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

Expressão do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA -1) de *Plasmodium vivax* na superfície de células COS-7 transfectadas para uso em estudos funcionais.

Mayara de Brito Barbedo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2007

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

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

Expressão do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA -1) de *Plasmodium vivax* na superfície de células COS-7 transfectadas para uso em estudos funcionais.

Mayara de Brito Barbedo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2007

19045

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013314

Ficha Catalográfica

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

B233c Barbedo, Mayara de Brito
Expressão do antígeno 1 de membrana apical (AMA-1) de
Plasmodium vivax na superfície de células COS-7 transfectadas
para uso em estudos funcionais / Mayara de Brito Barbedo. --
São Paulo, 2008.
103p.

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. Imunologia : *Plasmodium vivax*
3. Malária I. T. II. Soares, Irene da Silva, orientador.

616.96 CDD

Mayara de Brito Barbedo

Expressão do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA -1) de *Plasmodium vivax* na superfície de células COS-7 transfectadas para uso em estudos funcionais.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Irene da Silva Soares
Orientadora/ presidente

Luzia Helena Carvalho
1º. examinador

Daniela Santoro Rosa
2º. examinador

Trabalho realizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**"Porque Tu és a minha rocha e a minha fortaleza; pelo
que, por amor do teu nome, guia-me e encaminha-
me."**

Salmos, 31:3

Dedicatória

A Deus, pela sua presença constante na minha vida, pelas incontáveis bênçãos que nem mesmo pedi, por dirigir minhas escolhas e por me confortar nas horas mais difíceis.

Aos meus pais, Eloisa e Manoel, pelo amor e apoio incondicionais; pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviram e carinho com que sempre me ajudaram.

Ao meu namorado Eder pela paciência, amor, apoio, compreensão e por estar sempre disposto a me ajudar, em qualquer situação.

Ao meu irmão Raony, pela amizade, que me deixa mais forte para superar os desafios.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Irene da Silva Soares primeiramente pela confiança, amizade e incentivo. Por ser um grande exemplo de profissionalismo e de sabedoria na tomada de decisões e pelos valiosos ensinamentos, que levarei para a vida inteira.

Ao Prof. Dr. Gerhard Wunderlich e Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, pelas sugestões e críticas na banca prévia.

A Profa. Dra. Erika M. Braga e Kezia Scopel do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelo auxílio no estabelecimento dos protocolos de cultivo e transfecção das células COS-7, mas principalmente pela hospitalidade e amizade.

A Profa. Dra. Maria Julia Manso Alves, Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, Profa. Dra. Silvy Stuchi e ao Prof. Dr. Sandro Almeida por disponibilizarem equipamentos indispensáveis para a condução deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

A Ana Cláudia Trocoli, Sérgio Málaga e Carla Abdo Brohem, pelo auxílio no estabelecimento dos protocolos de imunofluorescência.

Aos meus tios Neide e José Roberto e ao meu primo Tutti por me receberem de braços abertos sempre que precisei.

Ao meus grandes amigos Vanessa Tavares, Ricardo Ricci, Bruno Múfalo, Wesley Ormundo, Elaine Vicentin e Fernanda Gentil pela amizade, alegria, apoio nos momentos de dificuldade e por contribuírem cada qual da sua maneira, para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Ao Mariano Augusto Filho, pela ajuda indispensável a este trabalho e pela amizade.

A Mariana Borges pela amizade e cumplicidade e por estar sempre disposta a me auxiliar em tudo.

A minha grande amiga Maria Carolina Jimenez, por estar sempre do meu lado nos momentos de dificuldade, por me apoiar em tudo e pela paciência com que me ensinou diversas técnicas em biologia molecular.

Ao amigo Celso Eduardo, por me ajudar com os softwares, por fazer a espera de todos os dias pelo ônibus não ser tão cansativa e pela amizade.

A técnica e amiga Sônia Buratto, pelos conselhos valiosos e pela grande amizade que nasceu entre nós.

Aos colegas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP: Gisele, Gloria, Rosana, Karen, Fabiana, Andréia Bartachini, Andréia,

Maria Cristina, Renata e Maurício, pela amizade e alegre convivência durante esses dois anos e meio.

Às Profas. Dras. Dulcinéia Abdalla, Primavera Borelli coordenadora e vice-coordenadora do Programa de Pós-graduação.

As funcionárias: Dorley, Claudia, Carmem, Rose, Ana, Sueli, Dora e Edna pela amizade, simpatia e ajuda nas mais diversas situações.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
I. Introdução.....	01
1. Aspectos epidemiológicos da malária no mundo e no Brasil.....	02
2. Malária: Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> , características gerais e patologia.....	06
3. Proteínas de merozoítas envolvidas na ligação a eritrócitos.....	10
4. Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1).....	14
4.1. Estrutura, função e polimorfismo	14
4.2. Papel dos anticorpos contra AMA-1 na imunidade contra a malária.....	20
4.3. Propriedades imunogênicas.....	22
(A) Imunização experimental.....	22
(B) Resposta imune humana contra proteínas recombinantes baseadas em AMA-1 de <i>P. vivax</i>	25
5. Importância da padronização de um ensaio funcional de ligação de células transfectadas expressando diferentes domínios de PvAMA-1 a eritrócitos humanos.....	26
II. Objetivos.....	28
1. Objetivo geral.....	29
2. Objetivos específicos.....	29
III. Material e Métodos.....	30
1. Composição das soluções, tampões e meios de cultura utilizados.....	31
1.1. Soluções e tampões para eletroforese em gel de agarose.....	31
1.2. Soluções e tampões para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE).....	31
1.3. Soluções e tampões para “immunoblotting”.....	32
1.4. Meios para cultura de bactérias.....	32
1.5. Meios para cultura de células.....	32
1.6. Soluções utilizadas nos ensaios de imunofluorescência.....	33
1.7. Soluções utilizadas nos ensaios de ligação das proteínas recombinantes a eritrócitos humanos pela metodologia tradicional.....	33
2. Construção dos plasmídios recombinantes contendo os genes que codificam	

para domínios selecionados das proteínas AMA-1 e DBP-RII de <i>P. vivax</i>	33
3. Obtenção dos soros policlonais e de anticorpos monoclonais de camundongos	36
3.1. Imunização de camundongos com as proteínas recombinantes <i>PV66/AMA-1</i> e <i>PvDBP-RII</i> para obtenção dos soros policlonais.....	36
3.2. Produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o domínio II de <i>PvAMA-1</i>	36
4. Cultura celular e Transfecção transiente.....	37
5. Análise da expressão das proteínas AMA-1, DBP e MSP1 ₁₉ em células COS-7 transfectadas por imunofluorescência.....	38
6. Ensaio de ligação de células COS-7 transfectadas a eritrócitos humanos.....	40
7. Ensaio de inibição da ligação de células que expressam os domínios I e II de <i>PvAMA-1</i> a eritrócitos humanos	41
8. Efeito do tratamento enzimático de eritrócitos na capacidade de ligação às células COS-7 que expressam <i>PvAMA-1</i> (DI-II), <i>PvAMA-1</i> (DIII) e <i>PvDBP</i> (RII).....	42
9. Ensaio de ligação das proteínas AMA-1 (DI-II), AMA-1 (DIII), DBP (RII) e MSP1 ₁₉ a eritrócitos humanos utilizando a metodologia tradicional.....	43
IV. Resultados	45
1. Obtenção dos plasmídios recombinantes.....	46
2. Análise da expressão das proteínas <i>PvAMA-1</i> , <i>PvMSP1₁₉</i> e <i>PvDBP- RII</i> em células COS-7 transfectadas por imunofluorescência.....	47
3. Ensaio de ligação de células COS-7 transfectadas a eritrócitos humanos.....	47
4. Ensaio de inibição da ligação de células COS-7 que expressam os domínios I e II de <i>PvAMA-1</i> a eritrócitos humanos.....	51
5. Efeito do tratamento enzimático de eritrócitos na capacidade de ligação às células COS-7 que expressam <i>PvAMA-1</i> (DI-II), <i>PvAMA-1</i> (DIII) ou <i>PvDBP</i> (RII)...	56
6. Ensaio de ligação das proteínas AMA-1 (DI-II), AMA-1 (DIII), MSP1 ₁₉ e DBP (RII) utilizando a metodologia tradicional.....	58
V. Discussão	60
VI. Conclusões	70
VII. Referências Bibliográficas	73
VIII. Anexos	87

Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição mundial do <i>Plasmodium vivax</i>	03
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	07
Figura 3. Representação esquemática da estrutura das proteínas pertencentes à família EBL.....	12
Figura 4. Estrutura da proteína AMA-1 de <i>Plasmodium</i>	16
Figura 5. Seqüência de aminoácidos (aa) correspondentes ao ectodomínio da proteína AMA-1.....	35
Figura 6. Análise da expressão das proteínas na superfície das células COS-7 por imunofluorescência.....	48
Figura 7. Ensaio de ligação a eritrócitos utilizando células COS-7 transfectadas.....	50
Figura 8. Comparação do número de rosetas formadas por células que expressam PvAMA-1 (DI-II), PvAMA-1 (DIII), PvDBP (RII) e PvMSP1 ₁₉	51
Figura 9. Ensaio de inibição da ligação de células transfectadas a eritrócitos humanos utilizando anticorpos policlonais anti-PvAMA-1(humano e de camundongos).....	53
Figura 10. Ensaio de inibição da ligação de células transfectadas a eritrócitos humanos utilizando anticorpos monoclonais contra o domínio II de PvAMA-1.....	55
Figura 11. Efeito do tratamento enzimático de eritrócitos na ligação de células transfectadas.....	57
Figura 12. Ensaio de ligação a eritrócitos pela metodologia tradicional utilizando as proteínas recombinantes AMA-1 (DI-II e DIII), DBP (RII) e MSP1 ₁₉	59

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais ligantes de merozoítas de <i>Plasmodium</i> e seus respectivos receptores em eritrócitos ou reticulócitos.....	13
Tabela 2. Sumário de imunizações experimentais baseadas em AMA-1 de <i>Plasmodium</i>	24
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na construção dos plasmídios recombinantes.....	34
Tabela 4. Sumário das condições utilizadas nos ensaios de imunofluorescência de células COS-7 transfectadas.....	39
Tabela 5. Sumário das construções utilizadas para a transfecção de células COS-7.....	46

RESUMO

O Antígeno-1 de Membrana Apical (AMA-1) de merozoítas de *Plasmodium* é um dos principais candidatos a compor uma vacina contra a malária. A função biológica de AMA-1 não é totalmente conhecida, entretanto, existem evidências que sugerem a participação dessa proteína na ligação a eritrócitos de diferentes espécies de *Plasmodium*. O objetivo deste estudo foi investigar a participação de AMA-1 de *P. vivax* (PvAMA-1) na ligação a eritrócitos humanos utilizando células COS-7 transfectadas com plasmídios recombinantes codificando diferentes regiões do ectodomínio de PvAMA-1. Para isso, os genes que codificam os domínios I-II ou III de PvAMA-1 foram inseridos no vetor pDisplay-EGFP, que permite a expressão das proteínas recombinantes em fusão com a porção N-terminal da Proteína Fluorescente Verde (GFP). Em paralelo, utilizamos construções contendo os genes que codificam a região C-terminal de 19 kDa da Proteína 1 de Superfície do Merozoíta (PvMSP1₁₉) e a região II da Duffy Binding Protein (PvDBP-RII). As quatro construções foram utilizadas para transfectar células COS-7 na presença de lipofectamina. A eficiência das transfecções transientes foi confirmada por imunofluorescência utilizando anticorpos específicos. Em seguida, estudamos a participação dos diferentes domínios de PvAMA-1 na ligação aos eritrócitos. Nossos resultados mostraram que os domínios contíguos I-II, ao contrário do domínio III, foram capazes de se ligar a eritrócitos *in vitro*. Essa ligação foi específica, pois soros de indivíduos infectados por *P. vivax* e soros policlonais de camundongos contendo anticorpos anti-PvAMA-1 foram capazes de inibir essa ligação em 82,0% e 79,8%, respectivamente. Além disso, anticorpos monoclonais dirigidos contra o domínio II dessa proteína foram capazes de inibir parcialmente essa ligação. Após o tratamento de eritrócitos com tripsina ou quimiotripsina, estas células perderam grande parte de sua capacidade de ligação, sugerindo que o receptor para PvAMA-1 tenha constituição predominantemente protéica. Em conjunto, nossos resultados podem servir de base para futuros estudos visando um melhor entendimento da função de anticorpos gerados durante a infecção natural ou induzidos após vacinação com PvAMA-1.

ABSTRACT

The Apical Membrane Antigen (AMA-1) of *Plasmodium* merozoites is one of the main candidates to be part of a vaccine against malaria. The biological function of AMA-1 is unknown. However, there are evidences that suggest the participation of this protein in the interaction with erythrocytes (RBC) of different *Plasmodium* species. Using transfected COS-7 cells with recombinant plasmids encoding different portions of the PvAMA-1 ectodomain, our aim was to identify possible domains of PvAMA-1 able to interact with human RBC. The genes that encoded domains I and II in combination or domain III of PvAMA-1 were cloned into the pDisplay-EGFP vector. This vector allows expression of the protein fused to the N-terminus of enhanced green fluorescent protein (GFP). In parallel, we also used constructions containing the genes that encoded the 19 kDa C-terminal region of Merozoite Surface Protein 1 (PvMSP1₁₉) and region II of the Duffy Binding Protein (PvDBP-RII). Constructions were used to transiently transfect COS-7 cells. The efficiency of expression of all constructs was confirmed by immunofluorescence assay using specific antibodies. After that, we studied the participation of the different domains of PvAMA-1 in the binding to human RBC. We found that COS-7 cells expressing domains I-II, but not domain III, bound to human RBC in vitro. This binding was specific, because sera from malaria-infected patients and mouse polyclonal sera containing antibodies to PvAMA-1 were able to block the adhesion by 82.0% and 79.8%, respectively. Moreover, monoclonal antibodies directed against domain II were partially inhibitory in the cytoadherence assays. The receptor recognized on the surface of COS-7 cells expressing the domains I and II was partially removed after human RBC were treated with trypsin or chymotrypsin, suggesting that its composition is predominantly protein. In conclusion, our results can be used as basis for future studies aimed at better understating the function of the antibodies generated during the natural infection or after vaccination with PvAMA-1.

I. INTRODUÇÃO

1. Aspectos epidemiológicos da malária no mundo e no Brasil

A malária é uma doença parasitária potencialmente letal que, juntamente com a AIDS e a tuberculose, atinge e mata um número expressivo de pessoas, constituindo-se atualmente num dos maiores e mais graves problemas de saúde pública mundial. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS – World Malaria Report, 2005), a malária representa hoje a antroponose de maior prevalência no mundo. Atualmente, cerca de 40% da população mundial corre o risco de contrair a malária. A OMS estima que ocorram de 300 a 500 milhões de casos anuais com mortalidade calculada em mais de 1 milhão de indivíduos. A maior incidência de mortes ocorre na África, sendo as principais vítimas, crianças menores de cinco anos de idade e mulheres grávidas infectadas pelo *Plasmodium falciparum*. Estimativas revelam que uma criança africana morre a cada 30 segundos em decorrência da malária. Outros grupos de alto risco são os viajantes não-imunes, refugiados, migrantes e trabalhadores que ingressam em áreas endêmicas (OMS, 2005).

O *Plasmodium vivax* é a segunda mais prevalente espécie causadora de malária no mundo ocorrendo principalmente no Oriente Médio, Ásia, oeste do Pacífico, América do Sul e América Central (Figura 1). Dados mais recentes estimam que ocorram de 130 – 145 milhões de casos anualmente (revisto por BAIRD *et al.*, 2007), contrastando com informações mais antigas, que estimava o número de casos anuais entre 70 e 80 milhões (revisto por MENDIS *et al.*, 2001). Nas Américas, o *P. vivax* está presente em 20 países. A maioria dos casos de malária *vivax* da América do Sul ocorre na Colômbia e Brasil (revisto por HIGGS & SINA, 2005).

No sudeste e leste africano, a malária causada por *P. vivax* é incomum (MENDIS *et al.*, 2001). Essa baixa porcentagem do total de casos notificados ocorre devido à existência de variantes negativas do grupo sanguíneo Duffy que limitam a invasão eritrocitária pelo parasita (revisto por GUERRA *et al.*, 2006).

Figura 1. Distribuição mundial do *Plasmodium vivax* (adaptado do site <http://www.map.ox.ac.uk> – acessado em abril de 2007)

No Brasil, mais de 99% dos casos de malária ocorrem na Região Amazônica nos Estados do Pará, Amazonas, Rondônia, Acre, Amapá, Mato Grosso, Maranhão e Tocantins. Fora da Região Amazônica, a malária é restrita a focos residuais em regiões onde existem áreas remanescentes de floresta tropical. Até o ano de 1988, o número de casos de malária causada por *P. falciparum* e *P. vivax* eram similares. Entretanto, a partir de 1999 houve um aumento significativo do número de casos de malária *vivax* em relação à malária *falciparum*, atingindo 80% dos casos (Sistema de

Vigilância Epidemiológica em Malária, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde - SVS/MS, 2003). Em 2006, foram registrados 550.576 casos de malária no Brasil, sendo o *P. vivax* responsável por aproximadamente 73,4% destes casos. Segundo o número de internações, o *P. vivax* foi responsável por aproximadamente 37,3% e o *P. falciparum* por 37%. A notificação de formas não especificadas e outras formas, representa grande parte dos casos (22,4%), denotando deficiência no diagnóstico específico da rede hospitalar, bem como na atualização de dados do sistema de informações. Esse fato pode vir a influenciar no tratamento adequado e aponta para a necessidade de capacitação das equipes de atenção hospitalar (Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, SVS/MS, 2007).

Além de perdas humanas, a malária tem um impacto econômico significativo em países endêmicos, pois é capaz de reduzir os esforços das pessoas para desenvolverem seus recursos econômicos, capacidade produtiva e melhorarem suas condições de vida. Nos últimos anos, o Ministério da Saúde, em parceria com estados e municípios, tem intensificado as ações de controle da malária na Amazônia, alcançando resultados relativamente positivos. Apesar desses avanços, a elevada incidência da malária e a persistência de fatores ambientais e socioeconômicos predisponentes exigem o permanente aperfeiçoamento do Programa Nacional de Controle da Malária (SVS/MS – A Malária no Brasil, 2005).

A transmissão da malária nas áreas endêmicas do Brasil é heterogênea e a presença de indivíduos assintomáticos na região Amazônica tem sido demonstrada em alguns estudos. Em um deles, os autores demonstraram a prevalência de infecções assintomáticas, tanto por *P. vivax* quanto por *P. falciparum* em duas populações ribeirinhas do estado de Rondônia. Essa prevalência foi maior nos indivíduos com idades entre 21 e 26,5 anos, sendo que a média de idade da

população nas áreas estudadas foi de aproximadamente 18 anos (ALVES *et al.*, 2002). Indivíduos assintomáticos apresentam baixas parasitemias, muitas vezes sendo indetectáveis pelo método da gota espessa. Pela ausência de sintomas, esses indivíduos não são tratados corretamente e podem funcionar como reservatórios do parasita, ajudando a manter as altas taxas de transmissão nas áreas endêmicas para a malária. A importância desses indivíduos na transmissão da malária têm sido demonstrada por meio de infecções experimentais, nas quais o *Anopheles darlingi*, o mais importante vetor da malária na região Amazônica, pode se infectar ao picar pacientes com baixíssimas parasitemias, detectáveis somente por reação em cadeia de polimerase (PCR) (ALVES *et al.*, 2005). Recentemente, um outro estudo, realizado em uma área endêmica para malária no Estado do Amazonas, revelou alta prevalência de infecção assintomática por *P. vivax*. Um total de 109 pessoas residentes em cinco comunidades do Rio Padauri, afluente do Rio Negro, foram estudadas. Deste total, 99 indivíduos relataram um ou mais episódios prévios de malária. As amostras de sangue deste grupo foram submetidas ao PCR, e vinte delas foram positivas para *P. vivax* (20,4%). Porém, nenhum paciente com PCR positivo durante o inquérito, seis meses antes ou depois teve manifestações clínicas de malária, sendo considerados então, assintomáticos (SUÁREZ-MUTIS *et al.*, 2007). Nos últimos anos, esta técnica têm sido muito útil para a detecção e identificação das diferentes espécies de *Plasmodium* por apresentar maior sensibilidade na identificação de infecções mistas e infecções caracterizadas por baixas parasitemias, validando o uso deste método também em estudos epidemiológicos (SNOUNOU *et al.*, 1993; KIMURA *et al.*, 1997).

2. Malária: ciclo de vida do *Plasmodium*, características gerais e patologia

Os parasitas causadores da malária pertencem ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. Das 120 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros, apenas 4 espécies parasitam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, sendo que a última espécie ocorre apenas em regiões restritas do continente Africano (GILLES *et al.*, 1993). Dessas 4 espécies, o *P. vivax* e o *P. falciparum* são responsáveis pela grande maioria dos casos de malária no mundo. O *P. falciparum* é responsável por altos níveis de mortalidade que estão associados a ampla e crescente resistência à diversos antimaláricos (revisto por CUNHA-RODRIGUES *et al.*, 2006).

O *Plasmodium* apresenta um ciclo biológico caracterizado por uma fase sexuada, que ocorre na fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, e três etapas de reprodução assexuada, sendo que uma ocorre no hospedeiro invertebrado e as outras duas no hospedeiro vertebrado (Figura 2). Durante o repasto sangüíneo, o mosquito inocula uma quantidade estimada em 15 a 123 esporozoítas na derme do hospedeiro (revisto por PRUDENCIO *et al.*, 2006). Recentemente foi demonstrado em modelo murino, utilizando-se cepas de *Plasmodium berghei* expressando a Proteína Fluorescente Verde, que após a picada do mosquito, os esporozoítas, apesar de sua alta motilidade, são capazes de permanecer na derme durante um longo período de tempo (podendo ultrapassar 7 horas após a picada), realizando movimentos aleatórios e de padrão tortuoso. No intervalo de uma hora, aproximadamente 50% dos esporozoítas deixam a derme.

Dentre estes, 70% atingem os vasos sanguíneos dirigindo-se para o fígado, invadindo hepatócitos, enquanto os 30% restantes invadem os vasos linfáticos.

Estes esporozoítas que são levados por meio de vasos linfáticos apresentam um movimento de deslizamento lateral, sendo detectados posteriormente nos linfonodos, onde entram em contato com células do sistema imune, e apenas uma pequena porcentagem se desenvolve na forma exo-eritrocítica (AMINO *et al.*, 2005).

Figura 2. Ciclo de vida do *Plasmodium*. (Adaptado do site <http://www.images.encarta.msn.com> – acessado em março de 2007)

Uma característica obrigatória durante a infecção é a capacidade dos esporozoítas de *Plasmodium* de se desenvolverem no interior dos hepatócitos. Semelhantemente a outras formas invasivas de parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa, estes possuem duas características importantes: a motilidade e a capacidade de migrarem por meio das células do hospedeiro (MOTA *et al.*, 2001).

A infecção das células hospedeiras pelos esporozoítas pode envolver a invaginação da membrana plasmática e a subsequente formação do vacúolo parasitóforo (STEWART & VANDERBERG, 1992) ou pode ocorrer também pela ruptura da membrana plasmática, processo que requer motilidade e é usado pelo parasita ao migrar entre células e tecidos (AMINO *et al.*, 2005). Estudos muito recentes demonstraram que os hepatócitos, cada um contendo por volta de 10.000 merozoítas, modificam-se para formar as estruturas denominadas merosomas, cheias de parasitas, as quais migram para a circulação sangüínea conseguindo escapar dos fagócitos. O envoltório dos merosomas, constituído de hepatócitos mortos, deveria normalmente sinalizar para que ocorresse a fagocitose. Porém, os parasitas inibem a exposição da fosfatidilserina na superfície. Desta forma, os merosomas parecem assegurar a migração dos parasitas para a corrente sangüínea e sua evasão da imunidade do hospedeiro (STURM *et al.*, 2006).

No interior dos hepatócitos, os esporozoítas se transformam em esquizontes hepáticos. Estes se multiplicam por esquizogonia e originam milhares de merozoítas (ciclo pré-eritrocítico). A ruptura do esquizonte hepático e a subsequente invasão eritrocitária pelos merozoítas caracterizam respectivamente o término da fase pré-eritrocítica e o início da fase eritrocítica do parasita. Nos ciclos de *P. vivax* e *P. ovale*, existe outra forma hepática denominada hipnozoíta, um estágio latente responsável pelas recaídas observadas nesses dois tipos de malária. No entanto, os mecanismos pelos quais essas formas latentes são ativadas ainda permanecem desconhecidos (IMWONG *et al.*, 2007).

No sangue, o ciclo esquizogônico repete-se em prazos regulares e característicos para cada espécie: 36 a 48 horas para *P. falciparum*, 48 horas para *P. ovale* ou 72 horas para *P. malarie*. O paroxismo por *P. vivax*, assim como em *P.*

ovale ocorre tipicamente em intervalos de 48 horas e coincidem com a ruptura dos eritrócitos infectados, que permite a exposição do parasita ao sistema imune do hospedeiro. É importante ressaltar que, ao contrário do *P. falciparum*, que invade eritrócitos jovens e maduros, o *P. vivax* infecta e se multiplica exclusivamente em eritrócitos jovens (reticulócitos). Nos eritrócitos/reticulócitos, os merozoítas originam os trofozoítas, que amadurecem e se dividem por esquizogonia, gerando os esquizontes sangüíneos. Os merozoítas liberados pela ruptura da célula sangüínea podem invadir novos eritrócitos, mantendo assim o ciclo.

Foi demonstrado por meio de análises moleculares e bioquímicas que a membrana de eritrócitos infectados pelas diversas espécies de *Plasmodium* pode sofrer modificações drásticas que incluem o aparecimento de protusões na superfície (NAGAO *et al.*, 2000), mudanças na composição lipídica da membrana (MAGUIRE *et al.*, 1990), inserção de proteínas derivadas do parasita (revisto por SMITH *et al.*, 2000) e modificações nas proteínas características dos eritrócitos do hospedeiro (EDA *et al.*, 2004).

Na malária *vivax*, a infecção geralmente é caracterizada como benigna, com possíveis recaídas. Em indivíduos não imunes, o paroxismo compreende sintomas como febre, calafrios e cefaléia. Outros sintomas usualmente associados à infecção são náuseas e vômitos (revisto por KARUNAWEEERA *et al.*, 2003). Eventualmente, as infecções por *P. vivax* podem resultar em sintomas clínicos graves, similares às infecções por *P. falciparum*. Dentre esses sintomas destacam-se a malária cerebral (BEG *et al.*, 2002; OZEN *et al.*, 2006), falência renal (PRAKASH *et al.*, 2003) e trombocitopenia (revisto por RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2005). No caso específico do Brasil, há relatos de formas graves e letais por *P. vivax*. As principais complicações causadas pelo *P. vivax* (relatadas entre os anos de 2001 e 2003) são:

alterações hematológicas, ruptura esplênica, alterações renais e pulmonares (LACERDA *et al.*, 2006).

A reprodução sexuada ocorre quando parte das formas sangüíneas se diferencia em gametócitos masculinos e femininos e estes são ingeridos durante um novo repasto sangüíneo pela fêmea do *Anopheles* em indivíduos infectados. O processo de fertilização entre os gametas que ocorre no hospedeiro invertebrado origina o oocineto, que ao migrar para a parede intestinal, transforma-se em oocisto, o qual se multiplica por esporogonia e origina milhares de esporozoítas. Estes migram para a glândula salivar do inseto onde se tornam maduros e capazes de iniciar uma infecção no hospedeiro vertebrado.

3. Proteínas de merozoítas envolvidas na ligação a eritrócitos

As manifestações clínicas associadas à malária humana são causadas pela fase eritrocítica do parasita. Apesar de ser um processo complexo e ainda não completamente entendido, a invasão de eritrócitos/reticulócitos pelo parasita pode ser dividido em algumas etapas críticas já conhecidas. A adesão inicial do parasita aos eritrócitos é seguida da reorientação do mesmo, a qual é necessária, para que seu pólo apical entre em contato com a superfície do eritrócito, formando uma junção. A formação desta junção é irreversível e precede a entrada do *Plasmodium* pela invaginação da membrana dos eritrócitos. A formação desta junção é mediada pela interação entre receptores específicos, presentes na superfície dos eritrócitos e moléculas ligantes pertencentes ao parasita (revisto por GAUR *et al.*, 2004).

Domínios conservados ricos em cisteínas exercem importante papel durante esta invasão, assim como em outros estágios do ciclo de vida do *Plasmodium*.

Domínios do tipo “Duffy Binding Like” (DBL) são característicos de uma família de proteínas ligantes denominada “Erythrocyte Binding Proteins” (EBP), as quais são regiões ricas em cisteínas, que reconhecem receptores específicos presentes na superfície das células do hospedeiro. Estes domínios atuam como determinantes críticos na especificidade da ligação aos eritrócitos e são os mais bem definidos ligantes presentes em estágios invasivos das espécies causadoras de malária (MICHON *et al.*, 2002). As proteínas pertencentes à família EBP localizam-se inicialmente nos micronemas e, posteriormente, são transportadas à superfície do merozoíta durante a invasão (ADAMS *et al.*, 1990). A mais bem estudada entre as proteínas de *P. vivax* é a “Duffy Binding Protein” (PvDBP), que é capaz de se ligar a um receptor específico na superfície de eritrócitos, o antígeno Duffy (ADAMS *et al.*, 1992), que também está presente em *Plasmodium knowlesi*.

A estrutura das proteínas pertencentes à família EBL é característica e pode ser dividida em seis regiões que incluem dois domínios ricos em cisteínas, denominados região II e região VI (Figura 3). A região II em PvDBP e PkDBP é responsável pela atividade de ligação ao receptor específico presente na superfície dos eritrócitos do hospedeiro e, por esta capacidade de ligação, esta região é chamada de “Duffy Binding Domain” (CHITNIS *et al.*, 1994). Em *P. falciparum*, as proteínas da família EBL consistem em duas regiões ricas em cisteínas, denominadas F1 e F2, homólogas ao “Duffy Binding Domain” (revisto por HOWELL *et al.*, 2006). Este domínio em repetição é encontrado nas proteínas EBA-175, BAEBL e JSEBL e tem sido demonstrado que essas proteínas possuem atividade de

ligação a eritrócitos (ADAMS *et al.*, 1992; GILBERGER *et al.*, 2003; NARUM *et al.*, 2002).

Figura 3. Representação esquemática da estrutura das proteínas pertencentes à família EBL. (Adaptada de Howell *et al.*, 2006)

O receptor para EBA-175 é a glicoforina A (SIM *et al.*, 1994), enquanto os receptores para BAEBL e JSEBL estão apenas parcialmente caracterizados (Tabela 1). Algumas evidências sugerem que BAEBL se liga a glicoforina C (LOBO *et al.*, 2003), mas outros estudos apontam a capacidade desta proteína em se ligar a outros receptores (MAYER *et al.*, 2004). Para JSEBL, os receptores ainda não foram completamente caracterizados (GAUR *et al.*, 2004).

Um parálogo da família EBL é a proteína MAEBL em cuja estrutura existe uma substituição do domínio DBL por um domínio, também rico em cisteínas, muito similar a região ligante do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1), que é constituída pelos domínios I e II, altamente conservada entre as diversas espécies de *Plasmodium* e outros parasitas do filo apicomplexa (MICHON *et al.*, 2002). O gene *maeb1* foi inicialmente identificado nas espécies *Plasmodium yoelii* e *P. berguei* responsáveis pela infecção em roedores (KAPPE *et al.*, 1997, 1998).

Tabela 1. Principais ligantes de merozoítas de *Plasmodium* e seus respectivos receptores em eritrócitos ou reticulócitos (Adaptada de GAUR *et al.*, 2004).

	Proteína Ligante	Receptor eritrocitário
<i>P. falciparum</i>	EBA-175	Glicoforina A
	BAEBL (variante Dd/NM)	Glicoforina C
	BAEBL (outras variantes)	Desconhecido
	JESEBL	Desconhecido
	EBL-1	Banda 3
	PMSP ₁₉	Desconhecido
	PfAMA-1	Desconhecido
<i>P. vivax</i>	PvDBP	Antígeno sangüíneo Duffy
	PvRBP 1 & 2	Desconhecido (Reticulócitos)
<i>P. knowlesi</i>	PkDBP - alfa proteína	Antígeno sangüíneo Duffy (humano e Rhesus)
	Beta proteína; gama proteína	Desconhecido; Rhesus Quimiotripsina-resistente
<i>P. yoelii</i>	Py235 (RBP like)	Desconhecido; ácido siálico independente
		Tripsina-sensível
	Proteína 135 kDa	Antígeno Sangüíneo Duffy

Esta proteína apresenta características da família EBL, possuindo uma região carboxil rica em cisteínas, região que é homóloga a região VI das DBL-EBPs. Porém, diferentemente das outras proteínas ligantes pertencentes a essa família, MAEBL possui um domínio rico em cisteínas, que é expresso em repetição (M1 e M2) e que não possui nenhum grau de similaridade aos domínios do tipo DBL característicos da família (KAPPE *et al.*, 1998). Ao invés disso, esse ligante possui similaridade com os domínios I e II de AMA-1, presente em todas as espécies de *Plasmodium* (revisto por MICHON *et al.*, 2002), em *Toxoplasma gondii* (DONAHUE *et al.*, 2000) e em *Babesia bovis* (GAFFAR *et al.*, 2004). Em múltiplos alinhamentos das sequências dos genes que codificam MAEBL e AMA-1 de diversas espécies de

Plasmodium, foi observado alto grau de similaridade entre essas duas proteínas (MICHON *et al.*, 2002). Em ensaios de citoaderência utilizando as regiões M1 e M2 de MAEBL de *P. yoelii*, foi demonstrado que estas porções da proteína possuem capacidade de se ligar a eritrócitos de camundongos, sendo esta proteína então funcionalmente semelhante a outras proteínas pertencentes à família EBL (KAPPE *et al.*, 1998). A atividade de ligação a eritrócitos foi observada no mesmo tipo de ensaio utilizando os domínios I e II de AMA-1 de *P. yoelii* (FRASER *et al.*, 2001).

4. Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1)

4.1. Estrutura, função e polimorfismo

AMA-1 de *Plasmodium* é uma proteína transmembrana altamente conservada, do tipo 1 (WATERS *et al.*, 1990), possuindo ortólogos em pelo menos duas espécies do filo Apicomplexa: *Babesia bovis* (GAFFAR *et al.*, 2004) e *Toxoplasma gondii* (DONAHUE *et al.*, 2000; HEHL *et al.*, 2000). No *Plasmodium*, AMA-1 está presente inicialmente nos micronemas e, posteriormente, na superfície de merozoítas maduros (PETERSON *et al.*, 1989; CREWETHER *et al.*, 1990; NARUM & THOMAS, 1994), enquanto que no *Toxoplasma* AMA-1 está isolado nos micronemas (DONAHUE *et al.*, 2000; HEHL *et al.*, 2000). Esta proteína é constituída por uma pro-seqüência, um ectodomínio rico em cisteínas, um domínio transmembrana e uma região citoplasmática (Figura 4A). As pontes dissulfídicas formadas pelos resíduos de cisteínas promovem a separação do ectodomínio em três domínios (I, II e III) (HODDER *et al.*, 1996).

Em *P. falciparum*, a forma precursora da proteína é constituída por 622 aminoácidos, com massa molecular aparente de 83 kDa (PETERSON *et al.*, 1989; NARUM & THOMAS, 1994). Antes de ser transportada do complexo apical para a superfície dos merozoítas, esta proteína sofre uma primeira clivagem proteolítica que resulta na remoção da região N-terminal, originando uma proteína de 66 kDa (NARUM & THOMAS, 1994; HOWELL *et al.*, 2001; HOWELL *et al.*, 2003). Posteriormente, esta proteína migra para a superfície do merozoíta maduro (NARUM & THOMAS, 1994; HEALER *et al.*, 2002) onde dois novos processos de clivagens proteolíticas ocorrem resultando em fragmentos de 48 kDa ou 44 kDa (NARUM & THOMAS, 1994; HOWELL *et al.*, 2001; HOWELL *et al.*, 2003). A importância biológica do processamento secundário de AMA-1 não é conhecida, mas sugere-se que este é necessário para que ocorra o processo de invasão do eritrócito (NARUM & THOMAS, 1994; HOWELL *et al.*, 2001; HEALER *et al.*, 2002; HOWELL *et al.*, 2003).

Recentemente, a estrutura cristalográfica de AMA-1 de *P. vivax* foi elucidada (PIZARRO *et al.*, 2005) a partir de uma proteína recombinante representando o ectodomínio, produzida na levedura *Pichia pastoris* (KOCKEN *et al.*, 1999). A resolução desta estrutura confirmou o tipo de conformação inicialmente sugerido pela sequência primária de aminoácidos da proteína, sendo constituída por três domínios que possuem 16 resíduos de cisteína que formam 8 ligações dissulfídicas, dos quais dois (I e II) formam módulos “PAN”, freqüentemente associados a interações proteína-proteína e proteína-carboidrato (PIZARRO *et al.*, 2005). A Figura 4B mostra a ilustração dessa estrutura tridimensional

A

B

Figura 4. Estrutura da proteína AMA-1 de *Plasmodium*. (A) Representação esquemática da proteína AMA-1 de *Plasmodium* (HOWELL *et al.*, 2003) destacando os fragmentos resultantes da clivagem proteolítica da proteína; (B) Ilustração representando a estrutura tridimensional obtida pela análise cristalográfica de uma proteína recombinante baseada no ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax* (PIZARRO *et al.*, 2005). Nesta ilustração, as fitas em verde representam a estrutura do domínio I, em azul o domínio II e em vermelho, o domínio III.

A função desempenhada por AMA-1 não é totalmente conhecida. Entretanto, as evidências descritas a seguir sugerem o seu envolvimento no processo de invasão do eritrócito: (i) anticorpos monoclonais contra AMA-1 de *P. knowlesi* são capazes de inibir a invasão de merozoítas *in vitro* (THOMAS *et al.*, 1984); (ii) peptídeos sintéticos derivados de *PfAMA-1* inibem a interação do merozoíta com o eritrócito (URQUIZA *et al.*, 2000); (iii) A complementação parcial da função de invasão do merozoíta de *PfAMA-1* pode ser obtida após a substituição por AMA-1 de *Plasmodium chabaudi* (HEALER *et al.*, 2005); (iv) Células COS-7 transfectadas com o domínio I-II de AMA-1 de *P. yoelii* são capazes de ligar a eritrócitos (FRASER *et al.*, 2001) e (v) um peptídeo selecionado de uma biblioteca do tipo “phage display” por sua alta afinidade por *PfAMA-1* é um potente inibidor da invasão do merozoíta (LI *et al.*, 2002). Além disso, recentemente foi demonstrado que AMA-1 é também expresso nos micronemas de esporozoítas de *P. falciparum* e anticorpos específicos contra *PfAMA-1* foram capazes de inibir a invasão de hepatócitos (SILVIE *et al.*, 2004). Esta informação tem fortes implicações do ponto de vista de importância deste antígeno como candidato a vacina. É importante ressaltar que tentativas de excluir (“knock-out”) o gene *ama-1* de *P. falciparum* (TRIGLIA *et al.*, 2000) e *Toxoplasma gondii* (HEHL *et al.*, 2000) geraram parasitas inviáveis, o que sugere que a proteína AMA-1 é essencial para a sobrevivência desses parasitas.

O polimorfismo que resulta na substituição de aminoácidos indica que AMA-1 sofre pressões imunes que resultam na diversificação da conformação dos epítomos impedindo assim a invasão de novos eritrócitos pelos merozoítas (HEALER *et al.*, 2004). A comparação da seqüência de nucleotídeos de *ama-1* de *P. vivax* com *ama-1* de *P. knowlesi*, *P. fragile*, *P. chabaudi* e *P. falciparum* revelou que a identidade entre a seqüência de *P. vivax* e das demais espécies é, respectivamente, de 86%,

83%, 57% e 52%. A baixa identidade entre a sequência de nucleotídeos de *ama-1* de *P. falciparum* é devido a uma inserção de 42 aminoácidos na região N-terminal da proteína AMA-1 de *P. falciparum* (CHENG & SAUL, 1994).

Recentemente, em estudo mais abrangente, Feng *et al.* (2005) compararam as seqüências de aminoácidos do ectodomínio e de cada um dos domínios da PfAMA-1 separadamente com as seqüências correspondentes a outras 8 espécies importantes de *Plasmodium*: *P. reichenowi*, *P. chabaudi*, *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. fragile*, *P. knowlesi*, *P. vivax* e *P. cynomolgi*. Foi observado que as médias de identidade entre as seqüências foram de: 57,1% para a proteína inteira, 53,2% para o domínio I, 64,1% para o domínio II e 58% para o domínio III. Ao estenderem esta análise para outros dois parasitas do filo Apicomplexa (*T. gondii* e *B. bovis*), os autores encontraram 54,1%, 47,7%, 56,5% e 49,4% de identidade, respectivamente. Os autores concluem que o alto grau de conservação da seqüência do domínio II é consistente com o papel de manter a estrutura tridimensional de AMA-1 e/ou manutenção de sua função.

Em estudos realizados por Chesne-Seck *et al.* (2005), os autores compararam a estrutura de PvAMA-1 e PfAMA-1 e examinaram a distribuição tridimensional dos sítios polimórficos. Consideraram como polimórficos os sítios que tinham pelo menos duas seqüências que diferiam do consenso de aminoácidos. Os autores observaram que todos os sítios polimórficos estão expostos na superfície da proteína e identificaram em PfAMA-1 32 sítios no DI (15,5% do domínio), 11 sítios no DII (8% do domínio), 9 sítios no DIII (8,6% do domínio), demonstrando que o DI é a região mais polimórfica da proteína. No caso específico de PvAMA-1, apenas o domínio I foi analisado, o qual apresentou 17 sítios polimórficos (8,3% do domínio).

Mais recentemente foram publicados dois trabalhos importantes sobre o polimorfismo de *PvAMA-1*. Em um deles, utilizando 11 isolados coletados de pacientes infectados por *P. vivax* provenientes da parte ocidental da Índia, foi observado um grau de diversidade genética que se mostrou maior do que o polimorfismo reportado em estudos anteriores. Na análise da sequência de nucleotídeos foram identificadas mutações pontuais em 48 posições ao longo do gene *pvama-1* (RAJESH *et al.*, 2007). Em um outro estudo utilizando amostras de indivíduos com infecção por *P. vivax* de uma única população do Sri Lanka, foi demonstrado alto grau de diversidade alélica entre os parasitas. Quinze haplótipos diferentes foram identificados nos 23 isolados seqüenciados. Foram identificados 34 sítios polimórficos ao longo do gene *pvama-1*, sendo o domínio II o mais polimórfico de *PvAMA-1* (GUNASEKERA *et al.*, 2007).

No Brasil, o primeiro estudo sobre a diversidade antigênica de *AMA-1* de *P. vivax* foi realizado utilizando – se um fragmento de 388 pb, representando o domínio variável de *Pvama-1*. Cinco das 20 amostras de DNA analisadas demonstraram seqüências polimórficas, pertencentes a diferentes alelos quando comparadas a seqüência do gene correspondente, pertencente a cepa de referência PH-84 de *P. vivax* (RODRIGUES *et al.*, 2005). Recentemente, outro estudo importante utilizando a seqüência de aminoácidos codificada pelo domínio I do gene *ama-1* de *P. vivax* foi realizado. Essas seqüências foram obtidas a partir de amostras de pacientes infectados apresentando contagem normal de plaquetas ou trombocitopenia. Foi demonstrado que a presença de determinados resíduos de aminoácidos está associada com a contagem normal de plaquetas, independentemente do nível de parasitemia. (GRYNBERG *et al.*, 2007). A importância destes polimorfismos foi recentemente demonstrada por Dutta *et al.* (2007), utilizando um modelo *in vitro* de

crescimento e inibição da invasão de eritrócitos pelo *Plasmodium*. Neste trabalho foi demonstrado que 24 sítios polimórficos localizados no gene *ama-1* de *P. falciparum* contribuem para o escape antigênico do parasita. Foi observado que a maioria destes resíduos polimórficos está localizada na região correspondente ao domínio I.

4.2. Papel dos anticorpos contra AMA-1 na imunidade contra a malária

Diversas linhas de evidências indicam um papel importante para os anticorpos contra AMA-1 na imunidade contra a malária. Estudos iniciais demonstraram que anticorpos monoclonais contra AMA-1 de *P. knowlesi* são capazes de inibir a invasão de merozoítas *in vitro* (DEANS *et al.*, 1982; THOMAS *et al.*, 1984). Estes resultados foram confirmados utilizando-se anticorpos policlonais de coelhos específicos contra AMA-1 de *P. chabaudi*, os quais foram capazes de transferir passivamente imunidade contra a infecção em camundongos (CREWETHER *et al.*, 1996). Outras evidências que sugerem fortemente a importância dos anticorpos contra a AMA-1 na imunidade contra as formas sangüíneas do parasita foram obtidas por meio de imunizações experimentais com proteínas recombinantes. Foi demonstrado que a imunização de coelhos com proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 foi capaz de induzir anticorpos capazes de inibir a invasão do merozoíta de *P. falciparum in vitro* (HODDER *et al.*, 2001; DUTTA *et al.*, 2002; KOCKEN *et al.*, 2002; KENNEDY *et al.*, 2002; LALITHA *et al.*, 2004; DUTTA *et al.*, 2005).

O mecanismo pelo qual esses anticorpos protetores agem ainda não está definido, mas dois mecanismos principais de inibição da invasão por anticorpos anti-AMA1 têm sido propostos: (i) bloqueio direto da função de AMA-1 (THOMAS *et al.*, 1984; DUTTA *et al.*, 2005) e ii) “cross-linking” e conseqüente inibição da dispersão

de AMA-1 sobre a superfície apical do parasita (DUTTA *et al.*, 2003; 2005). O bloqueio direto da função de AMA-1 por anticorpos inibidores da invasão é sugerido com base em observações de que fragmentos Fab dos anticorpos monoclonais R31/C2 (THOMAS *et al.*, 1984) e 4G2 (DUTTA *et al.*, 2005) são inibidores eficientes da invasão do parasita *in vitro*. A possibilidade de que ambos os mecanismos atuem concomitantemente não é descartada.

Kocken *et al.* (1998) mapearam o epítopo de AMA-1 reconhecido por um anticorpo monoclonal (4G2) capaz de inibir a invasão de *P. falciparum in vitro*. Diferentes combinações dos domínios de *PfAMA-1* (I-II, II-III, I-II-II e I, II e III separadamente) foram expressas em *Pichia pastoris* e testadas quanto ao reconhecimento por 4G2. Somente as combinações I-II e I-II-III, em condições não redutoras, foram reativas por “immunoblotting”, demonstrando que o anticorpo monoclonal reconhece um epítopo conformacional que requer ambos os domínios I e II (KOCKEN *et al.*, 2002; PIZARRO *et al.*, 2005). Este epítopo foi localizado, por modelagem, no domínio II da estrutura tridimensional de *PvAMA-1* (PIZARRO *et al.*, 2005). Muito recentemente, Collins *et al.* (2007) realizaram a completa caracterização do epítopo de *P. falciparum* reconhecido pelo monoclonal 4G2, o qual fornece um importante passo na identificação de regiões funcionais dentro da proteína AMA-1 e também pode levar ao desenvolvimento de vacinas de subunidades, de baixo peso molecular, capazes de induzir uma resposta imune eficientemente protetora.

4.3. Propriedades imunogênicas

(A) Imunização experimental e humana

O potencial antigênico da proteína AMA-1 foi observado, inicialmente, após a imunização de macacos *Rhesus* com a proteína nativa purificada de *P. knowlesi*, a qual foi capaz de induzir proteção significativa contra a infecção (DEANS *et al.*, 1988). Posteriormente, a imunização de camundongos ou macacos com proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 de *P. chabaudi* (ANDERS *et al.*, 1998) ou *P. fragile* (COLLINS *et al.*, 1994), respectivamente, foi capaz de induzir proteção significativa contra a infecção. A eficiência protetora de AMA-1 também foi verificada após a imunização de macacos *Aotus vociferans* com AMA-1 de *P. falciparum* expresso em *Pichia pastoris* e desafio com dose letal do parasita. A proteção induzida pela imunização foi considerada efetiva, pois foi capaz de manter a parasitemia baixa em relação ao grupo não imunizado (STOWERS *et al.*, 2002).

No que se refere à AMA-1 de *P. vivax*, apenas um único estudo de imunização foi realizado até o presente momento utilizando a proteína correspondente ao ectodomínio expressa em *Pichia pastoris*, a qual foi capaz de induzir forte resposta de anticorpos em primatas não humanos (KOCKEN *et al.*, 1999). Além disso, a imunização de camundongos com plasmídios contendo o gene *Pvama-1* foi capaz de induzir anticorpos que reconhecem a proteína nativa por imunofluorescência (ROGERS *et al.*, 1999).

A Tabela 2 apresenta um sumário das imunizações experimentais baseadas em AMA-1 realizadas até o presente momento utilizando, como antígenos, tanto proteína nativa purificada como DNA plasmidial e proteínas recombinantes obtidas a

partir de diferentes sistemas de expressão (bactérias, levedura, baculovírus). Os resultados obtidos reforçam a importância de AMA-1 para compor, junto com outras proteínas, uma vacina contra a malária.

Alguns estudos realizaram também imunizações experimentais utilizando AMA-1 em combinação com outros possíveis antígenos candidatos a compor uma vacina contra o estágio sangüíneo de *Plasmodium*. No primeiro deles, avaliou-se a eficácia da imunização com *PcAMA-1* e *PcMSP-1*. Foi demonstrado que anticorpos induzidos pela referida imunização foram capazes de proteger parcialmente camundongos contra infecção por *P. chabaudi*, com redução significativa dos picos de parasitemia (BURNS *et al.*, 2003). Em outro estudo foi conduzida a imunização de camundongos com plasmídio contendo genes que codificavam para duas proteínas candidatas à compor uma vacina contra a malária: *PcMSP4/5* e *PcAMA-1*. A imunização com a vacina de DNA garantiu a sobrevivência dos camundongos após desafio letal com *P. chabaudi* (RAINCHZUK *et al.*, 2004).

Com base nestes resultados promissores, foram realizados estudos clínicos de Fase I. No primeiro deles, realizado por Saul *et al.*, 2005, foram realizadas imunizações com formulação composta por AMA-1 de *P. falciparum* recombinante e adjuvante Montanide ISA720 em voluntários saudáveis. Os resultados deste estudo não foram satisfatórios: apenas um único indivíduo desenvolveu altos títulos de anticorpos contra AMA-1 após a terceira imunização. Os autores atribuem esta baixa eficácia da vacina a perda de potencia da formulação ao longo do estudo.

Tabela 2. Sumário de imunizações experimentais baseadas em AMA-1 de *Plasmodium*.

Espécie	Modelo animal	Tipo de antígeno	Resultado	Referência
<i>P. knowlesi</i>	Macaco	Proteína nativa	Proteção contra a infecção	DEANS <i>et al.</i> (1988)
<i>P. fragile</i>	Macaco	Proteína recombinante	Proteção contra a infecção	COLLINS <i>et al.</i> (1994)
<i>P. chabaudi</i>	Camundongo	Proteína recombinante	Proteção contra a infecção	CREWITHER <i>et al.</i> (1996)
<i>P. chabaudi</i>	Camundongo	Proteína recombinante	Proteção contra a infecção	ANDERS <i>et al.</i> (1998)
<i>P. vivax</i>	Camundongo	DNA plasmidial	Anticorpos reconhecem a proteína nativa por imunofluorescência	ROGERS <i>et al.</i> (1999)
<i>P. vivax</i>	Macaco	Proteína recombinante	Altamente imunogênica em macacos	KOCKEN <i>et al.</i> (1999)
<i>P. yoelii</i>	Camundongo	Proteína nativa	Proteção contra a infecção	NARUM <i>et al.</i> (2000)
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de inibir a invasão de eritrócitos <i>in vitro</i>	HODDER <i>et al.</i> (2001)
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína recombinante	Inibição da invasão de eritrócitos por parasitas homólogos	KOCKEN <i>et al.</i> (2002)
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de bloquear o crescimento das cepas dos parasitas homólogos	KENNEDY <i>et al.</i> (2002)
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de inibir o crescimento do parasita <i>in vitro</i>	DUTTA <i>et al.</i> , (2002)
<i>P. falciparum</i>	Macaco	Proteína recombinante	Proteção contra a infecção	STOWERS <i>et al.</i> (2002)

Em 2005, foi realizado um segundo ensaio clínico de fase 1, utilizando proteínas recombinantes baseadas em AMA-1 das cepas de referência FVO e 3D7, de *P. falciparum*, produzidas em *Pichia pastoris*. As imunizações foram conduzidas na presença do adjuvante Alhydrogel. De 30 voluntários sadios que participaram do estudo, 54% desenvolveram níveis significativos de anticorpos contra PfAMA-1 após a segunda imunização e 92% após a terceira imunização (MALKIN *et al.*, 2005).

Recentemente, um estudo clínico de fase I, utilizando AMA-1 de *P. falciparum* recombinante e produzido em *E. coli* demonstrou segurança e imunogenicidade quando administrada a voluntários na presença do adjuvante AS02A (HEPPNER *et al.*, 2005). A formulação foi capaz de induzir níveis significativos de anticorpos específicos contra a proteína. Além disso, o soro dos voluntários imunizados foi capaz de reconhecer o parasita por imunofluorescência. (POLHEMUS *et al.*, 2007).

(B) Resposta imune humana contra proteínas recombinantes baseadas em AMA-1 de *P. vivax*

O primeiro estudo sobre a resposta imune naturalmente adquirida contra AMA-1 de *P. vivax* foi conduzido recentemente pelo nosso grupo (RODRIGUES *et al.*, 2005). Duas proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 (produzidas em bactérias ou leveduras) foram altamente reconhecidas por anticorpos de indivíduos com infecção patente, sendo IgG1 a subclasse de anticorpos predominante. Posteriormente, outros estudos caracterizando a resposta imune humana naturalmente adquirida contra PvAMA-1 foram realizados em áreas endêmicas de malária do Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2006; MORAIS *et al.*, 2006) e

Sri Lanka (WICKRAMARACHICHI *et al.*, 2006) confirmando que esta proteína é altamente imunogênica em infecções naturais. É importante ressaltar que estudos realizados em áreas endêmicas de malária demonstraram que anticorpos específicos para o ectodomínio de AMA-1 de *P. falciparum* (POLLEY *et al.*, 2004) e *P. vivax* (MORAIS *et al.*, 2006) estão significativamente associados com a redução de risco de malária clínica.

5. Importância da padronização de um ensaio funcional de ligação de células transfectadas expressando diferentes domínios de PvAMA-1 a eritrócitos humanos

A principal limitação dos estudos de antigenicidade de proteínas de superfície de merozoítas de *Plasmodium* por ELISA é que os anticorpos detectados neste ensaio representam uma população heterogênea com diferentes funções, o que dificulta a interpretação da presença de altos títulos de anticorpos específicos para um determinado antígeno (MSP1₁₉ ou AMA-1) observada em indivíduos naturalmente expostos ao parasita (SOARES *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2005). No caso específico do *P. vivax*, a dificuldade de realização de ensaios funcionais *in vitro* (ligação/invasão do reticulócito) tem dificultado consideravelmente as pesquisas nesta área. A padronização de um ensaio funcional *in vitro* utilizando anticorpos humanos específicos anti-AMA-1 pode ser extremamente útil para verificar se existe correlação entre anticorpos detectados por ELISA e anticorpos funcionais. Neste sentido, recentemente, foi desenvolvido um ensaio funcional *in vitro* de ligação a eritrócitos humanos utilizando células COS-7 transfectadas com a MSP1₁₉ (Han *et al.*, 2004).

Utilizando este ensaio, foi demonstrado que “pool” de soros de pacientes naturalmente expostos ao *P. vivax* foi capaz de inibir a ligação de células COS-7 transfectadas com a MSP₁₉ a eritrócitos humanos. Ambos os domínios EGF (1 e 2) foram necessários como ligantes.

No que se refere a AMA-1, existem evidências que suportam a idéia de que a atividade de ligação aos eritrócitos está diretamente relacionada aos domínios I-II (FENG *et al.*, 2005; FRASER *et al.*, 2001). Entretanto, recentemente foi demonstrado que o domínio III de AMA-1 de *P. falciparum* foi capaz de ligar-se a uma proteína específica de eritrócitos (KATO *et al.*, 2005). Com base nestes estudos, estamos propondo neste projeto investigar o possível envolvimento de PvAMA-1 na ligação a eritrócitos humanos. É nosso intuito estabelecer um ensaio funcional *in vitro* de ligação de células COS-7 transfectadas com plasmídios recombinantes derivados de PvAMA-1, PvMSP₁₉ e PvDBP-RII a eritrócitos humanos. Para isso, utilizamos dois plasmídios recombinantes, os quais codificam para os seguintes domínios de PvAMA-1: i) AMA-1 (domínios I-II), ii) AMA-1 (domínio III). Utilizaremos ainda outros dois plasmídios como controles: i) *PvmSP1₁₉* e ii) *Pvdbp-rii*. O segundo plasmídio será incluído neste estudo por conter o gene que codifica a região II da DBP, porção considerada essencial na ligação da proteína ao grupo sanguíneo Duffy durante o processo de invasão dos reticulócitos pelos merozoítas (XAINLI *et al.*, 2003). A padronização do ensaio de citoaderência possibilitará investigar a capacidade de anticorpos específicos, detectados em infecções naturais por ELISA, de interferirem com esta possível ligação das células transfectadas aos eritrócitos.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral:

Investigar o possível envolvimento do Antígeno 1 de Membrana Apical de *P. vivax* (PvAMA-1) na ligação a eritrócitos humanos utilizando células COS-7 transfectadas com plasmídios recombinantes codificando diferentes regiões do ectodomínio de PvAMA-1.

2. Objetivos específicos:

2.1. Construção de plasmídios recombinantes correspondentes a diferentes domínios de AMA-1 (I-II e III) e região II da DBP de *P. vivax* em fusão com a proteína fluorescente verde (GFP);

2.2. Transfecção de células COS-7 com os plasmídios recombinantes pDE-*ama-1* (*di-ii*), pDE-*ama-1* (*diii*), pDE-*msp1*₁₉ ou pDE-*dbp* (*rii*) e análise do padrão de expressão das proteínas correspondentes por microscopia de fluorescência utilizando anticorpos específicos (policlonais ou monoclonais);

2.3. Padronização do ensaio de ligação a eritrócitos humanos utilizando as células transfectadas com cada um dos quatro plasmídios recombinantes;

2.4. Avaliação da capacidade de soros de indivíduos com infecção patente por *P. vivax* e soros de camundongos (policlonais e monoclonais) contendo anticorpos anti-PvAMA-1 em inibir a ligação das células transfectadas aos eritrócitos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Composição das soluções, tampões e meios de cultura utilizados

1.1. Soluções e tampões para eletroforese em gel de agarose (eletroforese de DNA)

- Gel de agarose: 1% agarose (Invitrogen); TAE (1X); 1 µg/mL brometo de etídio (Invitrogen).
- TAE (Tris-Acetato-EDTA)(1x): 40 mM Tris-acetato (USB); 1 mM EDTA (Bio-Rad), pH 8,0.
- Tampão de amostra para DNA (5x): 0,25% azul de bromofenol (Bio-Rad); 0,25% xileno-cianol (Bio-Rad); 30% glicerol (Merck).

1.2. Soluções e tampões para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

- Gel de corrida: 30% acrilamida; 0,8% bis-acrilamida (Fluka Chemie); 0,75 M Tris, 0,2% SDS pH 8,8; 0,1% persulfato de amônio; Temed 15 µL (Invitrogen) (vol. final de 10 mL).
- Gel de separação: 12% acrilamida; 1,2% bis-acrilamida; 0,25 M Tris/0,2% SDS pH 6,8; 0,1% persulfato de amônio; Temed 12 µL (vol. final 5 mL).
- Tampão de amostra para SDS-PAGE (4x): 10% glicerol; 4% SDS; 100 mM 2-mercaptoetanol (Bio-Rad); 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% de azul de bromofenol (Bio-Rad).
- Tampão de corrida (1x): 35 mM SDS; 160 mM glicina; 25 mM Tris-HCl pH 8,0.

1.3. Soluções e tampões para “immunoblotting”.

- Tampão de transferência: 160 mM glicina (Synth); 25 mM Trizma base (Invitrogen); 20% metanol (Merck).
- Ponceau-S: 0,1% Ponceau red; 10% ácido acético.
- Solução de bloqueio para ensaios com soros de camundongos: PBS; 5% de leite desnatado (Molico); 2,5% de BSA (Sigma).
- Solução de revelação: 3,3-Diaminobenzidina (DAB, Sigma) 5 mg, H₂O₂ (Merck) 10 µL, diluídos em PBS.

1.4. Meios para cultura de bactérias

- LB (Luria Bertani): 2% LB broth base (Invitrogen); 0,5% NaCl (Synth), pH 7,0.
- LB-amp: LB; 100 µg/mL de ampicilina (USB).
- LB-ágar: LB; 1,5% bacto ágar (BD Biosciences).
- SOB: 2% triptona (BD Biosciences); 0,5% extrato de levedura (Sigma); 0,5% NaCl (Synth).
- SOC: SOB; 10 mM MgCl₂ (Synth); 20 mM glicose (Gibco).

1.5. Meios para cultura de células

- DMEM incompleto: Meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 2 mM de glutamina (Gibco), 25 mM de HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinaetanosulfônico) (Sigma-Aldrich), 2% de glicose (Gibco) e 2% de bicarbonato de sódio (Synth), pH 7,4.
- DMEM Completo: Meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES [4-(2-hidroxietil)-1-ácido

piperazinaetanosulfônico)], 2% de glicose, 40 mg/L de gentamicina (Gibco) e 2% de bicarbonato de sódio, pH 7,4.

- Meio RPMI: Meio RPMI (Sigma – Aldrich), pH 7,4.

1.6. Soluções utilizadas nos ensaios de Imunofluorescência

- PBS: 8 mM NaH₂PO₄, 2,3 mM Na₂HPO₄ (Synth), 130 mM NaCl, pH final 7,4.
- Solução de Bloqueio: 0,15% Gelatina (MP Biomedicals); 0,01% NaN₃ (USB).
- Solução para o preparo das lâminas de imunofluorescência: PBS 1 X (50%) , Glicerol 50%, pH 7,4.

1.7. Solução utilizada nos ensaios de ligação das proteínas recombinantes a eritrócitos humanos pela metodologia tradicional.

- Tampão de eluição: RPMI 1640 (Sigma – Aldrich), pH 7,4; NaCl 1,5 M (Synth), 10% Soro fetal bovino (Gibco) e 2mM PMSF (Pierce).

2. Construção dos plasmídios recombinantes contendo os genes que codificam para domínios selecionados das proteínas AMA-1 e DBP-RII de *P. vivax*

A sequência de nucleotídeos correspondente aos domínios *i-ii* e *iii* de *ama-1* de *P. vivax* foram obtidas através da amplificação por PCR a partir do plasmídio recombinante pHIS-*ama-1* (RODRIGUES *et al.*, 2005), o qual contém o gene que codifica os aminoácidos 43 a 487 do ectodomínio de AMA-1. A sequência de nucleotídeos correspondentes a região *ii* da *dbp* (que codifica os aminoácidos 194 a 521) foi obtida por PCR a partir do plasmídio recombinante pMOS-*dbp-rii*, construído previamente (RODRIGUES, 2005). As reações de

PCR foram realizadas com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição enzimática específicos para a clonagem no vetor pDisplay - EGFP (pDE) em fusão com a GFP, o qual foi cedido pelo Dr. Joon-Yong Chung, da Coréia do Sul (HAN *et al.*, 2004). A Tabela 3 mostra os oligonucleotídeos desenhados de forma a inserir as seqüências de interesse no vetor de expressão acima citado. As porções sublinhadas dos oligonucleotídeos senso e antisenso indicam sítios para as enzimas *Bgl*II ou *Sac*II (Invitrogen), respectivamente.

Cada um dos produtos de PCR foi purificado utilizando-se o kit GeneClean II (Q – Biogene) e inseridos inicialmente no vetor comercial pGEM-T-Easy de acordo com as instruções do fabricante (Promega). Os clones recombinantes foram selecionados por análise de restrição das preparações de plasmídios obtidos em pequena escala.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na construção dos plasmídios recombinantes.

Plasmídio Recombinante	5' → 3'	Função	Enzima de Restrição
pDE- <i>ama-1</i> d(i-ii)	GCCAGATCTCCTACCGTTGAGAGAAGC	Senso	<i>Bgl</i> II
pDE- <i>ama-1</i> (di-ii)	GCAGCCGCGGATCTCCGGGCCTACTTCTTG	Antisenso	<i>Sac</i> II
pDE- <i>ama-1</i> (diii)	GCCAGATCTTCCCCCTGCAGCATATATAAA	Senso	<i>Bgl</i> II
pDE- <i>ama-1</i> (diii)	GCAGCCGCGGATTAGTAGCATCTGCTTGTTCTGA	Antisenso	<i>Sac</i> II
pDE- <i>dbp</i> (rii)	GCCAGATCTGATCATAAGAAAACGATCTCT	Senso	<i>Bgl</i> II
pDE- <i>dbp</i> (rii)	GCAGCCGCGGATTGTCACAACTTCCTGAGTATT	Antisenso	<i>Sac</i> II

Posteriormente, os insertos foram removidos do vetor pGEM através de digestão com enzimas apropriadas. Os insertos purificados foram então ligados no vetor pDE, digerido com as mesmas enzimas. Após transformação em bactérias DH5 α , os plasmídios de interesse foram extraídos e aqueles que continham os insertos na orientação correta foram selecionados através de análises de restrição enzimática. Todas as construções geradas foram analisadas por seqüenciamento do DNA no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, utilizando-se o kit DYEnamic ET Dye Terminator no seqüenciador MegaBACE 1000 (ambos da GE Healthcare).

A Figura 5 apresenta a seqüência de aminoácidos que compõem o ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax*. As seqüências codificantes para os diferentes domínios estão destacadas com as cores: verde (Domínio I), azul (Domínio II) e vermelha (Domínio III).

```
PTVERSTRMSNPWKAFMEKYDIEKTHSSGVRVDLGEDAEVENAKYRIPAGRC
PVFGKGIVIENS AVSFLTPVATGDQRLKDGGFAFPNANDHISPMTIANLKARYK
DNVEMMKLNDIALCRTHAASFVMAGDQNSSYRHPAVYDEKEKTCHMLYLSA
QENMGPRYCSPDAQNRDAVFCFKPDKNESFENLVYLSKNVRNDWDKKCPRK
NLGNAKFGLWVDGNCEEIPYVKEVEAKDLRECNRIVFEASASDQPTQYEEEM
TDYQKIQQGFRQNNREMIKSAFLPVGAFNSDNFKSKGRGFNWANFDSVKKK
CYIFNTKPTCLINDKNFIATTALSHPQEVGPEFPCSIYKDEIEREIKKQSRNMNL
YSVDGERIVLPRIFISNDKESIKCPCEPERISNSTCNFYVCNCVEKRAEIKENNQ
VVIKEEFRDYYENGEEKSNKQMLL
```

Figura 5. Seqüência de aminoácidos (aa) correspondentes ao ectodomínio da proteína AMA-1.

3. Obtenção dos soros policlonais e de anticorpos monoclonais de camundongos

3.1. Imunização de camundongos com as proteínas recombinantes PV66/AMA-1 e PvDBP-RII para obtenção dos soros policlonais.

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo aprovou este estudo em 10 de julho de 2006, que se apresenta de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Grupos de 4 camundongos, fêmeas, da linhagem BALB/c foram imunizados na base da cauda, por via subcutânea (s.c), com 5 µg das proteínas PV66/AMA-1 (KOCKEN *et al.*, 1999) e PvDBP-RII (SINGH, *et al.*, 2001) emulsificadas em Adjuvante Completo de Freund (ACF, Sigma-Aldrich). Após 2 e 4 semanas, os animais receberam um reforço com 5 µg da mesma proteína emulsificada em Adjuvante Incompleto de Freund (AIF, Sigma – Aldrich) injetado s.c. na base da cauda. Dez dias após a primeira, segunda e terceira dose, os animais foram sangrados pela veia caudal. O sangue foi centrifugado, o soro separado e estocado a -20°C até o momento do uso.

3.2. Produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o domínio II de PvAMA-1.

Os anticorpos monoclonais contra o domínio II de PvAMA-1 foram produzidos pela Dra. Noeli Espindola, pós doutoranda do Laboratório de Imunologia Clínica da FCF/USP. Resumidamente, 5 camundongos BALB/c

machos foram imunizados via intraperitoneal com 20 µg da proteína recombinante derivada do domínio II de AMA-1 de *P. vivax*, que foi produzida recentemente em nosso laboratório (MUFALO, 2007), emulsificada em ACF (Sigma-Aldrich). Duas e quatro semanas depois, os animais receberam reforços com 10 µg da proteína emulsificada em AIF (Sigma-Aldrich) ou solução salina, respectivamente. Os esplenócitos dos camundongos imunizados foram removidos três dias após a terceira dose e fundidos com células de mieloma (SP2/O) usando polietilenoglicol 4000 (Merck). Os hibridomas resultantes foram cultivados durante duas semanas e amostras dos sobrenadantes destas culturas foram analisadas por ELISA e Imunnoblotting, de acordo com o protocolo já estabelecido em nosso laboratório. As células híbridas cujos sobrenadantes apresentaram anticorpos secretores contra o domínio II de *PvAMA* -1 foram então selecionadas para clonagem por meio da técnica de diluição limitante. A ascite de cinco camundongos produtores de anticorpos monoclonais foi utilizada para ensaios de inibição. Utilizamos diferentes concentrações (50, 100 e 200 µg/mL) de cada anticorpo para a determinação da concentração ideal para a realização dos ensaios de inibição da ligação entre células transfectadas com os domínios I-II de AMA-1 a eritrócitos humanos.

4. Cultura celular e Transfecção transiente

Células da linhagem COS-7 (células de rim de macaco transfectadas com sv 40) foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium, Gibco) suplementado com 5% de soro fetal bovino, 2 mM de

glutamina, 25 mM de HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinaetanosulfônico), 40 mg/L de gentamicina, 2% de glicose e 2% de bicarbonato de sódio em estufa a 37°C contendo 5% CO₂ em placas para cultura celular contendo 6 poços. Para a transfecção das células COS-7, cerca de 1 µg dos plasmídios recombinantes pDE-ama -1 (di-ii) ou pDE-ama-1 (diii) foram incubados com 5 µL do Reagente Plus (Invitrogen) por 15 minutos a temperatura ambiente (t.a). Após este período, foi adicionada a solução de transfecção, 3 µL de Lipofectamina (Invitrogen), seguido por nova incubação de 15 minutos a t.a. A solução de transfecção foi diluída em meio DMEM incompleto e colocada lentamente sobre os poços da placa de cultura contendo as células COS-7. As células foram incubadas durante 6 horas em estufa a 37°C contendo 5% CO₂. Após as 6 horas de incubação, o meio de cultura foi trocado por meio DMEM completo. Uma nova troca do meio de cultura celular foi realizada após 24 horas da transfecção. O volume final da cultura foi de 1 mL. Como controle positivo, utilizamos os plasmídios pDE-*msp1*₁₉ (Cedido pelo Dr. Mauricio Rodrigues, CINTERGEN, UNIFESP) e pDE-*dbp* (rii) para transfecção. O plasmídio pDE vazio foi utilizado como controle negativo. As células transfectadas foram analisadas por microscopia de fluorescência após 40-60 horas.

5. Análise da expressão das proteínas AMA-1, DBP e MSP1₁₉ em células COS-7 transfectadas por imunofluorescência

Para os ensaios de imunofluorescência, células da linhagem COS-7 foram cultivadas sobre lâminulas de microscopia estéreis previamente depositadas em placas para cultura celular contendo 24 poços. As células COS-7 transfectadas com os plasmídios pDE-*ama-1* (di-ii), pDE-*ama-1* (diii), pDE-*msp1₁₉* ou pDE-*dbp* (rij) foram lavadas com PBS 1X e fixadas em paraformaldeído 3,5%, por 1 hora a t.a. 40-60 horas após a transfecção. As células foram então lavadas com PBS 1X e incubadas em solução de bloqueio constituída por 0,15% de gelatina e 0,01% NaN₃ por 30 minutos a t.a. Em seguida, as células foram incubadas com soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1, anticorpo monoclonal anti-PvMSP1₁₉ ou anticorpo policlonal de camundongo anti-PvDBP-RII diluídos em solução de bloqueio por 45 minutos a t.a. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a rodamina (Kirkegaard and Perry Laboratories) diluído em solução de bloqueio, por 45 minutos a t.a. Após serem lavadas novamente, as lâminas foram montadas utilizando-se PBS contendo 50% de glicerol. Como controle negativo utilizamos células transfectadas com o plasmídio vazio (pDE) incubadas com todos os anticorpos primários utilizados neste ensaio. A Tabela 4 apresenta um sumário das condições utilizadas nos ensaios de imunofluorescência das células COS-7.

Tabela 4. Sumário das condições utilizadas nos ensaios de imunofluorescência de células COS-7 transfectadas.

Plasmídio	Anticorpo primário (diluição final)	Anticorpo secundário (diluição final)
pDE - <i>ama-1</i> (<i>di-ii</i>)	Anticorpo policlonal anti-PV66 AMA-1 (1:100)	Anti-IgG (camundongo) conjugado à rodamina (1:80)
	Soro normal de camundongo (1:100)	
pDE - <i>ama-1</i> (<i>diii</i>)	Anticorpo policlonal anti-PV66 AMA-1 (1:100)	
	Soro normal de camundongo (1:100)	
pDE - <i>msp1₁₉</i>	Anticorpo monoclonal anti-PvMSP1 ₁₉ (10 µg/mL)	
	Soro normal de camundongo (1:100)	
pDE - <i>dbp</i> (<i>rii</i>)	Anticorpo policlonal anti-PvDBP-RII (1:200)	
	Soro normal de camundongo (1:100)	
pDE (vazio)	Anticorpo policlonal anti-PV66AMA-1	
	Anticorpo policlonal anti-PvDBP-RII (1:200)	
	Anticorpo monoclonal anti-PvMSP1 ₁₉ (10 µg/mL)	
	Soro normal de camundongo (1:100)	

6. Ensaio de ligação de células COS-7 transfectadas a eritrócitos humanos

Os ensaios de ligação das células transfectadas a eritrócitos humanos foram realizados como descrito por Han *et al.* (2004). Amostras de sangue humano do grupo sanguíneo O Rh+ foram coletadas de indivíduos normais em tubos contendo anticoagulante (EDTA). Utilizamos os plasmídios recombinantes pDE-*msp1₁₉* e pDE-*dbp* (*rii*) como controles positivos nos ensaios de ligação a eritrócitos, pois em trabalhos anteriores células

transfectadas expressando essas duas proteínas foram capazes de se ligar a eritrócitos *in vitro* (HAN *et al.*, 2004; XAINLI *et al.*, 2000). Para realização do ensaio de ligação, os eritrócitos, após centrifugação, foram lavados três vezes com 10 volumes de DMEM incompleto e ressuspensos em volume final correspondente a um hematócrito de 10%. Um volume de 300 µl desta suspensão foi adicionado em cada poço contendo células COS-7 transfectadas (40-60 horas após transfecção) e, em seguida, as placas foram agitadas suavemente para distribuir uniformemente os eritrócitos no poço. Após incubação por 2 horas a 37°C, as placas foram lavadas três vezes com 2,0 mL de DMEM incompleto para remover os eritrócitos não aderentes. As células COS-7 com eritrócitos aderentes (rosetas) foram contadas com auxílio de um microscópio invertido de fluorescência (Nikon Eclipse TE300). Definimos previamente que cada roseta corresponde a uma célula transfectada com cinco ou mais eritrócitos aderentes. Imagens das rosetas formadas foram captadas com o auxílio do programa Image ProPlus – Versão 4.1. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As análises estatísticas envolvendo a contagem das rosetas e o cálculo do desvio padrão de experimentos em triplicata foram realizadas com o software GraphPad Prism, versão 4.0 (GraphPad Software).

7. Ensaio de inibição da ligação de células que expressam os domínios I e II de PvAMA-1 a eritrócitos humanos

Para os ensaios de inibição da ligação de células transfectadas a eritrócitos humanos foram testados os seguintes soros: (i) soro policlonal de

camundongo anti-PV66-AMA-1, (ii) “pool” de soros de indivíduos naturalmente infectados com *P. vivax* contendo altos títulos de anticorpos do tipo IgG contra AMA-1 (RODRIGUES *et al.*, 2005; BARBEDO *et al.*, 2007), (iii) anticorpos monoclonais anti-AMA-1 (DII). As amostras de soro de pacientes de áreas endêmicas de malária foram utilizadas em estudos anteriores sobre a resposta imune humana a MSP-1 (SOARES *et al.*, 1997, 1999a; RODRIGUES *et al.*, 2003) e AMA-1 (RODRIGUES *et al.*, 2005). Nos ensaios de inibição da ligação, utilizamos “pool” contendo soros de cinco destes pacientes, que apresentaram maiores títulos de anticorpos contra PvAMA-1 (RODRIGUES *et al.*, 2005; BARBEDO *et al.*, 2007). Como controle para os ensaios de inibição das células transfectadas a eritrócitos humanos utilizamos “pool” de soros de cinco indivíduos saudáveis, provenientes de São Paulo que nunca estiveram em área endêmica de malária ou soro normal de camundongos.

As células COS-7 transfectadas foram incubadas previamente, por 2 horas, com os soros policlonais de camundongo ou humanos em diferentes diluições (1:50, 1:100 e 1:200). Os anticorpos monoclonais foram utilizados na diluição final de 100 µg/mL. O ensaio de ligação das células transfectadas aos eritrócitos humanos foi realizado como descrito no item anterior. O número de rosetas formadas nos ensaios de inibição da ligação a eritrócitos, após a adição de soros anti-AMA-1 foi comparado ao número de rosetas formadas após a adição de soros de camundongos não imunizados ou de indivíduos sem histórico de malária (soros normais).

8. Efeito do tratamento enzimático de eritrócitos na capacidade de ligação às células COS-7 que expressam *PvAMA-1* (DI-II), *PvAMA-1* (DIII) e *PvDBP* (RII)

Após 40 a 60 horas da transfecção de células COS-7 com os plasmídios pDE-*ama-1* (*di-ii*), pDE-*ama-1* (*diii*) ou pDE-*dbp* (*rii*), amostras de sangue humano do grupo sanguíneo O Rh+ foram coletadas em tubos contendo anticoagulante (EDTA). Os eritrócitos foram lavados três vezes em meio RPMI, pH 7,4 e o volume do meio da última lavagem foi ajustado para um hematócrito de 5%. Os eritrócitos foram tratados então com 0,5 mg/mL de tripsina (TPCK - “trypsin from bovine pancreas”, Sigma-Aldrich) ou 0,5 mg/mL de quimiotripsina (TLCK - “ α -chymotrypsin from bovine pancreas”, Sigma-Aldrich), diluída em meio RPMI por 2 horas, a 37°C. Após a incubação com as referidas enzimas, os eritrócitos foram lavados novamente por três vezes em meio RPMI e tratados com 0,5 mg/mL de inibidor de tripsina (SBTI - “soybean trypsin inhibitor”, Gibco) ou 0,1 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila, Pierce) por 30 minutos a t.a. Após a incubação com os inibidores, os eritrócitos foram lavados cinco vezes em meio RPMI e o hematócrito foi ajustado para 10%. Cerca de 300 μ l desta suspensão de eritrócitos foi colocada em contato com as células transfectadas. As rosetas foram contadas com o auxílio de um microscópio de fluorescência invertido e o número total destas foi comparado ao número de rosetas formado utilizando-se eritrócitos sem qualquer tratamento enzimático prévio.

9. Ensaio de ligação das proteínas AMA-1 (DI-II), AMA-1 (DIII), DBP (RII) e MSP1₁₉ a eritrócitos humanos utilizando a metodologia tradicional

Neste ensaio, realizado conforme Liang *et al.*, 2001 com algumas modificações, utilizamos as proteínas recombinantes correspondentes aos domínios I e II e ao domínio III de PvAMA-1, recentemente geradas em nosso laboratório (MUFALO, 2007). Também utilizamos as proteínas correspondentes à região II da DBP (SINGH *et al.*, 2001) e a MSP1₁₉ (CUNHA *et al.*, 2001) de *P. vivax*. Todas as proteínas utilizadas neste ensaio foram produzidas em *Escherichia coli* em fusão com uma cauda de histidina.

Aproximadamente 4 mL de sangue humano do tipo O Rh+ foram coletados em tubos contendo anticoagulante (EDTA). Os eritrócitos foram lavados três vezes após centrifugação inicial, com meio RPMI 1640. Cerca de 2×10^5 eritrócitos foram incubados com 10 µg de proteína por 1 hora, a t.a. e sob leve agitação.

Os eritrócitos foram centrifugados e o precipitado ressuspendido em meio RPMI 1640, por duas vezes. Após as lavagens, o sedimento formado pelos eritrócitos foi incubado em solução de eluição, por 10 minutos, sob agitação e novamente centrifugado. As lavagens e a eluição foram analisadas através de immunoblotting de acordo com o protocolo já estabelecido em nosso laboratório. Brevemente, após a separação por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), as frações a serem analisadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond N, Amersham Biosciences) a uma voltagem de 100 V por 60 minutos usando equipamento “Mini Trans-Blot” (Bio-Rad). A eficiência da transferência foi averiguada pela coloração da membrana de nitrocelulose com Ponceau-S (Bio-Rad). Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi incubada por

aproximadamente 16 horas a 4°C, em solução de bloqueio. Após este período, a membrana foi incubada por 1 hora a t.a com o anticorpo monoclonal anti-His (GE Healthcare) diluído em solução de bloqueio (1:1000). Após 3 lavagens de 10 minutos com PBS/ Tween 20 a 0,05%, foi realizada uma incubação por 1 hora a t.a. com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (KPL) diluído 1:2.000 e a revelação feita com DAB (3,3-Diaminobenzidina, Sigma) e peróxido de hidrogênio em PBS ou por quimioluminescência utilizando kit ECL Western Blotting Analyses System (Amersham Biosciences).

IV. RESULTADOS

1. Obtenção dos plasmídios recombinantes

Na primeira etapa do projeto, geramos dois plasmídios recombinantes contendo os diferentes segmentos do gene correspondente ao ectodomínio de *ama-1* de *P. vivax* a partir do plasmídio pHIS-*ama-1* (RODRIGUES *et al.*, 2005). Posteriormente, geramos o plasmídio recombinante derivado da região *ii* da *dbp* de *P. vivax* a partir do plasmídio pMOS-*dbp-rlI* construído previamente (RODRIGUES, KM, 2005). Os plasmídios obtidos foram transformados em *E. coli* (DH5- α) competente e os clones recombinantes que apresentavam os insertos na orientação correta foram selecionados por restrição enzimática. Posteriormente os plasmídios foram clonados no vetor pDE-EGFP, utilizando as mesmas enzimas de restrição. A Tabela 5 apresenta um sumário de todas as construções utilizadas neste estudo, incluindo o plasmídio baseado na MSP1₁₉ de *P. vivax* que já estava disponível para este estudo.

Tabela 5. Sumário das construções utilizadas para a transfecção de células COS-7.

Gene	Domínio	Codifica aminoácidos:
<i>Pvama-1</i>	i e ii	43-385
<i>Pvama-1</i>	iii	386-487
<i>Pvdbp</i>	ii	194-521
<i>PvmSP1₁₉</i>	C-terminal (19 KDa)	1637-1751

2. Análise da expressão das proteínas *PvAMA-1*, *PvMSP1₁₉* e *PvDBP-RII* em células COS-7 transfectadas por imunofluorescência

As células transfectadas com cada um dos quatro plasmídios recombinantes foram analisadas por ensaio de imunofluorescência 48 horas após a transfecção para a verificação do padrão de expressão das proteínas. As condições deste ensaio estão descritas no item 5 de Material e Métodos. Através deste ensaio confirmamos a expressão das proteínas de interesse na superfície das células COS-7 (Figura 6). Uma vez que as células COS-7 permaneceram metabolicamente ativas durante parte do ensaio, a endocitose do anticorpo conjugado foi evidente em algumas das células analisadas.

3. Ensaio de ligação de células COS-7 transfectadas a eritrócitos humanos

Após a confirmação da expressão das proteínas de interesse na superfície das células COS-7 transfectadas, iniciamos a padronização das condições dos ensaios de ligação a eritrócitos. As células transfectadas foram incubadas com eritrócitos humanos do tipo O+ e as rosetas formadas foram contadas em microscópio de fluorescência.

Figura 6. Análise da expressão das proteínas na superfície das células COS-7 por imunofluorescência. Células COS-7 foram analisadas por imunofluorescência 40-60 horas após transfecção e observadas por microscopia de fluorescência, onde constatamos a expressão da GFP (**A**). Para confirmar o padrão de expressão das proteínas nas células transfectadas, utilizamos anticorpos especificamente dirigidos contra cada uma das proteínas expressas. Como anticorpo secundário, utilizamos anti-IgG conjugado à rodamina (**B**). Células transfectadas com o vetor pDE foram utilizadas como controle negativo.

Nestes ensaios pudemos confirmar a atividade de ligação a eritrócitos humanos exercida pelos domínios I e II de *PvAMA-1* ($564,9 \pm 77,0$ rosetas formadas) e região II de *PvDBP* ($365,1 \pm 36,50$ rosetas formadas). A atividade de ligação a eritrócitos observada nas células expressando estas proteínas está representada nas Figuras 7 e 8.

O menor número de rosetas formadas nas células expressando a região II de *PvDBP* (RII) em comparação ao número de rosetas observadas nos ensaios utilizando células expressando *PvAMA-1* (DI-II) se deve ao fato de

que a transfecção com o plasmídeo pDE-*dbp* (*nii*) apresenta uma porcentagem de eficiência menor quando comparado a transfecção com o plasmídeo pDE-*ama-1* (*di-ii*). Portanto, estes resultados não contradizem o papel indispensável de DBP no processo invasivo das formas sangüíneas de *P. vivax*, onde esta proteína atua como ligante principal (MILLER *et al.*, 1976). Ao contrário do observado com PvAMA-1, todas as células expressando PvDBP (RII) foram capazes de formar rosetas, a maioria destas com mais de 10 eritrócitos aderidos (Figura 7).

Ao contrário do esperado, células expressando a PvMSP1₁₉ ($9,8 \pm 4,2$ rosetas) não exibiram atividade de ligação a eritrócitos humanos. A partir desta observação, nos experimentos subseqüentes o controle positivo passou a ser células expressando PvDBP (RII). Células expressando o domínio III de PvAMA-1 também não foram capazes de se ligar a eritrócitos humanos *in vitro* ($12,3 \pm 8,5$ rosetas, Figura 8), diferentemente dos resultados observados para esse mesmo domínio em AMA-1 de *P. falciparum*, que em ensaio semelhante foi capaz de se ligar a uma proteína específica presente na superfície de eritrócitos humanos após o tratamento dos mesmos com tripsina (KATO *et al.*, 2005).

Figura 7. Ensaio de ligação a eritrócitos utilizando células COS-7 transfectadas. Após 40-60 horas da transfecção, células COS-7 foram incubadas com eritrócitos humanos por 2 horas e analisadas por microscópio de fluorescência invertido. Foram contadas como rosetas células transfectadas que apresentavam cinco ou mais eritrócitos aderidos. As figuras A, C e D mostram algumas das rosetas formadas por células expressando os domínios I e II de PvAMA-1, a PvMSP1₁₉ e a região II da PvDBP, respectivamente. As figuras B e D mostram que células que expressam PvAMA-1 (DIII) e PvMSP1₁₉ não foram capazes de formar rosetas.

Figura 8. Comparação do número de rosetas formadas por células que expressam *PvAMA-1* (DI-II), *PvAMA-1* (DIII), *PvDBP* (RII) e *PvMSP1*₁₉. O número de rosetas em 5x10⁵ células foi contado com o auxílio de um microscópio de fluorescência invertido e os valores foram representados como número total de rosetas. Como controle, utilizamos células transfectadas com o plasmídeo pDE vazio, expressando, somente a GFP. Cada barra representa o resultado de três experimentos em triplicata +/- desvio padrão.

4. Ensaio de inibição da ligação de células que expressam os domínios I e II de *PvAMA-1* a eritrócitos humanos

Após verificarmos que os domínios I-II de *PvAMA-1* possuem atividade de ligação a eritrócitos humanos (Figuras 7 e 8), desenvolvemos os ensaios de inibição desta ligação utilizando "pool" de anticorpos policlonais anti-*PV66AMA-1* produzidos em camundongos, "pool" composto de soros de cinco indivíduos com infecção patente por *P. vivax* apresentando altos títulos de

anticorpos dirigidos contra PvAMA-1, detectados previamente em nosso laboratório por ELISA (RODRIGUES *et al.*, 2005) e cinco anticorpos monoclonais dirigidos contra o domínio II de PvAMA-1. Os ensaios de inibição da ligação a eritrócitos foram realizados utilizando diferentes diluições destes soros. Os resultados dos experimentos estão expressos em número total de rosetas (Figuras 9A e 9B). Nos ensaios de inibição da ligação das células transfectadas a eritrócitos humanos utilizando soro produzido em camundongos, pudemos verificar que a adição do “pool” de soros policlonais anti-PV66/AMA-1 foi capaz de inibir a ligação das células transfectadas aos eritrócitos em até 82,0 % ($106,1 \pm 15,4$ rosetas formadas) na diluição 1:50 . As porcentagens de inibição utilizando-se diluições de 1:100 e 1:200 foram de 70,0% ($185,0 \pm 32,2$ rosetas) e 20,56% ($478,5 \pm 47,6$ rosetas) respectivamente (Figura 9A).

No ensaio seguinte, investigamos os efeitos da resposta naturalmente adquirida por anticorpos sobre a inibição da ligação entre os domínios I e II de PvAMA-1 a eritrócitos humanos utilizando “pool” de soros de pacientes com infecção patente por *P. vivax*. Como controle, utilizamos soros de indivíduos residentes no estado de São Paulo, sem contato prévio com malária. O número de rosetas formadas com a adição de “pool” de soros humanos normais foi comparado ao número de rosetas formadas em diferentes concentrações do “pool” de soros com altos títulos de anticorpos contra PvAMA-1. O resultado foi expresso em número de rosetas.

Figura 9. Ensaio de inibição da ligação de células transfectadas a eritrócitos humanos utilizando anticorpos policlonais anti-PvAMA-1 (humano e de camundongos). As células COS-7 expressando os domínios I e II de PvAMA-1 foram incubadas com “pool” de soros policlonais anti-PV66/AMA-1 produzido em camundongos, em diferentes concentrações **(A)** ou “pool” de soros de indivíduos provenientes de áreas endêmicas do estado do Pará, infectados pelo *P. vivax* **(B)**, antes da adição de eritrócitos humanos ao ensaio. O número de rosetas destes ensaios foi comparado ao número de rosetas contadas utilizando-se soros normais de camundongos ou soros de indivíduos sem história prévia de malária. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados estão apresentados como número total de rosetas +/- desvio padrão.

A porcentagem de inibição da atividade de ligação a eritrócitos humanos *in vitro* foi de 79,8% ($96,20 \pm 32,26$ rosetas) na diluição 1:50. Nas diluições de 1:100 e 1:200 foram observadas porcentagens de inibição de 64,2% ($180,1 \pm 47,58$ rosetas) e 23,4% ($394,7 \pm 25,99$ rosetas) respectivamente (Figura 9B).

Nos ensaios de inibição da ligação com células expressando os domínios I e II de *PvAMA-1*, notamos uma alta taxa de inibição da ligação entre essas células e eritrócitos, utilizando tanto anticorpos policlonais anti-*PV66AMA-1* quanto anticorpos anti-*PvAMA-1* naturalmente formados em infecções naturais. Esses resultados são fortemente sugestivos da presença de anticorpos funcionais altamente capazes de bloquear grande parte da ligação entre parasita/eritrócitos. Deste modo, esses anticorpos funcionais podem ser provenientes de imunização ou naturalmente adquiridos através de infecção pelo *P. vivax*.

Cinco anticorpos monoclonais especificamente dirigidos contra o domínio II de *PvAMA-1* foram gerados neste trabalho e foram denominados K₂14, K₂39, K₂43, K₂68 e K₂72. Verificamos que anticorpos monoclonais específicos contra o domínio II de *AMA-1* foram capazes de inibir parcialmente a ligação entre *PvAMA-1* (DI-II) e eritrócitos humanos. Os valores de inibição obtidos variaram de 13,9% a 55,6% (Figura 10). Dentre estes, observa-se que o anticorpo monoclonal denominado K₂39 demonstrou a maior capacidade em inibir a ligação das células transfectadas a eritrócitos. As porcentagens de inibição dos anticorpos monoclonais K₂14, K₂43 e K₂68 foram de 21,1%, 35,2% e 35,1%, respectivamente.

Figura 10. Ensaio de inibição da ligação de células transfectadas a eritrócitos humanos utilizando anticorpos monoclonais contra o domínio II de PvAMA-1. Os ensaios de inibição foram realizados como descrito na Figura 9. Os anticorpos monoclonais foram utilizados na concentração de 100 µg/mL e o soro normal de camundongo na diluição 1:100. Os resultados foram expressos em número total de rosetas +/- desvio padrão.

Estes resultados sugerem que o domínio I exerce papel importante na atividade de ligação a eritrócitos desempenhada por AMA-1, pois somente anticorpos dirigidos contra o ectodomínio apresentaram uma taxa significativa de inibição desta ligação.

5. Efeito do tratamento enzimático de eritrócitos na capacidade de ligação às células COS-7 que expressam *PvAMA-1* (DI-II), *PvAMA-1* (DIII) ou *PvDBP* (RII)

Através do tratamento enzimático dos eritrócitos com tripsina ou quimiotripsina e posterior ensaio de ligação a células transfectadas com os plasmídios citados, pudemos padronizar as concentrações adequadas das enzimas e seus respectivos inibidores para posterior avaliação da especificidade da ligação de *PvAMA-1* a eritrócitos humanos enzimaticamente tratados. Neste ensaio, utilizando inicialmente diferentes concentrações tanto de tripsina ou quimiotripsina quanto de seu inibidor específico, concluímos que a proporção 1:1 (enzima/inibidor) foi a que mostrou melhores resultados. Com o ensaio padronizado, verificamos que células expressando *PvAMA-1* (DI-II) perderam grande parte da capacidade de ligação a eritrócitos humanos quando estes foram tratados previamente com tripsina ou quimiotripsina (Figura 11). A porcentagem de inibição da ligação entre células expressando os domínios I e II de AMA-1 e eritrócitos tratados foi de 64,1% utilizando tripsina e de 72,9% utilizando quimiotripsina. Nos ensaios de ligação utilizando células expressando *PvAMA-1* (DIII) e *PvDBP* (RII), no entanto, não foram observadas nenhum tipo de alteração na capacidade de ligação quando os eritrócitos foram previamente tratados com tripsina. Porém, ao se utilizar eritrócitos tratados com quimiotripsina, houve uma redução significativa na capacidade de ligação das células COS-7 expressando a região II da DBP. A inibição da ligação entre essas células e eritrócitos tratados com quimiotripsina foi de 89,9% (Figura 11). Esses resultados sugerem que o receptor eritrocitário para o *PvAMA-1* deve

ser predominantemente protéico pois foi observada baixa porcentagem de rosetas formadas utilizando-se eritrócitos enzimaticamente tratados em relação a condição controle, na qual os eritrócitos não foram submetidos a tratamento enzimático prévio.

Figura 11. Efeito do tratamento enzimático de eritrócitos na ligação de células transfectadas. Células COS-7 expressando *PvAMA-1* (DI-II), *PvAMA-1* (DIII) e *PvDBP* (RII), foram incubadas com eritrócitos humanos previamente submetidos a tratamento enzimático por 2 horas com tripsina ou quimiotripsina. Os resultados foram expressos em número total de rosetas +/- desvio padrão.

6. Ensaio de ligação das proteínas AMA-1 (DI-II), AMA-1 (DIII), MSP1₁₉ e DBP (RII) utilizando a metodologia tradicional.

Para a confirmação dos resultados obtidos com os ensaios de ligação a eritrócitos humanos utilizando células expressando os domínios I-II e o domínio III de *PvAMA-1*, *PvMSP1₁₉* e a região II da *PvDBP*, realizamos ensaios de ligação a eritrócitos utilizando metodologia tradicionalmente empregada. Neste ensaio, utilizamos quatro proteínas recombinantes: AMA-1 (DI-II), AMA-1 (DIII), DBP (RII) e MSP1₁₉ de *P. vivax*. Através de análise por imunoblotting utilizando anticorpo anti-His, podemos observar que as proteínas recombinantes correspondentes aos domínios I-II de AMA-1 e a região II da DBP de *P. vivax* foram detectadas na fração eluída demonstrando que as mesmas possuem atividade de ligação a eritrócitos humanos (Figura 12A). Ambas as proteínas não foram detectáveis na lavagem mesmo utilizando-se um método de alta sensibilidade como a quimioluminescência (Figura 12B). Por outro lado, as proteínas AMA-1 (DIII) e MSP1₁₉ foram detectadas somente nas frações correspondentes a lavagem do precipitado de eritrócitos após a incubação com as referidas proteínas (Figura 12A e B). A detecção destas proteínas na lavagem indica a incapacidade das mesmas em se ligar a eritrócitos humanos, confirmando os resultados obtidos utilizando células COS-7 expressando o domínio III de AMA-1 e a MSP1₁₉. Mais uma vez, a utilização da metodologia tradicionalmente empregada para a avaliação da capacidade de ligação a eritrócitos que determinadas proteínas têm comprovou a eficácia dos ensaios de ligação utilizando células COS-7 transfectadas.

V. DISCUSSÃO

Diversos estudos utilizando proteínas recombinantes baseadas no ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax*, expressas em bactérias ou leveduras, têm demonstrado que essa proteína é altamente imunogênica durante infecções naturais no Brasil (RODRIGUES *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; MORAIS *et al.*, 2006; BARBEDO *et al.*, 2007) e Sri-Lanka (WICKAMARACHCHI *et al.*, 2006). Recentemente, geramos cinco novas proteínas recombinantes baseadas em diferentes regiões do ectodomínio de PvAMA-1, o qual compreende os domínios I a III, com intuito de mapear regiões particularmente antigênicas da proteína. As diferentes proteínas recombinantes foram comparadas, por ELISA, quanto ao reconhecimento por anticorpos IgG de indivíduos infectados por *P. vivax* procedentes de áreas endêmicas do Estado do Pará. Nossos resultados mostraram que as proteínas recombinantes contendo o domínio II foram particularmente imunogênicas durante a infecção natural (MÚFALO, 2007).

A função destes anticorpos encontrados em altos níveis em infecções naturais permanece desconhecida. Além do papel destes anticorpos não estar completamente elucidado, a própria função biológica de AMA-1 é desconhecida, porém a localização subcelular da proteína e a expressão da mesma em dois estágios invasivos do parasita (pré-eritrocítico e eritrocítico) sugerem que esta possa estar associada à invasão de hepatócitos e reticulócitos/eritrócitos (TRIGLIA *et al.*, 2000; SILVIE *et al.*, 2004). Além disso, os altos níveis de conservação dos domínios I e II em diferentes espécies de *Plasmodium* e dos domínios extracelulares de AMA-1 de *Toxoplasma* sugerem que estes domínios podem ter importância funcional durante os processos de ligação/invasão a eritrócitos (URQUIZA *et al.*, 2000; DONAHUE *et al.*, 2000;

MICHON *et al.*, 2002). Outra característica importante de AMA -1 é o número significativo de aminoácidos conservados presentes nos domínios I e II que também se encontram conservados em MAEBL, uma proteína já caracterizada como ligante de eritrócitos (MICHON *et al.*, 2002). Entretanto, a ausência de um sistema de cultivo eficiente do *P. vivax* tem dificultado o estudo das propriedades funcionais de AMA-1 bem como da função de anticorpos encontrados em infecções naturais. A padronização de ensaios funcionais *in vitro* poderia facilitar a elucidação da função da proteína e do papel dos anticorpos dirigidos contra a mesma.

Neste contexto, com o objetivo de avaliar a capacidade de PvAMA-1 em se ligar a eritrócitos humanos *in vitro* e a capacidade de anticorpos anti-PvAMA-1 em inibir essa provável interação, desenvolvemos um ensaio funcional de ligação a eritrócitos utilizando células da linhagem COS-7 transfectadas com os domínios contíguos *i-ii* ou domínio *iii* de *Pvama-1*. Como controle positivo deste ensaio, utilizamos células transfectadas com a região *ii* de *Pvdbp*, cuja capacidade de ligação a eritrócitos já está bem definida (XAINLI *et al.*, 2000). Em ensaios utilizando células expressando os domínios I e II de PvAMA-1, observamos que essa região possui capacidade de ligação a eritrócitos humanos *in vitro*, capacidade essa já evidenciada por Fraser *et al.*, (2001), que utilizou os domínios contíguos I e II de AMA-1 de *P. yoelii* em ensaio semelhante, com eritrócitos de camundongos. Neste trabalho foi verificado também que estes mesmos domínios, que demonstraram capacidade de ligação a eritrócitos de camundongo e rato, não foram capazes de se ligar a eritrócitos humanos, indicando que, em relação as suas propriedades funcionais, esta proteína é específica para cada espécie ou pode

atuar em espécies evolutivamente relacionadas. Nossos resultados indicam que PvAMA-1 desempenha importante papel como molécula ligante durante a invasão do merozoíta aos eritrócitos, sendo os domínios I e II a região da proteína responsável por esta característica funcional.

Estes resultados, por outro lado, contrastam com aqueles observados utilizando-se diferentes combinações do ectodomínio de AMA-1 de *P. falciparum*, onde apenas as células CHO expressando o domínio III foram capazes de se ligar a eritrócitos previamente tratados com tripsina, interagindo com um receptor específico presente na superfície do eritrócito, o receptor Kx (KATO *et al.*, 2005). No presente trabalho, entretanto, verificamos que células COS-7 expressando o domínio III de PvAMA-1 não demonstraram capacidade de ligação a eritrócitos, mesmo após o tratamento enzimático dos eritrócitos com tripsina. Uma possível explicação para este fato é que a mesma proteína (AMA-1) pode exibir características funcionais distintas nas diferentes espécies de *Plasmodium* (COLLINS *et al.*, 2007).

No caso das células COS-7 expressando a PvMSP1₁₉, cuja utilização como controle positivo nos ensaios de ligação foi inicialmente proposta (HAN *et al.*, 2004), também não foi demonstrada atividade de ligação a eritrócitos. Além de os resultados observados por Han *et al.*, (2004) apontarem a PvMSP1₁₉ como a região ligante da PvMSP1, existem outras evidências de que esta região possui capacidade de ligação a eritrócitos. A MSP1₁₉ é composta por dois domínios do tipo EGF – like e proteínas que possuem esta característica estão frequentemente envolvidas em interações com receptores específicos ou outras interações na superfície celular (DAVIS *et al.*, 1990). Apesar de evidências importantes relacionarem a MSP1₁₉ como proteína com capacidade

de ligação a eritrócitos, não pudemos comprovar esta propriedade, tanto no ensaio funcional *in vitro* desenvolvido como nos ensaios convencionais de ligação a eritrócitos utilizando a proteína recombinante purificada.

É importante ressaltar, que o ensaio funcional desenvolvido possui ainda algumas limitações. A principal delas é a baixa eficiência da transfecção que foi de no máximo 15%, mesmo após utilizarmos agentes alternativos para transfecção (GeneJuice Transfection Reagente, Novagen). Esta baixa eficiência de transfecção foi também relatada em outros trabalhos que utilizaram transfecção com lipídio catiônico (XAINLI *et al.*, 2000). Por outro lado, Kato *et al.* (2005), utilizando células CHO obtiveram cerca de 80 - 90% de eficiência na transfecção. A fim de minimizar esse problema, modificamos o protocolo original, aumentando o número de células utilizadas para a transfecção, bem como a quantidade de plasmídeo recombinante. No entanto, as modificações introduzidas, não garantiram uma alta considerável na eficácia do processo de transfecção das células COS-7.

No presente trabalho, analisamos também a capacidade de anticorpos contra PvAMA-1 em inibir a ligação entre células COS-7 expressando os domínios I-II de AMA-1 a eritrócitos humanos. Verificamos inicialmente que “pool” de soros de pacientes naturalmente infectados por *P. vivax* que continham altos títulos de anticorpos contra PvAMA-1 foi capaz de inibir significativamente essa ligação (79,8%). Resultado semelhante foi demonstrado após a adição de “pool” de soros policlonais anti-PvAMA-1 produzido em camundongos após imunização com a proteína PV66/AMA-1, que foi capaz de inibir esta ligação em até 82,0%. Estes resultados, em conjunto, reforçam a idéia de que tanto anticorpos contra PvAMA-1 gerados

após sucessivas infecções naturais como após imunização, podem ser considerados como anticorpos funcionais, uma vez que ambos demonstraram capacidade em inibir grande parte da ligação entre os domínios I-II e eritrócitos humanos. Os dados obtidos neste trabalho reforçam alguns resultados importantes demonstrados anteriormente, nos quais anticorpos presentes em pacientes infectados pelo *P. falciparum* (HODDER *et al.*, 2001) ou anticorpos policlonais dirigidos contra o ectodomínio de AMA-1 de *P. falciparum*, produzidos em coelhos, foram capazes de inibir a invasão do parasita *in vitro*, enfatizando a idéia de que estes anticorpos são mesmo funcionais (HODDER *et al.*, 2001; KENNEDY *et al.*, 2002; KOCKEN *et al.*, 2002; DUTTA *et al.*, 2002).

O grau de conservação dos resíduos presentes nos domínios ligantes das proteínas que possuem capacidade de ligação a eritrócitos é um fator crítico no reconhecimento destas por anticorpos específicos bem como por seus receptores (MAYER *et al.*, 2002), como demonstrado em estudos utilizando a DBP (VAN BUSKIRK *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2006; VERRA *et al.*, 2006), BAEBL (MAYER *et al.*, 2002) e EBA-175 (BINK *et al.*, 2001; MAMILLAPALLI *et al.*, 2006). Em alguns destes trabalhos foi demonstrado que determinados polimorfismos em regiões ligantes podem fazer parte de uma estratégia do parasita em evadir-se da resposta imune do hospedeiro. No caso específico de PvAMA-1, existem poucos estudos moleculares sobre a diversidade genética nesta espécie em comparação com os mesmos estudos existentes sobre AMA-1 de *P. falciparum*. Com exceção dos primeiros estudos, nos quais foi analisada a seqüência completa de PvAMA-1 (CHENG & SAUL, 1994; KOCKEN *et al.*, 1999), a maioria destes estudos têm foco exclusivo no

domínio I desta proteína (FIGTREE *et al.*, 2000; HAN *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2005). Recentemente a análise da diversidade dos nucleotídeos ao longo do gene inteiro em parasitas isolados de determinada população do Sri-Lanka demonstrou evidências de forte seleção no domínio II (GUNASEKERA *et al.*, 2007). Possivelmente a localização de polimorfismos em epítomos reconhecidos por anticorpos anti-AMA-1 pode impedir que haja inibição da ligação e, conseqüentemente, da invasão de eritrócitos/reticulócitos pelo merozoíta (COLLINS *et al.*, 2007). Deste modo, para melhor identificar a função de anticorpos anti-PvAMA-1 encontrados em infecções naturais no Brasil, seria interessante identificar possíveis polimorfismos presentes no domínio II desta proteína.

Outro resultado relevante verificado neste trabalho foi que anticorpos monoclonais dirigidos especificamente contra o domínio II de PvAMA-1 também foram capazes de inibir a ligação entre os domínios I-II desta proteína a eritrócitos humanos, embora parcialmente. Dentre os anticorpos monoclonais utilizados, o anticorpo monoclonal K₂₃₉ demonstrou a maior capacidade de inibição (55,6%). O fato de termos observado uma inibição parcial sugere que o domínio I pode conter regiões que desempenham papel fundamental na atividade de ligação a eritrócitos ou que esta ligação é dependente de conformação específica, desempenhada pela interação entre os domínios I e II e, portanto, anticorpos contra o domínio II são incapazes de inibirem a ligação a eritrócitos com eficiência semelhante demonstrada por anticorpos dirigidos contra o ectodomínio PvAMA-1.

Além disso, nossos resultados sugerem fortemente que o receptor para PvAMA-1 é predominantemente protéico, já que o tratamento de eritrócitos

humanos com tripsina inibiu mais de 60% e o tratamento com quimiotripsina foi capaz de inibir aproximadamente 72,9% a capacidade da ligação às células COS-7 expressando os domínios I e II. Estas observações são importantes, uma vez que estes resultados correspondem a primeira evidência sobre a composição de um possível receptor eritrocitário para *PvAMA-1*. Diferentemente de outras moléculas ligantes presentes em *Plasmodium* como EBA-175, BAEBL e outras proteínas pertencentes a família EBL que se ligam a receptores ricos em ácido siálico presentes na superfície dos eritrócitos (ADAMS *et al.*, 1992; SIM *et al.*, 1994; LOBO *et al.*, 2003; MAYER *et al.*, 2004), *PvAMA-1*, de acordo com os dados demonstrados neste trabalho se liga a receptores essencialmente protéicos.

Alternativamente, com o objetivo de confirmar os dados obtidos nos ensaios de citoaderência e verificar se a proteína recombinante baseada no domínio I-II de *PvAMA-1* é funcional, realizamos os ensaios de ligação a eritrócitos humanos pela metodologia convencional, a qual tem sido utilizada em diversos estudos que visam avaliar a capacidade de interação a eritrócitos humanos que determinadas proteínas encontradas em *Plasmodium* possuem. Entre elas, a própria DBP que utilizamos como controle positivo em nosso ensaio (OCAMPO *et al.*, 2002; TRAN *et al.*, 2005), *PfEBA-175* (Liang *et al.*, (2001), *PfBAEBL* (MAYER *et al.*, 2002), *PfJESEBL* (MAYER *et al.*, 2004), *PvRBP* (CANTOR *et al.*, 2001) e *PyMSP-8* (SHI *et al.*, 2006). Em nosso caso, utilizando essa metodologia, foi confirmado que os domínios I e II de *PvAMA-1* possuem capacidade de ligação a eritrócitos humanos e que a proteína recombinante encontra-se em conformação apropriada.

Ambos os ensaios de ligação utilizados neste trabalho sugerem a participação dos domínios I-II de *PvAMA-1* na interação com eritrócitos humanos. Apesar de estes dados importantes corroborarem para a definição do papel de AMA-1 no processo de invasão a eritrócitos sugerido por alguns trabalhos anteriores, observamos que, quando comparamos esta capacidade de ligação exercida por estes domínios à capacidade de ligação exercida pela região II da DBP, os domínios I e II de *PvAMA-1* possui uma atividade de ligação a eritrócitos menos eficiente, dados demonstrados pelo menor número de eritrócitos aderentes as células transfectadas expressando estes domínios. Estes resultados sugerem que esta adesão, com a participação da proteína AMA-1 não é obrigatória para um processo eficiente de invasão do merozoíta ao eritrócito/reticulócito, provavelmente por este processo, além da obrigatoriedade da participação da DBP em *P. vivax*, contar o auxílio de outras proteínas de superfície de merozoíta, como as MSPs (KAUTH *et al.*, 2006).

A identificação dos domínios ligantes de AMA-1 envolvidos na interação entre o parasita e a célula hospedeira pode ser de grande utilidade no desenvolvimento de novas estratégias de bloqueio da progressão da fase sanguínea do parasita. Além de identificar os domínios I e II como região ligante de *PvAMA-1*, demonstramos que anticorpos anti-*PvAMA-1* são capazes de bloquear a ligação entre a proteína e eritrócitos humanos *in vitro*. Para o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra malária *vivax*, é de fundamental importância entender a função exercida pelas principais proteínas candidatas a compor esta vacina e o papel dos anticorpos desenvolvidos em infecções naturais. Deste modo, acreditamos que nossos resultados irão colaborar para um melhor entendimento sobre a função de AMA-1 e dos

anticorpos específicos contra esta proteína, a fim de contribuir para o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax*.

VI. CONCLUSOES

1. Três plasmídios recombinantes correspondentes a diferentes domínios de AMA-1 (I-II e III) e região II da DBP de *P. vivax* foram gerados em fusão com a GFP e utilizados para transfecção de células COS-7, além do plasmídio baseado na MSP1₁₉ que já estava disponível;
2. Após confirmação da expressão de cada uma das diferentes proteínas na superfície das células COS-7 transfectadas, foi estabelecido um ensaio funcional *in vitro* de ligação a eritrócitos humanos, o qual demonstrou que apenas que os domínios contíguos I-II, ao contrário do domínio III de PvAMA-1, foram capazes de se ligar a eritrócitos;
3. Soros de indivíduos infectados por *P. vivax* e soros policlonais de camundongos imunizados contendo anticorpos anti-PvAMA-1 foram capazes de inibir a ligação da célula transfectada expressando DI-II aos eritrócitos. Além disso, anticorpos monoclonais dirigidos contra o domínio II dessa proteína inibiram parcialmente essa ligação.
4. Após o tratamento de eritrócitos com tripsina ou quimiotripsina, estas células perderam grande parte de sua capacidade de ligação, sugerindo que o receptor para PvAMA-1 tenha constituição predominantemente protéica.
5. A participação dos domínios I-II de PvAMA-1 na ligação a eritrócitos humanos foi confirmada utilizando-se o ensaio tradicional de ligação de proteínas recombinantes a eritrócitos humanos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADAMS, J.H.; HUDSON, D.E.; TORII, M.; WARD, G.E.; WELLEMS, T.E.; AIKAWA, M.; MILLER, L.H. The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. **Cell**. 63(1): 141-53, 1990.

ADAMS, J.H.; SIM, B.K.; DOLAN, S.A.; FANG, X.; KASLOW, D.C.; MILLER, L.H. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. 89(15): 7085-9, 1992.

ALVES, F.P.; DURLACHER, R.R.; MENEZES, M.J.; KRIEGER, H.; SILVA, L.H.; CAMARGO, E.P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. **Am. J. Trop Med Hyg**. 66(6): 641-8, 2002.

ALVES, F.P.; GIL, L.H.; MARRELLI, M.T.; RIBOLLA, P.E.; CAMARGO, E.P.; DA SILVA, L.H. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. **J. Med. Entomol**. 42(5): 777-9, 2005.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MENARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nat. Med**. 12(2): 220-4, 2005.

ANDERS, R.F.; CREWETHER, P.E.; EDWARDS, S.; MARGETTS, M.; MATTHEW, M.L.; POLLOCK, B.; PYE, D. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. **Vaccine**. 16(2-3): 240-7, 1998.

BAIRD, J.K. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends. Parasitol**. 23(11): 533-9, 2007.

BARBEDO, M.B.; RICCI, R.; JIMENEZ, M.C.; CUNHA, M.G.; YAZDANI, S.S.; CHITNIS, C.E.; RODRIGUES, M.M.; SOARES, I.S. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 102(3): 335-9, 2007.

BEG, M.A.; KHAN, R.; BAIG, S.M.; GULZAR, Z.; HUSSAIN, R.; SMEGO, R.A. Cerebral involvement in benign tertian malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 67(3): 230-2, 2002.

BURNS, J.M.; FLAHERTY, P.R.; ROMERO, M.M.; WEIDANZ, W.P. Immunization against *Plasmodium chabaudi* malaria using combined formulations of apical membrane antigen-1 and merozoite surface protein-1. **Vaccine**. 16(17-18): 1843-52, 2003.

CHENG, Q.; SAUL, A. Sequence analysis of the apical membrane antigen 1 (AMA-1) of *Plasmodium vivax*. **Mol. Biochem. Parasitol**. 65(2): 183-7, 1994.

CHESNE-SECK, M.L.; PIZARRO, J.C.; VULLIEZ-LE, N.B.; COLLINS, C.R.; BLACKMAN, M.J.; FABER, B.W.; REMARQUE, E.J.; KOCKEN, C.H.; THOMAS,

A.W.; BENTLEY, G.A. Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. **Mol. Biochem. Parasitol.** 144(1): 55-67, 2005.

CANTOR, E.M.; LOMBO, T.B.; CEPEDA, A.; ESPINOSA, A.M.; BARRERO, C.A.; GUZMÁN, F.; GUNTURIZ, M.L.; URQUIZA, M.; OCAMPO, M.; PATARROYO, M.E.; PATARROYO, M.A. *Plasmodium vivax*: functional analysis of a highly conserved PvRBP-1 protein region. **Mol. Biochem. Parasitol.** 117(2): 229-34, 2001.

CHITNIS, C.E.; MILLER, L.H. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. **J. Exp. Med.** 180(2): 497-506, 1994.

COLLINS, W.E.; PYE, D.; CREWETHER, P.E.; VANDENBERG, K.L.; GALLAND, G.G.; SULZER, A.J.; KEMP, D.J.; EDWARDS, S.J.; COPPEL, R.L.; SULLIVAN, J.S.; MORRIS, C.L.; ANDERS, R.F. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 51(6): 711-9, 1994.

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. **J. Biol. Chem.** 282(10): 7431-41, 2007.

CORTES, A.; MELLOMBO, M.; MUELLER, I.; BENET, A.; REEDER, J.C.; ANDERS, R.F. Geographical structure of diversity and differences between symptomatic and asymptomatic infections for *Plasmodium falciparum* vaccine candidate AMA-1. **Infect. Immun.** 71(3): 1416-26, 2003.

CREWETHER, P.E.; CULVENOR, J.G.; SILVA, A.; COOPER, J.A.; ANDERS, R.F. *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. **Exp. Parasitol.** 70(2): 193-206, 1990.

CREWETHER, P.E.; MATTHEW, M.L.; FLEGG, R.H.; ANDERS, R.F. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. **Infect. Immun.** 64(8): 3310-7, 1996.

CUNHA, M.G.; RODRIGUES, M.M.; SOARES I.S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine.** 20(3-4): 385-96, 2001.

CUNHA-RODRIGUES, M.; PRUDENCIO, M.; MOTA, M.M.; HAAS, W. Antimalarial drugs - host targets (re) visited. **Biotechnol. J.** 1(3): 321-32, 2006.

DAVIS, C.G. The many faces of epidermal growth factor repeats. **New Biol.** 2(5): 410-19, 1990.

DEANS, J.A.; ALDERSON, T.; THOMAS, A.W.; MITCHELL, G.H.; LENNOX, E.S.;

COHEN, S. Rat monoclonal antibodies which inhibit the *in vitro* multiplication of *Plasmodium knowlesi*. **Clin. Exp. Immunol.** 49(2): 297-309, 1982.

DEANS, J.A.; KNIGHT A.M.; JEAN, W.C.; WATERS, A.P.; COHEN, S.; MITCHELL, G.H. Vaccination trials in *Rhesus* monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kDa merozoite antigen. **Parasite. Immunol.** 10(5): 535-52, 1988.

DONAHUE, C.G.; CARRUTHERS, V.B.; GILK, S.D.; WARD, G.E. The *Toxoplasma* homolog of *Plasmodium* apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. **Mol. Biochem. Parasitol.** 111(1): 15-30, 2000.

DUTTA, S.; LALITHA, P.V.; WARE, L.A.; BARBOSA, A.; MOCH, J.K.; VASSELL, M.A.; FILETA, B.B.; KITOV, S.; KOLODNY, N.; HEPPNER, D.G.; HAYNES, J.D.; LANAR, D.E. Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 expressed in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 70(6): 3101-10, 2002.

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. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 100(21): 12295-300, 2003.

DUTTA, S.; HAYNES, J.D.; BARBOSA, A.; WARE, L.A.; SNAVELY, J.D.; MOCH, J.K.; THOMAS, A.W.; LANAR, D.E. Mode of action of invasion-inhibitory antibodies directed against apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum*. **Infect. Immun.** 73(4): 116-22, 2005.

DUTTA, S.; LEE, S.Y.; BATCHELOR, A.H.; LANAR, D.E. Structural basis of antigenic escape of a malaria vaccine candidate. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 104(30): 12488-93, 2007.

EDA, K.; EDA, S.; SHERMAN I.W. Identification of peptides targeting the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes using a phage display peptide library. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 71(2): 190-5, 2004.

FENG, Z.P.; KEIZER, D.W.; STEVENSON, R.A.; YAO, S.; BABON, J.J.; MURPHY, V.J.; ANDERS, R.F.; NORTON R.S. Structure and inter-domain interactions of domain II from the blood-stage malarial protein, apical membrane antigen 1. **J. Mol. Biol.** 350(4): 641-56, 2005.

FIGTREE, M.; PASAY, C.J.; SLADE, R.; CHENG, Q.; CLOONAN, N.; WALKER, J.; SAUL, A. *Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies; evolution and population structure deduced from diversity in AMA-1 and MSP-1 genes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 108(1): 56-66, 2000.

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. **Mol. Biochem. Parasitol.** 117(1): 49-59, 2001.

FUGIKAHA, E.; FORNAZARI, P.A.; PENHALBEL, S.; LORENZETTI, A.; MAROSO R.D.; AMORAS, J.T.; SARAIVA, A.S.; SILVA, R.U.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; MATTOS, L.C.; ROSSIT, A.R.; CAVASINI, C.E.; MACHADO, R.L. Molecular screening of *Plasmodium* sp. asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. **Rev. Inst. Med. Trop.** 49(1): 1-4, 2007.

GAFFAR, F.R.; YATSUDA, A.P.; FRANSSSEN, F.F.; DE VRIES, E. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. **Infect. Immun.** 72(5): 2947-55, 2004.

GAUR, D.; MAYER, D.C.; MILLER, L.H. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **Int. J. Parasitol.** 34(13-14): 1413-29, 2004.

GILBERGER, T.W.; THOMPSON, J.K.; TRIGLIA, T.; GOOD, R.T.; DURAISINGH, M.T.; COWMAN, A.F. A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. **J. Biol. Chem.** 278(16): 14480-6, 2003.

GILLES, H.M.; WARREL, D.A. Bruce-Chwatt's Essential Malariology. London: Edward Arnold, 1993.

GRYNBERG, P.; FERNANDES FONTES, C.J.; BRAGA, E.M. Association between particular polymorphic residues on apical membrane antigen 1 (AMA-1) and platelet levels in patients with vivax malaria. **Clin. Microbiol. Infect.** 13(11): 1089-94, 2007.

GUERRA, C.A.; SNOW, R.W.; HAY, S.I. Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends. Parasitol.** 22(8): 353-8, 2006.

GUNASEKERA, A.M.; WICKRAMARACHCHI, T.; NEAFSEY, D.E.; GANGULI, I.; PERERA, L.; PREMARATNE, P.H.; HART, L. D.; HANDUNNETTI, S.M.; UDAGAMA-RANDENIYA, P.V.; WIRTH, D.F. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan Population. **Mol. Biol. Evol.** 24(4): 939-47, 2007.

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. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 320(2): 563-70, 2004.

HEALER, J.; MURPHY, V.; HODDER, A.N.; MASCIANTONIO, R.; GEMMILL, A.W.; ANDERS, R.F.; COWMAN, A.F.; BATCHELOR, A. Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. **Mol. Microbiol.** 52(1): 159-68, 2004.

HEALER, J.; TRIGLIA, T.; HODDER, A.N.; GEMMILL, A.W.; COWMAN, A.F. Functional analysis of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 utilizing interspecies domains. **Infect. Immun.** 73(4): 2444-51, 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. **Infect. Immun.** 68(12): 7078-86, 2000.

HEPPNER, D.G.JR.; KESTER, K.E.; OCKENHOUSE, C.F.; TORNIEPORTH, N.; OFORI, O.; LYON, J.A.; STEWART, V.A.; DUBOIS, P.; LANAR, D.E.; KRZYCH, U.; MORIS, P.; ANGOV, E.; CUMMINGS, J.F.; LEACH, A.; HALL, B.T.; DUTTA, S.; SCHWENK, R.; HILLIER, C.; BARBOSA, A.; WARE, L.A.; NAIR, L.; DARKO, C.A.; WITHERS, M.R.; OGUTU, B.; POLHEMUS, M.E.; FUKUDA, M.; PICHYANGKUL, S.; GETTYACAMIN, M.; DIGGS, C.; SOISSON, L.; MILMAN, J.; DUBOIS, M.C.; GARÇON, N.; TUCKER, K.; WITTES, J.; PLOWE, C.V.; THERA, M.A.; DUOMBO, O.K.; PAU, M.G.; GOUDSMIT, J.; BALLOU, W.R.; COHEN, J. Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against *falciparum* malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. **Vaccine.** 23(17-18): 2243-50, 2005.

HIGGS, E.S.; SINA, B. *Plasmodium vivax* vaccine research: steps in the right direction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 73(5): 1-2, 2005.

HODDER, A.N.; CREWETHER, P.E.; MATTHEW, S.M.; REID, G.E.; MORITZ, R.L.; SIMPSON, R.J.; ANDERS, R.F. The disulfide bond structure of *Plasmodium* Apical Membrane Antigen-1. **J. Biol. Chem.** 271(46): 29446-52, 1996.

HODDER, A.N.; CREWETHER, P.E.; ANDERS, R.F. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. **Infect. Immun.** 69(5): 3286-94, 2001.

HOWELL, S.A.; WITHERS-MARTINEZ, C.; KOCKEN, C.H.; THOMAS, A.W.; BLACKMAN, M.J. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. **J. Biol. Chem.** 276(33): 31311-20, 2001.

HOWELL, S.A.; WELL, I.; FLECK, S.L.; KETTLEBOROUGH, C.; COLLINS, C. R.; BLACKMAN, M.J. A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. **J. Biol. Chem.** 278(26): 23890-8, 2003.

KAPPE, S.H.; CURLEY, G.P.; NOE, A.R.; DALTON, J.P.; ADAMS, J.H. Erythrocyte binding protein homologues of rodent malaria parasites. **Mol. Biochem. Parasitol.** 89(1):137-48, 1997.

KAPPE, S.H.; NOE, A.R.; FRASER, T.S.; BLAIR, P.L.; ADAMS, J.H. A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 95(3):1230-5, 1998.

KARUNAWEERA, N.D.; WIJESEKERA, S.K.; WANASEKERA, D.; MENDIS, K.N.; CARTER R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends. Parasitol.** 19(4): 188-93, 2003.

KATO, K.; MAYER, D.C.; SINGH, S.; REID, M.; MILLER, L.H. Domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 102(15): 5552-7.

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*. **J. Biol. Chem.** 281(42): 31517-27, 2006.

KENNEDY, M.C.; WANG, J.; ZHANG, Y.; MILES, A.P.; CHITSAZ, F.; SAUL, A.; LONG, C.A.; MILLER, L.H.; STOWERS, A.W. *In vitro* studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. **Infect. Immun.** 70(12): 6948-60, 2002.

KIMURA, M.; KNEKO, O.; LIU, Q. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasit. Int.** 46(3): 89-95, 1997.

KOCKEN, C.H.; VAN DER WEL, A.M.; DUBBELD, M.A.; NARUM, D.L.; VAN DE RIJKE, F.M.; VAN GEMERT, G.J.; VAN DER LINDE, X.; BANNISTER, L. H.; JANSE, C.; WATERS, A.P.; THOMAS, A.W. Precise timing of expression of a *Plasmodium falciparum*-derived transgene in *Plasmodium berghei* is a critical determinant of subsequent subcellular localization. **J. Biol. Chem.** 273(24): 15119-24, 1998.

KOCKEN, C.H.; DUBBELD, M.A.; VAN DER WEL, A.; PRONK, J.T.; WATERS, A.P.; LANGERMANS, J.A.; THOMAS, A.W. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. **Infect. Immun.** 67(1): 43-9, 1999.

KOCKEN, C.H.; NARUM, D.L.; MASSOUGBODJI, A.; AYIVI, B.; DUBBELD, M.A.; VAN DER WEL, A.; CONWAY, D.J.; SANANI, A.; THOMAS, A.W. Molecular characterization of *Plasmodium reichenowi* apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with *P. falciparum* AMA-1, and antibody-mediated inhibition of red cell invasion. **Mol. Biochem. Parasitol.** 109(2): 147-56, 2000.

KOCKEN, C.H.; WITHERS-MARTINEZ, C.; DUBBELD, M.A.; VAN DER WEL, A.; HACKETT, F.; VALDERRAMA, A.; BLACKMAN, M.J.; THOMAS, A.W. High-Level Expression of the Malaria Blood-Stage Vaccine Candidate *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. **Infect. Immun.** 70(10): 5901-6, 2002.

IMWONG, M.; SNOUNOU, G.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; TANOMSING, N.; KIM, J.R.; NANDY, A.; GUTHMANN, J.P.; NOSTEN, F.; CARLTON, J.; LOOAREESUWAN, S.; NAIR S.; SUDIMACK, D.; DAY, N.P.; ANDERSON, T.J.; WHITE, N.J. Relapses of *Plasmodium vivax* infection usually result from activation of heterologous hypnozoites. **J. Infect. Dis.** 195(7): 927-33, 2007.

LACERDA, M.V.G.; ALEXANDRE, M.A.A.; DE OLIVEIRA, M.S.; CAVALCANTE, T.B.; DA SILVA, A.C.; ALECRIM, M.G.C. Hematological aspects of the severe vivax malaria in the western brazilian amazon. In: XXII Annual meeting of the brazilian society of protozoology, 2006, Caxambu. Anais....São Paulo: s.n., 2006, p. 22-23.

LALITHA, P.V.; WARE, L.A.; BARBOSA, A.; DUTTA, S.; MOCH, J.K.; HAYNES, J.D.; FILETA, B.B.; WHITE, C.E.; LANAR, D.E. Production of the subdomains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 ectodomain and analysis of the immune response. **Infect. Immun.** 72(8): 4464-70, 2004.

LOBO, C.A.; RODRIGUEZ, M.; REID, M.; LUSTIGMAN, S. Glycophorin C is the receptor for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding ligand PfEBP-2 (baebl). **Blood.** 101(11): 4628-31, 2003.

LI, F.; DLUZEWSKI, A.; COLEY, A.M.; THOMAS, A.; TILLEY, L.; ANDERS, R. F.; FOLEY, M. Phage-displayed peptides bind to the malarial protein apical membrane antigen-1 and inhibit the merozoite invasion of host erythrocytes. **J. Biol. Chem.** 277(5): 50303-10, 2002.

LIANG, H.; NARUM, D.L.; FUHRMANN, S.R.; LUU, T.; SIM, B.K. A recombinant baculovirus-expressed *Plasmodium falciparum* receptor-binding domain of erythrocyte binding protein EBA-175 biologically mimics native protein. **Infect. Immun.** 68(6): 3564-8, 2001.

MAGUIRE, P.A.; SHERMAN, I.W. Phospholipid composition, cholesterol content and cholesterol exchange in *Plasmodium falciparum*-infected red cells. **Mol. Biochem. Parasitol.** 38(1): 105-12, 1990.

MALARIA ATLAS PROJECT – MAP 2006.

Disponível em <<http://www.map.ox.ac.uk>>. Acesso em 04 abril 2007.

MALKIN, E.M.; DIEMERT, D.J.; MCARTHUR, J.H.; PERREAULT, J.R.; MILES, A.P.; GIERING, B.K.; MULLEN, G.E.; ORCUTT, A.; MURATOVA, O.; AWKAL, M.; ZHOU, H.; WANG, J.; STOWERS, A.; LONG, C.A.; MAHANTY, S.; MILLER, L.H.; SAUL, A.; DURBIN, A.P. Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. **Infect. Immun.** 73(6): 3677-85, 2005.

MAMILLAPALLI, A.; PATTNAIK, P.; SHARMA, M.; SHARMA, S.K.; TYAGI, P.K.; JOSHI, H.; CHITNIS, C.E. Sequence polymorphisms in the receptor-binding domain of *Plasmodium falciparum* EBA-175: implications for malaria vaccine development. **Mol. Biochem. Parasitol.** 146(1): 120-3, 2006.

MAYER, D.C.; MU, J.B.; FENG, X.; SU, X.Z.; MILLER, L.H. Polymorphism in a *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand changes its receptor specificity. **J Exp. Med.** 196(11): 1523-8, 2002.

MAYER, D.C.; MU, J.B.; KANEKO, O.; DUAN, J.; SU, X.Z.; MILLER, L.H. Polymorphism in the *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand

JESEBL/EBA-181 alters its receptor specificity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 101(8): 2518-23, 2004.

MENDIS, K.; SINA, B.J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 64(1-2): 97-106, 2001.

MICHON, P.; STEVENS, J.R.; KANEKO, O.; ADAMS, J.H. Evolutionary relationships of conserved cysteine-rich motifs in adhesive molecules of malaria parasites. **Mol. Biol. Evol.** 19(7): 1128-42. 2002

MILLER, L.H.; MASON, S.J.; CLYDE, D.F.; MCGINNISS, M.H. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. **N. Engl. J. Med.** 295(6): 302-4, 1976.

MORAIS, C.G.; SOARES, I.S.; CARVALHO, L.H.; FONTES, C.J.; KRETTLI, A.U.; BRAGA, E.M. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 75(4): 582-7, 2006.

MOTA, M.M.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells by apicomplexan parasites. **Microbes. Infect.** 3(13): 1123-8, 2001.

MUFALO, B.C. Avaliação da resposta imune de anticorpos contra proteínas recombinantes derivadas do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *Plasmodium vivax* em indivíduos de áreas endêmicas de malária do Brasil. **Dissertação (Mestrado em Farmácia – Área: Análises Clínicas)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

NAGAO, E.; KANEKO, O.; DVORAK, J.A. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: qualitative and quantitative analyses of parasite-induced knobs by atomic force microscopy. **J. Struct. Biol.** 130(1): 34-44, 2000.

NARUM, D.L.; THOMAS, A.W. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Mol. Biochem. Parasitol.** 67(1): 59-68, 1994.

NARUM, D.L.; OGUN, S.A.; THOMAS, A.W.; HOLDER, A.A. Immunization with parasite-derived Apical Membrane Antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM Blood-Stage Infection. **Infect. Immun.** 65(8): 2899–906, 2000.

NARUM, D.L.; FUHRMANN, S.R.; LUU, T.; SIM, B.K. A novel *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding protein-2 (EBP2/BAEBL) involved in erythrocyte receptor binding. **Mol. Biochem. Parasitol.** 119(2): 159-68, 2002.

OCAMPO, M.; VERA, R.; EDUARDO – RODRIGUEZ, L.; CURTIDOR, H.; URQUIZA, M.; SUAREZ, J.; GARCIA, J.; PUENTES, A.; LOPEZ, R.; TRUJILLO, M.; TORRES, E.; PATARROYO, M.E. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein peptides specifically bind to reticulocytes. **Peptides.** 23(1): 13-22, 2002

OLIVEIRA, T.R.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; JIMENEZ, M.C.; DEL PORTILLO, H.A.; SOARES, I.S. Evaluation of the acquired immune responses to *Plasmodium vivax* VIR variant antigens in individuals living in malaria-endemic areas of Brazil. **Malar. J.** 5:83, 2006.

OZEN, M.; GUNGOR, S.; ATAMBAY, M.; DALDAL, N. Cerebral malaria owing to *Plasmodium vivax*: case report. **Ann. Trop. Paediatr.** 26(2): 141-4, 2006.

PETERSON, M.G.; MARSHALL, V.M.; SMYTHE, J.A.; CREWETHER, P.E.; LEW, A.; SILVA, A.; ANDERS, R.F.; KEMP, D.J. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. **Mol. Cell. Biol.** 9(7): 3151-4, 1989.

POLHEMUS, M.E.; MAGILL, A.J.; CUMMINGS, J.F.; KESTER, K.E.; OCKENHOUSE, C.F.; LANAR, D.E.; DUTTA, S.; BARBOSA, A.; SOISSON, L.; DIGGS, C.L.; ROBINSON, S.A.; HAYNES, J.D.; STEWART, V.A.; WARE, L.A.; BRANDO, C.; KRZYCH, U.; BOWDEN, R.A.; COHEN, J.D.; DUBOIS, M.C.; OFORI-ANYINAM, O.; DE-KOCK, E.; BALLOU, W.R.; HEPPNER, D.G. JR. Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* apical membrane protein (AMA-1) FMP2.1, adjuvanted with AS02A, in malaria-naïve adults at the Walter Reed Army Institute of Research. **Vaccine.** 25(21):4203-12, 2007.

POLLEY, S.D.; CONWAY, D.J. Strong diversifying selection on domains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 gene. **Genetics.** 158(4): 1505-12, 2001.

POLLEY, S.D.; MWANGI, T.; KOCKEN, C.H.; THOMAS, A.W.; DUTTA, S.; LANAR, D.E.; REMARQUE, E.; ROSS, A.; WILLIAMS, T.N.; MWAMBINGU, 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.** 23(5): 718-28, 2004.

PIZARRO, J.C.; NORMAND, V.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. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science.** 308: 408-11, 2005.

PRAKASH, J.; SINGH, A.K.; KUMAR, N.S.; SAXENA, R.K. Acute renal failure in *Plasmodium vivax* malaria. **J. Assoc. Physicians. India.** 51(2):265-7, 2003.

PRUDENCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M.M. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. **Nat. Rev. Microbiol.** 4(11): 849-56, 2006.

RAINCHZUK, A.; SCORZA, T.; SPITHILL, T.W.; SMOOKER, P.M. A bicistronic DNA vaccine containing apical membrane antigen 1 and merozoite surface protein 4/5 can prime humoral and cellular immune responses and partially protect mice against virulent *Plasmodium chabaudi* adami DS malaria. **Infect. Immun.** 72(10): 5565-73, 2004.

RAJESH, V.; ELAMARAN, M.; VIDYA, S.; GOWRISHANKAR, M.; KOCHAR, D.; DAS, A. *Plasmodium vivax*: Genetic diversity of the apical membrane antigen-1 (AMA-1) in isolates from India. **Exp. Parasitol.** 116 (3): 252-6, 2007.

RODRIGUEZ-MORALES, A.J.; SANCHEZ, E.; VARGAS, M.; PICCOLO, C.; COLINA, R.; ARRIA, M.; FRANCO-PAREDES, C. Occurrence of thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria. **Clin. Infect. Dis.** 41(1): 130-1, 2005.

RODRIGUES, M.H.C.; CUNHA, M.G.; MACHADO, R.L.D.; FERREIRA O.C.; RODRIGUES, M.M.; SOARES, I.S. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoíta surface protein-1. **Malar. J.** 2: 39, 2003.

RODRIGUES, M.H.C.; RODRIGUES, K.M.; OLIVEIRA, T.R.; COMODO, A. N.; RODRIGUES, M.M.; KOCKEN, C.H.M.; THOMAS, A.W.; SOARES, I.S. Antibody immune response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **Int. J. Parasitol.** 35(2): 185-192, 2005.

ROGERS, W.O.; GOWDA, K.; HOFFMAN, S.L. Construction and immunogenicity of DNA vaccine plasmids encoding four *Plasmodium vivax* candidate vaccine antigens. **Vaccine.** 17(23-24): 3136-44, 1999.

SAUL, A.; LAWRENCE, G.; ALLWORTH, A.; ELLIOTT, S.; ANDERSON, K.; RZEPCHYK, C.; MARTIN, L.B.; TAYLOR, D.; EISEN, D.P.; IRVING, D.O.; PYE, D.; CREWTER, P.E.; HODDER, A.N.; MURPHY, V.J.; ANDERS, R.F. A human phase 1 vaccine clinical trial of the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1 in Montanide ISA720 adjuvant. **Vaccine.** 23(23): 3076-83, 2005.

SHI, Q.; CERNETICH-OTT, A.; LYNCH, M.M.; BURNS, J.M. Expression, localization, and erythrocyte binding activity of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein-8. **Mol. Biochem. Parasitol.** 149(2): 231-41, 2006.

SILVIE, O.; FRANETICH, J.F.; CHARRIN, S.; MUELLER, M.S.; SIAU, A.; BODESCOT, M.; RUBINSTEIN, E.; HANNOUN, L.; CHAROENVIT, Y.; KOCKEN, CH.; THOMAS, A.W.; VAN GEMERT, G.J.; SAUERWEIN, R.W.; BLACKMAN, M.J.; ANDERS, R.F.; PLUSCHKE, G.; MAZIER, D. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. **J. Biol. Chem.** 279(10): 9490-6, 2004.

SMITH, J.D.; GAMAIN, B.; BARUCH, D.I.; KYES, S. Decoding the language of var genes and *Plasmodium falciparum* sequestration. **Trends. Parasitol.** 17(11): 538-45, 2001.

SIM, B.K.; CHITNIS, C.E.; WASNIOWSKA, K.; HADLEY, T.J.; MILLER, L.H. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. **Science.** 264(5167): 1941-4, 1994.

SOARES, I.S.; LEVITUS, G.; SOUZA, J.M.; DEL PORTILLO, H.A.; RODRIGUES, M.M. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. **Infect. Immun.** 65(5): 1606-14, 1997.

SOARES, I.S. & RODRIGUES, M.M. Malaria vaccines: roadblocks and possible solutions. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31(3): 317-32, 1998.

SOARES, I.S.; OLIVEIRA, S.; SOUZA, J.M.; RODRIGUES, M.M. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. **Acta. Trop.** 72(1): 13-24, 1999a.

SOARES, I.S.; CUNHA, M.G.; SILVA, M.N.; SOUZA, J.M.; DEL PORTILLO, H.A.; RODRIGUES, M.M. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 60(3): 357-63, 1999b

SOARES, I.S.; BARNWELL, J.W.; FERREIRA, M.U.; CUNHA, M.G.; LAURINO, J.P.; CASTILHO, B.A.; RODRIGUES, M.M. A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism; which does not restrict recognition by antibodies. **Mol. Med.** 5(7): 459-70, 1999c.

SOUZA, T.N.; CERÁVOLO, I.P.; FERNANDES – FONTES, C.J.; COUTO, A.; CARVALHO, L.H.; BRITO, C.F. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. **Mol. Biochem. Parasitol.** 146(2): 251-4, 2006.

STEWART, M.J.; VANDERBERG, J.P. Electron microscopic analysis of circumsporozoite protein tail formation by gliding malaria sporozoites. **J. Protozool.** 39(6): 663-71, 1992.

STOWERS, A.W.; KENNEDY, M.C.; KEEGAN, B.P.; SAUL, A.; LONG, C.A.; MILLER, L.H. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. **Infect. Immun.** 70(12): 6961-7, 2002.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J.M.; MENARD, R.; HEUSSLER, V.T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science.** 313(5791): 1287-90, 2006.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2006. Disponível em <<http://dtr2001.saude.gov.br/svs>>. Acesso em 13 de novembro de 2007.

SILVIE, O.; FRANETICH, J.F.; CHARRIN, S.; MUELLER, M.S.; SIAU, A.; BODESCOT, M.; RUBINSTEIN, E.; HANNOUN, L.; CHAROENVIT, Y.; KOCKEN, C.H.; THOMAS, A.W.; GEMERT G.J.V.; SAUERWEIN, R.W.; BLACKMAN, M.J.;

ANDERS, R.F.; PLUSCHKE, G.; MAZIER, D. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. **J. Biol. Chem.** 279(10): 9490-6, 2004.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; JARRA, W.; THAITHONG, S.; BROWN, K.N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. **Mol. Biochem. Parasitol.** 58(2): 283-92, 1993

SUÁREZ-MUTIS, M.C.; CUERVO, P.; LEORATTI F.M.; MORAES-AVILA, S.L.; FERREIRA, A. W.; FERNANDES, O.; COURA, J.R. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** 49(3):159-64, 2007.

THOMAS, A.W.; DEANS, J.A.; MITCHELL, G.H.; ALDERSON, T.; COHEN, S. The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 13(2):187-99, 1984.

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 A.** 63(1): 59-66, 2005.

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. **Mol. Microbiol.** 38(4): 706-18, 2000.

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.** 19(4-5): 508-13, 2000.

VANBUSKIRK, K.M.; COLE-TOBIAN, J.L.; BAISOR, M.; SEVOVA, E.S.; BOCKARIE M.; KING, C.L.; ADAMS, J.H. Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium vivax* duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. **J. Infect. Dis.** 190(9): 1556-62, 2004.

VERRA, F.; CHOKEJINDACHAI, W.; WEEDALL, G.D.; POLLEY, S.D.; MWANGI, T.W.; MARSH, K.; CONWAY, D.J. Contrasting signatures of selection on the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen gene family. **Mol. Biochem. Parasitol.** 149(2): 182-90, 2006.

XAINLI, J.; COLE-TOBAN, J.L.; BAISOR, M.; KASTENS, W.; BOCKAIRE, M.; YAZDANI, S.S.; CHITNIS, C.E.; ADAMS, J.H.; KING, C.L. Epitope-specific humoral immunity to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Infect. Immun.** 71(2): 2508-15, 2003.

WATERS, A.P.; THOMAS, A.W.; DEANS, J.A.; MITCHELL, G.H.; HUDSON, D.E.; MILLER, L.H.; MCCUTCHAN, T.F.; COHEN, S. A merozoite receptor protein from *Plasmodium knowlesi* is highly conserved and distributed throughout *Plasmodium*.

J. Biol. Chem. 265(29): 17974–79, 1990.

WICKRAMARACHCHI, T.; PREMARATNE, P.H.; PERERA, K.L.R.L.; BANDARA, S.; KOCKEN, C.H.M.; THOMAS, A.W.; HANDUNNETTI, S.M.; UDAGAMA-RANDENIYA, P.V. Natural human antibody responses to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. **Infect. Immun.** 74 (1): 798–801, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. 2005. Disponível em <<http://www.who.int/tdr/diseases/malaria/>>. Acesso em 10 março 2007.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 85/2006

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Imunizações pré-clínicas utilizando proteínas recombinantes baseadas em antígenos da superfície de merozoítas de Plasmodium vivax” (Protocolo CEEA nº112), sob a responsabilidade da Profa. Irene da Silva Soares, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 10/07/2006.

São Paulo, 07 de dezembro de 2006.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 142/2005

São Paulo, 27 de setembro de 2005.

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

Prezado(a) Senhor(a),

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 26 de setembro de 2005, **APROVOU** o projeto "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 nº 325) apresentado por Vossa Senhoria, devendo ainda:

1) No Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, substituir o termo "furada" por "picada de agulha", bem como descrever o local onde será feita a coleta.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP