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

Avaliação da resposta de anticorpos em indivíduos expostos ao
Plasmodium vivax contra um antígeno recombinante
correspondente a Proteína de Ligação ao grupo sanguíneo Duffy

Karina Martinelli Rodrigues

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2005

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

Avaliação da resposta de anticorpos em indivíduos expostos ao
Plasmodium vivax contra um antígeno recombinante
correspondente a Proteína de Ligação ao grupo sanguíneo Duffy

Karina Martinelli Rodrigues

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011334

Ficha Catalográfica

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

Rodrigues, Karina Martinelli

R696av Avaliação da resposta de anticorpos em indivíduos expostos
ao *Plasmodium vivax* contra um antígeno recombinante
correspondente a proteína de ligação ao grupo sanguíneo
Duffy / Karina Martinelli Rodrigues. -- São Paulo, 2005.
77p.

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

Orientador: Soares, Irene da Silva

1. Parasitologia 2. Malária 3. Doença parasitária :
Imunologia I. T. II. Soares, Irene da Silva, orientador.

616.96 CDD

Karina Martinelli Rodrigues

Avaliação da resposta de anticorpos em indivíduos expostos ao
Plasmodium vivax contra um antígeno recombinante
correspondente a Proteína de Ligação ao grupo sanguíneo Duffy

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Irene da Silva Soares
Orientadora/presidente

PROFA. DRA. ADELAIDE JOSÉ VAZ.
1º. examinador

PROFA. DRA. KARIN KIRCHGATTER.
2º. examinador

São Paulo, 19 de 12 /

Tudo depende de mim!!!

Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia-noite.

É minha função escolher que tipo de dia vou ter hoje.

Posso reclamar porque está chovendo...
ou agradecer às águas por lavarem a poluição.

Posso ficar triste por não ter dinheiro...
ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício.

Posso reclamar sobre minha saúde...
ou dar graças por estar vivo.

Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria...
ou posso ser grato por ter nascido.

Posso reclamar por ter que ir trabalhar...
ou agradecer por ter trabalho.

Posso sentir tédio com as tarefas da casa...
ou agradecer a Deus por ter um teto para morar.

Posso lamentar decepções com amigos...
ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades.

Se as coisas não saíram como planejei,
posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar.

O dia está na minha frente esperando
para ser o que eu quiser.

E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma.

"Tudo depende só de mim".

Charles Chaplin.

Dedicatória

Aos meus queridos pais e amigos, Irani e Sebastião, pela contribuição inigualável nos momentos críticos, pelo amor, incentivo constante na conquista de meus objetivos e pelo auxílio financeiro. A minha irmã e amiga Camila pela energia e entusiasmos.

Dedicatória

Ao André, meu adorável namorado que esteve presente desde o início com palavras e atitudes de encorajamento, força, determinação e muita compreensão.

Agradecimentos especiais

A minha prima Sabrina, pelo companheirismo e amizade. A todos os meus tios e tias que sempre estiveram por perto. Aos meus primos Diva, Dr. Lauro de Almeida Brito e Dra. Fernanda Canduri. Aos avôs e pais do André pelo incentivo. Às minhas amigas e amigos de longa data e distância. Aos meus queridos amigos e professores Dra. Denise de C. Rossa Feres e Dr. Reinaldo José Fazzio Feres. Aos médicos e profissionais da saúde dos quais precisei de seus serviços ao longo deste trabalho. A Meg Julieta pela diversão.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Irene da Silva Soares, pela orientação, profissionalismo, oportunidade e contribuição para minha capacitação científica.

Meu agradecimento particular para minhas amigas e companheiras de trabalho: Tatiane, Maria Helena, Maria Carolina, Andréia e Juliana, pela amizade e essencial ajuda durante esta trajetória.

A técnica Sônia por sua importante contribuição.

A Karen, Eliver, Glorinha, Marina, Carol, Juliana e demais colegas do Bloco 17.

A Juliana Sá, Sergio Rodriguez-Malaga, Mauro e demais companheiros do ICB II.

A Daniela Santoro Rosa, Maire e turma da UNIFESP.

Aos amigos da UNESP e FAMERP.

Ao Prof. Dr. Mauricio M. Rodrigues do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP, pelo apoio durante a execução deste trabalho.

A Profa. Dra. Dulcinéia Abdalla e Profa. Dra. Ana Campa coordenadora e vice-coordenadora do Programa de Pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno por disponibilizar a câmara escura.

Ao Prof. Dr. Hernando A. Del Portillo Obando e a Profa. Dra. Carmen Fernandez-Becerra.

A Profa. Dra. Dulcinéia Abdalla, Profa. Dra. Ana Campa, Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez, Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka, Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, Profa. Dra. Adelaide Vaz, por permitir o uso de suas instalações e equipamentos de laboratórios.

Ao Dr. Chetan Chitnis por nos ceder a proteína recombinante DBP-RII *Sal-1*.

A Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza e ao Prof. Dr. Wanderley Polizelli.

A Tatiane Rodrigues de Oliveira pela obtenção do soro policlonal anti-DBP-RII em camundongos.

A Maria Carolina Sarti Jimenez por ceder a proteína recombinante MSP1₁₉ para complementação de nossos estudos.

Aos membros da Banca do Exame de Qualificação Dra. Adelaide José Vaz e Dra. Karin Kirchgatter pelas sugestões.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

A todos que estiveram presentes colaborando com apoio, amizade e muito companheirismo.

Meus sinceros agradecimentos.

Sumário

Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas	xvi
Resumo	xviii
Abstract	xix
 I. INTRODUÇÃO	 01
1. Epidemiologia da malária no mundo e no Brasil	02
2. O parasita e seu ciclo de vida	04
3. Patogenia da malária	07
4. Estratégias de controle da malária	08
5. Perspectivas de desenvolvimento de vacina contra o <i>P. vivax</i>	09
5.1. Proteína de Ligação ao Duffy (DBP)	10
5.2. Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1)	15
5.3. Proteína 1 da Superfície do Merozoíta (MSP-1)	16
 II. OBJETIVOS	 19
1. Objetivo Geral	20
2. Objetivos específicos	20
 III. MATERIAL e MÉTODOS	 21
1. Amostras de Soro	22
1.1. Indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> procedentes de duas áreas endêmicas da Região Amazônica	22
1.2. Indivíduos tratados para malária	23

1.3. Indivíduos sadios.....	23
2. Composição de soluções e meios de cultura utilizados.....	23
2.1. Soluções	23
2.2. Meios de cultura.....	27
3. Construção dos plasmídios recombinantes	27
3.1. Construção dos plasmídios recombinantes contendo o gene que codifica a região II da proteína DBP de <i>P. vivax</i>	27
3.2. Construção do plasmídio recombinante contendo o gene que codifica a proteína AMA-1 de <i>P. vivax</i>	29
4. Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos das proteínas correspondentes a DBP-RII (isolado BEL-12 e cepa Sal-1 e Belém)	30
5. Obtenção das proteínas recombinantes para uso nos ensaios imunológicos <i>in vitro</i>	30
5.1. Proteína recombinante DBP-RII (BEL-12).....	31
5.2. Proteína recombinante AMA-1	33
5.3. Proteína recombinante MSP1 ₁₉	34
6. Imunização de camundongos para obtenção de soro policlonal anti-DBP-RII (cepa Sal-1).....	35
7. “Immunoblotting” para detecção da proteína recombinante DBP- RII (BEL-12) produzida em <i>E. coli</i>	36
8. Ensaio imunoenzimático	36
9. Análise estatística	37
IV. RESULTADOS	38
1. Obtenção do gene que codifica a região II da proteína DBP de <i>P.</i> <i>vivax</i>	39
2. Construção dos plasmídios recombinantes	39

2.1. Construção do plasmídio recombinante contendo o gene que codifica a proteína DBP-RII de <i>P. vivax</i>	39
2.2. Construção do plasmídio recombinante contendo o gene que codifica a proteína AMA-1 de <i>P. vivax</i>	39
3. Obtenção das proteínas recombinantes	40
3.1. Expressão e purificação da proteína recombinante DBP-RII (BEL-12)	40
3.2. Expressão e purificação da proteína recombinante AMA-1	42
3.3. Obtenção da proteína recombinante MSP1 ₁₉	43
4. Avaliação comparativa do reconhecimento imune das duas proteínas recombinantes correspondentes a DBP-RII	43
5. Avaliação comparativa do reconhecimento imune das proteínas recombinantes derivadas de DBP-RII (Sal-1), AMA-1 e MSP1 ₁₉ por anticorpos de indivíduos infectados por <i>P. vivax</i>	45
6. Análise do efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos anti-DBP-RII, anti-AMA-1 e anti-MSP1 ₁₉	48
7. Comparação da longevidade da resposta de anticorpos do tipo IgG de indivíduos expostos à malária contra as proteínas recombinantes representando a DBP-RII, AMA-1 e MSP1 ₁₉	49
V. DISCUSSÃO	56
VI. CONCLUSÕES.....	62
VII. REFERÊNCIAS.....	64
VIII. ANEXO.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global da transmissão de malária em 2003.....	03
Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	06
Figura 3. Representação esquemática do gene que codifica a proteína DBP de <i>P. vivax</i>	12
Figura 4. Representação esquemática da proteína AMA-1 de <i>P.</i> <i>vivax</i>	16
Figura 5. Representação esquemática do gene que codifica a proteína MSP-1 de <i>P. vivax</i>	17
Figura 6. Múltiplo alinhamento Clustal W das seqüências preditas de aminoácidos de <i>dbp-rlI</i> (isolado BEL-12) e das cepas previamente descritas: Belém e Salvador (Sal-1).....	40
Figura 7. Etapas de solubilização e purificação da proteína DBP- RII (BEL-12) expressa em <i>E. coli</i> BL21(DE3) a partir do vetor pHIS	41
Figura 8. Análise da proteína recombinante DBP-RII (BEL-12) purificada	42
Figura 9. Comparação do reconhecimento imune das proteínas recombinantes derivadas de DBP por anticorpos IgG de 50 indivíduos infectados por <i>P. vivax</i>	45
Figura 10. Análise comparativa da reatividade de soros de indivíduos com malária patente causada por <i>P. vivax</i> contra três proteínas recombinantes, DBP-RII (Sal-1), AMA-1 e MSP1 ₁₉	47
Figura 11. Análise comparativa da resposta imune de indivíduos com infecção patente quanto à freqüência de episódios prévios de malária contra as proteínas recombinantes DBP-RII, AMA-1 e MSP1 ₁₉	50

Figura 12. Avaliação comparativa da longevidade da resposta de anticorpos específicos para as proteínas recombinantes DBP-RII, AMA-1 e MSP1 ₁₉ em indivíduos com infecção patente e após o tratamento	52
Figura 13. Avaliação comparativa dos títulos de anticorpos obtidos contra cada uma das proteínas recombinantes durante a infecção e após o tratamento	53
Figura 14. Avaliação comparativa dos títulos de anticorpos obtidos para DBP-RII durante a infecção e após o tratamento.....	55
Figura 15. Avaliação comparativa dos títulos de anticorpos obtidos para AMA-1 durante a infecção e após o tratamento.....	55
Figura 16. Avaliação comparativa dos títulos de anticorpos obtidos para MSP1 ₁₉ durante a infecção e após o tratamento	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Antígenos relevantes de merozoíta de <i>P. vivax</i> identificados e caracterizados	11
Tabela 2. Sumário das condições de PCR utilizadas para amplificação do gene <i>dbp-rlI</i> 2. Composição de soluções e meios de cultura utilizados.....	29
Tabela 3. Sumário das condições de obtenção das proteínas recombinantes correspondentes a DBP-RII.....	33
Tabela 4. Sumário das proteínas recombinantes derivadas de DBP-RII, AMA-1 e MSP1 ₁₉ de <i>P. vivax</i> utilizadas nos ensaios sorológicos.....	35
Tabela 5. Análise da reatividade dos soros de indivíduos com malária causada por <i>P. vivax</i> procedentes de duas áreas endêmicas do Estado do Pará contra as proteínas recombinantes DBP-RII, AMA-1 e MSP1 ₁₉	48

LISTA DE ABREVIATURAS

β -ME	β -mercaptoetanol
A	Absorbância
AMA	“Apical membrane antigen”
Amp	Ampicilina
BSA	Albumina Sérica Bovina
$C_6H_8O_7$	Ácido cítrico
CHAPS	3-(-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulfonate
DAB	3,3-diaminobenzidina
DBP	“Duffy-binding protein”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPMix	Desoxirribonucleotídeos Triposfatos
DO	Densidade Óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilenodiamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S-transferase
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
His ₆	Cauda de seis resíduos de histidina
ICBs	“Interspecies conserved blocks”
Ig	Imunoglobulina
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopiranosídeo
kb	Quilo pares de bases
kDa	Quilo Dalton
L	Litro
LB	Luria Bertani
M	Molar

mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MSP	“Merozoite surface protein”
N	Normal
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio bibásico
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
OPD	Orto-fenilenodiamina
Pb	Pares de bases
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
rpm	rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TEMED	N,N,N',N' tetrametil etilenodiamida
Tris	Hidroximetilaminometano
V	Volt
vol/vol	volume/volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

RESUMO

No presente estudo, avaliamos a resposta de anticorpos, por ELISA, contra um recombinante bacteriano baseado no domínio II da Proteína de Ligação ao Duffy (DBP-RII) em indivíduos naturalmente expostos ao *Plasmodium vivax*. Amostras de soro de 160 pacientes com malária *vivax*, procedentes de duas áreas endêmicas do Estado do Pará (Belém e São Jorge), foram utilizadas neste estudo. Estes soros foram também testados contra outras duas proteínas recombinantes derivadas de merozoítas de *P. vivax*, para efeito de comparação da resposta de anticorpos: AMA-1 (Antígeno 1 de Membrana Apical) e MSP1₁₉ (região C-terminal de 19 kDa da Proteína 1 de Superfície do Merozoíta).

A frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG específicos contra as proteínas recombinantes DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉ foi de 15,6%, 50% e 93,1%, respectivamente. Observamos que a proporção de indivíduos que apresentaram anticorpos contra DBP-RII e AMA-1 aumentou de acordo com o maior número de exposições prévias ao *P. vivax*, enquanto que a resposta de anticorpos contra a MSP1₁₉ desenvolveu-se rapidamente após uma única exposição ao parasita.

A persistência da resposta de anticorpos contra DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉ foi avaliada em amostras de soro coletadas durante a infecção patente e dois ou nove meses após o tratamento. Observamos que, durante este período, não houve uma diminuição significativa das frequências de respondedores contra DBP-RII e AMA-1. Por outro lado, a frequência de respondedores contra a MSP1₁₉, diminuiu significativamente nove meses após o tratamento. Não observamos diferença significativa entre os títulos de anticorpos obtidos contra DBP-RII e AMA-1, durante a infecção e dois ou nove meses após o tratamento, indicando que a resposta de anticorpos se manteve. Por outro lado, os títulos de anticorpos para MSP1₁₉ foram significativamente maiores durante a infecção patente do que nove meses após o tratamento.

ABSTRACT

In the present study, we evaluated by ELISA the antibody immune response to a recombinant protein based on the domain II of the Duffy Binding Protein (DBP-RII) in individuals naturally exposed to *Plasmodium vivax*. Serum samples from 160 patients with *vivax* malaria were collected in two endemic areas of State of Pará (Belém and São Jorge). For purposes of comparison, ELISA were also performed using two other recombinant proteins representing antigens derived from *P. vivax* merozoites: AMA-1 (Apical Membrane Antigen-1) and MSP1₁₉ (19 kDa C-terminal region of Merozoite Surface Protein-1).

The frequency of individuals who presented IgG antibodies specific to the recombinant proteins DBP-RII, AMA-1 or MSP1₁₉ were 15.6%, 50% or 93.1%, respectively. We observed that the proportions of individuals who presented antibodies against DBP-RII or AMA-1 increased according to the number of malaria episodes, while the antibodies response to MSP1₁₉ developed quickly after a single contact with the parasite.

The persistence of antibodies response to DBP-RII, AMA-1 or MSP1₁₉ was compared in serum samples during patent infection or two and nine months following treatment. We observed that during this period the frequency of responders to DBP-RII and AMA-1 remained similar. In contrast, the frequency of responders to MSP1₁₉ dropped significantly nine months after treatment. No difference was observed when we compared the antibody titers obtained to DBP-RII or AMA-1 during the infection or after treatment. These results established that the antibodies response to DBP-RII or AMA-1 remained similar two or nine months after treatment. In contrast, the antibody titers to MSP1₁₉ were significantly lower nine months after treatment when compared to patent infection.

I. Introdução

1. Epidemiologia da malária no mundo e no Brasil.

A malária humana, um dos principais problemas de saúde pública mundial, aliada com a AIDS e a tuberculose, acomete e mata um número significativo de pessoas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005), atualmente, a malária é considerada a antroponose de maior prevalência no mundo, sendo transmitida em mais de 100 países onde cerca de 3,2 bilhões de pessoas estão expostas à infecção, principalmente por *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* (Figura 1). Estima-se que ocorram aproximadamente de 350 a 500 milhões de casos anuais com cerca de 1 milhão de mortes. A maior incidência de mortes ocorre na África, sendo as principais vítimas, crianças menores de cinco anos de idade e mulheres grávidas infectadas pelo *P. 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 entram em áreas endêmicas. (OMS, 2005).

O *P. vivax* é responsável por mais de 50% de todos os casos registrados fora da África (revisado por SATTABONGKOT *et al.*, 2004), representando cerca de 70-80 milhões de ocorrências anualmente (MUHLBERGER *et al.*, 2004). Dez a 15% destes episódios ocorrem na América do Sul e Central (MENDIS *et al.*, 2001).

No Brasil, mais de 99% dos casos de malária registrados ocorrem na Amazônia Legal (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, SVS, MS, 2005). No ano de 2003 foram registrados 401.569 episódios de malária no Brasil, sendo que o *P. vivax* foi responsável por aproximadamente 80% dos casos (SVS, MS, 2003). Entretanto, nos últimos anos, têm-se verificado um aumento considerável de casos de malária *falciparum*, contribuindo para a ocorrência da forma grave e letal (SVS, MS, 2004). Em 2004, a incidência da malária na Amazônia permaneceu elevada, comprometendo a saúde da população e o desenvolvimento da região (SVS, MS, 2005).

A propagação da malária na Amazônia ocorre, principalmente, devido à intensa ocupação descontrolada das áreas periféricas dos centros urbanos pela população procedente de áreas malarígenas (SVS, MS, 2005). Elevando, desta forma, a ocorrência dos casos de malária na periferia de certas capitais da Amazônia Legal (SVS, MS, 2005). Além disso, a carência de saneamento básico e infra-estrutura em áreas habitadas de modo desordenado, nas grandes capitais, favorecem a formação de criadouros de mosquitos vetores, anofelinos (MARQUES, 1986, 1987).

Os prejuízos econômicos gerados em decorrência da malária referem-se ao estado de morbidez causado pela doença e por conseqüência, inviabilizando o trabalho. De acordo com CAMARGO *et al.* (1994), estudos epidemiológicos demonstram que no Brasil a maior incidência da doença é observada em indivíduos adultos do sexo masculino. Diversas medidas, no sentido de combater a doença, foram adotadas pelo Estado por intervenção do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM) no ano de 2000, como exemplo, projetos de controle que abrangem a ampliação da rede de diagnóstico rápido e tratamento oportuno dos casos, redução dos insetos vetores e freqüente controle dos fatores de risco, tais como, epidemiológicos, ecológicos e sócio-econômicos (SVS, MS, 2004).

Figura 1. Distribuição global da transmissão de malária em 2003. Adaptado de: <http://rbm.who.int/wmr2005/html/map1.htm> (acessado em 29/09/2005).

2. O parasita e seu ciclo de vida.

Os parasitas causadores da malária são protozoários intracelulares pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. Aproximadamente 150 espécies de *Plasmodium* são conhecidas atualmente como causadoras de malária em diversos vertebrados, mas apenas quatro espécies acometem o homem e causam malária: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, e *P. ovale*. Dentre estas espécies *P. falciparum* e *P. vivax* são responsáveis pela maioria dos casos da doença no mundo, sendo que o *P. falciparum* é o mais virulento, responsável pela forma grave da doença, incluindo a malária cerebral, podendo conduzir o paciente ao óbito em poucos dias, sobretudo em pessoas que estão tendo o primeiro contato com o parasita (OMS, 2005). A malária *vivax* é considerada 'não complicada', ou benigna, com episódio de reincidências, diferindo da malária *falciparum* em seus aspectos clínicos (revisado por SATTABONGKOT *et al.*, 2004).

As fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* são as responsáveis pela transmissão da malária ao hospedeiro vertebrado, através de picadas. No Brasil, cinco espécies são consideradas como vetores: *A. darlingi*, *A. aquasalis*, *A. albitarsis*, *A. bellator* e *A. cruzii*. Sendo que o *A. darlingi* é a principal espécie responsável pela difusão da malária na Amazônia (TADEI & THATCHER, 2000). A propagação do vetor acontece com maior frequência em localidades rurais, porém ocorrências são observadas em áreas urbanas, principalmente nas periferias dos grandes municípios (SVS, MS, 2005).

O agente etiológico da malária possui um ciclo de vida extremamente complexo, compreendido em uma etapa sexuada que ocorre na fêmea anofelina e três estágios de reprodução assexuada, que consiste em uma no hospedeiro invertebrado e duas no hospedeiro vertebrado. Durante o ciclo assexuado no sangue, uma pequena quantidade de parasitas não seguem a multiplicação assexuada e se diferenciam em células comprometidas sexualmente, gametócitos masculino e feminino, e tornam-se infectantes ao

mosquito (revisto por KHAN & WATERS, 2004). No mosquito acontece a reprodução sexuada, após a fêmea anofelina alimentar-se do sangue de indivíduos com gametócitos. No interior do estômago do mosquito os gametas masculinos e femininos iniciam a fertilização gerando o zigoto e, posteriormente, o oocineto. Este migra para a parede intestinal originando o oocisto. Assim, inicia-se o estágio de esporogonia e milhares de esporozoítas são produzidos, os quais são móveis e invasivos e irão alojar-se nas glândulas salivares do anofelino. Ao alimentar-se novamente, a fêmea inocula, através da saliva, os esporozoítas na corrente sanguínea do hospedeiro, onde circulam livremente pelo sangue por um breve período de cerca de uma hora.

Logo após os esporozoítas invadirem os hepatócitos, passam por uma primeira divisão assexuada, ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia tecidual, permanecendo no fígado por aproximadamente dez dias. Neste período, esquizontes hepáticos são produzidos, passam por processos de maturação e várias multiplicações originando, assim, milhares de merozoítas. Este evento conduz à ruptura dos hepatócitos e os merozoítas abandonam o fígado. Estes são lançados na corrente sangüínea, para então invadirem os eritrócitos e/ou reticulócitos, começando, desta forma, o próximo estágio do ciclo assexuado do parasita denominado ciclo eritrocítico ou esquizogonia eritrocítica. Nesta etapa do ciclo, os merozoítas originam os trofozoítas que se dividem por esquizogonia, gerando os esquizontes sanguíneos. Após o rompimento das hemácias, os merozoítas encontram-se livres para infectarem novamente outros glóbulos vermelhos. Depois de algumas etapas de divisão assexuada, alguns trofozoítas transformam-se em gametócitos, que amadurecem sem divisão celular. Estas são as formas infectantes para o mosquito, fechando, assim, o ciclo do *Plasmodium*. Os sinais clínicos e a patogenia da malária manifestam-se em decorrência do ciclo eritrocítico.

De acordo com a espécie de *Plasmodium*, o período de incubação oscila em torno de 15 dias. A Figura 2 representa uma ilustração do ciclo de vida do *Plasmodium* [Adaptado de:

<http://www.iladiba.com.co/revista/2004/10/malaria.asp> (acessado em 29/092005)].

Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida do *Plasmodium*.

3. Patogenia da malária.

As quatro espécies de *Plasmodium* que causam malária humana geram algumas manifestações clínicas semelhantes quando na fase aguda, tais como náuseas, vômitos e debilidade física. A fase aguda é desencadeada pela destruição das hemácias parasitadas por esquizontes durante o ciclo eritrocítico assexuado do *Plasmodium* e é denominada de paroxismo malárico. Em 1889, GOLGI demonstrou que o paroxismo malárico é a principal característica clínica da malária em indivíduos não-imunes, sendo caracterizado, sobretudo, por febre e calafrios seguidos de mal estar e cefaléia, com duração entre 15 minutos a 1 hora. Devido à periodicidade do paroxismo febril, o indivíduo torna-se abatido e pálido. Ocorrem dores musculares e articulares, náuseas, vômitos, forte dor abdominal, esplenomegalia, anemia, alterações neurológicas, disfunção renal e pulmonar. A anemia pode ser variável, sendo mais acentuada em infecções causadas por *P. falciparum* entre os indivíduos não imunes, principalmente crianças e gestantes, resultando em neonatos com baixo peso, nascimentos prematuros e mortalidade infantil (OMS, 2005).

A espécie infectante determina a severidade da malária. Em infecção por *P. falciparum* a falta de terapêutica rápida e eficaz pode conduzir a diversas formas clínicas graves da malária. As complicações caracterizam-se por insuficiência renal aguda, trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada, malária pulmonar e malária cerebral (BEG *et al.*, 2002), podendo levar o paciente ao óbito.

A malária causada por *P. vivax* em geral não é complicada, porém caracteriza-se pela presença de reincidências. Este fenômeno ocorre devido ao estado de latência em que alguns esporozoítas, denominados hipnozoítas, permanecem no interior do hepatócito. A permanência do hipnozoíta no hepatócito pode variar entre 1 mês a 2 anos. A ativação destes hipnozoítas resulta no reaparecimento da doença mesmo após o tratamento, denominado de recaída ou reincidência. O mecanismo que desencadeia a ativação dos hipnozoítas não é totalmente conhecido.

Ainda que a infecção por *P. vivax* dificilmente conduza o paciente ao óbito, anemia grave e complicações respiratórias, sobretudo em crianças já foram relatadas. Além disso, outros quarenta e um casos foram previamente descritos relatando malária cerebral causada por *P. vivax* em diferentes regiões do mundo (BEG *et al.*, 2002). Estudos recentes sugerem que a resposta anti-parasitária do indivíduo tenha efeito sobre a expressão das formas clínicas da malária *vivax* (KARUNAWEEERA *et al.*, 2003).

4. Estratégias de controle da malária.

O número de casos de malária notificados vem aumentando nos últimos anos, na maior parte dos países. Os motivos para este crescimento estão relacionados à instabilidade de políticas de saúde, alterações climáticas locais e globais, e biológicas, como o surgimento de cepas de parasitas e mosquitos refratários às drogas.

Com intuito de prevenir a expansão da malária, algumas ferramentas em potencial no controle da transmissão seriam: (i) impedir o contato entre o homem e o mosquito através do uso de inseticidas e mosquiteiros, (ii) eliminar o mosquito vetor por meio de inseticidas, bactérias larvicidas e peixes larvívoros, (iii) inibir o desenvolvimento do parasita no homem utilizando drogas e vacinas, (iv) inibir a transmissão do parasita, do homem para o mosquito e vice-versa, por meio da ação de drogas ou vacinas bloqueadoras da transmissão (revisto por SATTABONGKOT *et al.*, 2004).

Assim, visando reduzir a incidência de malária, diminuir a mortalidade e as formas graves da doença, eliminar a transmissão em áreas urbanas e manter a ausência de transmissão da doença em áreas onde tiver sido eliminada, o Ministério da Saúde implantou em 2003 o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), fundamentado em um conjunto de estratégias de intervenção, visando fortalecer ainda mais as estruturas dos serviços de saúde. Estas estratégias baseiam-se no apoio à estruturação dos serviços de saúde, diagnóstico e tratamento, implementação da vigilância da malária, capacitação de recursos humanos, educação em

saúde, controle seletivo dos vetores, pesquisa, monitoramento do PNCM e sustentabilidade política. Contudo, a malária permanece uma grave questão de saúde pública no Brasil, especialmente na Amazônia Legal.

Neste contexto, é indispensável maior empenho para praticar novas medidas de controle e informação a respeito da doença. Desta forma, é imprescindível o desenvolvimento de estratégias adicionais, como vacinas, drogas e inseticidas efetivos. Assim, acredita-se que os projetos genoma humano, do parasita e do mosquito possam contribuir para a compreensão da biologia de cada um e conduzir a novas perspectivas de combate à malária.

5. Perspectivas de desenvolvimento de vacina contra o *P. vivax*.

Apesar da biologia do *P. vivax* ser diferente da biologia do *P. falciparum* avanços relevantes tem sido obtidos no sentido de desenvolver uma vacina específica para *P. vivax* baseada em dados adquiridos através das pesquisas realizadas com *P. falciparum* (revisto por ARÉVALO-HERRERA & HERRERA, 2001). Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa têm contribuído com significativos avanços na identificação molecular de antígenos de *Plasmodium*, bem como no entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na destruição das diversas formas do parasita (revisto por SOARES & RODRIGUES, 1998, ARÉVALO-HERRERA & HERRERA, 2001, GREENWOOD *et al.*, 2005).

Durante o ciclo de vida, o parasita muda continuamente sua morfologia e os antígenos expressos na sua superfície, de modo que possa ser capaz de escapar da resposta imune do hospedeiro. Assim, o desenvolvimento do parasita poderia ser bloqueado por uma resposta imune gerada pelos antígenos presentes na superfície do merozoíta. Neste contexto, diversas pesquisas foram realizadas com intuito de caracterizar esses antígenos importantes na etapa de invasão, dos quais estes podem estar associados à superfície do merozoíta ou localizados em organelas do polo apical, como as roptrias e os micronemas. Acredita-se que o uso de

uma vacina multi-estágio e multi-espécie seja vantajoso, pois atingiria as principais espécies circulantes (revisto por ARÉVALO-HERRERA & HERRERA, 2001).

Os estudos visando a identificação de antígenos-alvo de *P. vivax* para o desenvolvimento de vacinas ainda são limitados, principalmente devido à dificuldade de se conseguir abundância de parasitas, uma vez que a propagação *in vitro* deste até o presente é exclusiva de poucos centros de pesquisas (GOLENDÁ *et al.*, 1997) e, também, pelas baixas parasitemias observadas em indivíduos infectados.

Contudo, com o advento da biotecnologia relacionada à obtenção do DNA recombinante, tornou-se viável isolar, clonar e seqüenciar os genes correspondentes aos antígenos de *P. vivax*, imunologicamente importantes. As proteínas recombinantes obtidas, através desta tecnologia, correspondentes às regiões imunogênicas, estão sendo empregadas em pesquisas de imunizações experimentais e estudos imuno-epidemiológicos, para, assim, obter um entendimento mais amplo da resposta imune humana e contribuir para o desenho de uma vacina efetiva contra o *P. vivax*. Os antígenos de merozoítas de *P. vivax* mais relevantes que já tiveram seus genes clonados e seqüenciados estão listados na Tabela 1.

Dentre as proteínas expressas na superfície do merozoíta de *P. vivax*, três foram selecionadas como alvo para nossos estudos comparativos visando determinar os níveis de anticorpos em indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax*.

5.1. Proteína de ligação ao Duffy (DBP).

A proteína de ligação ao Duffy (DBP, "Duffy Binding Protein") foi a primeira proteína descrita expressa no complexo apical (micronemas) de merozoítas de *P. vivax*. Este antígeno participa do processo de invasão dos reticulócitos pelos merozoítas através de sua ligação com as glicoproteínas da membrana do eritrócito pertencentes ao grupo sanguíneo Duffy (BARNWELL *et al.*, 1989). A DBP é constituída por 1.115 aminoácidos,

sendo que na porção N- terminal 22 aminoácidos formam a seqüência de um peptídeo sinal.

TABELA 1
Antígenos relevantes de merozoíta de *P. vivax* identificados e caracterizados.

Proteína	Localização	Referência
Merozoite Surface Protein-1 (MSP-1)	Membrana externa	DEL PORTILLO <i>et al.</i> (1991)
MSP-2	"	BARNWELL <i>et al.</i> (1999)
MSP-3 α	"	GALINSKI <i>et al.</i> (1999)
MSP-3 β e MSP-3 γ	"	GALINSKI <i>et al.</i> (2001)
MSP-4 e MSP-5	"	BLACK <i>et al.</i> (2002)
MSP-9	"	VARGAS-SERRATO <i>et al.</i> (2002)
Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1)	Polo apical	CHENG & SAUL (1994)
Reticulocyte Binding Protein (RBP-1 e RBP-2)	"	GALINSKI <i>et al.</i> (1992)
Duffy Binding Protein (DBP)	Micronema	FANG <i>et al.</i> (1991)

De acordo com a seqüência primária, DBP foi dividida em seis regiões. Região I apresenta grande número de substituições de resíduos de aminoácidos e existe alta homologia entre *P. vivax* e *P. knowlesi*. A região 5' rica em cisteínas ou região II, contém 12 resíduos de cisteínas conservados entre estas duas espécies de *Plasmodium* (OCAMPO *et al.*, 2002). A região crítica de ligação de DBP localiza-se no domínio rico em cisteínas, região II, entre os aminoácidos 291-460 (XAINLI *et al.*, 2003). Existe outra região rica em cisteínas, região VI, que precede a região transmembrana. Separando as regiões ricas em cisteínas existem as regiões III, IV e V, com seqüência variável entre *P. vivax* e *P. knowlesi* (OCAMPO *et al.*, 2002).

A Figura 3 apresenta uma representação esquemática do gene correspondente à proteína DBP de *P. vivax* (adaptado de MICHON *et al.*, 2000).

Figura 3. Representação esquemática do gene que codifica a proteína DBP de *P. vivax*.

A DBP pertence à família de proteínas de ligação aos eritrócitos “Erythrocyte-Binding Proteins” (EBP) que também inclui a proteína de ligação ao ácido siálico de *P. falciparum* e proteína de ligação ao Duffy de *P. knowlesi* (SINGH *et al.*, 2001). O domínio extracelular de cada EBP contém duas regiões conservadas ricas em cisteínas, regiões II e VI. Estes domínios conservados são denominados de “Duffy-binding like” (DBL). Os domínios DBL são atrativos candidatos à vacina, pois anticorpos dirigidos contra estes domínios funcionais poderiam bloquear suas interações com os receptores da superfície do eritrócito (SINGH *et al.*, 2001).

Análises experimentais utilizando DBP demonstraram que o domínio II extracelular rico em cisteínas foi a região ligante do parasita interagindo com antígeno do grupo sanguíneo Duffy em eritrócitos do hospedeiro (MICHON *et al.*, 2001). A molécula liga-se somente a eritrócitos Duffy-positivos, que são suscetíveis à invasão por *P. vivax* (OCAMPO *et al.*, 2002). Entretanto, em indivíduos com fenótipo Duffy-negativo não é esperado que desenvolva

infecção de estágio sangüíneo por *P. vivax*, porém ocorre infecção de estágio hepático, assim estes indivíduos são expostos aos antígenos de merozoítas (MICHON *et al.*, 1998).

Com intuito de estudar esta molécula como possível alvo para uma vacina contra o *P. vivax*, diversos grupos produziram proteínas recombinantes representando o domínio II de DBP de *P. vivax* em bactéria (FRASER *et al.*, 1997, SINGH *et al.*, 2001, YAZDANI *et al.*, 2004) e baculovírus (DUTTA *et al.*, 2000).

O primeiro ensaio sorológico utilizando uma proteína recombinante correspondente aos domínios II a IV da DBP (RII-IV), expressa em fusão com GST, revelou que 60% dos indivíduos naturalmente expostos à malária *vivax* residentes em uma região de alta endemicidade da Papua Nova Guiné apresentaram anticorpos IgG anti-DBP (FRASER *et al.*, 1997). Posteriormente, MICHON *et al.* (1998) demonstraram que 40% dos indivíduos de uma área endêmica da Colômbia reagiram positivamente contra esta mesma proteína recombinante. Em ambos os estudos foram observados que a frequência de indivíduos respondedores aumenta significativamente com a idade caracterizando um efeito de reforço, possivelmente devido a repetidas exposições ao parasita.

SINGH *et al.* (2001) produziram uma proteína recombinante correspondente a região II de DBP (RII ou PvRII) em *Escherichia coli* a partir de um vetor de expressão contendo cauda de histidina. Esta proteína recombinante foi obtida a partir de corpos de inclusão, porém na sua conformação apropriada após “refolding” e análise de sua estrutura secundária por dicroísmo circular. A imunização de coelhos com PvRII foi capaz de induzir a produção de anticorpos capazes de inibir a ligação da proteína a eritrócitos humanos Duffy positivos, confirmando que a proteína recombinante obtida mantém sua conformação funcional (SINGH *et al.* 2001).

Em 2003, XAINLI *et al.* avaliaram comparativamente a resposta de anticorpos IgG em indivíduos da Papua Nova Guiné contra uma proteína recombinante e peptídeos sintéticos correspondentes ao domínio funcional

da proteína. Foi observado que indivíduos expostos ao *P. vivax* desenvolvem anticorpos tanto contra epítomos lineares como conformacionais da proteína, entretanto, a presença de anticorpos contra epítomos lineares parece ser dependente de uma maior exposição ao parasita, uma vez que indivíduos primoinfectados desenvolvem anticorpos somente contra a proteína recombinante (XAINLI *et al.*, 2003). Ainda é necessário investigar se existe correlação entre presença de anticorpos contra os diferentes antígenos e proteção contra re-infecção.

No Brasil, recentemente foi realizado o primeiro estudo de reconhecimento imune da DBP utilizando amostras de indivíduos procedentes de populações com diferentes níveis de exposição à malária (CERAVOLO *et al.*, 2005). Neste estudo, foi demonstrado que a frequência de indivíduos com anticorpos IgG contra uma proteína recombinante derivada da DBP (RII-IV) aumenta de acordo com o maior tempo de exposição à malária.

Com relação à imunogenicidade da DBP-RII em modelos experimentais, foi demonstrado que a imunização de camundongos e coelhos utilizando três diferentes estratégias, tais como, proteína recombinante, vacina de DNA e peptídeos sintéticos sugerem elevada imunogenicidade desta molécula (MICHON *et al.*, 2000). Mais recentemente, a imunogenicidade da proteína recombinante PvRII produzida em *E. coli* foi avaliada em modelo murino, na presença de diferentes adjuvantes compatíveis para uso no homem. Foi observado que todas as combinações antígeno-adjuvante testadas foram capazes de induzir altos títulos de anticorpos em camundongos (YAZDANI *et al.*, 2004).

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

O antígeno 1 de membrana apical (AMA-1, “Apical Membrane Antigen 1”) está presente em todas as espécies de *Plasmodium*, existindo considerável nível de conservação da sequência de aminoácidos, estrutura primária e predição da estrutura secundária entre as espécies (KOCKEN *et al.*, 1999). Localizada no micronema apical do merozoíta, AMA-1 é formada por uma prosequência, um ectodomínio acessível à superfície pelas regiões transmembrana e citoplasmática, (POLLEY *et al.*, 2004) (Figura 4). Composta de 622 aminoácidos e com massa molecular aparente de 83 kDa, AMA-1 aparece inicialmente no complexo apical onde, antes do merozoíta invadir o eritrócito, é processada por clivagem proteolítica ocorrendo a perda da prosequência, resultando em uma proteína de massa molecular aparente de 66 kDa. Posteriormente migra para a superfície do merozoíta onde dois novos processos de clivagens proteolíticas ocorrem resultando em fragmentos de 48 kDa e em seguida um de 44 kDa (HODDER *et al.*, 1996, ESCALANTE *et al.*, 2001, CORTÉS *et al.*, 2005).

O ectodomínio de AMA-1 apresenta 19 e 16 resíduos de cisteínas, em *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente. As pontes dissulfídicas formadas pelos resíduos de cisteínas promovem a separação do ectodomínio em três domínios conferindo uma estrutura conformacional que pode ter um papel importante no reconhecimento do antígeno e na indução da resposta imune (HODDER *et al.*, 1996, KOCKEN *et al.*, 1999, FENG *et al.*, 2005). 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 função desempenhada por AMA-1 não é totalmente conhecida, contudo parece estar envolvida no processo de orientação do merozoíta no eritrócito antes da invasão (FENG *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que anticorpos para o ectodomínio (I-II-III) de AMA-1 de *P. falciparum* estão

significativamente associados com a redução de risco de malária clínica (POLLEY *et al.*, 2004).

Figura 4. Representação esquemática da proteína AMA-1 de *P. vivax*.

De acordo com RODRIGUES *et al.* (2005), AMA-1 de *P. vivax* é altamente imunogênica durante a infecção natural e apresenta limitado polimorfismo em isolados do Brasil. A propriedade imunogênica da proteína AMA-1 de *P. vivax* em modelo experimental foi demonstrada pela imunização de macacos com uma proteína recombinante expressa em *Pichia pastoris*, a qual foi capaz de induzir forte resposta de anticorpos (KOCKEN *et al.*, 1999). Juntos, estes dados sugerem que AMA-1 pode ser um importante alvo para compor, em associação com outras proteínas, uma vacina contra a malária.

5.3. Proteína 1 da Superfície do Merozoíta (MSP-1).

A proteína 1 da superfície do merozoíta (MSP-1, “Merozoite Surface Protein 1”), do estágio eritrocítico do *Plasmodium*, tem sido exaustivamente estudada como potencial alvo para compor uma vacina efetiva contra a malária (PARK *et al.*, 2001). Sintetizada inicialmente como uma proteína precursora de aproximadamente 200 kDa, esta sofre clivagem proteolítica em duas etapas (revisto por HOLDER & BLACKMAN, 1994). A clivagem

inicial produz quatro fragmentos que permanecem associados à superfície do parasita, já o segundo processamento proteolítico, que ocorre durante a invasão, gera fragmentos em que apenas um de 19 kDa, região C-terminal denominada de MSP₁₉, se mantém associado à superfície do merozoíto por uma ancora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (BLACKMAN *et al.*, 1990).

A Figura 5, adaptada de FERREIRA & SOARES (2000), é uma representação esquemática da MSP-1 de *Plasmodium sp.* Em destaque podemos observar as regiões conservadas entre as espécies *P. vivax*, *P. yoelli* e *P. falciparum*, denominadas de “Inter-species Conserved Blocks” (ICBs) intercaladas por regiões variáveis (DEL PORTILLO *et al.*, 1991).

Formada por duas regiões ricas em cisteínas, a MSP₁₉ apresenta dois domínios contendo 4 ou 6 resíduos de cisteínas em *P. falciparum* e *P. vivax*, respectivamente, configurados de maneira semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF-like). Este tipo de conformação foi confirmado pela análise estrutural da MSP₁₉ de diferentes espécies de *Plasmodium* (MORGAN *et al.*, 1999, CHITARRA *et al.*, 1999, GARMAN *et al.*, 2003).

Figura 5. Representação esquemática do gene que codifica a proteína MSP-1 de *P. vivax*.

A MSP₁₉ recombinante de *P. vivax* tem sido obtida a partir de sistema procariótico de expressão utilizando *E. coli* (LEVITUS *et al.*, 1994, SOARES *et al.*, 1997, CUNHA *et al.*, 2001) e sistema eucariótico de baculovírus (LONGACRE *et al.*, 1994), *Saccharomyces cerevisiae* (GIBSON *et al.*, 1992, KASLOW & KUMAR, 1996, SOARES *et al.* 1999c) e *Pichia pastoris* (SOARES & RODRIGUES, 2002).

Diversos estudos têm sido realizados com intuito de caracterizar a resposta imune adquirida contra a MSP-1 de *P. vivax* em indivíduos expostos naturalmente à malária, em áreas endêmicas da Amazônia brasileira (LEVITUS *et al.*, 1994, SOARES *et al.*, 1997, 1999a, 1999b). Recentemente demonstramos que mais de 90% dos indivíduos com infecção patente procedentes de diferentes áreas endêmicas do Estado do Pará apresentaram anticorpos contra proteínas recombinantes derivadas da MSP1₁₉, expressas em bactérias ou leveduras (RODRIGUES *et al.*, 2003). Estes resultados sugerem que a detecção de anticorpos anti-MSP1₁₉ constitui-se em um marcador de exposição recente ao *P. vivax*.

Muito recentemente, MORAIS *et al.* (2005) demonstraram que uma alta proporção de indivíduos com diferentes níveis de exposição à malária, procedentes de áreas endêmicas do Pará e Mato Grosso apresentaram anticorpos anti-MSP1₁₉ de *P. vivax*. A prevalência de anticorpos nas diferentes populações testadas foi semelhante.

No presente estudo, avaliamos comparativamente a resposta imune naturalmente adquirida contra diferentes antígenos recombinantes candidatos a compor uma vacina contra as formas sanguíneas do *P. vivax* em populações de áreas endêmicas do Brasil. Damos ênfase ao estudo da antigenicidade da DBP uma vez que ainda existem poucos estudos realizados no Brasil utilizando esta proteína. Assim nos propusemos a avaliar comparativamente o reconhecimento imune de uma proteína recombinante correspondente a DBP-RII, utilizando para efeito de comparação duas outras proteínas derivadas de AMA-1 e MSP1₁₉. O efeito do número de episódios prévios de malária *vivax* e a longevidade da resposta de anticorpos do tipo IgG contra os diferentes antígenos também foram avaliados.

II. Objetivos

1. Objetivo Geral.

O objetivo geral deste estudo é avaliar comparativamente o reconhecimento imune de proteínas recombinantes derivadas de antígenos de merozoítas de *P. vivax* por anticorpos de indivíduos naturalmente infectados. As proteínas recombinantes utilizadas correspondem aos seguintes antígenos: Domínio II da proteína de ligação ao antígeno Duffy (DBP-RII), Ectodomínio do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) e região C-terminal da Proteína 1 de Superfície do Merozoíta (MSP1₁₉) de *P. vivax*.

2. Objetivos específicos.

2.1. Avaliação comparativa do reconhecimento imune das proteínas recombinantes derivadas de DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉ por anticorpos IgG de indivíduos infectados por *P. vivax*;

2.2. Análise do efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgG anti-DBP-RII, anti-AMA-1 e anti-MSP1₁₉;

2.3. Comparação da longevidade da resposta de anticorpos do tipo IgG de indivíduos expostos à malária contra as diferentes proteínas recombinantes representando a DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉.

III. Material e Métodos

1. Amostras de soro.

Neste estudo foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos com as seguintes características clínicas:

1.1. Indivíduos infectados por *P. vivax* procedentes de duas áreas com diferentes níveis de endemicidade da Região Amazônica.

a) Belém, PA.

Amostras de sangue foram obtidas de 77 indivíduos com malária causada por *P. vivax*, residentes em área de baixa endemicidade, admitidos no Ambulatório de Malária do Instituto Evandro Chagas/Fundação Nacional de Saúde (Belém, PA). Todas as coletas de sangue foram realizadas durante o ano de 1997, sob a responsabilidade do Dr. José Maria de Souza, após o consentimento verbal dos doadores. Dados como sexo, idade e número de episódios anteriores de malária foram solicitados. Estas amostras foram utilizadas em estudos anteriores sobre a resposta imune humana a MSP-1 e AMA-1 (SOARES *et al.*, 1999b, RODRIGUES *et al.*, 2003, 2005).

Cinco mililitros de sangue foram coletados de cada paciente em tubos "Vacutainer" sem anticoagulante após o diagnóstico para o *P. vivax* pela gota espessa e antes do início do tratamento quimioterápico. O sangue permaneceu a temperatura ambiente até a separação do soro. O sangue foi centrifugado e alíquotas de soro foram mantidas a -20°C até o momento da realização dos ensaios. Este grupo de indivíduos é constituído por 70,1% de homens e a idade variou de 09 a 66 anos (média $\pm$ desvio padrão = $25,77 \pm 12,26$).

b) São Jorge, Igarapé-Açu, PA.

Oitenta e três amostras de sangue foram coletadas de indivíduos com parasitemia patente durante o ano de 1997, no município de Igarapé-Açu,

Estado do Pará, pela Dra. Maristela Gomes da Cunha, da Universidade Federal do Pará. Este grupo de pacientes é formado por 57,8% de indivíduos do sexo masculino com idade entre 01 e 88 anos (média $\pm$ desvio padrão = 24,50 $\pm$ 17,91), sendo que 96% destes indivíduos são primoinfectados em decorrência de um surto de malária.

1.2. Indivíduos tratados para malária.

Cinco mililitros foram coletados de cada indivíduo procedente de Belém na ocasião de seu comparecimento ao Ambulatório de Malária no segundo mês após o diagnóstico (controle de cura). O mesmo procedimento foi adotado em relação aos indivíduos procedentes de São Jorge, sendo que neste caso, os indivíduos foram solicitados a comparecer ao Posto de Saúde da FUNASA nove meses após o tratamento quimioterápico. Nenhum dos indivíduos teve malária clínica durante os intervalos entre as coletas (2 ou 9 meses).

1.3. Indivíduos sadios.

Vinte indivíduos adultos sadios que nunca estiveram em área endêmica de malária foram selecionados entre os doadores de sangue do Hemocentro do Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP. Além destes, outras 20 amostras de soro foram cedidas pelo Dr. Orlando C. Ferreira Jr. do Departamento de Hemoterapia do Hospital Israelita Albert Einstein.

2. Composição de soluções e meios de cultura utilizados.

2.1. Soluções.

Gel de agarose: agarose 1% (Invitrogen, Auckland, Nova Zelândia), TAE (1X), brometo de etídio 1 μ g/mL (Invitrogen).

Gel de poliacrilamida para eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) – Para 2 géis (mini-gel):

(I) Gel de corrida: acrilamida 30%, bis-acrilamida 0,8% (Fluka Chemie, Steinheim, Alemanha) - 3,5 mL; Trizma base 0,75 M (Invitrogen), SDS 0,2% pH 8,8 (Invitrogen) - 4,5 mL; persulfato de amônio 10% - 100 µL, TEMED (Invitrogen) - 15 µL.

(II) Gel de separação: acrilamida 12%, Bis-acrilamida 1,2% - 1,25 mL; Trizma base 0,25 M, SDS 0,2% pH 6,8 - 2,5 mL; persulfato de amônio 10% - 100 µL, TEMED - 12 µL.

PBS: NaH₂PO₄ 8 mM, Na₂HPO₄ 2,3 mM, NaCl 130 mM, pH 7,4.

PBS/Tween: PBS, Tween 20 0,05% (Fluka Chemie).

Ponceau-S: Ponceau red 0,1%, ácido acético 10%.

Soluções de bloqueio: ELISA: (I) soro humano: leite desnatado 5% (Molico) dissolvido em PBS. (II) soro de camundongo: leite desnatado 5%, anbumina bovina (BSA) 2,5% (Sigma, Saint Louis, EUA), Tween 20 0,05%, dissolvidos em PBS. “Immunoblotting”: (III) soro de camundongo: leite desnatado 5%, BSA 2,5%, dissolvidos em PBS.

Solução corante: coomassie blue R250 1% (Sigma), metanol 45%, ácido acético 10%.

Solução descorante: etanol 45%, ácido acético 10%.

Soluções de revelação: ELISA: σ-Phenylenediamine (OPD, Sigma) 1 mg/mL, H₂O₂ 0,03%, diluídos em tampão fosfato-citrato. “Immunoblotting”: 3,3-Diaminobenzidina (DAB, Sigma) 5 mg, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 µL, diluídos em PBS.

Tampão carbonato 0,05 M: Na_2CO_3 0,015 M, 0,035 M, pH 9,6.

Tampão de amostra para SDS-PAGE (4X): glicerol 10%, SDS 4%, β -mercaptoetanol (β -ME) 100 mM (Bio-Rad, Hercules, EUA), Tris-HCl 50 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,1% (Bio-Rad).

Tampão de amostra para eletroforese de DNA (5X): azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25% (Sigma), glicerol 30%.

Tampão de corrida: SDS 35 mM, glicina 160 mM, Trizma base 25 mM, pH 8,3.

Tampão de transferência ("immunoblotting"): glicina 192 mM, Trizma base 25 mM, metanol 20%.

Tampão fosfato-citrato: NaH_2PO_4 0,2 M, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 0,2 M, pH 5,0.

Tampão de lise:

DBP:

- (1) Triton X-100 1%, lisozima 1 mg/mL e PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 0,1 mM, em PBS.
- (2) Tris-HCl pH 8,0 10 mM, EDTA 1 mM, lisozima 0,5 mg/mL, DNase I 0,1 mg/mL e CaCl_2 10 mM.
- (3) Na_2HPO_4 15 mM, KH_2PO_4 5,1 mM, NaCl 450 mM, pH 7,4, Sarcosyl 5% (Sigma).

AMA-1: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, EDTA 10 mM, PMSF 2 mM (Pierce), lisozima 200 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma).

Tampão de lavagem dos corpos de inclusão:

AMA-1: Tris-HCl 10 mM pH 8,0, CHAPS 0,5% (Pierce, Milwaukee, EUA).

Tampão de solubilização:

AMA-1: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, uréia 8 M (Invitrogen), glicerol 10%, pH 8,0.

Tampão de diluição:

DBP: Na₂HPO₄ 15 mM, KH₂PO₄ 5,1 mM, NaCl 450 mM, pH 7,4;

Tampão de equilíbrio (cromatografia de afinidade):

DBP: Na₂HPO₄ 15 mM, KH₂PO₄ 5,1 mM, NaCl 450 mM, pH 7,4, e Sarcosyl 1%.

AMA-1: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, uréia 8 M, glicerol 10%, imidazol 5 mM (USB, Cleveland, EUA), pH 8,0.

Tampão de lavagem (cromatografia de afinidade):

DBP: (I) Na₂HPO₄ 15 mM, KH₂PO₄ 5,1 mM, NaCl 450 mM, pH 7,4, Sarcosyl 0,1% e imidazol 5 mM (USB), (II) Na₂HPO₄ 20 mM, Sarcosyl 0,1% e imidazol 10 mM, pH 8,0.

AMA-1: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, uréia 8 M, glicerol 10%, imidazol 20 mM, pH 8,0.

Tampão de “refolding” (cromatografia de afinidade):

DBP: Na₂HPO₄ 20 mM, Sarcosyl 0,1%, Imidazol 10 mM, glicerol 20%, GSSG 0,5 mM (ICN, Aurora, EUA), GSH 5 mM (Sigma), pH 8,0.

AMA-1: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, glicerol 10%, Triton X-100 0,1% (Bio-Rad), imidazol 20 mM, GSSG 0,5 mM, GSH 5 mM, uréia (6 M, 4 M, 2 M, 1 M, 0,5 M ou sem uréia), pH 8,0.

Tampão de eluição (cromatografia de afinidade):

DBP: Na₂HPO₄ 20 mM, Sarcosyl 0,1%, glicerol 20%, GSSG 0,5 mM, GSH 5 mM, imidazol 200 mM, pH 8,0.

AMA-1: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, glicerol 10%, Triton X-100 0,1%, GSSG 0,5 mM, GSH 5mM, imidazol 300 mM, pH 8,0.

Tampão de diálise:

DBP: Na₂HPO₄ 20 mM, Sarcosyl 0,1%, DTT 10 mM (Invitrogen), glicerol 20%.

AMA-1: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, glicerol 50%, DTT 0,1 mM.

2.2. Meios de cultura.

LB (Luria Bertani): LB broth base 2% (USB), NaCl 0,5%, pH 7,0.

LB-Amp: LB, ampicilina (Sigma) 100 µg/mL.

RM: peptona 2%, sal M9 10X, glicose 0,2%, MgCl₂ 1 mM, ampicilina 100 µg/mL.

3. Construção dos plasmídios recombinantes.**3.1. Construção dos plasmídios recombinantes contendo o gene que codifica a região II da proteína DBP de *P. vivax*.**

A seqüência de nucleotídeos correspondente aos aminoácidos 194 a 521 de DBP (Região II, DBP-RII) foi obtida por PCR a partir do DNA genômico isolado de um paciente (BEL-12) infectado por *P. vivax*, procedente de Belém, Pará. A reação de PCR foi realizada com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição enzimática específicos (sublinhados) para clonagem nos vetores pHIS (SHEFFIELD *et al.*, 1999), pBAD/gIII A (Invitrogen) e pET-44a (Novagen). A proteína recombinante produzida a partir do vetor pET-44a caracteriza-se pela presença de uma seqüência adicional (NusA) de 601 aminoácidos na região N-terminal com o objetivo de aumentar a solubilidade da proteína e dois resíduos de His₆ para facilitar a purificação. Os oligonucleotídeos desenhados de forma a inserir a seqüência de interesse nos vetores de expressão acima citados foram: 5'-ATGGATCCGGATCATAAGAAAACGATC -3' (senso) e 5'-

TTTGAATTCTGTCACAACCTTCCTGAGT -3' (antisenso) (*Bam*HI/*Eco*RI), 5'-GAGCTCGAGGATCATAAGAAAACGATC -3' (senso) e 5'-TCGAATTCCTGTCACAACCTTCCTGAGT -3' (antisenso) (*Xho*I/*Eco*RI), 5'-CGTGGATCCGATCATAAGAAAACGATCTCT -3' (senso) e 5'-ACAGAATTCTGTCACAACCTTCCTGAGTATT -3' (antisenso) (*Bam*HI/*Eco*RI) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), respectivamente. As concentrações finais de cada um dos reagentes utilizados nas amplificações por PCR estão listados na Tabela 2. As condições de amplificação foram, para clonagem em (i) pHIS: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e 35 ciclos de PCR (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 46°C por 30 segundos, extensão a 68°C por 1 minuto) e uma extensão final a 68°C por 7 minutos, em (ii) pBAD/gIII A: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e 35 ciclos de PCR (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 48°C por 30 segundos, extensão a 68°C por 1 minuto) e uma extensão final a 68°C por 7 minutos, em (iii) pET-44a: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e 35 ciclos de PCR (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos, extensão a 68°C por 1 minuto) e uma extensão final a 68°C por 7 minutos. O produto de PCR foi clonado inicialmente no vetor pMOS com a utilização do "Blue blunt ended cloning kit" (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra) para análise da sequência do DNA e, posteriormente, nos vetores correspondentes para expressão em fusão com His₆. As amplificações dos genes correspondentes a DBP-RII para clonagem nos vetores de expressão pBAD/gIII A e pET-44a foram realizadas a partir do plasmídio recombinante pMOS-*dbp-rii*, construído previamente a partir de DNA genômico isolado do paciente BEL-12 para subclonagem no vetor pHIS.

TABELA 2
Sumário das condições de PCR utilizadas para amplificação do gene
***dbp-rll*.**

Reagentes	Vetores de Expressão		
	pHIS	pBAD	pET44a
Concentração final			
Tampão da Taq Platinum HiFi 10x	1x	1x	1x
dNTP Mix 10 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
MgSO ₄ 50 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Oligonucleotídeos senso	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM
Oligonucleotídeos antisenso	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM
DNA	2 µL (DNA genômico)	100 ng (DNA plasmidial) *	250 ng (DNA plasmidial) *
Platinum Taq HiFi	1 unidade	1 unidade	1 unidade

(*) DNA plasmidial: construção pMOS-*dbp-rll*.

3.2. Construção do plasmídio recombinante contendo o gene que codifica a proteína AMA-1 de *P. vivax*.

A seqüência de nucleotídeos correspondente aos aminoácidos 43 a 487 de AMA-1 foi obtida através da amplificação por PCR a partir do DNA genômico de um paciente (BEL-12) infectado por *P. vivax* procedente de Belém, Pará. A reação de PCR foi realizada com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição enzimática para as enzimas *Bam*HI e *Xho*I (sublinhado), específicos para clonagem no vetor pHIS. A amplificação foi realizada na presença dos seguintes reagentes: Tampão da Taq Platinum HiFi 1x, dNTP Mix 0,2 mM, MgSO₄ 2 mM, oligonucleotídeo senso 0,2 µM, oligonucleotídeo antisenso 0,2 µM, DNA genômico 4 µL e Platinum Taq HiFi 1 unidade (Invitrogen). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e 35 ciclos de PCR (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 48°C por 30 segundos, extensão a 68°C por 1 minuto e 30 segundos) e uma extensão final a 68°C por 7 minutos. Os

oligonucleotídeos utilizados foram os seguintes: 5'-ATGGATCCGCCTACCGTTGAGAGAAGC -3' (senso) e 5'-GCTCGAGTGTAGTAGCATCTGCTTGTT -3' (antisenso) (Invitrogen, São Paulo, Brasil). O produto de PCR foi clonado inicialmente no vetor comercial pMOS para análise da sequência do DNA e, posteriormente, no vetor pHIS para expressão em fusão com His₆ (RODRIGUES *et al.*, 2005).

4. Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos das proteínas correspondentes a DBP-RII (isolado BEL-12 e cepas Sal-1 e Belém).

O alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos correspondentes ao gene *dbp-rii* [isolado BEL-12, cepa Sal-1 (acesso M37514) e cepa Belém (acesso U50591)] foi realizado utilizando-se o programa MEGALIGN, DNASTAR versão 5.0 (DNASTAR Inc.) através do alinhamento Clustal W.

5. Obtenção das proteínas recombinantes para uso nos ensaios imunológicos *in vitro*.

As proteínas recombinantes derivadas da DBP-RII (BEL-12) (aminoácidos 194-521), AMA-1 (aminoácidos 43-487) e MSP1₁₉ (aminoácidos 1616-1704) de *P. vivax* foram produzidas em *Escherichia coli* cepa BL21 DE3 (Novagen, Madison, EUA) a partir dos vetores pHIS-*dbp-rii*, pHIS-*ama-1* (RODRIGUES *et al.*, 2005) e pET-14b-*mSP1*₁₉ (CUNHA *et al.*, 2001). O protocolo de expressão e purificação de cada uma das proteínas recombinantes será descrito detalhadamente nos próximos itens.

A proteína recombinante DBP-RII (Sal-1) expressa em *E. coli* (SINGH *et al.*, 2001, YAZDANI *et al.*, 2004) foi gentilmente cedida pelo Dr. Chetan Chitnis (Malaria Research Group, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Índia).

5.1. Proteína recombinante DBP-RII (BEL-12).

De acordo com o vetor de expressão utilizado, diferentes linhagens de bactérias foram testadas [BL21(DE3), LMG194, BL21 *trxB*(DE3), Rosetta(DE3) e Rosetta-gami(DE3)]. As bactérias transformadas com os respectivos plasmídios foram cultivadas em meio LB (vetores pHIS e pET-44a) ou RM (vetor pBAD/gIII A) na presença de antibiótico específico (de acordo com as exigências das diferentes cepas), por 16 horas a 37°C (Tabela 3). A seguir, a cultura foi diluída (1:50) em meio contendo os antibióticos correspondentes e incubada a 37°C até atingir uma absorbância (A_{600}) entre 0,6-0,8, seguido de indução com IPTG (Invitrogen, Auckland, Nova Zelândia) (vetores pHIS e pET-44a) ou L(+) arabinose (Sigma) (vetor pBAD/gIII A). Diferentes concentrações de IPTG (0,01 a 2 mM) ou L(+) arabinose (0,002% a 0,2%), tempo (3 a 18 horas), temperaturas de indução (18 a 37°C) e A_{600} (0,01 a 1,0) foram analisadas.

Após este período, as bactérias foram centrifugadas a 8.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o precipitado ressuspenso em tampão de lise (1), descrito anteriormente, para as bactérias transformadas com vetores pHIS e pET-44a ou tampão (2) para bactérias transformadas com vetores pBAD/gIII, seguido de incubação no gelo por 15 minutos. Posteriormente, as bactérias foram lisadas em banho de gelo por sonicação, 5 ciclos de 15 segundos (Branson Sonifier mod. 450, EUA). Os precipitados bacterianos e sobrenadantes foram analisados em SDS-PAGE 10% corado por azul de Coomassie e por "immunoblotting" utilizando anticorpo monoclonal anti-His (Amersham Biosciences).

Diversos protocolos de expressão, solubilização e purificação descritos na literatura foram avaliados (SINGH *et al.*, 2001, CHANG *et al.*, 2001, SAINI *et al.*, 2002, DUTTA *et al.*, 2002). Posteriormente a proteína recombinante DBP passou a ser expressa em *E. coli* BL21(DE3) a partir do vetor pHIS de acordo com DUTTA *et al.* (2002), com algumas modificações. Brevemente, as bactérias recombinantes foram cultivadas em meio LB com ampicilina (LB-Amp) por 16 horas a 37°C. A seguir, a cultura foi diluída

(1:50) e incubada a 37°C até atingir de A_{600} entre 0,4-0,6. As bactérias recombinantes foram induzidas com IPTG 0,01 mM por 16-18 horas à 18°C. Após este período, as bactérias foram centrifugadas à 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o precipitado ressuspendido em tampão de lise (3), previamente descrito, seguido de incubação no gelo por 15 minutos. As bactérias foram lisadas em banho de gelo com auxílio de um sonicador, 5 ciclos de 15 segundos, e centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Em seguida, precipitado e sobrenadante foram analisados por separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE 12%) utilizando equipamento "Mini PROTEAN® 3 cell" (Bio-Rad, Hercules, EUA), em condições redutoras, na presença de β -ME e coradas por azul de Coomassie.

Para a purificação das proteínas recombinantes, o sobrenadante obtido após solubilização foi diluído cinco vezes em tampão de diluição e aplicado em resina de Cobalto (BD TALON™) previamente equilibrada. Em seguida a resina foi lavada em duas etapas e, posteriormente com o tampão de "refolding". As proteínas foram eluídas no tampão de "refolding" acrescido de imidazol 200 mM, seguido de incubação por 40 minutos, sob agitação, a temperatura ambiente. Após centrifugação a 2.000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi coletado e o processo de eluição repetido por mais quatro vezes com incubações de 15 minutos. O material eluído foi analisado em SDS-PAGE a 12% e as frações contendo a proteína foram reunidas e dialisadas durante 16 horas a 4 °C.

Após diálise, a proteína purificada foi aplicada em SDS-PAGE 12% na presença ou não do agente redutor β -ME. Uma outra alíquota foi coletada após centrifugação de 30 minutos a 13.000 rpm e ambas as frações (precipitado e sobrenadante) analisadas na presença de β -ME com o objetivo de verificar a presença ou não de formação de precipitados.

A Tabela 3 apresenta um sumário das proteínas recombinantes correspondentes a DBP-RII e respectivas linhagens de bactérias testadas neste trabalho, assim como a massa molecular aparente das proteínas produzidas a partir de cada um dos vetores de expressão.

TABELA 3
Sumário das condições de obtenção das proteínas recombinantes
correspondentes a DBP-RII.

Vetor de expressão	Linhagem de <i>E. coli</i>	Antibiótico para seleção	Massa molecular aparente (kDa)
pBAD/gIII	LMG194	Amp	48
pHIS	BL21(DE3)	Amp	48
pET-44a	BL21(DE3)	Amp	102
pET-44a	BL21 <i>trxB</i>	Amp, Kan	102
pET-44a	Rosetta(DE3)	Amp, Clo	102
pET-44a	Rosetta-gami	Amp, Kan, Tetra, Clo	102

Amp = ampicilina (100 µg/mL), Kan = kanamicina (15 µg/mL), Clo = cloranfenicol (35 µg/mL), Tetra = tetraciclina (15 µg/mL)

5.2. Proteína recombinante AMA-1.

A proteína recombinante AMA-1 foi obtida de acordo com o protocolo descrito recentemente pelo nosso grupo (RODRIGUES *et al.*, 2005), com algumas modificações. Brevemente, as bactérias recombinantes *E. coli* linhagem BL21 (DE3) foram cultivadas em meio LB-Amp por 16 horas a 37°C. Após este período, a cultura foi diluída em uma razão de 1:50 em LB-Amp e incubada a 37°C até alcançar uma A_{600} entre 0,5-0,6. A seguir, foi adicionado IPTG 0,1 mM (Invitrogen) às bactérias, e estas induzidas por 3 horas. Após indução, o material foi centrifugado por 15 minutos a 8.000 rpm a 4°C.

Posteriormente, o precipitado foi dissolvido em tampão de lise acompanhado de incubação em banho de gelo, por 5 minutos. As bactérias foram lisadas com auxílio de um sonicador utilizando-se 3 ciclos de 30 segundos, em banho de gelo. Em seguida, as bactérias foram precipitadas

por centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. As frações obtidas, sobrenadante e precipitado, foram avaliadas em SDS-PAGE 12% na presença β -ME.

Inicialmente, a proteína detectada no precipitado na forma de agregados insolúveis, passou por duas lavagens. Posteriormente, o material foi solubilizado durante incubação de 2 horas, em banho de água a 37°C. Na seqüência, como acima exposto, o material foi centrifugado e a eficácia da solubilização foi avaliada em SDS-PAGE 12%.

A fração contendo a proteína solubilizada foi aplicada lentamente, por duas vezes, em resina de cobalto equilibrada previamente com tampão de equilíbrio. Após esta etapa, a resina foi lavada com o mesmo tampão. Em seguida, a resina foi lavada novamente com tampão de "refolding" contendo concentrações decrescentes de uréia. Na etapa de eluição da proteína, a resina foi incubada com o tampão de "refolding" sem o agente desnaturante, uréia, acrescida de imidazol 300 mM. Após eluição, o produto obtido foi analisado em SDS-PAGE 12% e, em seguida, submetido a diálise durante 16 horas, a 4°C, sob agitação. O método de BRADFORD (1976) foi utilizado a fim de verificarmos a concentração da proteína obtida.

5.3. Proteína recombinante MSP1₁₉.

A expressão e purificação da proteína recombinante MSP1₁₉ foi realizada conforme descrito anteriormente por CUNHA *et al.* (2001). A proteína MSP1₁₉ vem sendo produzida em nosso laboratório pela estudante de doutorado Maria Carolina Sarti Jimenez.

As informações sobre as proteínas recombinantes (seqüência de aminoácidos e vetores de expressão) utilizadas nos ensaios sorológicos estão apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4

Sumário das proteínas recombinantes derivadas de DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉ de *P. vivax* utilizadas nos ensaios sorológicos.

Proteína recombinante	Aminoácidos	Vetor de expressão
DBP-RII (BEL-12)	194-521	pHIS/pBAD/gIII A/pET44a
DBP-RII (Sal-1)	194-521	pET28a
AMA-1	43-487	pHIS (pET-22b)
MSP1 ₁₉	1616-1704	pET-14b

6. Imunização de camundongos para obtenção de soro policlonal anti-DBP-RII (cepa Sal-1).

Quatro camundongos, fêmeas, da linhagem BALB/c foram imunizados com 10 µg da proteína recombinante DBP-RII (Sal-1) emulsificada em adjuvante completo de Freund na base da cauda, por via subcutânea. Os animais, após três semanas, receberam um reforço com 10 µg da mesma proteína emulsificada em adjuvante incompleto de Freund, injetado como anteriormente, na base da cauda. Os animais foram sangrados pela veia caudal quinze dias após a primeira e segunda dose. O soro foi separado logo após o sangue ser centrifugado, e então estocado a -20°C até ser utilizado. Estes soros foram produzidos com o objetivo de serem utilizados na detecção das proteínas produzidas em bactérias e/ou leveduras por “immunoblotting”.

7. “Immunoblotting” para detecção da proteína recombinante DBP-RII (BEL-12) produzida em *E. coli*.

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (NC) (Hybond N, Amersham Biosciences) a 100 V por 1 hora usando equipamento “Mini Trans-Blot” (Bio-Rad). A eficiência da transferência foi avaliada pela coloração das membranas de NC com Ponceau-S.

As membranas de NC foram incubadas durante 16 horas a 4°C em solução de bloqueio. Após este período, as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo policlonal anti-DBP-RII (Sal-1) diluído 1:250 em solução de bloqueio. Após três lavagens de 10 minutos com PBS/Tween 20 foi realizada uma incubação por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (específico para a porção Fab da IgG, Sigma) diluído 1:1.000 e a revelação feita com DAB (3,3-Diaminobenzidina, Sigma) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em PBS e/ou Quimioluminescência utilizando o kit “ECL Western Blotting Analysis System” (Amersham Biosciences).

8. Ensaio imunoenzimático.

A detecção de anticorpos IgG anti-DBP-RII foi feita por ELISA conforme descrito por RODRIGUES *et al.* (2003, 2005). A concentração da proteína recombinante foi ajustada para 4 µg/mL em tampão carbonato 0,05 M pH 9,6 e, em seguida, 50 µL por poço foram adicionados a placa de 96 poços (High binding, Costar). Após incubação durante 16 horas à temperatura ambiente, a placa foi lavada cinco vezes com PBS/Tween 20 e incubada em solução de bloqueio por 2 horas a 37°C. Inicialmente as amostras (soro ou plasma) foram diluídas 1:100 em solução de bloqueio. Em seguida, 50 µL de cada amostra foram adicionados por poço, em duplicata. As placas foram novamente incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem das placas com PBS/Tween 20, uma outra

incubação foi realizada por 1 hora com 50 μ L por poço de uma solução contendo IgG de cabra anti-IgG humano conjugado a peroxidase (específico para a porção Fc de IgG, Sigma) diluído 1:16.000 em solução de bloqueio. A reação enzimática foi revelada pela adição OPD diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo H_2O_2 . A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μ L de uma solução contendo H_2SO_4 4 N. A absorbância (A) foi determinada em um leitor de microplacas (SLT SPECTRA, Labinstruments) usando comprimento de onda de 492 nm (A_{492}).

A absorbância discriminante entre os resultados positivos e negativos ("cutoff") foi estabelecida pela média das absorbâncias produzidas por amostras de 40 indivíduos sem história clínica de malária (descrito anteriormente), acrescida de três desvios padrão. As amostras com A_{492} acima do "cutoff" foram posteriormente testadas em diluições seriadas até a diluição de 1:102.400 com finalidade de determinar o título de anticorpos IgG para cada uma das proteínas recombinantes. O título foi estabelecido como sendo a última diluição que apresentava a A_{492} acima de 0,1.

Os resultados foram expressos em Índice de Reatividade (IR), calculado dividindo-se a A_{492} de cada amostra pelo valor do cutoff, sendo os soros com $IR \geq 1$ considerados positivos.

9. Análise estatística.

As proporções de soros positivos foram comparadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2) em tabelas de contingência (2x2), com correção de Yates através do programa de computador GraphPad Prism 4.0. A comparação entre os títulos de anticorpos foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis através do programa de computador GraphPad Prism 4.0. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

IV. Resultados

1. Obtenção do gene que codifica a região II da proteína DBP de *P. vivax*.

A sequência de nucleotídeos correspondente aos aminoácidos 194 a 521 de DBP foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico de um paciente (BEL-12) infectado por *P. vivax* procedente de Belém, Pará. O produto de PCR foi inserido no vetor comercial pMOS e a sequência que codifica a região II da proteína DBP foi confirmada através de seqüenciamento do DNA. A comparação entre as seqüências de aminoácidos do isolado BEL-12 com seqüências de aminoácidos de cepas previamente descritas [Sal-1 (FANG *et al.*, 1991), acesso M61095; Belém (AMPUDIA *et al.*, 1996), acesso U50591], mostrou que estas apresentam uma elevada percentagem de identidade, sendo de 97,3% para BEL-12 x Sal-1, 99,3% entre BEL-12 x Belém, e 97,2% para Belém x Sal-1 (Figura 6).

2. Construção dos plasmídios recombinantes.

2.1. Construção do plasmídio recombinante contendo o gene que codifica a proteína DBP-RII de *P. vivax*.

Três plasmídios recombinantes correspondentes à região II de DBP foram gerados como descrito em Material e Métodos. Os plasmídios obtidos foram transformados em *E. coli* (DH5- α) competentes e os clones recombinantes que apresentavam os insertos na orientação correta foram selecionados por restrição enzimática.

2.2. Construção do plasmídio recombinante contendo o gene que codifica a proteína AMA-1 de *P. vivax*.

A sequência de nucleotídeos correspondente aos aminoácidos 43 a 487 de AMA-1 foi obtida através da amplificação por PCR a partir do DNA genômico de um paciente (BEL-12) infectado por *P. vivax* procedente de

Belém, Pará. O produto de PCR foi clonado inicialmente no vetor comercial pMOS para análise da sequência do DNA e, posteriormente, no vetor pHIS para expressão em fusão com His₆ (RODRIGUES *et al.*, 2005).

		*	20	*	40	*	60																			
BEL-12	:	DHK	TISSAI	INHAF	LQNTVMKNC	NYKRKR	RRERD	WD	CNTKKD	VCI	PD	RRYQ	LC	MKEL	TNL	:	60									
Sal-1	:	DHK	TISSAI	INHAF	LQNTVMKNC	NYKRKR	RRERD	WD	CNTKKD	VCI	PD	RRYQ	LC	MKEL	TNL	:	60									
Belém	:	DHK	TISSAI	INHAF	LQNTVMKNC	NYKRKR	RRERD	WD	CNTKKD	VCI	PD	RRYQ	LC	MKEL	TNL	:	60									
		*	80	*	100	*	120																			
BEL-12	:	VNNTD	TNFHSD	ITFRKL	YLKRKL	IYDAA	VEGD	LL	KLNNY	RYNKD	FC	KDIR	WSL	GDF	GDI	:	120									
Sal-1	:	VNNTD	TNFHSD	ITFRKL	YLKRKL	IYDAA	VEGD	LL	KLNNY	RYNKD	FC	KDIR	WSL	GDF	GDI	:	120									
Belém	:	VNNTD	TNFHSD	ITFRKL	YLKRKL	IYDAA	VEGD	LL	KLNNY	RYNKD	FC	KDIR	WSL	GDF	GDI	:	120									
		*	140	*	160	*	180																			
BEL-12	:	IMG	TDMEG	IGYSE	VVENN	LSIFG	TGKNA	QORR	KQW	WNE	SKAQ	IWT	AM	YSV	KKRL	KGKF	:	180								
Sal-1	:	IMG	TDMEG	IGYSE	VVENN	LSIFG	TGKNA	QORR	KQW	WNE	SKAQ	IWT	AM	YSV	KKRL	KGKF	:	180								
Belém	:	IMG	TDMEG	IGYSE	VVENN	LSIFG	TGKNA	QORR	KQW	WNE	SKAQ	IWT	AM	YSV	KKRL	KGKF	:	180								
		*	200	*	220	*	240																			
BEL-12	:	IWICK	IN	VA	NIEP	QIYR	RI	EW	GRD	YV	SEL	P	TE	VQ	KL	RE	KD	GK	IN	YTD	KK	VCK	VPP	PCQ	:	240
Sal-1	:	IWICK	IN	VA	NIEP	QIYR	RI	EW	GRD	YV	SEL	P	TE	VQ	KL	RE	KD	GK	IN	YTD	KK	VCK	VPP	PCQ	:	240
Belém	:	IWICK	IN	VA	NIEP	QIYR	RI	EW	GRD	YV	SEL	P	TE	VQ	KL	RE	KD	GK	IN	YTD	KK	VCK	VPP	PCQ	:	240
		*	260	*	280	*	300																			
BEL-12	:	NACKS	YDQ	WIT	TRKNQ	WD	VLS	NKF	IS	VKNAE	KV	Q	TAG	I	V	T	P	YD	IL	KQEL	DE	FNE	VAF	ENE	:	300
Sal-1	:	NACKS	YDQ	WIT	TRKNQ	WD	VLS	NKF	IS	VKNAE	KV	Q	TAG	I	V	T	P	YD	IL	KQEL	DE	FNE	VAF	ENE	:	300
Belém	:	NACKS	YDQ	WIT	TRKNQ	WD	VLS	NKF	IS	VKNAE	KV	Q	TAG	I	V	T	P	YD	IL	KQEL	DE	FNE	VAF	ENE	:	300
		*																								
BEL-12	:	INK	R	D	G	A	Y	I	E	L	C	V	C	S	V	:	316									
Sal-1	:	INK	R	D	G	A	Y	I	E	L	C	V	C	S	V	:	316									
Belém	:	INK	R	D	G	A	Y	I	E	L	C	V	C	S	V	:	316									

Figura 6. Múltiplo alinhamento Clustal W das seqüências preditas de aminoácidos de *dbp-rii* (isolado BEL-12) e das cepas previamente descritas: Belém e Salvador (Sal-1).

3. Obtenção das proteínas recombinantes

3.1. Expressão e purificação da proteína recombinante DBP-RII (BEL-12).

A proteína recombinante DBP-RII foi detectada sob forma insolúvel, em bom nível de expressão, a partir dos diferentes vetores e linhagens de bactérias testadas (dados não mostrados). Desta forma, optamos pela utilização do vetor de expressão pHIS a partir da cepa BL21(DE3), pela simplicidade do sistema em relação aos demais.

Os corpos de inclusão foram solubilizados em paralelo na presença de três agentes desnaturantes conforme descrito no item Material e Métodos. Observamos que na presença do detergente Sarcosyl 5% os corpos de inclusão foram solubilizados de forma eficiente (Figura 7A).

Figura 7. Etapas de solubilização e purificação da proteína DBP-Ril (BEL-12) expressa em *E. coli* BL21(DE3) a partir do vetor pHIS. (A) Precipitado bacteriano após solubilização da proteína: 1. sobrenadante do precipitado solubilizado, 2. precipitado pós-solubilização. **(B)** Diferentes etapas do processamento do sobrenadante do precipitado solubilizado: 1. sobrenadante da fração não ligada, 2. sobrenadante da 1ª lavagem com imidazol 5 mM, 3. sobrenadante da 2ª lavagem - imidazol 10 mM, 4. sobrenadante da 1ª eluição, 5. sobrenadante da 2ª eluição. SDS-PAGE a 12% corado com azul de Coomassie.

Para efeito de purificação em resina de Cobalto, o sobrenadante contendo a proteína após solubilização foi diluído a uma concentração final de Sarcosyl 1%. Este material foi aplicado na resina, seguido de uma tentativa de “refolding” parcial caracterizado por uma lavagem de remoção do agente desnaturante na presença de GSSG 0,5 mM e GSH 5 mM e posteriormente eluída com imidazol 200 mM (Figura 7B).

Com intuito de avaliarmos se a proteína obtida estava sob forma agregada ou não, submetemos a mesma a um SDS-PAGE em condições redutoras, na presença do agente β -ME, e não redutoras. Constatamos através do padrão de migração, que a proteína recombinante aparentemente não estava sob forma agregada (Figura 8A).

Figura 8. Análise da proteína recombinante DBP-RII purificada. (A) Avaliação do padrão de migração da proteína recombinante DBP-RII em condições redutoras ou não 1. sobrenadante da fração eluída na presença de β -ME, 2. sobrenadante da fração eluída sem o agente redutor β -ME. SDS-PAGE a 12% corado com azul de Coomassie. **(B)** Reconhecimento imune da proteína recombinante DBP-RII por anticorpo policlonal de camundongos imunizados com DBP-RII Sal-1: 1. DBP-RII BEL-12, com β -ME, 2. DBP-RII cepa Sal-1, com β -ME, 3. DBP-RII BEL-12, sem β -ME, 4. DBP-RII Sal-1, sem β -ME.

3.2. Expressão e purificação da proteína recombinante AMA-1.

A proteína recombinante foi obtida a partir da construção pHIS/AMA-1 em *E. coli* cepa BL21(DE3). A análise das frações, precipitado e sobrenadante, após expressão demonstraram que a proteína recombinante AMA-1 encontrava-se na forma de agregados insolúveis e com massa molecular aparente de 66 kDa. Os processos de solubilização dos corpos de inclusão e purificação de AMA-1 foram realizados de acordo com o protocolo descrito recentemente pelo nosso grupo com algumas modificações (RODRIGUES *et al.*, 2005).

3.3. Obtenção da proteína recombinante MSP1₁₉.

A proteína recombinante MSP1₁₉ tem sido produzida rotineiramente em nosso laboratório (CUNHA *et al.*, 2001) e já estava disponível para este estudo.

4. Avaliação comparativa do reconhecimento imune das duas proteínas recombinantes correspondentes a DBP-RII.

Inicialmente, avaliamos o reconhecimento da proteína DBP-RII por “immunoblotting” utilizando soro policlonal de camundongos imunizados com DBP-RII (Sal-1). Como demonstrado na Figura 8B, a proteína recombinante DBP-RII foi reconhecida pelo anticorpo policlonal anti-DBP-RII em condições redutoras e não redutoras.

Inicialmente avaliamos os resultados da reatividade de 20 soros de pacientes infectados pelo *P. vivax*, procedentes de Tailândia, Estado do Pará, contra a proteína recombinante DBP-RII BEL-12 produzida em *E. coli*. Verificamos que uma percentagem muito baixa de indivíduos apresentaram anticorpos IgG contra esta proteína (15%), dados não mostrados. Estes resultados sugeriram que a proteína recombinante obtida nas condições descritas anteriormente provavelmente não apresenta a conformação apropriada. Isto pode ser devido à presença de Sarcosyl e DTT que foram mantidos, ainda que em baixas concentrações, na etapa final de obtenção da proteína.

Por outro lado, vários estudos têm demonstrado que a proteína recombinante DBP-RII Sal-1 que nos foi cedida pelo Dr. Chetan Chitnis está na sua conformação funcional (SINGH *et al.*, 2001, YAZDANI *et al.*, 2004). Com base nesta informação, resolvemos realizar uma análise comparativa da reatividade de soros de 50 indivíduos com malária patente causada por *P. vivax*, procedentes de Belém, contra as proteínas recombinantes correspondentes a DBP-RII (cepa Sal-1 e isolado BEL-12). Os soros foram

testados por ELISA quanto à presença de anticorpos IgG anti-DBP-RII específicos.

A frequência de respondedores para ambas as proteínas foi semelhante, tendo sido de 12% para a DBP, isolado BEL-12, e 20% para DBP, cepa Sal-1. Entretanto, quando analisamos a correlação entre o reconhecimento imune de ambas as proteínas recombinantes por anticorpos IgG, observamos que o coeficiente de determinação (r^2) obtido foi muito baixo ($r^2 = 0,12$), sugerindo que os epítomos reconhecidos em ambas as proteínas são distintos (Figura 9). A partir destes dados, nos concentramos no estudo da antigenicidade da proteína DBP-RII (Sal-1). Para efeito de comparação, as proteínas recombinantes AMA-1 e MSP1₁₉ foram também analisadas.

Figura 9. Comparação do reconhecimento imune das proteínas recombinantes derivadas de DBP por anticorpos IgG de 50 indivíduos infectados por *P. vivax*. O gráfico representa a reatividade destes soros contra as duas proteínas recombinantes representando a DBP-RII (Sal-1 e BEL-12). Os soros foram testados em duplicata na diluição final de 1:100 e cada símbolo representa a média das A_{492} . O coeficiente de determinação (r^2) está indicado no painel. As linhas tracejadas correspondem aos cutoff obtidos por ELISA para cada proteína recombinante, sendo de 0,510 e 0,465 para DBP-RII Sal-1 e BEL-12, respectivamente.

5. Avaliação comparativa do reconhecimento imune das proteínas recombinantes derivadas de DBP-RII (Sal-1), AMA-1 e MSP1₁₉ por anticorpos de indivíduos infectados por *P. vivax*.

As proteínas recombinantes correspondentes a DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉ foram comparadas, por ELISA, quanto ao reconhecimento por anticorpos IgG de 160 pacientes infectados pelo *P. vivax* procedentes de duas áreas endêmicas do Estado do Pará, Belém e São Jorge.

A frequência total de indivíduos infectados por *P. vivax* que apresentaram anticorpos IgG contra cada uma das proteínas recombinantes foi de 15,6%, 50% e 93,1% para DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉, respectivamente (Tabela 5). Utilizando-se o teste do qui-quadrado,

verificamos que a proporção de indivíduos respondedores para a proteína recombinante MSP1₁₉ foi significativamente maior do que as proporções obtidas para as proteínas recombinantes DBP-RII ($P<0,05$) e AMA-1 ($P<0,05$). A proporção de indivíduos respondedores para a proteína recombinante AMA-1 foi significativamente maior do que a proporção de indivíduos respondedores para DBP-RII ($P<0,05$).

A frequência de indivíduos procedentes de Belém, que apresentaram anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉ durante a infecção foi de 27,3%, 64,9% e 87%, respectivamente (Tabela 5 e Figura 10). Observamos que a proporção de respondedores para a proteína MSP1₁₉ foi significativamente maior quando comparada com as proporções obtidas para as proteínas recombinantes DBP-RII ($P<0,05$) e AMA-1 ($P<0,05$). De forma semelhante, houve diferença estatisticamente significativa entre a proporção de indivíduos respondedores para DBP-RII e AMA-1 ($P<0,05$), sendo significativamente maior para AMA-1.

A percentagem de respondedores procedentes de São Jorge que apresentaram anticorpos IgG durante a infecção contra as proteínas recombinantes DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉ foi de 4,8%, 36,2% e 98,8%, respectivamente (Tabela 5 e Figura 10). Observamos que a proporção de indivíduos respondedores para a proteína MSP1₁₉ foi significativamente maior quando comparado com as proporções obtidas para as proteínas recombinantes DBP-RII ($P<0,05$) e AMA-1 ($P<0,05$). Quando comparamos as proporções de respondedores para DBP-RII e AMA-1, observamos que a proporção de indivíduos respondedores para AMA-1 foi significativamente maior ($P<0,05$).

A comparação dos valores de Índices de Reatividade (IR) das amostras de soros dos indivíduos mostrou que os valores obtidos para a proteína recombinante MSP1₁₉ foram significativamente maiores do que os observados para AMA-1 e os valores para esta foram maiores do que os obtidos para DBP-RII (Tabela 5, $P<0,001$ para cada comparação, Kruskal-Wallis test). Quando comparamos os IR das amostras de soros dos indivíduos obtidos para as proteínas recombinantes DBP-RII, AMA-1 e

MSP1₁₉ em ambas as áreas endêmicas em estudo, verificamos que houve diferença estatisticamente significativa somente para AMA-1 ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis test), sendo que, para as amostras de soros de Belém observamos os maiores valores de IR em relação ao grupo em estudo de São Jorge.

Figura 10. Análise comparativa da reatividade de soros de indivíduos com malária patente causada por *P. vivax* contra três proteínas recombinantes, DBP-RII (Sal-1), AMA-1 e MSP1₁₉. Soros de 77 indivíduos, procedentes de Belém e soros de 83 indivíduos, procedentes de São Jorge, foram analisados quanto à presença de anticorpos IgG específicos por ELISA. Os soros foram testados na diluição 1:100, em duplicata.

TABELA 5

Análise da reatividade dos soros de indivíduos com malária causada por *P. vivax* procedentes de duas áreas endêmicas do Estado do Pará contra as proteínas recombinantes DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉.

Área de estudo		Proteínas Recombinantes		
		DBP-RII	AMA-1	MSP1 ₁₉
Belém n=77	Positividade (%)	27,3	64,9	87
	IR	0,68	3,5	11,01
	IC 95%	0,39 - 0,98	2,60 - 4,31	9,73 - 12,30
São Jorge n=83	Positividade (%)	4,8	36,2	98,8
	IR	0,13	1,3	11,8
	IC 95%	-0,006 - 0,26	0,75 - 1,85	11,10 - 12,42
TOTAL	Positividade (%)	15,6	50	93,1

Os valores de cutoff para cada proteína recombinante foram: DBP: 0,523, AMA-1: 0,225, MSP1₁₉: 0,200. Os resultados estão expressos em Índice de Reatividade (IR), determinado pelo cálculo: IR= valores de A₄₉₂ de cada amostra testada / pelo cutoff, descrito acima, com Intervalo de Confiança (IC) de 95%. (n): número de amostras testadas.

6. Análise do efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos anti-DBP-RII, anti-AMA-1 e anti-MSP1₁₉.

Visando avaliar se a frequência de respondedores contra as proteínas recombinantes DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉ aumenta de acordo com o número de episódios prévios de malária, 150 indivíduos que informaram o número de episódios prévios de malária causada por *P. vivax* procedentes de Belém e São Jorge foram divididos em dois grupos: i) primoinfectados

(n=123) e ii) indivíduos que tiveram um ou mais episódios prévios de malária *vivax* (n=27).

Na Figura 11 pode ser observado que as proporções de indivíduos que apresentam anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes DBP-RII e AMA-1 aumentam significativamente com o maior número de exposições prévias à malária ($P<0,05$). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre as proporções de respondedores contra a MSP1₁₉ nos dois grupos estudados ($P>0,05$). É importante ressaltar que a percentagem de respondedores contra a MSP1₁₉ no grupo primoinfectado já é bastante alta (91,1%).

7. Comparação da longevidade da resposta de anticorpos do tipo IgG de indivíduos expostos à malária contra as proteínas recombinantes representando a DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉.

Com intuito de avaliar a persistência da resposta de anticorpos contra as proteínas recombinantes DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉ de *P. vivax* após o tratamento contra a malária, comparamos a reatividade dos soros de indivíduos de Belém (n=35) e São Jorge (n=32), dos quais foram coletadas duas amostras de soro. A primeira amostra de soro foi coletada durante a infecção patente por *P. vivax*, confirmada por análise de microscopia, e antes do início do tratamento quimioterápico. Após dois meses do tratamento para os indivíduos procedentes de Belém, e nove meses, para os indivíduos de São Jorge, foi realizada a segunda coleta de soro. As amostras coletadas foram analisadas quanto à frequência e títulos de anticorpos IgG contra cada proteína recombinante em estudo.

Figura 11. Análise comparativa da resposta imune de indivíduos com infecção patente quanto à frequência de episódios prévios de malária contra as proteínas recombinantes DBP-RII, AMA-1 e MSP1₁₉. Foram analisadas 150 amostras de soro de indivíduos procedentes de Belém e São Jorge, quanto à presença de anticorpos IgG específicos por ELISA. Todos os soros foram testados em duplicata na diluição final de 1:100. (*) $P < 0,05$.

Como podemos observar na Figura 12A, durante a infecção patente, a frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos específicos contra cada um dos recombinantes não foi significativamente mais alta do que 60 dias após o tratamento ($P > 0,05$, em todos os casos). O mesmo foi observado quanto à frequência de respondedores procedentes de São Jorge com relação às proteínas recombinantes DBP-RII e AMA-1 ($P > 0,05$, em ambos os casos). Por outro lado, durante a infecção, a frequência de indivíduos procedentes de São Jorge que apresentaram anticorpos específicos para MSP1₁₉ foi significativamente maior do que nove meses após o tratamento ($P < 0,05$) (Figura 12B).

A Figura 13 apresenta os títulos de anticorpos IgG ($\log_{10}$) dos indivíduos respondedores contra cada uma das três proteínas recombinantes. Quando os títulos de anticorpos dos indivíduos das duas áreas endêmicas que reconheceram a proteína recombinante DBP-RII foram comparados observamos que estes não diminuíram significativamente após o tratamento em ambas as áreas endêmicas estudadas (Figura 13A, Kruskal-Wallis $P > 0,05$). Resultados similares foram obtidos com a proteína

recombinante AMA-1 (Figura 13B, $P>0,05$). Por outro lado, quanto à proteína MSP1₁₉ observamos que durante a infecção patente os títulos de anticorpos foram significativamente mais altos do que os títulos observados 9 meses após o tratamento somente nos indivíduos de São Jorge (Figura 13C, $P<0,05$). Para os indivíduos de Belém não houve diferença significativa entre os títulos de anticorpos dos pacientes com infecção patente e 2 meses após o tratamento (Figura 13C, $P>0,05$).

Figura 12. Avaliação comparativa da longevidade da resposta de anticorpos específicos para as proteínas recombinantes DBP-R11, AMA-1 e MSP1₁₉ em indivíduos com infecção patente e após o tratamento. (A) Foram analisadas 35 amostras de soro de indivíduos, procedentes de Belém, durante a infecção e dois meses após o tratamento, **(B)** Analisamos 32 amostras de soro de indivíduos de São Jorge, durante a infecção e nove meses após o tratamento. (*) $P < 0,05$.

Figura 13. Avaliação comparativa dos títulos de anticorpos obtidos contra cada uma das proteínas recombinantes durante a infecção e após o tratamento. Sessenta e sete amostras de soro foram analisadas quanto à presença de anticorpos IgG específicos contra as proteínas recombinantes DBP-R11 (A), AMA-1 (B) e MSP1₁₉ (C), por ELISA. Foram utilizados soros de indivíduos procedentes de Belém e São Jorge, durante a infecção e dois ou nove meses após o tratamento, respectivamente. Os indivíduos não respondedores estão representados na figura com títulos de anticorpos correspondentes a $\log_{10} = 1,0$.

Dentre os indivíduos procedentes de Belém respondedores para DBP-RII (Figura 14A), 8,6% tornaram-se sorologicamente negativos com uma redução em títulos de anticorpos de até 8 vezes, 2,9% tiveram seus títulos reduzidos e 5,7% dos indivíduos mantiveram os títulos de anticorpos. A análise dos indivíduos de São Jorge (Figura 14B) mostra que dos indivíduos que responderam para DBP-RII, 6,2% tornaram-se negativos. Por outro lado, dos não respondedores durante a infecção, 6,2% tornaram-se sorologicamente positivos nove meses após o início do tratamento.

Dos respondedores para AMA-1, procedentes de Belém (Figura 15A), 22,9% tornaram-se negativos dois meses após o tratamento, enquanto que, em 20% dos indivíduos houve aumento dos títulos de anticorpos de 2 a 16 vezes. O mesmo intervalo, de 2 a 16 vezes, é observado nos 22,9% de indivíduos com redução nos títulos de anticorpos. Os indivíduos que mantiveram os títulos de anticorpos correspondem a 5,7%.

Na população procedente de São Jorge (Figura 15B) verificamos que, 25% dos pacientes passaram a ser sorologicamente negativos em relação aos anticorpos para AMA-1. No entanto, 18,8% dos indivíduos apresentaram aumento nos títulos, com variação de 4 a 128 vezes. Somente em 3,1% ocorreu redução dos títulos, bem como a manutenção dos mesmos em 3,1% dos pacientes.

Quando avaliamos os indivíduos respondedores para MSP1₁₉, verificamos que na população procedente de Belém (Figura 16A), 5,7% dos indivíduos tornaram-se negativos, enquanto, 22,9% apresentaram aumento nos títulos de até 32 vezes. Contudo, houve redução de até 64 vezes nos títulos de anticorpos de 57,1% dos pacientes e apenas 14,3% dos indivíduos mantiveram os títulos de anticorpos dois meses após o início do tratamento quimioterápico.

No mesmo estudo, utilizando a população de São Jorge (Figura 16B), observamos que 40,6% dos indivíduos passaram a ser sorologicamente negativos, em 12% ocorreu aumento dos títulos e 46,9% apresentaram diminuição nos títulos de anticorpo, com variação de 2 a 512 vezes, após nove meses do início do tratamento.

Figura 14. Avaliação comparativa dos títulos de anticorpos obtidos para DBP-RII durante a infecção e após o tratamento. (A) Belém e (B) São Jorge.

Figura 15. Avaliação comparativa dos títulos de anticorpos obtidos para AMA-1 durante a infecção e após o tratamento. (A) Belém e (B) São Jorge.

Figura 16. Avaliação comparativa dos títulos de anticorpos obtidos para MSP1₁₉ durante a infecção e após o tratamento. (A) Belém e (B) São Jorge.

V. Discussão

O objetivo inicial deste estudo foi obter um recombinante bacteriano correspondente a Proteína de Ligação ao Duffy (DBP) do merozoíta de *P. vivax* para estudos imunoepidemiológicos utilizando soros de indivíduos expostos à malária *vivax* procedentes de áreas endêmicas do Estado do Pará. Com este fim, amplificamos o gene que codifica para o domínio funcional da proteína DBP (DBP-RII), a partir de um paciente infectado por *P. vivax* procedente de Belém (BEL-12). O alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos do isolado BEL-12 e das cepas Belém e Sal-1, revelou uma identidade de 97,3% entre BEL-12 e Sal-1, 99,3% entre BEL-12 e Belém (Figura 6). Como podemos observar, a seqüência de aminoácidos do isolado BEL-12 apresenta uma elevada percentagem de identidade com as cepas previamente descritas, Belém e Sal-1. Resultados semelhantes foram obtidos por outros grupos que verificaram elevada similaridade das seqüências de nucleotídeos correspondentes a DBP de isolados da Coréia quando comparados com as seqüências de nucleotídeos das cepas Belém, Sal-1, isolados da Colômbia e Papua Nova Guiné (SUH *et al.*, 2001).

Utilizando três diferentes plasmídios bacterianos, conseguimos expressar proteínas recombinantes correspondentes a DBP-RII a partir do isolado BEL-12. Do ponto de vista da expressão, todos os vetores geraram proteínas recombinantes insolúveis, sob forma de corpos de inclusão, fato que é muito comum ocorrer com proteínas de *Plasmodium*, quando produzidas a partir de *E. coli*. Desta forma, optamos por expressar a proteína a partir do vetor pHIS, em fusão com cauda de histidina. A proteína produzida a partir deste vetor foi solubilizada na presença do detergente Sarcosyl e purificada por cromatografia de afinidade, após “refolding”. Em paralelo, contatamos o Dr. Chetan Chitnis e solicitamos que nos cedesse a proteína recombinante PvRII (DBP-RII Sal-1), a qual tem sido produzida em seu laboratório com sucesso a partir de *E. coli* (SINGH *et al.*, 2001, YAZDANI *et al.*, 2004) para que pudéssemos realizar estudos comparativos de antigenicidade utilizando as duas proteínas recombinantes.

Por “immunoblotting” utilizando soro policlonal de camundongo anti-DBP-RII (Sal-1), observamos que a proteína recombinante que produzimos

foi especificamente reconhecida em condições redutoras e não redutoras (Figura 8B). Em contraste, uma análise comparativa do reconhecimento imune de ambas as proteínas por ELISA utilizando 50 soros de indivíduos infectados por *P. vivax* mostrou um coeficiente de determinação muito baixo ($r^2=0,12$, Figura 9), sugerindo que, provavelmente, os epítomos reconhecidos em ambas as proteínas são distintos. A razão precisa para tal discrepância ainda é desconhecida, mas estes resultados podem significar que o “refolding” da proteína que produzimos não foi feito de forma apropriada ou que os epítomos presentes na proteína DBP-RII (Sal-1) são mais semelhantes aos expostos na proteína nativa durante a infecção natural no homem. A partir destes dados, nos concentramos no estudo da antigenicidade da proteína DBP-RII (Sal-1).

Na segunda parte deste trabalho caracterizamos e comparamos a resposta de anticorpos IgG anti-DBP-RII de 160 indivíduos expostos à malária procedentes de duas áreas endêmicas do Estado do Pará (Belém e São Jorge). Para efeito de comparação, utilizamos também duas proteínas recombinantes representando diferentes antígenos de merozoítas de *P. vivax* AMA-1 e MSP1₁₉. Inicialmente, confirmamos que durante a infecção patente por *P. vivax* a frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes correspondentes a AMA-1 e MSP1₁₉ foi alta (50 e 93,1%, respectivamente) (Tabela 5). Uma alta frequência de respondedores contra AMA-1 e MSP1₁₉ de *P. vivax* já havia sido demonstrada anteriormente pelo nosso grupo (SOARES *et al.*, 1997, 1999b, RODRIGUES *et al.*, 2003, 2005).

Por outro lado, a frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos contra a proteína recombinante derivadas da DBP-RII foi mais baixa (15,6%). Uma característica da população de São Jorge em estudo é ser constituída majoritariamente por indivíduos primoinfectados (96%), devido a um surto de malária ocorrido no momento da coleta. Assim, uma possível explicação para a baixa frequência de respondedores, observada contra a proteína recombinante representando a DBP-RII pode ser devido à necessidade de haver repetidas exposições aos antígenos do parasita para

ocorrer a soroconversão, o que significa que alguns indivíduos podem tornar-se respondedores dependendo da intensidade de exposição ao parasita.

Para responder esta questão, avaliamos o efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos contra a proteína recombinante correspondente a DBP-RII. Utilizamos nesta análise, os resultados obtidos contra as duas outras proteínas recombinantes (AMA-1 e MSP1₁₉) para efeito comparativo. Foi observado que a proporção de indivíduos que apresentam anticorpos IgG anti-DBP-RII e anti-AMA-1 aumenta de acordo com o maior número de exposições prévias ao *P. vivax*, enquanto que a proporção de indivíduos com anticorpos anti-MSP1₁₉ se mantém alta (Figura 11). Com base nesta observação parece que a resposta imune adquirida naturalmente, avaliada pela soroconversão contra a MSP1₁₉, desenvolve-se rapidamente após um único contato com o parasita enquanto que contra as outras proteínas, DBP-RII e AMA-1, é necessário um maior número de exposições. Este resultado sugere uma associação entre a exposição e o desenvolvimento da imunidade.

Estudos anteriores realizados por grupos independentes em áreas de alta endemicidade, Papua Nova Guiné e Coréia, verificaram que uma elevada percentagem dos indivíduos expostos ao *P. vivax* apresentaram anticorpos contra um recombinante bacteriano correspondente a DBP (RII-IV) (FRASER *et al.*, 1997, SUH *et al.*, 2003).

No Brasil, dois estudos imunoepidemiológicos utilizando proteínas recombinantes derivadas da DBP foram realizados recentemente (CERAVOLO *et al.*, 2005, TRAN *et al.*, 2005). Um dos estudos foi realizado a partir da análise de soros de indivíduos com diferentes níveis de exposição ao *P. vivax* procedentes de áreas endêmicas dos Estados do Pará e Mato Grosso. Foi observado que frequência de indivíduos com anticorpos IgG DBP-RII-IV específicos aumenta de acordo com o maior nível de exposição à malária, variando de 14 a 65% (CERAVOLO *et al.*, 2005). Em um segundo estudo, realizado com amostras de três populações endêmicas do Estado de

Rondônia, foi observado que 67% dos indivíduos expostos ao *P. vivax* apresentaram anticorpos anti-DBP-R11 (TRAN *et al.*, 2005).

No presente trabalho foi também avaliada a persistência da resposta de anticorpos contra as diferentes proteínas recombinantes em indivíduos expostos ao *P. vivax*. Amostras de soros destes indivíduos foram coletadas em Belém antes e após dois meses do início do tratamento (SOARES *et al.*, 1999b). Um outro grupo de amostras de soros foi coletado na localidade de São Jorge, município de Igarapé Açu, Estado do Pará, antes e nove meses depois do início do tratamento. Observamos que, durante estes períodos, não houve uma diminuição significativa das freqüências de respondedores contra cada proteína recombinante nas duas populações estudadas, exceto contra a MSP1₁₉, somente após nove meses do tratamento (Figuras 12).

A longevidade da resposta de anticorpos IgG anti-DBP-R11, anti-AMA-1 e anti-MSP1₁₉ também foi avaliada pela análise dos títulos de anticorpos dos indivíduos respondedores das duas populações estudadas. Observamos que não houve diferença significativa entre os títulos de anticorpos obtidos contra as proteínas recombinantes DBP-R11 e AMA-1, antes e após o tratamento em ambas as áreas endêmicas. Indicando que a resposta de anticorpos anti-DBP-R11 e anti-AMA-1 se mantém mesmo após nove meses do tratamento. Por outro lado, os títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉ foram significativamente maiores durante a infecção patente do que após nove meses do início do tratamento (Figura 13).

Esta observação confirma os dados que obtivemos anteriormente, os quais demonstraram que a resposta de anticorpos contra a MSP1₁₉ é de curta duração (SOARES *et al.*, 1999b). É importante ressaltar, que em nosso estudo anterior sobre longevidade da resposta de anticorpos anti-MSP1₁₉ no qual demonstramos que a resposta diminui significativamente após dois meses do tratamento (SOARES *et al.*, 1999b), foi utilizada uma outra proteína recombinante derivada da MSP1₁₉, a qual estava em fusão com GST e continha uma seqüência adicional, âncora de GPI (SOARES *et al.*, 1997).

A questão da persistência da resposta de anticorpos IgG contra proteínas recombinantes derivadas da região C-terminal da MSP-1 de *P. vivax* é ainda bastante controversa. Em contraste aos nossos resultados, foi descrito que a resposta de anticorpos contra a proteína recombinante Pv200 produzida em leveduras persistiu por 7 anos após breve exposição dos indivíduos ao *P. vivax* (BRAGA *et al.*, 1998). Mais recentemente, foi observada a persistência de anticorpos anti-MSP1₁₉ por mais de 30 anos em indivíduos que vivem em áreas onde a malária foi erradicada (LIM *et al.*, 2004). De fato, os resultados apresentados aqui mostram que, embora haja uma diminuição significativa na frequência de respondedores contra a MSP1₁₉, a proporção de indivíduos que continuam respondedores nove meses após o tratamento é bastante expressiva, sendo de 59,4%.

Em relação a longevidade da resposta de anticorpos contra AMA-1, nossos resultados confirmam os de um estudo muito recente realizado com a proteína recombinante que produzimos, o qual mostrou que a resposta de anticorpos anti-AMA-1 persistiu por 7 anos após breve exposição dos indivíduos ao *P. vivax* (MORAIS *et al.*, submetido).

Em suma, nossos resultados demonstraram que: (i) a frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra a proteína recombinante DBP-RII foi significativamente menor do que para as proteínas AMA-1 e MSP1₁₉, (ii) a resposta de anticorpos IgG contra DBP-RII e AMA-1 desenvolve-se somente após repetidas infecções, enquanto que para a MSP1₁₉ desenvolve-se após uma única exposição ao parasita, (iii) a resposta de anticorpos IgG anti-DBP-RII e anti-AMA-1 se mantém mesmo após nove meses do tratamento, enquanto que a resposta para a MSP1₁₉ é de curta duração.

Alguns aspectos da resposta imune naturalmente adquirida contra estas proteínas ainda necessitam serem investigados, como a determinação da frequência de indivíduos que apresentam anticorpos IgM e subclasses de IgG durante a infecção e a persistência da resposta de subclasses de IgG.

VI. Conclusões

1. A frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra a proteína recombinante DBP-RII foi significativamente menor do que para as proteínas AMA-1 e MSP1₁₉;
2. A resposta de anticorpos IgG contra DBP-RII e AMA-1 desenvolve-se somente após repetidas infecções pelo *P. vivax*, enquanto que para a MSP1₁₉ desenvolve-se após uma única exposição ao parasita;
3. A resposta de anticorpos IgG anti-DBP-RII e anti-AMA-1 se mantém mesmo após nove meses do tratamento, enquanto que a resposta para a MSP1₁₉ é de curta duração.

VII. Referências bibliográficas

AMPUDIA, E., PATARROYO, M. A., PATARROYO, M. E., MURILLO, L. A. 1996. Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. **J. Mol. Biochem. Parasitol.** **78**: 269-272.

ARÉVALO-HERRERA, M., HERRERA, S. 2001. *Plasmodium vivax* malaria vaccine development. **Mol. Immunol.** **38**: 443-455.

BARNWELL, J. W., NICHOLS, M. E., RUBINSTEIN, P. 1989. *In vitro* evaluation of role of the duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. **J. Exp. Med.** **168**: 1795-1802.

BARNWELL, J. W., GALINSKI, M. R., DeSIMONE, S. G., PERLER, F., INGRAVALLO, P. 1999. *Plasmodium vivax*, *P. cynomolgi*, and *P. knowlesi*: Identification of homologue proteins associated with the surface of merozoites. **Exp. Parasitol.** **91**: 238-249.

BEG, M. A., KHAN, R., BAIG, S. M., GULZAR, Z., HUSSAIN, R., SMEGO, R. A. JR. 2002. Cerebral involvement in benign tertian malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **67**: 230-232.

BLACK, C. G., BARNWELL, J. W., HUBER, C. S., GALINSKI, M. R., COPPEL, R. L. 2002. The *Plasmodium vivax* homologues of merozoite surface proteins 4 and 5 from *Plasmodium falciparum* are expressed at different locations in the merozoite. **Mol. Biochem. Parasitol.** **120**: 215-224.

BLACKMAN, M. J., HEIDRICH, H., DONACHIE, S., McBRIDE, J. S., HOLDER, A. A. 1990. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **J. Exp. Med.** **172**: 379-382.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principles of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**: 248-254.

BRAGA, E. M., FONTES, C. J., KRETTLI, A. U. 1998. Persistence of humoral response against sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to *Plasmodium vivax*. **J. Infect. Dis.** **177**: 1132-1135.

CAMARGO, L. M., FERREIRA, M. U., KRIEGER, H., DE CAMARGO, E. P., DA SILVA, L. P. 1994. Unstable hypoendemic malaria in Rondonia (western Amazon region, Brazil): epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agro-industrial rural settlement. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **51**: 16-25.

CERAVOLO, I. P., BRUNA-ROMERO, O., BRAGA, E. M., FONTES, C. J., BRITO, C. F., SOUZA, J. M., KRETTLI, A. U., ADAMS, J. H., CARVALHO, L. H. 2005. Anti-*Plasmodium vivax* Duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. **Am J Trop Med Hyg** **72**: 675-681.

CHANG, S. Y., TSAI, P. C., TSENG, C. S., LIANG, P. H. 2001. Refolding and characterization of a yeast dehydrodolichyl diphosphate synthase overexpressed in *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif.** **23**: 432-439.

CHENG, Q., SAUL, A. 1994. Sequence analysis of the apical membrane antigen 1 (AMA-1) of *Plasmodium vivax*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **65**: 183-187.

CHITARRA, V., HOLM, I., BENTLEY, G. A., PETRES, S., LONGACRE, S. 1999. The crystal structure of C-terminal merozoite surface protein 1 at 1.8 Å resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. **Mol. Cell** **3**: 457-464.

CORTÉS, A., MELLOMBO, M., MASCIANTONIO, R., MURPHY, V. J., REEDER, J. C., ANDERS, R. F. 2005. Allele specificity of naturally acquired antibody responses against *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. **Infect. Immun.** **73**: 422-430.

CUNHA, M. G., RODRIGUES, M. M., SOARES I. S. 2001. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine** **20**: 385-396.

DEL PORTILLO, H. A., LONGACRE, S., KHOURI, E., DAVID, P. H. 1991. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**: 4030-4034.

DUTTA, S., DAUGHERTY, J. R., WARE, L. A., LANAR, D. E., OCKENHOUSE, C. F. 2000. Expression, purification and characterization of a functional region of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Mol. Biochem. Parasitol.** **109**: 179-184.

DUTTA, S., LATITHA, P. V., WARE, L. A., BARBOSA, A., MOCH, J. K., VASSEL, M. A., FILETA, B. B., KITOV, S., KOLODNY, N., HEPPNER, D. G., HAYNES, J. D., LANAR, D. E. 2002. Purification, characterization and immunogenicity of the refolded ectodomain of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 expressed in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **70**: 3101-3110.

ESCALANTE, A. A., GREBERT, H. M., CHAIYAROJ, S. C., MAGRIS, M., BISWAS, S., NAHLEN, B. L., LAL, A. A. 2001. Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of *Plasmodium falciparum*. X. Asembo Bay Cohort Project. **Mol. Biochem. Parasitol.** **113**: 279-287.

FANG, X. D., KASLOW, D. C., ADAMS, J. H., MILLER, L. H. 1991. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. **Mol. Biochem. Parasitol.** **44**: 125-132.

FENG, Z. P., KEIZER, D. W., STEVENSON, R. A., YAO, S., BABON, J. J., MURPHY, V. J., ANDERS, R. F., NORTON, R. S. 2005. Structure and inter-domain interactions of domain II from the blood-stage malarial protein, apical membrane antigen 1. **J. Mol. Biol.** **350**: 641-656.

FERREIRA, M. U., SOARES, I. S. 2000. The merozoite surface protein-1 (MSP-1) as a human malaria vaccine candidate: Geographic patterns of allelic diversity and immune recognition. **Ciência e Cultura** **52**: 254-268.

FRASER, T., MICHON, P., BARNWELL, J. W., NOE, A. R., ALYAMAN, F., KASLOW, D. C., ADAMS, J. H. 1997. Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Infect. Immun.** **65**: 2772-2777.

GALINSKI, M. R., CORREDOR-MEDINA, C., INGRAVALLO, P., BARNWELL, J. W. 1992. A reticulocyte-binding proteins complex of *Plasmodium vivax* merozoites. **Cell** **69**: 1213-1226.

GALINSKI, M. R., CORREDOR-MEDINA, C., POVOA, M., CROSBY, J., INGRAVALLO, P., BARNWELL, J. W. 1999. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in an alanine-rich central domain. **Mol. Biochem. Parasitol.** **101**: 131-147.

GALINSKI, M. R., INGRAVALLO, P., CORREDOR-MEDINA, C., AL-KHEDERY, B., POVOA, M., BARNWELL, J. W. 2001. *Plasmodium vivax* merozoite surface proteins-3 β and-3 γ share structural similarities with *P. vivax* merozoite surface protein-3 α and define a new gene family. **Mol. Biochem. Parasitol.** **115**: 41-53.

GARMAN, S. C., SIMCOKE, W. N., STOWERS, A. W., GARBOCZI, D. N. 2003. Structure of the C-terminal domains of merozoite surface protein-1 from *Plasmodium knowlesi* reveals a novel histidine binding site. **J. Biol. Chem.** **278**: 7264-7269.

GIBSON, H. L., TUCKER, J. E., KASLOW, D. C., KRETTLI, A. U., COLLINS, W.E., KIEFER, M. C., BATHUST, L. C., BARR, P. J. 1992. Structure and expression of the gene for Pv200: a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **50**: 325-334.

GOLENDA, C. F., LI, J., ROSENBERG, R. 1997. Continuous *in vitro* propagation of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **94**: 6786-6791.

GOLGI, C. 1889. On the cycle of development of malarial parasites in tertian fever: differential diagnosis between the intracellular malarial parasites of tertian and quartan fever. **Arch. Sci. Med.** **13**: 173-196.

GREENWOOD, B. M., BOJANG, K., WHITTY, C. J., TARGETT, G. A. 2005. Malaria. **Lancet.** **365**: 1487-1498.

HODDER, A. N., CREWETHER, P. E., MATTHEW, M. L. S. M., REIDI, G. E., MORITZI, R. L., SIMPSON, R. J., ANDERS, R. F. 1996. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. **J. Biol. Chem.** **271**: 29446-29452.

HOLDER, A. A., BLACKMAN, M. J. 1994. What is the function of MSP1 on the malaria merozoite? **Parasitol. Today** **10**: 182-184.

KARUNAWEEERA, N. D., WIJESEKERA, S. K., WANASEKERA, D., MENDIS, K. N., CARTER, R. 2003. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends Parasitol.** **19**: 188-193.

KASLOW, D. C., KUMAR, S. 1996. Expression and immunogenicity of the C-terminus of a major blood-stage surface protein of *Plasmodium vivax*, Pv200₁₉, secreted from *Saccharomyces cerevisiae*. **Immunol. Letters** **51**: 187-189.

KHAN, S. M., WATERS, A. P. 2004. Malaria parasite transmission stages: an update. **Trends Parasitol.** **12**: 575-580.

KOCKEN, C. H., DUBBELD, M. A., VAN DER WEL, A., PRONK, J. T., WATERS, A. P., LANGERMANS, J. A., THOMAS, A. W. 1999. 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**: 43-49.

LEVITUS, G., MERTENS, F., SPERANÇA, M. A., CAMARGO, L. M. A., FERREIRA, M. U., DEL PORTILLO, H. A. 1994. Characterization of naturally acquired human IgG responses against the N-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **51**: 68-76.

LIM, K. J. ; PARK, J. W. ; YEOM, J. S. ; LEE, Y. H. ; YOO, S. B. ; OH, J. H. ; SOHN, M. J. ; BAHK, Y. Y. ; KIM, Y. S. 2004. Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can be remembered for more than 30 years in persons exposed to *Plasmodium vivax*. **Parasitol. Res.** **92**: 384-389.

LONGACRE, S., MENDIS, K. N., DAVID, P. 1994. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus. **Mol. Biochem. Parasitol.** **64**: 191-205.

MARQUES, A. C. 1986. Migrations and the dissemination of malaria in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 81 (Supl. II): 17-30.

MARQUES, A. C. 1987. Human migration and the spread of malaria in Brazil. **Parasitol. Today** 3: 166-170.

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

MICHON, P. A., AREVALO-HERRERA, M., FRASER, T., HERRERA, S., ADAMS, J. H. 1998. Serologic responses to recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in a colombian village. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 59: 597-599.

MICHON, P., FRASER, T., ADAMS, J. H. 2000. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Infect. Immun.** 68: 3164-3171.

MICHON, P., WOOLEY, I., WOOD, E. M., KASTENS, W., ZIMMERMAN, P. A., ADAMS, J. H. 2001. Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the *Plasmodium vivax* ligand required for blood-stage infection. **FEBS letters.** 495: 111-114.

MORAIS, C. G., SOARES, I. S., CARVALHO, L. H., FONTES, C. J., KRETTLI, A. U., BRAGA, E. M. 2005. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. **Parasitol. Res.** 95: 420-426.

MORAIS, C. G., SOARES, I. S., CARVALHO, L. H., FONTES, C. J. F., KRETTLI, A. U., BRAGA, E. M. Antibodies to *Plasmodium vivax* Apical membrane antigen-1 are long-lasting and correlate to the Malaria

transmission intensity. (Submetido).

MORGAN, W. D., BIRDSALL, B., FRENKIEL, T. A., GRADWELL, M. G., BURGHHAUS, P. A., SYED, S. E. H., UTHAIPIBULL, C., HOLDER, A. A., FEENEY, J. 1999. Solution structure of an EGF module pair from the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. **J. Mol. Biol.** **289**: 113-122.

MUHLBERGER, N., JELINEK, T., GASCON, J., PROBST, M., ZOLLER, T., SCHUNK, M., BERAN, J., GJORUP, I., BEHRENS, R. H., CLERINX, J., BJORKMAN, A., MCWHINNEY, P., MATTEELLI, A., LOPEZ-VELEZ, R., BISOFFI, Z., HELLGREN, U., PUENTE, S., SCHMID, M. L., MYRVANG, B., HOLTHOFF-STICH, M. L., LAFERL, H., HATZ, C., KOLLARITSCH, H., KAPAUN, A., KNOBLOCH, J., IVERSEN, J., KOTLOWSKI, A., MALVY, D. J., KERN, P., FRY, G., SIIKAMAKI, H., SCHULZE, M. H., SOULA, G., PAUL, M., GOMEZ I PRAT, J., LEHMANN, V., BOUCHAUD, O., DA CUNHA, S., ATOUGUIA, J., BOECKEN, G. 2004. Epidemiology and clinical features of *vivax* malaria imported to Europe: sentinel surveillance data from TropNetEurop. **Malar. J.** **3**: 5.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. 2005. Roll Back Malaria. <http://rbm.who.int/wmr2005/html/1-2.htm> (Acessado em 03/10/2005)

PARK, J. W., MOON, S. H., YEOM, J. S., LIM, K. J., SOHN, M. J., JUNG, W. C., CHO, Y. J., JEON, K. W., JU, W., KI, C. S., OH, M. D., CHOE, K. 2001. Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of merozoite

surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** **8**: 14-20.

PIZARRO, J. C., VULLIEZ-LE NORMAND, B., CHESNE-SECK, M. L., COLLINS, C. R., WITHERS-MARTINEZ, C., HACKETT, F., BLACKMAN, M. J., FABER, B. W., REMARQUE, E. J., KOCKEN, C. H., THOMAS, A. W., BENTLEY, G. A. 2005. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science** **308**: 408-411.

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. 2004. Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. **Vaccine** **23**: 718-728.

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

RODRIGUES, M. H. C., RODRIGUES, K. M., OLIVEIRA, T. R., CÔMODO, A. N., RODRIGUES, M. M., KOCKEN, C.H., THOMAS, A. W., SOARES, I. S. 2005. Antibody immune response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen-1. **Int. J. Parasitol.** **35**: 185-192.

SATTABONGKOT, J., TSUBOI, T., ZOLLNER, G., SIRICHAISINTHOP, J., CUI, L. 2004. *Plasmodium vivax* transmission: chances for control? **Trends Parasitol.** **20**: 192-198.

SAINI, D. K., PANT, N., DAS, T. K., TYAGI, J. S. 2002. Cloning, overexpression, purification, and matrix-assisted refolding of DevS (Rv 3132c) histidine protein kinase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Prot. Exp. Purif.** **25**: 203-208.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2003. Boletim epidemiológico da malária nº 01/2003. http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21818 (Acessado em 03/10/2005)
http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/pdf/04_0003_M.pdf#search='PIACM%202000' (Acessado em 18/11/2005)

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2004. http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21397 (Acessado em 03/10/2005)

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2005. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2005.pdf (Acessado em 03/10/2005)
http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21400 (Acessado em 03/10/2005)

SHEFFIELD, P., GARRARD, S., DEREWENDA, Z. 1999. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "parallel" expression vectors. **Prot. Exp. Purif.** **15**: 34-39.

SINGH, S., PANDEY, K., CHATTOPADHAYAY, R., YAZDANI, S. S., LYNN, A., BHARADWAJ, A., RANJAN, A., CHITNIS, C. 2001. Biochemical, biophysical, and functional characterization of bacterially expressed and

refolded receptor binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. **J. Biol. Chem.** **276**: 17111-17116.

SOARES, I. S., LEVITUS, G., SOUZA, J. M., DEL PORTILLO, H. A., RODRIGUES, M. M. 1997. 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**: 1606-1614.

SOARES, I. S., RODRIGUES, M. M. 1998. Malaria vaccines: roadblocks and possible solutions. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **31**: 317-332.

SOARES, I. S., OLIVEIRA, S. G., SOUZA, J. M., RODRIGUES, M. M. 1999a. 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**: 13-24.

SOARES, I. S., CUNHA, M. G., SILVA, M. N., SOUZA, J. M., DEL PORTILLO, H. A., RODRIGUES, M. M. 1999b. 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**: 357-363.

SOARES, I. S., BARNWELL, J. W., FERREIRA, M. U., CUNHA, M. G., LAURINO, J. P., CASTILHO, B. A., RODRIGUES, M. M. 1999c. A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. **Mol. Med.** **5**: 459-470.

SOARES, I. S., RODRIGUES, M. M. 2002. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*. **Parasitology** **124**: 237-246.

SUH, I. B., HOFFMAN, K. J., KIM, S. H., SONG, K. J., SONG, J. W., LEE, J. S., LIM, C. S. 2001. The analysis of *Plasmodium vivax* Duffy receptor binding

domain gene sequence from resurgent Korea isolates. **Parasitol Res.** **87**:1007-1010.

SUH, I. B., CHOI, H. K., LEE, S. W., WOO, S. K., KANG, H. Y., WON, Y. D., CHO, M., LIM, C. S. 2003. Reactivity of sera from cases of *Plasmodium vivax* malaria towards three recombinant antigens based on the surface proteins of the parasite. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **97**: 481-487.

TADEI, W. P., THATCHER, B. D. 2000. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** **42**: 87-94.

TRAN, T. M., OLIVEIRA-FERREIRA, J., MORENO, A., SANTOS, F., YAZDANI, S. S., CHITNIS, C. E., ALTMAN, J. D., MEYER, E. V., BARNWELL, J. W., GALINSKI, M. R. 2005. Comparison of IgG reactivities to *Plasmodium vivax* merozoite invasion antigens in a Brazilian Amazon population. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **73**: 244-55.

VARGAS-SERRATO, E., BARNWELL, J. W., INGRAVALLO, P., PERLER, F. B., GALINSKI, M. R. 2002. Merozoite surface protein-9 of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites is orthologous to p101/ABRA of *P. falciparum*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **120**: 41-52.

XAINLI, J., COLE-TOBIAN, J. L., BAISOR, M., KASTENS, W., BOCKAIRE, M., YAZDANI, S. S., CHITNIS, C. E., ADANS, J. H., KING, C. L. 2003. Epitope-specific humoral immunity to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Infect. Immun.** **71**: 2508-2515.

YAZDANI, S. S., SHAKRI, A. R., MUKHERJEE, P. BANIWAL, S. K., CHITNIS, C. E. 2004. Evaluation of immune responses elicited in mice against a recombinant malaria vaccine based on *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Vaccine** **22**: 3727-3737.