entre a MSP1 e proteínas da célula hospedeira, inibição do processamento secundário da MSP1 e interferência no desenvolvimento do parasita após a invasão dos eritrócitos (revisto por HOLDER, 2009). Um estudo recente investigou a ação de anticorpos anti-PMSP1₁₉ gerados em coelhos e demonstrou que a inibição do processamento secundário não é o único mecanismo de ação e que deve haver um mecanismo ainda mais importante, provavelmente o impedimento estérico na ligação do parasita ao eritrócito (MOSS *et al.*, 2012). Além disso, demonstrou-se que, após a invasão,

os anticorpos permanecem no interior dos eritrócitos e são capazes de retardar o desenvolvimento do parasita (MOSS *et al.*, 2012).

No caso da DBP, sabe-se que altos níveis de anticorpos estão associados à diminuição do risco de re-infecção e redução da parasitemia (KING *et al.*, 2008) e que a ligação desta ao receptor DARC, presente nos eritrócitos, é essencial para que ocorra a invasão do *P. vivax*. Sendo assim, anticorpos anti-DBP poderiam agir inibindo essa interação e impedindo a invasão dos eritrócitos. De fato, demonstrou-se por ensaios de citoaderência, que anticorpos anti-DBP adquiridos em infecção natural por *P. vivax* e em imunizações experimentais foram capazes de inibir a ligação de DBP a eritrócitos (MICHON *et al.*, 2000). O mesmo foi observado em indivíduos da região Amazônica expostos à malária por períodos prolongados (CERAVOLO *et al.*, 2008). Tais anticorpos não apenas inibem a ligação da proteína ao seu receptor, mas são capazes de impedir a invasão de eritrócitos por *P. vivax* (GRIMBERG *et al.*, 2007).

Anticorpos anti-AMA-1 também estão associados à diminuição de risco de malária clínica (POLLEY *et al.*, 2004; DODOO *et al.*, 2008; NEBIE *et al.*, 2008; STANISIC *et al.*, 2009), indicando que estes anticorpos devem exercer papel fundamental na proteção, possivelmente, inibindo a invasão. Assim como para MSP1, há diversos mecanismos de ação propostos para estes anticorpos inibitórios. É provável que estes anticorpos interfiram no processamento proteolítico e na redistribuição de AMA-1 na superfície do merozoíta (DUTTA *et al.*, 2003, 2005).

Outro possível mecanismo seria a inibição da interação de AMA-1 com proteínas do parasita ou do hospedeiro, fundamentais para que ocorra a invasão. Um estudo de co-cristalização de AMA-1 com um anticorpo monoclonal inibitório

(1F9) identificou que este se ligava à uma região hidrofóbica de AMA-1 (COLEY *et al.*, 2007). Posteriormente, COLLINS e colaboradores foram capazes de mapear um epítopo no domínio II de AMA-1 em que se liga o anticorpo monoclonal inibitório 4G2 (COLLINS *et al.*, 2007). Estudos posteriores demonstraram que mutações próximas a este epítopo inibem a interação de AMA-1 com o complexo RON e que o anticorpo 4G2, provavelmente age, inibindo a formação do complexo AMA-1 com as proteínas RON (COLLINS *et al.*, 2009). Um estudo recente confirmou que os anticorpos 4G2 e 1F9 são capazes de inibir a ligação de AMA-1 à RON2 (SRINIVASAN *et al.*, 2011), no entanto, o mecanismo pelo qual esses anticorpos inibem a formação do complexo é desconhecido. É possível que isso ocorra por impedimento estérico ou ainda, mediando alteração conformacional da proteína (revisto por TREECK *et al.*, 2009).

Finalmente, é possível que as proteínas AMA-1 e MSP1 participem da invasão ao se ligar diretamente a proteínas presentes nos eritrócitos e que, assim como ocorre com a DBP, os anticorpos impediriam a formação dessas interações proteicas e consequentemente, inibindo a invasão dos eritrócitos. Nesse sentido, o desenvolvimento de um ensaio capaz de detectar a ligação de proteínas do merozoíta de *P. vivax* às células sanguíneas do hospedeiro e ainda avaliar a capacidade inibitória de anticorpos induzidos por infecção natural ou vacinação seria extremamente importante.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de ligação de proteínas de merozoítas de *P. vivax* a eritrócitos humanos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes baseadas na proteína *PvMSP1*₁₉, no ectodomínio e nos domínios II e I-II da proteína *PvAMA-1*;

2.2.2. Estabelecimento do ensaio de citometria de fluxo para análise da ligação de proteínas recombinantes a eritrócitos humanos;

2.2.3. Construção dos plasmídeos recombinantes codificando *PvMSP1*₁₉ (pEGFP-*msp1*₁₉) e os domínios I-II e III de *PvAMA-1* (pEGFP-*ama-1*_{di-ii} e pEGFP-*ama-1*_{diii}) em fusão com GFP para transfecção de células de mamíferos;

2.2.4. Transfecção de células COS-7 com os plasmídeos recombinantes e análise da ligação das células COS-7 transfectadas a eritrócitos humanos;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

A proteína PvDBP-RII foi cedida pelo pesquisador Chetan Chitnis do Centro Internacional para Engenharia Genética e Biotecnologia (ICGEB - Índia) (SINGH *et al.*, 2001).

3.1.1 Expressão e purificação da proteína recombinante correspondente à PvMSP1₁₉

A expressão e purificação da proteína recombinante PvMSP1₁₉ foi feita em *Escherichia coli* conforme descrito previamente por nosso grupo (CUNHA, RODRIGUES e SOARES, 2001). Resumidamente, bactérias *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) foram transformadas com o plasmídeo pET14b-*mSP1*₁₉ e cultivadas em meio LB (Luria Broth – Invitrogen) contendo 100 µg/mL de ampicilina (LB-amp, Sigma) por 16 horas a 200 rpm e 37°C. A cultura foi diluída na razão 1:25 em LB-amp e incubada a 37°C, sob agitação de 200 rpm até atingir D.O.₆₀₀ entre 0,6-0,8. A expressão da proteína foi induzida pela adição de 0,01 mM de IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactosídeo – Pierce) por 4 horas a 37°C e 200 rpm. O material foi centrifugado (1.600 g por 15 minutos a 4°C) e as bactérias foram ressuspendidas em tampão de lise [57,5 mM NaH₂PO₄ (Synth), 128,7 mM NaCl (Synth), 1 mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsufonila - Sigma) e 0,4 mg/mL de lisozima (Sigma)]. As bactérias foram lisadas por sonicação (6 ciclos de 1 minuto a 50% de amplitude) no sonicador Branson Digital Sonifier, em seguida, centrifugou-se a 15.000 g por 45 minutos a 4°C. A proteína foi obtida de forma solúvel no sobrenadante e purificada por cromatografia de afinidade.

Para a purificação por cromatografia de afinidade, o sobrenadante obtido após sonicação foi aplicado lentamente em resina de níquel (GE Healthcare)

previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio [57,5 mM NaH_2PO_4 , 128,7 mM NaCl, 10% glicerol (m/v) e 2 mM PMSF; pH=6,0]. Em seguida a resina foi lavada com o tampão de lavagem (57,5 mM NaH_2PO_4 , 128,7 mM NaCl, 10% glicerol (m/v) e 1 mM PMSF; pH=6,0) e submetida a um gradiente (15 a 400 mM) de imidazol (USB) em tampão de lavagem. Após passagem pela resina, as alíquotas foram recuperadas e analisadas por SDS-PAGE 15%. As frações contendo a proteína foram reunidas e dialisadas em membrana para diálise (“SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing” 10.000 MWCO, Thermo Scientific) contra 20 mM Tris-HCl, pH=8,0.

Após a diálise, a proteína foi filtrada (0,45 μm) e purificada por cromatografia de troca iônica, utilizando a Coluna Q FF (GE Healthcare), previamente equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH=8,0, que estava acoplada ao sistema ÄKTA prime plus (GE Healthcare). A eluição da proteína foi feita por gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl, neste mesmo tampão. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE 15% e as que continham a proteína foram reunidas e dialisadas contra PBS (8 mM NaH_2PO_4 , 2,3 mM Na_2HPO_4 , 130 mM NaCl; pH=7,4), durante a noite, sob agitação constante, a 4°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de densitometria a partir de eletroforese em gel de acrilamida, em que foi aplicado a amostra a ser testada e quantidades conhecidas de albumina sérica bovina (Sigma).

3.1.2 Expressão e purificação da proteína recombinante correspondente ao domínio II de *PvAMA-1* (*PvAMA-1_{DII}*)

A proteína recombinante *PvAMA-1_{DII}* foi obtida conforme descrito previamente por nosso grupo (MÚFALO *et al.*, 2008). Bactérias *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com o plasmídeo pET28a-*pvama-1_{dii}*, contendo a sequência codificante do domínio II de *PvAMA-1* (aminoácidos 249 a 385). Estas bactérias foram cultivadas em meio LB contendo 30 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina (LB-can, Sigma) por

16 horas a 37°C. A cultura foi diluída na razão 1:25 em LB-can e incubada a 37°C, sob agitação de 200 rpm até atingir uma D.O.₆₀₀ entre 0,6-0,8. A expressão da proteína foi induzida com a adição de 0,1 mM de IPTG por 4 horas a 37°C. O material foi centrifugado (1.600 g por 15 minutos a 4°C) e as bactérias foram ressuspensas em tampão de lise (20 mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, 1 mM PMSF e 1 mg/mL de lisozima). Após a lise das bactérias por sonicação, a proteína foi obtida de forma solúvel e purificada por cromatografia de afinidade, em resina de níquel.

Para a purificação por cromatografia de afinidade, o sobrenadante obtido após sonicação foi aplicado lentamente em resina de níquel previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio (20 mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl). Em seguida a resina foi lavada com o tampão de lavagem [20 mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, 10% glicerol (m/v) e 1 mM PMSF; pH7,0] e submetida a um gradiente de imidazol (15 a 400 mM). Após passagem pela resina, as alíquotas foram recuperadas e analisadas por SDS-PAGE 12%. As frações contendo a proteína foram reunidas e dialisadas contra 20 mM Tris-HCl, pH=8,0.

Após a diálise, a proteína foi filtrada (0,45 µm) e purificada por cromatografia de troca iônica, utilizando a Coluna Q FF acoplada ao sistema ÄKTA prime plus. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE 12% e as que continham a proteína foram dialisadas contra PBS, durante a noite, sob agitação constante, a 4°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (BioRad Protein Assay).

3.1.3 Expressão e purificação da proteína recombinante correspondente ao ectodomínio de PvAMA-1 (PvAMA-1_E)

A expressão e purificação da proteína recombinante correspondente ao ectodomínio de PvAMA-1 (PvAMA-1_E) foi feita em *P. pastoris*, conforme descrito,

recentemente, por nosso grupo (VICENTIN, 2012). O gene correspondente ao ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax* (aminoácidos 43 a 487) foi sintetizado comercialmente (Genscript, EUA) com o intuito de otimizar o códon para expressão em *P. pastoris*, remover 3 sítios de glicosilação e adicionar cauda de histidina. Este gene foi clonado no vetor pPIC9K (Invitrogen), o qual contém um peptídeo sinal para expressão secretada em leveduras (Figura 7).

Figura 7. Representação esquemática da construção do gene *pvama-1_E* clonado no vetor pPIC9K para expressão em *Pichia pastoris*.

A expressão da proteína foi realizada pelo cultivo do clone selecionado por 24 horas a 28°C, sob agitação constante (230 rpm), em 40 mL de meio BMGY [1% (m/v) extrato de levedura (Sigma), 2% (m/v) peptona (Sigma), 100 mM KH₂PO₄ (Synth), 0,34% (m/v) base nitrogenada de levedura (Invitrogen), 1% (m/v) sulfato de amônio (Sigma), 4x10⁻⁵% (m/v) biotina (Gibco) e 3% (m/v) glicerol (Sigma)]. Após este período, as células foram recolhidas por centrifugação, solubilizadas em 200 mL de meio BMMY [1% (m/v) metanol, 1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 100 mM KH₂PO₄, 0,34% (m/v) base nitrogenada de levedura, 1% (m/v) sulfato de amônio, 4x10⁻⁵% (m/v) biotina e 0,5% (v/v) metanol (Synth)] e cultivadas por 96 horas a 28°C, sob agitação constante (230 rpm). A indução foi mantida pela adição diária de metanol na concentração final de 1%. A proteína foi expressa de forma secretada, no sobrenadante de cultura.

O sobrenadante contendo a proteína solubilizada foi dialisado contra o tampão de equilíbrio (20 mM NaH_2PO_4 , 20 mM Na_2HPO_4 , 200 mM NaCl, pH=8,0) e a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de níquel. Para a purificação por cromatografia de afinidade, o sobrenadante foi aplicado lentamente em resina de níquel previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio. Em seguida a resina foi lavada com o tampão de lavagem [20 mM NaH_2PO_4 , 20 mM Na_2HPO_4 , 0,5 M NaCl, 10% glicerol (m/v) e 1 mM PMSF; pH=6,0] e submetida a um gradiente de imidazol (15 a 400 mM) em tampão de lavagem. Após passagem pela resina, as alíquotas foram recuperadas e analisadas por SDS-PAGE 12%. As frações contendo a proteína foram reunidas e dialisadas contra 20 mM Tris-HCl, pH=8,0. Após a diálise, a proteína foi filtrada (0,45 μm) e purificada por cromatografia de troca iônica, utilizando a Coluna Q FF acoplada ao sistema ÄKTA prime plus. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE 12% e as que continham a proteína foram dialisadas contra PBS, durante a noite, sob agitação constante, a 4°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford.

3.1.4 Expressão e purificação da proteína recombinante correspondente ao domínio I-II de PvAMA-1 em *Pichia pastoris* (yPvAMA-1_{DI-II})

A proteína recombinante baseada nos domínios I-II de PvAMA-1 foi expressa por nosso grupo, anteriormente, em bactérias *E. coli* BL21 (DE3) (MÚFALO *et al.*, 2008). No entanto, essa proteína foi obtida em corpos de inclusão e, após etapas de desnaturação, redobramento e purificação, era mantida solúvel em um tampão contendo 50% de glicerol. Porém, para ensaios com eritrócitos, essa solução não pode ser utilizada, pois provoca hemólise das células. Sendo assim, no esforço de obter essa proteína na forma solúvel em PBS, realizamos a expressão da proteína a partir da levedura *P. pastoris*.

O gene correspondente aos domínios I-II de AMA-1 de *P. vivax* (aminoácidos 43 a 385) foi sintetizado comercialmente (Genscript, EUA) com o intuito de otimizar o códon para expressão em *P. pastoris*, remover 2 potenciais sítios de glicosilação e inserir cauda de histidina. Este gene foi clonado no vetor pPIC9K (Figura 8).

Figura 8. Representação esquemática da construção do gene *pvama-1_{di-ii}* clonado no vetor pPIC9K para expressão em *Pichia pastoris*.

Para transformação de leveduras *P. pastoris*, 40 µg do plasmídeo pPIC9K-*ama-1_{di-ii}* foi linearizado com a enzima de restrição *Sall* (New England Biolabs). Após a digestão, o DNA foi purificado, adicionando-se 1 volume de fenol-clorofórmio (USB), seguido de centrifugação a 14.000 g por 3 minutos. A fase superior foi coletada e o DNA foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto gelado e incubação por 16 horas a -20°C. Após o término de incubação, o material foi centrifugado a 14.000 g por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado e novamente centrifugado nas mesmas condições. Após secagem do sedimento a temperatura ambiente (T. A.), este foi ressuscitado em 10 µL de água miliQ estéril.

O plasmídeo linearizado foi transformado em leveduras *P. pastoris* linhagem GS115. Para tanto, uma colônia de levedura foi inoculada em 5 mL de meio YPD [1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona e 2% (m/v) glicose (Fluka)] e mantida sob agitação constante a 230 rpm por 16 horas e 28°C. A seguir, 0,3 mL

deste pré-inóculo foi inoculado em 500 mL de meio YPD. A cultura foi incubada novamente, nas mesmas condições acima, até atingir uma D.O.₆₀₀ de 1,3 a 1,5. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C e 450 g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento solubilizado em 250 mL de água gelada estéril. Este procedimento de lavagem com água gelada foi repetido e, em seguida, o sedimento foi solubilizado em 20 mL de sorbitol (Sigma) 1 M estéril e gelado. Após nova centrifugação, o sedimento foi solubilizado em 500 µL de sorbitol 1 M estéril e gelado.

Para a transformação, 80 µL das leveduras em sorbitol 1 M foram misturados com 40 µg do plasmídeo linearizado com a enzima de restrição *SaI*. As células foram transferidas para uma cubeta de 0,2 cm (BioRad) gelada e incubadas no gelo por 5 minutos. As mesmas foram eletroporadas no eletroporador Gene Pulser/MicroPulser, Bio-Rad sob as condições: 1500 V, 200 de resistência e 25 µF de capacitância. Após o choque, adicionou-se imediatamente 1 mL de sorbitol 1 M gelado e as células foram semeadas em MD (meio mínimo contendo glicose 2%, sem histidina). As leveduras transformantes *His*⁺ foram identificadas após 3 dias de incubação a 30°C. A seleção dos clones para expressão foi feita por avaliação da resistência ao antibiótico geneticina (G418, Sigma) nas concentrações finais de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL em meio YPD. O clone resistente a 1 mg/mL de geneticina foi escolhido para expressão da proteína recombinante.

Para a expressão da proteína, o clone selecionado foi cultivado durante 24 horas, 28°C, 230 rpm, em 500 mL de meio BMGY. Após este período, as células foram recolhidas por centrifugação, durante 10 minutos, T.A. e 450 g, solubilizadas em 500 mL de meio BMMY e cultivadas por um período adicional de 4 dias. A indução foi mantida pela adição diária de metanol na concentração final de 1%. Após

esse período, a presença de proteína no sobrenadante foi analisada em SDS-PAGE 12%. A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford.

3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As eletroforeses foram realizadas de acordo com protocolos estabelecidos no laboratório. Os géis de empilhamento foram feitos utilizando-se 3% de acrilamida/bisacrilamida, a partir das soluções estoque [12% (m/v) acrilamida (Invitrogen), 1,2% (m/v) bis-acrilamida (Invitrogen) e 0,25 mM Tris (Invitrogen), 0,2% (m/v) dodecilsulfato de sódio (SDS – Invitrogen)] e polimerizados utilizando-se 0,1% (m/v) de persulfato de amônio (Sigma) e 12 µL de TEMED (Invitrogen) para 5 mL de solução final. Os géis de separação foram feitos utilizando-se 12% ou 15% de acrilamida/bisacrilamida, a partir de soluções estoque [30% (m/v) acrilamida, 0,8% (m/v) bis-acrilamida e 0,75 mM Tris, 0,2% (m/v) SDS] e polimerizados utilizando-se 0,1% (m/v) de persulfato de amônio e 12 µL de TEMED (Invitrogen) para 9 mL de solução final.

As eletroforeses foram realizadas a 140V em solução tampão tris-glicina (35 mM SDS, 160 mM glicina (Synth), 25 mM Tris-HCl). Os géis foram corados em solução corante [1% (m/v) Coomassie blue R250 (USB), 45% (v/v) metanol (Synth) e 10% (v/v) ácido acético (Synth)] e descorados com solução descorante [45% (v/v) etanol (Synth) e 10% (v/v) ácido acético glacial].

As amostras foram preparadas em tampão de amostra [concentração final: 2,5% (m/v) glicerol (Synth), 4% (m/v) SDS, 25 mM 2-mercaptoetanol (Bio-rad), 12,5 mM Tris-HCl e 0,025 mM azul de bromofenol (Bio-rad)] e aquecidas a 97°C por 2 minutos.

3.3 Ensaio de *immunoblotting*

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE conforme descrito anteriormente. Após a eletroforese, as amostras separadas no gel de acrilamida foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond N, GE Healthcare) em tampão de transferência [160 mM glicina, 25 mM Tris e 20% (v/v) metanol] a 100V por 1 hora, utilizando-se o sistema de transferência úmida Biorad. As membranas foram coradas com solução Ponceau-S [0,1% Ponceau red (Biorad) e 10% ácido acético] para confirmação da transferência. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi incubada por aproximadamente 16 horas a 4°C, em solução de bloqueio [5% (m/v) leite em pó desnatado (Molico), 2,5% (m/v) albumina sérica bovina (BSA-Sigma)] em PBS [8 mM NaH₂PO₄, 2,3 mM Na₂HPO₄, 130 mM NaCl; pH 7,4]. Após este período, a membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo primário monoclonal anti-His (GE Healthcare) diluído 1:1.000 em solução de bloqueio ou monoclonal anti-PvAMA-1_{DII} (30 ng/mL) (GENTIL *et al.*, 2010). Após 3 lavagens de 10 minutos com PBS/Tween 20 a 0,05%, a membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (KPL) diluído 1:1.000 em solução de bloqueio e, após lavagens, a revelação foi feita por quimioluminescência utilizando kit ECL Western Blotting Analyses System (GE Healthcare). A revelação foi feita em sala escura, expondo a membrana ao filme fotográfico (GE Healthcare) e este foi revelado, utilizando-se soluções de revelação e fixação (Kodak).

3.4 Obtenção de soros policlonais de camundongos

Grupos de 6 camundongos BALB/c, fêmeas, de 6-8 semanas, isogênicos, procedentes do Biotério da FCF-IQ/USP foram usados para os experimentos de

imunização com as proteínas recombinantes *PvDBP-RII*, *PvMSP1₁₉* e *PvAMA-1_E*. Cada animal recebeu 4 doses de 10 µg de proteína recombinante, em um volume final de 0,1 mL com intervalo de 15 dias. A imunização foi feita por via s.c. nas duas patas traseiras (1ª dose) ou base da cauda (doses subseqüentes), com o antígeno na presença de Adjuvante Incompleto de Freund (AIF, Sigma – Aldrich). As coletas de sangue foram realizadas 14 dias após cada imunização e os soros armazenados a -20°C. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP em 14 de março de 2011.

3.5 Fenotipagem do antígeno Duffy

Os eritrócitos de voluntários sadios foram fenotipados quanto à presença dos antígenos Duffy A (Fy^{a+}) ou Duffy B (Fy^{b+}) pelo teste indireto de Coombs, utilizando anticorpos anti- Fy^a ou anti- Fy^b (Fresenius Kabi), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, os eritrócitos foram obtidos no momento do ensaio por centrifugação do sangue periférico (300 g por 10 minutos) e lavados 3 vezes com solução fisiológica (1.000 g por 5 minutos). Em seguida, preparamos uma suspensão de 5% de hemácias em solução fisiológica e 50 µL desta suspensão foi adicionada à 50 µL do anticorpo anti- Fy^a ou anti- Fy^b e incubada por 15 minutos a 37°C. Após a incubação, as hemácias foram lavadas 3 vezes com solução fisiológica, adicionou-se 100 µL de soro de Coombs e homogeneizou-se. Em seguida, as hemácias foram centrifugadas por 15 minutos a 1.000 g, o botão foi ressuspendido e observou-se se houve a formação de aglutinação, o que indica a presença do antígeno. O painel de hemácias (Fresenius Kabi) foi utilizado como controle. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP em 28 de outubro de 2010.

3.6 Ensaio de ligação das proteínas recombinantes a eritrócitos humanos utilizando citometria de fluxo

Neste ensaio, avaliamos a ligação das proteínas recombinantes a eritrócitos humanos por citometria de fluxo. Para tanto, utilizamos as proteínas *PvMSP1*₁₉, *PvAMA-1*_E, *PvAMA-1*_{DII} e *PvAMA-1*_{DI-II}. A proteína recombinante baseada na região II de DBP (*PvDBP-RII*) foi utilizada como controle positivo e a tioredoxina como controle negativo, uma vez que esta possui cauda de histidina (his₆).

Para os ensaios de ligação por citometria, coletamos sangue periférico de voluntários sadios. Os eritrócitos foram obtidos no dia do ensaio por centrifugação (250 g por 10 minutos) e lavados 3 vezes com meio RPMI 1640. Em seguida, as células vermelhas foram lavadas 3 vezes em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (PBS-BSA) e diluídas para a concentração de $1 \cdot 10^7$ células/mL em PBS-BSA. Os eritrócitos ($1 \cdot 10^6$) foram incubados por 4 horas a temperatura ambiente com 0 a 50 µg/mL das proteínas recombinantes ou tioredoxina humana (Sigma). Em seguida, as amostras foram lavadas 2 vezes com 200 µL de PBS-BSA e incubadas por 1 hora a 4°C no escuro com anticorpo monoclonal conjugado mouse anti-penta-His Alexa Fluor 647 (Qiagen) diluído 1:25 em PBS-BSA. As amostras foram lavadas 3 vezes com 200 µL de PBS-BSA e ressuspensas em PBS-BSA 1%.

A aquisição dos dados foi feita no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company) e a análise foi feita no software Flowjo versão 9.4.4. O citômetro de fluxo foi calibrado antes de cada ensaio. Foram adquiridos 400.000 eventos totais por amostra no FACS. As amostras com tioredoxina foram usadas para determinar o background de ligação da proteína. Para validar estes resultados, realizamos ensaios de inibição da ligação, utilizando soro policlonal anti-*PvDBP-RII*

nas diluições 1:100, 1:200 e 1:400. Soros de camundongos “naive” foram utilizados como controle negativo.

Em todas as análises dos resultados de citometria, foi utilizada a média geométrica da intensidade de fluorescência (MIF). Para comparar as intensidades de fluorescência de experimentos diferentes, utilizamos a média geométrica da intensidade de fluorescência normalizada, conforme segue:

$$\text{MIF normalizada} = (\text{MIF} / \text{MIF basal}) * 100, \text{ onde:}$$

MIF basal = média geométrica da intensidade de fluorescência obtida com 0 µg/mL de proteína.

3.7 Plasmídeos recombinantes para transfecção celular

Plasmídeos recombinantes codificando a região II de DBP, a proteína MSP1₁₉ de *P. vivax* e os domínios I-II e III de AMA-1 de *P. vivax* foram utilizados para transfecção de células. Para tanto, selecionamos dois vetores para expressão em células de mamíferos em fusão com a GFP do inglês, (“green fluorescent protein”): pDisplay-EGFP, cedido pelo Dr. Joon-Yong Chung, da Coreia do Sul (HAN *et al.*, 2004) e o plasmídeo pEGFP-*dbp*, cedido pela Dra. Luzia Helena Carvalho do Instituto René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (CERAVOLO *et al.*, 2008).

Os plasmídeos pDEGFP-*msp1*₁₉, pDEGFP-*dbp*, pDEGFP-*ama-1*_{di-ii} e pDEGFP-*ama-1*_{diii} foram construídos, previamente, pela aluna de mestrado Mayara Barbedo (BARBEDO, 2007), a partir do vetor pDisplay-EGFP e já estavam disponíveis no laboratório.

Os plasmídeos pEGFP-*ama-1*_{di-ii} e pEGFP-*ama-1*_{diii} foram construídos a partir da seqüência de nucleotídeos correspondente aos domínios *i-ii* e *iii* de *ama-1* de *P.*

vivax através da amplificação por PCR a partir do plasmídeo recombinante pMOS-*ama-1* (RODRIGUES *et al.*, 2005), o qual contém o gene que codifica os aminoácidos 43 a 487 do ectodomínio de AMA-1. O plasmídeo pEGFP-*msp1*₁₉ foi construído a partir da sequência de nucleotídeos correspondente à *msp1*₁₉ de *P. vivax* através da amplificação por PCR a partir do plasmídeo recombinante pET14b-*msp1*₁₉ (CUNHA *et al.*, 2001). As reações de PCR foram realizadas com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição enzimática específicos para a clonagem no vetor pEGFP-N1 em fusão com a GFP (Tabela 2), o qual foi cedido pela Dra. Luzia Helena Carvalho do Instituto René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (CERAVOLO *et al.*, 2008).

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos utilizados para construção de plasmídeos recombinantes para transfecção celular.

Gene	Seqüência do oligonucleotídeo	Polaridade Sítio de restrição
<i>pvama-1</i> _{di-ii}	5'-GAT <u>CTCGAG</u> ATGCCTACCGTTGAGAGAAGC-3'	Senso <i>Xho</i> I
	5'-CGGT <u>G</u> GATCCCGCTCCGGGCCTACTTCTTG-3'	Antisenso <i>Bam</i> HI
<i>pvama-1</i> _{diii}	5'-CTTCGAATTCTGATGTTCCCCTGCAGCATATATAAA-3'	Senso <i>Eco</i> RI
	5'-CGGT <u>G</u> GATCCCGTAGTAGCATCTGCTTGTTCTGA-3'	Antisenso <i>Bam</i> HI
<i>pvmmsp1</i> ₁₉	5'-CTTCGAATTCTGATGAGCTCCGAGCACACATGT-3'	Senso <i>Eco</i> RI
	5'-CGGT <u>G</u> GATCCCGGCTACAGAAACTCCCTC-3'	Antisenso <i>Bam</i> HI

Sublinhado – sequências dos sítios de restrição.

3.8 Transfecção de células COS-7

Os plasmídeos recombinantes pDEGFP-*msp1*₁₉, pEGFP-*msp1*₁₉, pDEGFP-*dbp*, pEGFP-*dbp*, pDEGFP-*ama-1*_{di-ii}, pEGFP-*ama-1*_{di-ii}, pDEGFP-*ama-1*_{diii} e pEGFP-*ama-1*_{diii} foram utilizados para transfecção de células COS-7 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Para tanto, 1x10⁵ células/poço foram plaqueadas

em placas de 6 poços em meio DMEM High glucose (LGC biotecnologia) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco), 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 1mM de piruvato de sódio. Após 24 horas, as células foram transfectadas com 3 µg/poço dos plasmídeos recombinantes na presença de 6 µg/poço de polietilenoimina (Sigma). As células foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas e analisadas por microscopia de fluorescência a fim de confirmar a transfecção. A eficiência de transfecção foi avaliada pelo número de células fluorescentes (GFP), utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company) em comparação com células não transfectadas, e a análise foi feita no software Flowjo versão 9.4.4. Foram adquiridos 20.000 eventos totais por amostra no FACS.

3.9 Avaliação da expressão de proteínas na superfície de células COS-7 transfectadas

As células transfectadas com os plasmídeos recombinantes foram avaliadas quanto à expressão da proteína em sua superfície por citometria de fluxo. Após 24 horas de transfecção, as células foram removidas da placa de cultura, incubando-se com EDTA 10 mM a 37°C por 10 minutos, seguida de remoção mecânica com o auxílio de “cell scraper” (Corning). Após lavagens com PBS suplementado com 5% de soro fetal bovino (PBS-SFB), as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS-SFB e incubadas com anticorpos policlonais gerados em camundongos (anti-*PvAMA-1_E*, anti-*PvDBP-RII* ou anti-*PvMSP1₁₉*) ou soro de camundongos “naive” como controle, na diluição 1:100 por 1 hora a 4°C. Após 3 lavagens com PBS-SFB, as células foram incubadas com anticorpo anti-mouse IgG1 PE (Becton, Dickinson and Company). Após 3 lavagens com PBS-SFB, foram adquiridos 50.000 eventos no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company). Beads não

marcadas e marcadas com FITC e PE foram utilizadas na compensação das amostras. A percentagem de células expressando a proteína recombinante foi determinada em relação à células marcadas apenas com o anticorpo secundário. A análise foi feita no software Flowjo versão 9.4.4.

3.10 Ensaio de citoaderência para avaliação da ligação de proteínas a eritrócitos

As células transfectadas com os plasmídeos recombinantes foram avaliadas quanto à sua capacidade de ligação a eritrócitos humanos. Para tanto, foi coletado sangue periférico de voluntários sadios e os eritrócitos foram obtidos por centrifugação (250 g por 10 minutos). Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com meio DMEM High glucose (LGC biotecnologia) e ressuspensos a um hematócrito de 10%. O volume de 200 μ L desta suspensão foi adicionado em cada poço contendo células COS-7 transfectadas, obtendo-se a concentração final de 1% de eritrócitos, e incubou-se por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂. As placas foram lavadas três vezes com 2 mL de DMEM High glucose para remover os eritrócitos não aderentes. Após as lavagens, foi avaliado o número de rosetas formadas em 25 campos, em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TE 300) no aumento de 200X.

Para validar os experimentos, realizamos a inibição da ligação utilizando anticorpos policlonais anti-*PvDBP*-R11. Para tanto, as células COS-7 transfectadas (1×10^5) com os plasmídeos recombinantes pDEGFP-*dbp* ou pEGFP-*dbp*, expressando *PvDBP* em sua superfície, foram previamente incubadas por 1 hora com anticorpo policlonal anti-*PvDBP*-R11, nas diluições 1:400, 1:800 e 1:1600. Em seguida, foram incubadas com eritrócitos Duffy B (concentração final de 1%) por 2 horas e a formação de rosetas em 25 campos foi avaliada por microscópio de

fluorescência no aumento 200X. Os resultados foram expressos como a percentagem de inibição de ligação a eritrócitos em relação ao número total de rosetas formadas na ausência de soro. Soro de camundongos “naive” foi utilizado como controle negativo.

3.11 Análise estatística

A análise estatística foi determinada através do programa GraphPad PRISM 4. As análises de comparação entre mais de 2 grupos foram realizadas pela Análise de Variância Unidimensional (*One-way ANOVA*) seguida do teste de Tukey. As análises de comparação entre 2 grupos, apenas, foram feitas pelo teste t de *Student*.

4. RESULTADOS

4.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes de *P. vivax*

As proteínas *PvMSP1₁₉* e *PvAMA-1_{DI}* foram expressas em bactérias *E. coli*, na forma solúvel. A proteína *PvMSP1₁₉* apresentou massa molecular aparente de 18 kDa e a *PvAMA-1_{DI}* de 26 kDa (Figura 9). A proteína *PvAMA-1_E* expressa em levedura apresentou massa molecular aparente de 53 kDa e rendimento de 7,5 mg/mL (Figura 09).

Figura 9. Análise em SDS-PAGE 15% das proteínas recombinantes após purificação. MM: marcador de massa molecular (Fermentas). A. *PvDBP-RII*, B. *PvMSP1₁₉*, C. *PvAMA-1_{DI}* e D. *PvAMA-1_E*

Em função da dificuldade de obtenção da proteína *PvAMA-1_{DI-II}* em *E. coli* e, a partir do sucesso obtido com a expressão de *PvAMA-1_E* em levedura, decidimos padronizar a expressão de *PvAMA-1_{DI-II}* em *P. pastoris* (*yPvAMA-1_{DI-II}*), na tentativa de obter a proteína solúvel. A proteína foi expressa de forma solúvel e secretada no sobrenadante da cultura, apresentando máxima expressão após 96 horas de indução com metanol. A proteína *yPvAMA-1_{DI-II}* apresentou massa molecular aparente de 43-44 kDa (Figura 10) e foi reconhecida por anticorpo monoclonal anti-His e anti-*PvAMA-1_{DI}* (Figura 10 B e C).

Figura 10. Análise em SDS-PAGE 12% da proteína recombinante baseada nos domínios I-II de PvAMA-1 produzida em *P. pastoris* (yPvAMA-1_{DI-II}). A. yPvAMA-1_{DI-II} purificada. B. *Immunoblotting* da proteína yPvAMA-1_{DI-II} utilizando anticorpo anti-His (GE Healthcare). C. *Immunoblotting* da proteína yPvAMA-1_{DI-II} utilizando anticorpo monoclonal anti-PvAMA-1_{DI-II}. MM: marcador de massa molecular.

4.2 Ensaio de ligação das proteínas recombinantes a eritrócitos humanos utilizando citometria de fluxo

Após a expressão das proteínas de interesse, iniciamos a avaliação da ligação destas proteínas a eritrócitos por citometria de fluxo. Para tanto, usamos como controle positivo a proteína recombinante baseada na região II de DBP (PvDBP-RII), uma vez que a literatura mostra que foi possível detectar a ligação desta proteína a eritrócitos utilizando citometria de fluxo (TRAN *et al.*, 2005). Além disso, avaliamos a ligação de PvMSP1₁₉ e utilizamos a tioredoxina humana como controle negativo.

As proteínas contendo cauda de histidina, foram incubadas com os eritrócitos, nas concentrações de 0, 1, 10, 25 e 50 µg/mL por 4 horas a temperatura ambiente. A ligação das proteínas foi avaliada pela marcação com anticorpo monoclonal anti-His.

A estratégia de análise adotada para avaliar a ligação das proteínas aos eritrócitos está ilustrada na Figura 11. Inicialmente, foi feito um “gate” na população

de eritrócitos, baseado em tamanho (FSC) e complexidade (SSC). Na população de eritrócitos, determinou-se a população de células marcadas com anti-penta-His Alexa Fluor 647, ou seja, aquelas células em que houve ligação de proteínas. Na população de células anti-penta-His Alexa Fluor 647 positivas, foi avaliada a média geométrica da intensidade de fluorescência (MFI), determinada pelo software Flowjo v9.4.4.

Figura 11. Estratégia de análise adotada para avaliar a ligação de proteínas a eritrócitos por citometria de fluxo. Inicialmente, foi feito um “gate” na população de eritrócitos, baseado em tamanho (FSC) e complexidade (SSC). Em seguida, determinou-se a população de células marcadas com anti-penta-His Alexa Fluor 647.

Para comparar as intensidades de fluorescência entre experimentos diferentes utilizamos a média geométrica da intensidade de fluorescência normalizada pela intensidade de fluorescência basal (0 µg/mL de proteína).

Os resultados da média aritmética ($\pm$ desvio padrão) das proteínas PvDBP-RII, PvMSP1₁₉ e tioredoxina humana estão ilustrados na Figura 12. Nestes ensaios, notamos que a média de intensidade de fluorescência para a proteína PvDBP-RII foi diretamente proporcional à quantidade de proteína utilizada e que a ligação desta proteína a eritrócitos humanos Duffy B foi significativamente maior em relação à ligação à eritrócitos Duffy A (Figura 12). O controle negativo para cauda de histidina, tioredoxina humana, demonstra que não houve ligação inespecífica (Figura 12).

Figura 12. Curvas dose-resposta da ligação de proteínas a eritrócitos humanos. Eritrócitos (1×10^6 células) foram incubados com 0 a 50 µg/mL de proteína recombinante contendo cauda de histidina. A ligação das proteínas foi determinada com anti-penta-His Alexa Fluor 647, por citometria de fluxo. Os resultados são a média aritmética ($\pm$ desvio padrão). **A.** PvDBP-R11, **B.** PvMSP1₁₉ e **C.** Tioredoxina humana.

Prosseguimos as análises de ligação das proteínas de merozoítas de *P. vivax* a eritrócitos humanos, utilizando as proteínas recombinantes baseadas em PvAMA-1. As proteínas avaliadas foram: PvAMA-1_E, PvAMA-1_{DII} e yPvAMA-1_{DI-II}. As proteínas contendo cauda de histidina, foram incubadas com os eritrócitos, nas concentrações de 0, 1, 10, 25 e 50 µg/mL por 4 horas a T.A. A estratégia de análise adotada para avaliar a ligação das proteínas aos eritrócitos está ilustrada na Figura 11.

Notamos que as médias de intensidade de fluorescência para as proteínas PvAMA-1_E expressa em *P. pastoris* e PvAMA-1_{DII} expressa em *E. coli* foi baixa (Figura 13 A e B), denotando a ausência de detecção da ligação destas aos eritrócitos. Em seguida, realizamos os mesmos ensaios com a proteína yPvAMA-1_{DI-II} expressa em levedura *P. pastoris*, a qual é sóluvel em meio aquoso. Observamos médias de intensidade de fluorescência baixas (Figura 13 C), indicando a ausência de ligação desta proteína aos eritrócitos.

Figura 13. Curvas dose-resposta da ligação de *PvAMA-1* e seus domínios a eritrócitos. A ligação das proteínas foi determinada por citometria de fluxo conforme descrito. Os resultados são a média aritmética ($\pm$ desvio padrão). **A.** *PvAMA-1_E*, **B.** *PvAMA-1_{DII}* e **C.** $\gamma PvAMA-1_{DI-II}$.

A partir dos resultados observados, realizamos as análises dos ensaios de ligação apenas na concentração de 50 $\mu g/mL$ de proteínas. Observamos elevada média de intensidade de fluorescência quando analisada a ligação de *PvDBP-RII* a eritrócitos Duffy A ($p < 0,001$) e Duffy B ($p < 0,001$) em relação à tioredoxina humana

(Figura 14), indicando a ligação de *PvDBP-RII* aos eritrócitos humanos. Além disso, foi observada maior capacidade de ligação de *PvDBP-RII* a eritrócitos Duffy B em relação a Duffy A ($p < 0,001$), na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14).

Para validar estes resultados, realizamos ensaios de inibição da ligação, utilizando soro policlonal anti-*PvDBP-RII* nas diluições 1:100, 1:200 e 1:400. Observamos a inibição da ligação, da ordem de 60% (Figura 15). “Pool” de soros de camundongos “naive” foi utilizado como controle negativo.

Figura 14. Ligação da proteína *PvDBP-RII* a eritrócitos. A ligação da proteína (50 $\mu\text{g/mL}$) foi determinada por citometria de fluxo conforme descrito. Os resultados são a média aritmética ($\pm$ desvio padrão). (***) = $p < 0,001$.

Figura 15. Inibição da ligação da proteína PvDBP-RII a eritrócitos humanos. Soros policlonais anti-PvDBP-RII ou "naive" (diluições 1:100, 1:200 e 1:400) foram incubados com 50 µg/mL de proteína recombinante PvDBP-RII e, posteriormente, incubados com eritrócitos Duffy B. Os resultados são a média aritmética ($\pm$ desvio padrão) da percentagem de inibição da ligação das proteínas aos eritrócitos.

Ao analisarmos a ligação das proteínas de merozoítas de *P. vivax* (50 µg/mL) a eritrócitos humanos, confirmamos a ligação de PvDBP-RII a eritrócitos Duffy A ($p < 0,001$) e Duffy B ($p < 0,001$) em relação à tioredoxina humana (Figura 16). No entanto, não foi possível detectar a ligação das proteínas PvMSP1₁₉, PvAMA-1_E, PvAMA-1_{DII} e yPvAMA1_{DI-II} a eritrócitos humanos (Figura 16).

Figura 16. Ligação de proteínas de merozoítas de *P. vivax* a eritrócitos humanos. A ligação das proteínas (50 µg/mL) foi determinada por citometria de fluxo conforme descrito. Os resultados são a média aritmética ($\pm$ desvio padrão). (***) = $p < 0,001$.

4.3 Ensaio de ligação das proteínas de merozoítas de *P. vivax* a eritrócitos humanos por citoaderência

A avaliação da ligação das proteínas de merozoítas de *P. vivax* a eritrócitos humanos foi confirmada pelo ensaio clássico de citoaderência. Plasmídeos recombinantes codificando a região II de DBP, a proteína MSP1₁₉ de *P. vivax* e os domínios I-II e III de AMA-1 de *P. vivax* foram utilizados para transfecção de células COS-7. Para tanto, selecionamos dois vetores para expressão em células de mamíferos em fusão com a GFP: pDisplay-EGFP e o plasmídeo pEGFP-*dbp*.

Os plasmídeos pDEGFP-*msp1*₁₉, pDEGFP-*dbp*, pDEGFP-*ama-1*_{di-ii} e pDEGFP-*ama-1*_{diii} foram construídos pela aluna de mestrado Mayara Barbedo, a partir do vetor pDisplay-EGFP, porém, a eficiência de transfecção obtida era baixa, o que pode ter prejudicado a visualização da formação de rosetas (BARBEDO, 2007). Sendo assim, decidimos utilizar outro plasmídeo, o pEGFP-*dbp* cujo trabalho mostrava elevada eficiência de transfecção e formação de rosetas (CERAVOLO *et al.*, 2008). A partir deste, foram construídos os plasmídeos pEGFP-*ama-1*_{di-ii}, pEGFP-*ama-1*_{diii} e pEGFP-*msp1*₁₉.

Os plasmídeos recombinantes codificando a DBP, a proteína MSP1₁₉ de *P. vivax* e os domínios I-II e III de AMA-1 de *P. vivax* em fusão com a GFP foram utilizados para transfecção de células COS-7. As células transfectadas com os plasmídeos recombinantes foram avaliadas quanto à eficiência de transfecção e expressão da proteína em sua superfície por citometria de fluxo. Para essa análise, as células foram incubadas com anticorpos policlonais gerados em camundongos (anti-PvAMA-1_E, anti-PvDBP-RII ou anti-PvMSP1₁₉) e, posteriormente, incubadas com anticorpo anti-mouse IgG1 PE.

A estratégia de análise adotada para avaliar a eficiência de transfecção e a expressão das proteínas na superfície das células transfectadas está ilustrada na Figura 17. Inicialmente, foi feito um “gate” na população de células COS-7, baseado em tamanho (FSC) e complexidade (SSC). Em seguida, foi feito um “gate” na população de células fluorescentes (GFP), sendo que a percentagem destas células GFP+ indicam a eficiência de transfecção. Nesta população, definiu-se o “gate” de células expressando a proteína em sua superfície, pela fluorescência emitida pelo anticorpo anti-mouse IgG1 PE.

Figura 17. Estratégia de análise adotada para avaliar a expressão de proteínas na superfície de células transfectadas. Inicialmente, foi feito um “gate” na população de células COS-7, baseado em tamanho (FSC) e complexidade (SSC). Em seguida, foi feito um “gate” na população de células fluorescentes (GFP) e, dentro desta população, definiu-se o “gate” de células expressando a proteína em sua superfície (anti-mouse IgG1 PE). As linhas azuis representam o controle negativo.

A eficiência de transfecção e a expressão das proteínas na superfície das células estão indicadas na Tabela 3. Observamos que a eficiência de transfecção de todos os plasmídeos foi superior a 50% e que a eficiência de transfecção entre plasmídeos pEGFP e pDEGFP foram similares, quando comparamos plasmídeos codificando as mesmas proteínas.

Tabela 3. Análise da expressão de proteínas na superfície de células transfectadas. Os dados apresentados representam a eficiência de transfecção em cada condição experimental e a percentagem de células transfectadas expressando a proteína em sua superfície.

Plasmídeo Utilizado	Eficiência de Transfecção (% de células transfectadas)	Percentagem de células transfectadas expressando a proteína
pDEGFP- <i>dbp</i>	54,27 ± 3,19%	96,04 ± 0,01%
pDEGFP- <i>ama-1_{di-ii}</i>	68,53 ± 3,37%	1,59 ± 0,01%
pDEGFP- <i>ama-1_{diii}</i>	58,2 ± 7,44%	78,28 ± 0,06%
pDEGFP- <i>msp1₁₉</i>	75,17 ± 2,90%	19,07 ± 0,04%
pEGFP- <i>dbp</i>	73,6 ± 2,42%	79,78 ± 0,06%
pEGFP- <i>ama-1_{di-ii}</i>	67,17 ± 6,28%	38,73 ± 0,02%
pEGFP- <i>ama-1_{diii}</i>	46,9 ± 15,31%	26,03 ± 0,2%
pEGFP- <i>msp1₁₉</i>	60,47 ± 26,67%	45,76 ± 0,1%

Notamos que o número de células transfectadas expressando a proteína DBP foi bastante elevada, superior a 79%, conforme observamos na Tabela 3. Em relação às demais proteínas, esse índice foi menor, sendo que, a expressão de *PvMSP1₁₉* foi menor, quando utilizamos o plasmídeo pDEGFP-*msp1₁₉* ($19,07 \pm 0,04\%$) em relação ao plasmídeo pEGFP-*msp1₁₉* ($45,76 \pm 0,1\%$) (Tabela 3). No entanto, para o domínio III, a expressão da proteína foi maior com o plasmídeo pDEGFP-*ama-1_{diii}* ($78,28 \pm 0,06\%$) em relação ao plasmídeo pEGFP-*ama-1_{diii}* ($26,03 \pm 0,2\%$). Com relação ao domínio I-II de AMA-1 de *P. vivax*, observamos que apesar da eficiência de transfecção ter sido elevada com os dois plasmídeos (aproximadamente 67%), o número de células expressando a proteína foi muito variável. Notamos que a porcentagem de células expressando a proteínas, ao utilizarmos o plasmídeo pEGFP-*ama-1_{di-ii}* foi de $38,73 \pm 0,02\%$, porém, ao utilizarmos o plasmídeo pDEGFP-*ama-1_{di-ii}*, a expressão foi muito baixa, cerca de 1,63% (Tabela 3).

Prosseguimos as análises de citoaderência, a fim de avaliar a capacidade de ligação das proteínas a eritrócitos humanos e validar o método de citometria de fluxo. Para tanto, as células transfectadas com os plasmídeos recombinantes pDEGFP-*dbp* ou pEGFP-*dbp*, expressando *PvDBP* em sua superfície, foram utilizadas como controle positivo quanto à capacidade de ligação a eritrócitos humanos. Observamos que não houve diferença significativa no número de rosetas formadas entre eritrócitos Duffy A ou Duffy B (Figuras 18 e 19 A). Nas imagens de microscopia, podemos observar as células transfectadas, expressando GFP (verde) e, no campo claro, as rosetas formadas em torno destas células (Figuras 18 e 19B). Nota-se que o vetor pDEGFP-*dbp* apresenta fluorescência mais difusa em relação ao vetor pEGFP-*dbp*. Apesar de não ter sido observada diferença no número de

rosetas formadas entre Duffy A e Duffy B, foi possível notar que as rosetas formadas com eritrócitos Duffy B, aparentemente, apresentavam maior número de eritrócitos ao redor das células transfectadas.

Figura 18. Análise da ligação de eritrócitos a células transfectadas com o plasmídeo recombinante pEGFP-dbp. Células COS-7 foram transfectadas com o plasmídeo recombinante pEGFP-dbp. Após 24 horas de transfecção, estas células foram incubadas com eritrócitos Duffy A ou Duffy B por 2 horas. **A.** Os dados foram expressos em número de rosetas formadas em 25 campos no aumento de 200X. Os resultados são a média aritmética ($\pm$ desvio padrão). A análise estatística foi realizada por t-test de student. **ns** (não significativo) = $p > 0,05$. **B.** Imagens de citoaderência (rosetas) com células transfectadas com plasmídeo pEGFP-dbp (verde), na presença de eritrócitos Duffy A ou Duffy B.

Figura 19. Análise da ligação de eritrócitos a células transfectadas com plasmídeo recombinante pDEGFP-*dbp*. **A.** Os dados foram expressos em número de rosetas formadas em 25 campos. Os resultados são a média aritmética ($\pm$ desvio padrão). A análise estatística foi realizada por teste t de student. **ns** (não significativo) = $p > 0,05$. **B.** Imagens de citoaderência com células transfectadas (GFP), na presença de eritrócitos Duffy A ou Duffy B.

A fim de validar os experimentos acima, realizamos ensaios de inibição da citoaderência utilizando anticorpo policlonal anti-PvDBP-RII, nas diluições 1:400, 1:800 e 1:1.600. Os resultados foram expressos como a percentagem de inibição de ligação a eritrócitos em relação ao número total de rosetas formadas na ausência de soro (Figura 20). “Pool” de soros de camundongos “naive” foi utilizado como controle negativo. A percentagem de inibição de formação de rosetas foi superior a 90% para o plasmídeo pEGFP-*dbp* (Figura 20 A) e variou de 60% (diluição do soro de 1:1.600) a 84% (diluição do soro de 1:400) para o plasmídeo pDEGFP-*dbp* (Figura 20 B).

Nas imagens de microscopia, podemos observar as células transfectadas, expressando GFP (verde) e, no campo claro, as rosetas formadas em torno destas células. Nota-se a formação de rosetas quando foi utilizado soro de camundongos “naive” e ausência da formação destas, quando utilizado soros policlonais anti-PvDBP-RII, indicando a inibição da ligação (Figuras 21 e 22).

Figura 20. Análise da inibição da ligação de eritrócitos a células transfectadas com plasmídeo recombinante pEGFP-*dbp* (A) e pDEGFP-*dbp* (B) por anticorpos policlonais. Células COS-7 transfectadas foram previamente incubadas com soros policlonais anti-PvDBP-RII ou soro “naive”. A análise de inibição da ligação foi realizada conforme descrito. Os dados foram expressos em percentagem de inibição da ligação em relação ao ensaio de citoaderência na ausência de soros.

Figura 21. Imagens da inibição da ligação de eritrócitos a células transfectadas com plasmídeo recombinante pEGFP-*dbp* por anticorpos policlonais. A inibição da ligação foi determinada conforme descrito. As imagens refletem a inibição da formação de rosetas com células transfectadas (GFP), na presença de anticorpos policlonais anti-PvDBP-RII ou soro "naive".

Figura 22. Imagens da inibição da ligação de eritrócitos a células transfectadas com plasmídeo recombinante pDEGFP-*dbp* por anticorpos policlonais. A inibição da ligação foi determinada conforme descrito. As imagens refletem a inibição da formação de rosetas com células transfectadas (GFP), na presença de anticorpos policlonais anti-*PvDBP*-RII ou soro "naive".

Em seguida, realizamos a avaliação da ligação de *PvMSP1*₁₉ e dos domínios I-II e III de *PvAMA-1* por citoaderência. Para tanto, as células COS-7 foram transfectadas com os plasmídeos recombinantes pDEGFP-*ama-1*_{di-ii}, pDEGFP-*ama-1*_{diii} e pDEGFP-*msp1*₁₉ ou pEGFP-*ama-1*_{di-ii}, pEGFP-*ama-1*_{diii} e pEGFP-*msp1*₁₉. Nas imagens de microscopia, podemos observar as células transfectadas, expressando GFP (verde) e ausência de formação de rosetas, no campo claro, demonstrando que não foi possível detectar a ligação de *PvMSP1*₁₉ e dos domínios I-II e III de *PvAMA-1* pelo ensaio de citoaderência (Figuras 23 e 24). Utilizamos como controle negativo, os plasmídeos pDEGFP e pEGFP sem inserto, demonstrando a ausência de formação inespecífica de rosetas (Figura 25).

Figura 23. Análise da ligação de eritrócitos a células transfectadas expressando *PvMSP1*₁₉. Células COS-7 foram transfectadas com os plasmídeos recombinantes pEGFP-*msp1*₁₉ e pDEGFP-*msp1*₁₉. A avaliação da ligação foi realizada conforme descrito. Foi avaliada a formação de rosetas formadas em 25 campos, em microscópio de fluorescência no aumento de 200X.

Figura 24. Análise da ligação de eritrócitos a células transfectadas expressando *PvAMA-1*_{DI-II} ou *PvAMA-1*_{DIII}. Células COS-7 com os plasmídeos recombinantes pEGFP-*ama-1*_{di-ii}, pDEGFP-*ama-1*_{di-ii}, pEGFP-*ama-1*_{diii} ou pDEGFP-*ama-1*_{diii}. A avaliação da ligação foi realizada conforme descrito. Foi avaliada a formação de rosetas formadas em 25 campos, em microscópio de fluorescência no aumento de 200X.

Figura 25. Análise da ligação de eritrócitos a células transfectadas com plasmídeos sem inserto. Células COS-7 foram transfectadas com os plasmídeos pEGFP ou pDEGFP. A avaliação da ligação foi realizada conforme descrito. Foi avaliada a formação de rosetas formadas em 25 campos, em microscópio de fluorescência no aumento de 200X.

5. DISCUSSÃO

A invasão dos eritrócitos pelos merozoítas de *Plasmodium* é um processo bastante complexo que envolve a interação entre várias moléculas do parasita e da célula hospedeira. Este processo pode ser dividido em três etapas: i) adesão inicial do parasita à célula hospedeira, ii) reorientação e iii) formação de junção e invasão. O processo de invasão vem sendo muito estudado, porém, ainda não foi completamente elucidado. Muitas proteínas estão envolvidas nesse processo e, dentre estas, acredita-se que as MSPs estão relacionadas com a adesão inicial (GAUR *et al.*, 2004). Além disso, as proteínas ligantes tipo “Duffy” e as proteínas ligantes de reticulócitos são fundamentais para a formação da junção (COWMAN; CRABB, 2006; GAUR *et al.*, 2004). Dentre as proteínas tipo “Duffy”, destaca-se a DBP que, no caso de *P. vivax*, é fundamental para que ocorra a invasão. Sabe-se que esta proteína se liga ao receptor DARC presente nos eritrócitos, através da região II (DBP-RII) (CHITNIS; MILLER, 1994; CHITNIS *et al.*, 1996).

Além destas, AMA-1 tem sido amplamente estudado e as evidências apontam para um papel fundamental na invasão dos eritrócitos, porém, o mecanismo pelo qual este antígeno está envolvido na invasão ainda é discutido. Alguns estudos apontam que AMA-1 formaria um complexo com as proteínas RONS, no qual AMA-1 estaria associado à RON2 e esta, por sua vez, estaria inserida na célula hospedeira (Figura 6) (SRINIVASAN *et al.*, 2011). No entanto, outros estudos contradizem este modelo e apontam para a ligação direta de AMA-1 aos eritrócitos (revisto por BARGIERI *et al.*, 2012).

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a ligação de proteínas do merozoíta de *P. vivax* a eritrócitos humanos. Propomos o estabelecimento de um método de citometria de fluxo para a avaliação da ligação destas proteínas e a validação desse método, utilizando a metodologia clássica de citoaderência com

células transfectadas. Para tanto, a DBP foi utilizada como controle positivo, uma vez que esta possui a capacidade de ligação a eritrócitos.

O ensaio de ligação a eritrócitos por citometria de fluxo foi padronizado utilizando-se a *PvDBP-RII* como controle positivo e a tioredoxina humana como controle negativo. Observamos a ligação de *PvDBP-RII* a eritrócitos humanos (Figuras 14 e 16). Para confirmar a especificidade de ligação da proteína *PvDBP-RII* aos eritrócitos, realizamos ensaios de inibição da ligação utilizando soro policlonal gerados em camundongos imunizados com *PvDBP-RII*. Observamos a inibição da ligação, da ordem de 60% (Figura 16).

Um estudo recente demonstrou que o fenótipo do antígeno Duffy poderia influenciar na ligação da proteína DBP ao seu receptor e, conseqüentemente, modular a susceptibilidade à infecção (KING *et al.*, 2011). Nesse estudo, a ligação de DBP a eritrócitos Duffy A foi menor em relação a Duffy B e indivíduos Duffy A apresentavam redução de 30 a 80% no risco de desenvolver malária *vivax* (KING *et al.*, 2011). Os nossos dados gerados por citometria de fluxo também demonstraram a menor capacidade de ligação da proteína DBP a eritrócitos Duffy A em relação à Duffy B (Figuras 14 e 16).

Após a padronização do ensaio de ligação a eritrócitos pela técnica de citometria de fluxo com a proteína DBP, prosseguimos os ensaios com as demais proteínas recombinantes. A proteína *PvAMA-1_{DI-II}* havia sido previamente expressa por nosso grupo, em bactérias *E. coli* (MÚFALO *et al.*, 2008), porém, foi obtida na forma insolúvel, impossibilitando seu uso nos ensaios de citometria de fluxo.

Uma estratégia de obtenção de proteínas na forma solúvel seria o cultivo das bactérias em baixas temperaturas. Realizamos a padronização da expressão do domínio I-II de *PvAMA-1* em bactérias *E. coli* cepa ArcticExpress (DE3). Estas

bactérias possuem chaperoninas de *Oleispira antarctica*, que possuem atividade nas temperaturas de 4-12°C. A proteína foi expressa de forma parcialmente solúvel e observamos elevada média de intensidade de fluorescência com a proteína bPvAMA-1_{DI-II}, indicando provável ligação desta aos eritrócitos (dados não mostrados). No entanto, em função de sua pouca solubilidade, essa observação poderia ser um dado falso positivo gerado pela precipitação da proteína sobre os eritrócitos. Sendo assim, a partir do sucesso obtido na expressão de PvAMA-1_E em leveduras, decidimos expressar o domínio I-II de AMA-1 em leveduras (yPvAMA-1_{DI-II}). A proteína yPvAMA-1_{DI-II} foi expressa de forma solúvel, podendo ser utilizada nos ensaios de citometria de fluxo.

Realizamos os ensaios de citometria de fluxo e não observamos a ligação das proteínas PvMSP1₁₉ e PvAMA-1_{DII}, PvAMA-1_E e yPvAMA-1_{DI-II} aos eritrócitos humanos (figuras 14 e 17). Para validar a metodologia de citometria de fluxo, realizamos os ensaios de citoaderência com células transfectadas. Para tanto, utilizamos dois vetores para expressão em células de mamíferos em fusão com a GFP: pDisplay-EGFP (HAN *et al.*, 2004) e pEGFP-*dbp* (CERAVOLO *et al.*, 2008). As células COS-7 foram transfectadas com plasmídeos codificando as proteínas PvDBP, PvMSP1₁₉, PvAMA-1_{DIII} e PvAMA-1_{DI-II}. Obtivemos elevada eficiência de transfecção (superior a 50%) e bons níveis de expressão das proteínas na superfície das células, exceto para o plasmídeo pDEGFP-*ama-1_{di-ii}* (Tabela 3).

Os resultados de citoaderência confirmaram a capacidade de ligação de DBP a eritrócitos humanos, porém, ao contrário da citometria de fluxo, não observamos diferença significativa na ligação a eritrócitos Duffy A e Duffy B (Figuras 18 e 19). No entanto, foi possível notar que, apesar de não ter sido observada diferença no número de rosetas formadas, aparentemente, as rosetas formadas com Duffy B

eram maiores e apresentavam maior número de eritrócitos ao redor das células transfectadas. A especificidade de ligação de *PvDBP* foi confirmada, uma vez que soro de camundongos anti-*PvDBP* foi capaz de inibir a formação de rosetas em até 90% (Figura 20). Não observamos a formação de rosetas nas células transfectadas com plasmídeos codificando as proteínas *PvMSP1₁₉*, *PvAMA-1_{DIII}* e *PvAMA-1_{DI-II}*, denotando a ausência de ligação e confirmando os dados observados na citometria de fluxo (Figuras 23 e 24).

De maneira geral, fomos capazes de desenvolver um método de citometria de fluxo, para avaliação da ligação de proteínas a eritrócitos humanos, cujos dados foram validados pelo método clássico de citoaderência, conforme observado pelos resultados obtidos com a proteína DBP. Estes dados de ligação da proteína DBP aos eritrócitos estão de acordo com as observações da literatura (KING *et al.*, 2011; TRAN *et al.*, 2005). Em relação à *MSP1₁₉*, nossos dados demonstraram que a proteína *MSP1₁₉* não foi capaz de se ligar a eritrócitos humanos, apesar de estudos anteriores utilizando peptídeos sintéticos radioativos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2002) e ensaios de citoaderência com células transfectadas (HAN *et al.*, 2004) terem demonstrado essa ligação.

Com relação a AMA-1 a literatura aponta dados de ligação a eritrócitos dos domínios I-II de AMA-1 de *P. yoelii*, utilizando ensaio de citoaderência com células COS-7. Neste estudo, foi observado que apenas as células que expressavam os domínios I-II de *P. yoelii* na superfície foram capazes de se ligar a eritrócitos de camundongos e ratos e que o ectodomínio e os demais domínios não se ligaram aos eritrócitos (FRASER *et al.*, 2001). Por outro lado, em *P. falciparum*, identificou-se apenas a ligação do domínio III, expresso na superfície de células CHO-K1 (KATO *et al.*, 2005). Além disso, nosso grupo avaliou, anteriormente, a funcionalidade dos

domínios I-II e III de *PvAMA-1* através de immunoblotting e de ensaio de ligação com células transfectadas e os resultados mostraram indícios de ligação dos domínios I-II aos eritrócitos, porém, a eficiência de transfecção obtida foi baixa, dificultando a interpretação dos resultados (BARBEDO, 2007). No presente trabalho, ao contrário do observado para outras espécies de *Plasmodium*, não observamos a ligação de *PvAMA-1* a eritrócitos humanos pelas técnicas de citometria de fluxo e citoaderência.

É possível que a ausência de observação de ligação de AMA-1 aos eritrócitos seja uma limitação das técnicas que utilizamos e que, melhorias destas técnicas, tais como enriquecimento de reticulócitos, possam confirmar essa ligação. Porém, muitos estudos recentes em *T. gondii* e *P. falciparum* constataram que AMA-1 não se ligaria diretamente a eritrócitos, mas se liga a RON2 (Figura 6), formando um complexo essencial para que ocorra a invasão da célula hospedeira (LAMARQUE *et al.*, 2011; SRINIVASAN *et al.*, 2011; TONKIN *et al.*, 2011; TYLER; BOOTHROYD, 2011). Sendo assim, seria interessante avaliar se essa interação entre AMA-1 e RON2 também ocorre em *P. vivax*.

6. CONCLUSÕES

1. O método de citometria de fluxo foi capaz de determinar a ligação da proteína *PvDBP-RII* a eritrócitos humanos. A especificidade dessa ligação foi confirmada através da inibição utilizando anticorpo policlonal anti-*PvDBP-RII*;
2. Não foi possível detectar a ligação de *PvMSP1₁₉*, *PvAMA-1_{DII}*, *PvAMA-1_E* e *PvAMA-1_{DI-II}* a eritrócitos humanos pelo método de citometria de fluxo;
3. As células COS-7 transfectadas foram capazes de expressar as proteínas em sua superfície;
4. O método de citoaderência confirmou os dados obtidos pela citometria de fluxo. A proteína *PvDBP-RII* foi capaz de se ligar aos eritrócitos humanos e esta ligação foi inibida por anticorpo policlonal anti-*PvDBP-RII*, confirmando sua especificidade;
5. Não foi possível detectar a ligação de *PvMSP1₁₉*, *PvAMA-1_{DIII}* e *PvAMA-1_{DI-II}* a eritrócitos humanos pelo método de citoaderência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALY, A.S.I.; VAUGHAN, A.M.; KAPPE, S.H.I. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. **Annual review in microbiology**, n. 62, p. 195-221, 2009.

AMINO, R.; MÉNARD, R.; FRISCHKNECHT, F. In vivo imaging of malaria parasites--recent advances and future directions. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 4, p. 407-14, 2005.

BANNISTER, L.H.; HOPKINS, J.M.; DLUZEWSKI, A.R.; MARGOS, G.; WILLIAMS, I.T.; BLACKMAN, M.J.; KOCKEN, C.H.; THOMAS, A.W.; MITCHELL, G.H. Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. **Journal of cell science**, v. 116, n. 18, p. 3825-34, 2003.

BARBEDO, M.B. **Expressão do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de Plasmodium vivax na superfície de células COS-7 transfectadas para uso em estudos funcionais**. Universidade de São Paulo, 2007.

BARGIERI, D.; LAGAL, V.; TARDIEUX, I.; MÉNARD, R. Host cell invasion by apicomplexans: what do we know? **Trends in parasitology**, v. 28, n. 4, p. 131-135, 2012.

BARNWELL, J.W.; NICHOLS, M.E.; RUBINSTEIN, P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by Plasmodium vivax. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. 5, p. 1795-1802, 1989.

BEESON, J. G.; OSIER, F. H. A; ENGWERDA, C. R. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 12, p. 578-84, dez 2008.

BLACKMAN, M.J.; HEIDRICH, H.G.; DONACHIE, S.; MCBRIDE, J.S.; HOLDER, A.A. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **The Journal of experimental medicine**, v. 172, n. 1, p. 379-82, 1990.

CAO, J.; KANEKO, O.; THONGKUKIATKUL, A.; TACHIBANA, M.; OTSUKI, H.; GAO, Q.; TSUBOI, T.; TORII, M. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in Plasmodium falciparum merozoites. **Parasitology international**, v. 58, n. 1, p. 29-35, 2009.

CAVASINI, C.E.; DE MATTOS, L.C.; COUTO, A.A.; COUTO, V.S.; GOLLINO, Y.; MORETTI, L.J.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; ROSSIT, A.R.; CASTILHO, L.; MACHADO, R.L. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. **Malaria journal**, v. 6, p. 167, 2007.

CERAVOLO, I.P.; SOUZA-SILVA, F.A.; FONTES, C.J.; BRAGA, E.M.; MADUREIRA, A.P.; KRETTLI, A.U.; SOUZA, J.M.; BRITO, C.F.; ADAMS, J.H.; CARVALHO, L.H. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. **Scandinavian journal of immunology**, v. 67, n. 3, p. 270-8, 2008.

CHITNIS, C.E.; MILLER, L.H. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 2, p. 497-506, 1994.

CHITNIS, C.E.; SHARMA, A. Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 1, p. 29-34, 2008.

CHITNIS, C.E.; CHAUDHURI, A.; HORUK, R.; POGO, A.O.; MILLER, L.H. The domain on the duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 4, p. 1531-1536, 1996.

COLEY, A.M; GUPTA, A.; MURPHY, V.J.; BAI, T.; KIM, H.; FOLEY, M.; ANDERS, R.F.; BATCHELOR, A.H. Structure of the malaria antigen AMA1 in complex with a growth-inhibitory antibody. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 9, p. 1308-19, 2007.

COLLINS, C.R.; WITHERS-MARTINEZ, C.; BENTLEY, G.A; BATCHELOR, A.H.; THOMAS, A.W.; BLACKMAN, M.J. Fine mapping of an epitope recognized by an invasion-inhibitory monoclonal antibody on the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7431-41, 2007.

COLLINS, C.R.; WITHERS-MARTINEZ, C.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M.J. An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 1, 2009.

COWMAN, A.F.; CRABB, B.S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755-66, 2006.

CUNHA, M. G.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine**, v. 20, n. 3-4, p. 385-96, 2001.

DEANS, J.A; ALDERSON, T.; THOMAS, A.W.; MITCHELL, G.H.; LENOXX, E.S.; COHEN, S. Rat monoclonal antibodies which inhibit the in vitro multiplication of *Plasmodium knowlesi*. **Clinical and experimental immunology**, v. 49, n. 2, p. 297-309, 1982.

DEANS, J. A.; THOMAS, A W; ALDERSON, T.; COHEN, S. Biosynthesis of a putative protective *Plasmodium knowlesi* merozoite antigen. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 11, p. 189-204, 1984.

DLUZEWSKI, A.R; LING, I.T.; HOPKINS, J.M.; GRAINGER, M.; MARGOS, G.; MITCHELL, G.H.; HOLDER, A.A.; BANNISTER, L.H. Formation of the food vacuole in *Plasmodium falciparum*: A Potential Role for the 19 kDa Fragment of. v. 3, n. 8, 2008.

DODOO, D.; AIKINS, A.; KUSI, K.A.; LAMPTEY, H.; REMARQUE, E.; MILLIGAN, P.; BOSOMPRAH, S.; CHILENGI R.; OSEI, Y.D.; AKANMORI B.D.; THEISEN, M. Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. **Malaria journal**, v. 7, p. 142, 2008.

DUTTA, S.; HAYNES, J.D.; MOCH, J.K.; BARBOSA, A.; LANAR, D.E. Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 21, p. 12295-300, 2003.

EGAN, A.F.; MORRIS, J.; BARNISH, G.; ALLEN S.; GREENWOOD, B.M.; KASLOW, D.C.; HOLDER, A.A.; RILEY, E.M. 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. **The Journal of infectious diseases**, v. 173, n. 3, p. 765-9, 1996.

EGAN, A.F.; BURGHHAUS, P.; DRUILHE, P.; HOLDER, A.A; RILEY, E.M. Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro. **Parasite immunology**, v. 21, n. 3, p. 133-9, 1999.

FRASER, T.S.; KAPPE, S.H.; NARUM, D.L.; VANBUSKIRK, K.M; ADAMS, J.H. Erythrocyte-binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 117, n. 1, p. 49-59, 2001.

GAUR, D.; MAYER, D.C.G.; MILLER, L.H. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 13-14, p. 1413-29, 2004.

GAUR, D.; CHITNIS, C.E. Molecular interactions and signaling mechanisms during erythrocyte invasion by malaria parasites. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 4, p. 422-8, 2011.

GENTIL, F.; BARGIERI, D.Y.; LEITE, J.A; FRANÇOSO, K.S.; PATRICIO, M.B.; ESPÍNDOLA, N.M.; VAZ, A.J.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; RODRIGUES, M.;

COSTA, F.T.; SOARES I,S. A recombinant vaccine based on domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice. **Vaccine**, v. 28, n. 38, p. 6183-90, 2010.

GILSON, P.R.; O'DONNELL, R.A.; NEBL, T.; SANDERS, P.R.; WICKHAM, M.E.; MCELWAIN, T.F.; DE KONING-WARD, T.F.; CRABB, B.S. MSP1(19) miniproteins can serve as targets for invasion inhibitory antibodies in *Plasmodium falciparum* provided they contain the correct domains for cell surface trafficking. **Molecular microbiology**, v. 68, n. 1, p. 124-38, 2008.

GILSON, P.R.; CRABB, B.S. Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 1, p. 91-6, 2009.

GOEL, V.K.; LI, X.; CHEN, H.; LIU, S.C.; CHISHTI, A.H.; OH, S.S.. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5164-9, 2003.

GHOSH, A. K.; JACOBS-LORENA, M. *Plasmodium* sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 394-400, 2009.

GREEN, T.J.; MORHARDT, M.; BRACKETT, R.G.; JACOBS, R.L. Serum inhibition of merozoite dispersal from *Plasmodium falciparum* schizonts: indicator of immune status. **Infection and immunity**, v. 31, n. 3, p. 1203-8, 1981.

GRIMBERG, B.T.; UDOMSANGPETCH, R.; XAINLI, J.; MCHENRY, A.; PANICHAKUL, T.; SATTABONGKOT, J.; CUI, L.; BOCKARIE, M.; CHITNIS, C.; ADAMS, J.; ZIMMERMAN, P.A.; KING, C.L. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. **PLoS medicine**, v. 4, n. 12, p. e337, 2007.

HACKETT, F.; SAJID, M.; WITHERS-MARTINEZ, C.; GRAINGER, M.; BLACKMAN, M.J. PfSUB-2: a second subtilisin-like protein in *Plasmodium falciparum* merozoites. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 103, n. 2, p. 183-95, 1999.

HAN, H.J.; PARK, S.G.; KIM, S.H.; HWANG, S.Y.; HAN, J.; TRAICOFF, J.; KHO, W.G.; CHUNG, J.Y. Epidermal growth factor-like motifs 1 and 2 of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 are critical domains in erythrocyte invasion. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 320, n. 2, p. 563-70, 2004.

HARRIS, P.K.; YEOH, S.; DLUZEWSKI, A.R.; O'DONNELL, R.A.; WITHERS-MARTINEZ, C.; HACKETT, F.; BANNISTER, L.H.; MITCHELL,

G.H.; BLACKMAN, M.J. Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase. **PLoS pathogens**, v. 1, n. 3, p. 241-51, 2005.

HEHL, A.B.; LEKUTIS, C.; GRIGG, M.E.; BRADLEY, P.J.; DUBREMETZ J.F.; ORTEGA-BARRIA, E.; BOOTHROYD, J.C. Toxoplasma gondii homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. **Infection and immunity**, v. 68, n. 12, p. 7078-86, 2000.

HOLDER, A.A.; FREEMAN, R.R. Biosynthesis and processing of a Plasmodium falciparum schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 156, n. 5, p. 1528-1538, 1982.

HOLDER, A A. The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 445-56, 2009.

HOWELL, S.A.; WITHERS-MARTINEZ, C.; KOCKEN, C.H.M.; THOMAS A.W.; BLACKMAN, M.J. Proteolytic processing and primary structure of Plasmodium falciparum apical membrane antigen-1. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 33, p. 31311-20, 2001.

HOWELL, S.A; HACKETT, F.; JONGCO, A.M. WITHERS-MARTINEZ, C.; KIM, K.; CARRUTHERS, V.B.; BLACKMAN, M.J. Distinct mechanisms govern proteolytic shedding of a key invasion protein in apicomplexan pathogens. **Molecular microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1342-56, 2005.

IYER, J.; GRÜNER, A.C.; RÉNIA, L.; SNOUNOU, G.; PREISER, P.R. Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families. **Molecular microbiology**, v. 65, n. 2, p. 231-49, 2007.

JONES, M.K.; GOOD, M.F. Malaria parasites up close. **Nature medicine**, v. 12, n. 2, p. 170-1, 2006.

KATO, K.; MAYER, D.C.G.; SINGH, S.; REID, M.; MILLER, L.H. Domain III of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 15, p. 5552-7, 2005.

KAUTH, C.W.; WOEHLBIER, U.; KERN, M.; MEKONNEN, Z.; LUTZ, R.; MÜCKE, N.; LANGOWSKI, J.; BUJARD, H. Interactions between Merozoite Surface Proteins 1, 6, and 7 of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum. **Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 42, p. 31517-31527, 2006.

KING, C.L.; MICHON, P.; SHAKRI, A.R.; MARCOTTY, A.; STANISIC, D.; ZIMMERMAN, P.A.; COLE-TOBIAN, J.L.; MUELLER, I.; CHITNIS, C.E. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies

confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8363-8, 2008.

KING, C.L.; ADAMS, J.H.; XIANLI, J.; GRIMBERG, B.T.; MCHENRY, A.M.; GREENBERG, L.J.; SIDDIQUI, A. HOWES, R.E.; DA SILVA-NUNES, M.; FERREIRA, M.U.; ZIMMERMAN, P.A. Fy(a)/Fy(b) antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 50, p. 20113-8, 2011.

KOUSSIS, K.; WITHERS-MARTINEZ, C.; YEOH, S.; CHILD, M.; HACKETT, F.; KNUEPFER, E.; JULIANO, L.; WOHLBIER, U.; BUJARD, H.; BLACKMAN, M.J. A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. **The EMBO journal**, v. 28, n. 6, p. 725-35, 2009.

LACERDA, M.V.G.; MOURÃO, M.P.G.; ALEXANDRE, M.A.; SIQUEIRA, A.M.; MAGALHÃES, B.M.; MARTINEZ-ESPINOSA, F.E.; FILHO, F.S.; BRASIL, P.; VENTURA, A.M.; TADA, M.S.; COUTO, V.S.; SILVA, A.R.; SILVA, R.S.; ALECRIM, M.G. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria journal**, p. 1-18, 2012.

LAMARQUE, M.; BESTEIRO, S.; PAPOIN, J.; ROQUES, M.; VULLIEZ-LE NORMAND, B.; MORLON-GUYOT, J.; DUBREMETZ, J.F.; FAUQUENOY, S.; TOMAVO, S.; FABER, B.W.; KOCKEN, C.H.; THOMAS, A.W.; BOULANGER, M.J.; BENTLEY, G.A.; LEBRUN, M. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 2, 2011.

LAZAROU, M.; GUEVARA PATIÑO, J.A.; JENNINGS, R.M. MCINTOSH, R.S.; SHI, J.; HOWELL, S.; CULLEN, E.; JONES, T.; ADAME-GALLEGOS, J.R.; CHAPPEL, J.A.; MCBRIDE, J.S.; BLACKMAN, M.J.; HOLDER, A.A.; PLEASS, R.J. Inhibition of erythrocyte invasion and *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 processing by human immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies. **Infection and immunity**, v. 77, n. 12, p. 5659-67, 2009.

MCGREGOR, I. A. The passive transfer of human malarial immunity. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 237-239, 1964.

MENDES, C.; DIAS, F.; FIGUEIREDO, J.; MORA, V.G.; CANO, J.; DE SOUSA, B.; DO ROSÁRIO, V.E.; BENITO, A.; BERZOSA, P.; AREZ, A.P. Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax*--molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 6, p. e1192, 2011.

MERCEREAU-PUIJALON, O.; MÉNARD, D. Plasmodium vivax and the Duffy antigen: a paradigm revisited. **Transfusion clinique et biologique : journal de la Société française de transfusion sanguine**, v. 17, n. 3, p. 176-83, 2010.

MICHON, P; FRASER, T.; ADAMS, J.H. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the Plasmodium vivax Duffy binding protein. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3164-71, jun 2000.

MILLER, L.H; MASON, S.J.; DVORAK, J.A; MCGINNISS, M.H.; ROTHMAN, I.K. Erythrocyte receptors for (Plasmodium knowlesi) malaria: Duffy blood group determinants. **Science**, v. 189, n. 4202, p. 561-3, 1975.

MILLER, L.; MASON, S.; CLYDE, D. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. **New England Journal**, v. 295, n. 6, p. 302–304, 1976.

MILLER, L.H.; AIKAWA, M.; JOHNSON, J.G.; SHIROISH, T. Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 149, n. 1517, p. 172-184, 1979.

MITCHELL, G.H.; THOMAS, A.W.; MARGOS, G.; DLUZEWSKI, A.R.; BANNISTER, L.H. Apical Membrane Antigen 1 , a Major Malaria Vaccine Candidate , Mediates the Close Attachment of Invasive Merozoites to Host Red Blood Cells. **Infection and immunity**, v. 72, n. 1, p. 154-158, 2004.

MORGAN, W.D.; BIRDSALL, B.; FRENKIEL, T.A; GRADWELL, M.G.; BURGHANUS, P.A.; SYED, S.E.; UTHAIPIBULL, C.; HOLDER, A.A.; FEENEY, J. Solution structure of an EGF module pair from the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1. **Journal of molecular biology**, v. 289, n. 1, p. 113-22, 1999.

MOSS, D. K.; REMARQUE, E. J.; FABER, B. W. *et al.* Plasmodium falciparum 19-Kilodalton Merozoite Surface Protein 1 (MSP1)-Specific Antibodies That Interfere with Parasite Growth In Vitro Can Inhibit MSP1 Processing, Merozoite Invasion, and Intracellular Parasite Development. **Infection and immunity**, v. 80, n. 3, p. 1280-7, mar 2012.

MUELLER, I.; GALINSKI, M.R.; BAIRD, J.K.; CARLTON, J.M.; KOCHAR, D.K.; ALONSO, P.L.; DEL PORTILLO, H.A. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. **The Lancet infectious diseases**, v. 9, n. 9, p. 555-66, 2009.

MÚFALO, B.C.; GENTIL, F.; BARGIERI, D.Y.; COSTA, F.T.; RODRIGUES, M.M.; SOARES, I.S. Plasmodium vivax apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 10, n. 12-13, p. 1266-73, 2008.

MURHANDARWATI, E.E.H.; BLACK, C.G.; WANG, L.; WEISMAN, S.; KONING-WARD, T.F.; BAIRD, J.K.; TJITRA, E.; RICHIE, T.L.; CRABB, B.S.; COPPEL, R.L. Acquisition of invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of merozoite surface protein 1 in a transmigrant population requires multiple infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 198, n. 8, p. 1212-8, 2008.

MURRAY, C.J.L.; ROSENFELD, L.C.; LIM, S.S.; ANDREWS, K.G.; FOREMAN, K.J.; HARING, D.; FULLMAN, N.; NAGHAVI, M.; LOZANO, R.; LOPEZ, A.D. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. **Lancet**, v. 379, n. 9814, p. 413-31, 2012.

NEBIE, I.; DIARRA, A.; OUEDRAOGO, A.; SOULAMA, I.; BOUGOUMA, E.C.; TIONO, A.B.; KONATE, A.T.; CHILENGI, R.; THEISEN, M.; DODOO, D.; REMARQUE, E.; BOSOMPRAH, S.; MILLIGAN, P.; SIRIMA, S.B. Humoral responses to Plasmodium falciparum blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa. **Infection and immunity**, v. 76, n. 2, p. 759-66, 2008.

NIKODEM, D.; DAVIDSON, E. Identification of a novel antigenic domain of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 that specifically binds to human erythrocytes and inhibits parasite invasion, in vitro. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 108, n. 1, p. 79-91, 2000.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.V.G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.; TAUIL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria journal**, p. 1-15, 2010.

OMS. World Malaria Report 2011. 2011.

O'DONNELL, R.A.; KONING-WARD, T.F.; BURT, R.A.; BOCKARIE, M.; REEDER, J.C.; COWMAN, A.F.; CRABB, B.S. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 12, p. 1403-12, 2001.

PACHEBAT, J.A.; KADEKOPPALA, M.; GRAINGER, M.; DLUZEWSKI, A.R.; GUNARATNE, R.S.; SCOTT-FINNIGAN, T.J.; OGUN, S.A.; LING, I.T.; BANNISTER, L.H.; TAYLOR, H.M.; MITCHELL, G.H.; HOLDER, A.A. Extensive proteolytic processing of the malaria parasite merozoite surface protein 7 during biosynthesis and parasite release from erythrocytes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 151, n. 1, p. 59-69, 2007.

PERKINS, M.E.; ROCCO, L.J. Sialic acid-dependent binding of Plasmodium falciparum merozoite surface, Pf200, to human erythrocytes. **Journal of immunology**, v. 141, n. 9, p. 3190-3196, 1988.

PERRAUT, R.; MARRAMA, L.; DIOUF, B.; SOKHNA, C.; TALL, A.; NABETH, P.; TRAPE, J.F.; LONGACRE, S.; MERCEREAU-PUIJALON, O. Antibodies to the conserved C-terminal domain of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 and to the merozoite extract and their relationship with in vitro inhibitory antibodies and protection against clinical malaria in a Senegalese village. **The Journal of infectious diseases**, v. 191, n. 2, p. 264-71, 2005.

PERSSON, K.E.M. Erythrocyte invasion and functionally inhibitory antibodies in Plasmodium falciparum malaria. **Acta tropica**, v. 114, n. 3, p. 138-43, jun 2010.

PIZARRO, J.C.; VULLIEZ-LE NORMAND, B.; CHESNE-SECK, M.L.; COLLINS, C.R.; WITHERS-MARTINEZ, C.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M.J.; FABER, B.W.; REMARQUE, E.J.; KOCKEN, C.H.; THOMAS, A.W.; BENTLEY, G.A. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science**, v. 308, n. 5720, p. 408-11, 2005.

POLLEY, S.D.; MWANGI, T.; KOCKEN, C.H.M.; THOMAS, A.W.; DUTTA, S.; LANAR, D.E.; REMARQUE, E.; ROSS, A.; WILLIAMS, T.N.; MWAMBU, G.; LOWE, B.; CONWAY, D.J.; MARSH, K. Human antibodies to recombinant protein constructs of Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. **Vaccine**, v. 23, n. 5, p. 718-28, 2004.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M.M. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. **Nature reviews microbiology**, v. 4, n. 11, p. 849-56, 2006.

REMARQUE, E.J.; FABER, B.W.; KOCKEN, C.H.M.; THOMAS, A.W. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 2, p. 74-84, 2008.

RICHARD, D.; MACRAILD, C.A.; RIGLAR, D.T.; CHAN, J.A.; FOLEY, M.; BAUM, J.; RALPH, S.A.; NORTON, R.S.; COWMAN, A.F. Interaction between Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14815-22, 2010.

RIGLAR, D.T.; RICHARD, D.; WILSON, D.W.; BOYLE, M.J.; DEKIWADIA, C.; TURNBULL, L.; ANGRISANO, F.; MARAPANA, D.S.; ROGERS, K.L.; WHITCHURCH, C.B.; BEESON, J.G.; COWMAN, A.F.; RALPH, S.A.; BAUM, J. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. **Cell host and microbe**, v. 9, n. 1, p. 9-20, 2011.

RODRIGUES, M.H.; RODRIGUES, K.M.; OLIVEIRA, T.R.; CÔMODO, A.N.; RODRIGUES, M.M.; KOCKEN, C.H.; THOMAS, A.W.; SOARES, I.S. Antibody

response of naturally infected individuals to recombinant Plasmodium vivax apical membrane antigen-1. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 2, p. 185-92, 2005.

RODRÍGUEZ, L.E.; URQUIZA, M.; OCAMPO, M.; CURTIDOR, H.; SUÁREZ, J.; GARCÍA, J.; VERA, R.; PUENTES, A.; LÓPEZ, R.; PINTO, M.; RIVERA, Z.; PATARROYO, M.E. Plasmodium vivax MSP-1 peptides have high specific binding activity to human reticulocytes. **Vaccine**, v. 20, n. 9-10, p. 1331-9, 2002.

SABCHAREON, A.; BURNOUF, T.; OUATTARA, D.; ATTANATH, P.; BOUHAROUN-TAYOUN, H.; CHANTAVANICH, P.; FOUCAULT, C.; CHONGSUPHAJAISIDDHI, T.; DRUILHE, P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 45, n. 3, p. 297-308, 1991.

SANTOS-CIMINERA, P.D.; ROBERTS, D.R.; ALECRIM, M.D.G.C.; COSTA, M.R.F.; QUINNAN, G.V. Malaria diagnosis and hospitalization trends, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 10, p. 1597-600, 2007.

SINGH, S; PANDEY, K.; CHATTOPADHAYAY, R.; YAZDANI, S.S.; LYNN, A.; BHARADWAJ, A.; RANJAN, A.; CHITNIS C. Biochemical, biophysical, and functional characterization of bacterially expressed and refolded receptor binding domain of Plasmodium vivax duffy-binding protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 20, p. 17111-6, 2001.

SRINIVASAN, P.; BEATTY, W.L.; DIOUF, A.; HERRERA, R.; AMBROGGIO, X.; MOCH, J.K.; TYLER, J.S.; NARUM, D.L.; PIERCE, S.K.; BOOTHROYD, J.C.; HAYNES, J.D.; MILLER, L.H. Binding of Plasmodium merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 32, p. 13275-80, 2011.

STANISIC, D.I.; RICHARDS, J.S.; MCCALLUM, F.J.; MICHON, P.; KING, C.L.; SCHOEPFLIN, S.; GILSON, P.R.; MURPHY, V.J.; ANDERS, R.F.; MUELLER, I.; BEESON, J.G. Immunoglobulin G subclass-specific responses against Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. **Infection and immunity**, v. 77, n. 3, p. 1165-74, 2009.

TAN, L.K.K.; YACoub, S.; SCOTT, S.; BHAGANI, S.; JACOBS, M. Acute lung injury and other serious complications of Plasmodium vivax malaria. **Lancet infectious disease**, p. 449-454, 2008.

TJITRA, E.; ANSTEY, N.M.; SUGIARTO, P.; WARIKAR, N.; KENANGALEM, E.; KARYANA, M.; LAMPAH, D.A.; PRICE, R.N. Multidrug-resistant

Plasmodium vivax associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. **PLoS medicine**, v. 5, n. 6, p. e128, 2008.

TONKIN, M.L.; ROQUES, M.; LAMARQUE, M.H.; PUGNIÈRE, M.; DOUGUET, D.; CRAWFORD, J.; LEBRUN, M.; BOULANGER, M.J. Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. **Science**, v. 333, n. 6041, p. 463-7, 2011.

TRAN, T.M.; MORENO, A.; YAZDANI, S.S.; CHITNIS, C.E.; BARNWELL, J.W.; GALINSKI, M.R. Detection of a *Plasmodium vivax* erythrocyte binding protein by flow cytometry. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 63, n. 1, p. 59-66, 2005.

TREECK, M.; TAMBORRINI, M.; DAUBENBERGER, C.A.; GILBERGER, T.W.; VOSS, T.S. Caught in action: mechanistic insights into antibody-mediated inhibition of *Plasmodium* merozoite invasion. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 494-497, 2009.

TRIGLIA, T.; HEALER, J.; CARUANA, S.R.; HODDER, A.N.; ANDERS, R.F.; CRABB, B.S.; COWMAN, A.F. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. **Molecular microbiology**, v. 38, n. 4, p. 706-18, 2000.

TYLER, J.S.; BOOTHROYD, J.C. The C-Terminus of Toxoplasma RON2 Provides the Crucial Link between AMA1 and the Host-Associated Invasion Complex. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 2, p. e1001282, 2011.

TYLER, J.S.; TREECK, M.; BOOTHROYD, J.C. Focus on the ringleader: the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 9, p. 410-20, 2011.

URQUIZA, M.; SUAREZ, J.E.; CARDENAS, C.; LOPEZ, R.; PUENTES, A.; CHAVEZ, F.; CALVO, J.C.; PATARROYO, M.E. *Plasmodium falciparum* AMA-1 erythrocyte binding peptides implicate AMA-1 as erythrocyte binding protein. **Vaccine**, v. 19, n. 4-5, p. 508-13, 2000.

VANBUSKIRK, K.M.; SEVOVA, E.; ADAMS, J.H. Conserved residues in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15754-9, 2004.

VANDERBERG, J.P.; FREVERT, U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 9, p. 991-6, 2004.

VICENTIN, E.C.M. **Imunizações pré-clínicas contra malária baseadas no Antígeno 1 de Membrana Apical (PVAMA-1): testes de protocolos homólogos e heterólogos de indução e reforço utilizando DNA plasmidial e/ou proteína recombinante.** Universidade de São Paulo, 2012.

WOEHLBIER, U.; EPP, C.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M.J.; BUJARD, H. Antibodies against multiple merozoite surface antigens of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* inhibit parasite maturation and red blood cell invasion. **Malaria journal**, v. 9, p. 77, 2010.

WURTZ, N.; MINT LEKWEIRY, K.; BOGREAU, H.; PRADINES, B.; ROGIER, C.; OULD MOHAMED SALEM BOUKHARY, A.; HAFID, J.E.; OULD AHMEDOU SALEM, M.S.; TRAPE, J.F.; BASCO, L.K.; BRIOLANT S. Vivax malaria in Mauritania includes infection of a Duffy-negative individual. **Malaria journal**, v. 10, p. 336, 2011.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança

Of.CIBio/0562010/FCF

São Paulo, 17 de setembro de 2010

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, e de ordem do senhor Presidente da Comissão Interna de Biossegurança, informo a Vossa Senhoria que estamos aprovando "ad referendum" da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas o Projeto "Avaliação da ligação de proteínas de merozoítas de *Plasmodium vivax* a eritrócitos humanos e inibição por anticorpos gerados em infecções naturais e imunizações experimentais".

Em anexo envio cópia do CQB da Unidade para necessário quando da solicitação de recursos junto a agências de fomento.

Lembramos que, quando da elaboração do Relatório Anual a ser encaminhado à Comissão Interna de Biossegurança esta Comissão solicitará a V.Sa. comprovante de participação em treinamentos de Biossegurança de sua equipe para manutenção do credenciamento.

Atenciosamente,

Prof.Dr. MÁRIO HIROYUKI HIRATA
Presidente da CIBio

Ilma. Sra.

Profa. Dra. **IRENE DA SILVA SOARES**

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP

NESTA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comitê de Ética em PesquisaParecer CEP/FCF/121/2010

São Paulo, 28 de outubro de 2010.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Irene da Silva Soares
FBC**Projeto de Pesquisa:** "Expressão do Antígeno I de Membrana Apical (AMA-I) de 'Plasmodium vivax' na superfície de células COS-7 transfectadas para uso em estudos funcionais"**Protocolo CEP/FCF/325****Pesquisador Responsável:** Profa. Dra. Irene da Silva Soares**Assunto:** Inclusão do Adendo com o objetivo de avaliar a ligação à eritrócitos de proteínas envolvidas na invasão de merozoítas e inibição desta ligação por anticorpos gerados em infecções naturais.**Situação:** O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 25/10/2010, APROVOU o adendo ao projeto intitulado "Expressão do Antígeno I de Membrana Apical (AMA-I) de 'Plasmodium vivax' na superfície de células COS-7 transfectadas para uso em estudos funcionais".Profa. Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP/FCF/10/2012

São Paulo, 08 de fevereiro de 2012.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Irene da Silva Soares
FBC

Senhor(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 06 de fevereiro de 2012, aprovou a alteração do título do projeto intitulado "Expressão do Antígeno I de Membrana Apical (AMA-I) de 'Plasmodium vivax' na superfície de células COS-7 transfectadas para uso em estudos funcionais" (P/CEP/FCF/325) para **"Estabelecimento de um ensaio funcional de ligação de proteínas de merozoítas de Plasmodium vivax a eritrócitos humanos por citometria de fluxo"**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/21/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **“Avaliação da ligação de proteínas de merozoítas de 'Plasmodium vivax' a eritrócitos humanos e inibição por anticorpos gerados em infecções naturais e imunizações experimentais”** (Protocolo CEUA/FCF/301), de responsabilidade da pesquisadora **Kátia Sanches Françoso** sob a orientação do Profa. Dra. Irene da Silva Soares, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi **APROVADO** em reunião de 14 de março de 2011.

São Paulo, 15 de março de 2011.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUAOfício CEUA/FCF/15/2012

São Paulo, 07 de fevereiro de 2012.

Ilmo(a) Sr(a).
Profa. Dra. Irene da Silva Soares
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FCF/USP, em reunião realizada em 06/02/2012, aprovou a alteração do título do projeto “Avaliação da ligação de proteínas de merozoítas de ‘Plasmodium vivax’ a eritrócitos humanos e inibição por anticorpos gerados em infecções naturais e imunizações experimentais” (Protocolo CEUA nº 301) para **“Estabelecimento de um ensaio funcional de ligação de proteínas de merozoítas de *Plasmodium vivax* a eritrócitos humanos por citometria de fluxo”**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP