UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

Resposta de anticorpos contra proteínas recombinantes baseadas em antígenos de merozoítos de *Plasmodium vivax* em indivíduos de uma comunidade rural da Amazônia brasileira

Victória Simão Cumbane

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientadora:
Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo

2011

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

Cumbane, Victória Simão
C969r Resposta de anticorpos contra proteínas recombinantes baseadas em antígenos de merozoítos de *Plasmodium vivax* em indivíduos de uma comunidade rural da Amazônia brasileira / Victória Simão Cumbane. -- São Paulo, 2011.
83p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Soares, Irene da Silva

1. Malária 2. Anticorpo : Imunologia I. T. II. Soares, Irene da Silva, orientador.

616.9362 CDD

SUMÁRIO

Lista de figuras ii
Lista de tabelas iii
Lista de abreviaturas iv
Resumo v
I. INTRODUÇÃO 1
1. Considerações sobre a epidemiologia da malária no mundo e no Brasil 2
2. Epidemiologia da malária no Estado do Acre 6
3. Ciclo de vida do parasito e aspectos clínicos da doença 8
4. Aspectos imunológicos da malária 12
5. Antígenos de formas sanguíneas candidatos à vacina 15
5.1. Proteína 1 de Superfície do Merozoíto (MSP-1) 15
5.2. Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) 17
5.3. Proteína 3 de Superfície do Merozoíto (MSP-3) 20
6. Antígenos Duffy 23
II. OBJETIVOS 25
1. Objetivos Gerais 26
2. Objetivos específicos 26
III. MATERIAIS E MÉTODOS 27
1. Área e população de estudo 28
2. Colheita e manuseio das amostras 30
2.1. Indivíduos expostos à malária 30
2.2. Indivíduos sadios 31
3. Composição dos reagentes, soluções e meios de cultura utilizados 31
3.1. Soluções e tampões para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 31
3.2. Meios para cultura de bactérias 32
3.3. Tampões utilizados para a obtenção da proteína recombinante MSP3β 32
3.4. Tampões utilizados para obtenção da proteína recombinante AMA-1 a partir dos precipitados dos extratos bacterianos (corpos de inclusão) 33
3.5. Soluções e tampões para ensaios imunoenzimáticos (ELISA) 34

4. Obtenção das proteínas recombinantes em bactérias para uso nos ensaios imunológicos *in vitro*. 34
4.1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes 34
4.1.1. Região C-terminal da MSP-1 ($MSP1_{19}$) e MSP3α (FP-1) 34
4.1.2. Ectodomínio de AMA-1 35
4.1.3. MSP3β inteira (FP-3) 37
5. ELISA para detecção de anticorpos IgG 38
6. Análise estatística 39
IV. RESULTADOS 40
1. Avaliação comparativa da resposta de anticorpos IgG contra um painel de proteínas recombinantes de *P. vivax* em indivíduos expostos à malária (linha de base do estudo de coorte) 41
2. Efeito do tempo de residência (em anos) na área endêmica de malária sobre a resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes de *P. vivax* 46
3. Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos contra as proteínas recombinantes de *P. vivax* 47
4. Avaliação comparativa de reatividade de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes de *P. vivax* em indivíduos que residem em locais com diferentes riscos de transmissão de malária 49
5. Avaliação comparativa do reconhecimento imune das proteínas recombinantes de *P. vivax* em indivíduos com diferentes genótipos de antígeno Duffy 50
6. Resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes em estudo durante a infecção aguda por *P. vivax* no seguimento 54
V. DISCUSSÃO 58
VI. CONCLUSÕES 65
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 67
VIII. ANEXOS 79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global de *P. falciparum* e *P. vivax* em 2005 3

Figura 2. Mapa de risco da malária por município de infecção, Amazônia Legal, 2008. 5

Figura 3. Incidência parasitária anual (IPA) de malária por mil habitantes 7

Figura 4. Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* causadoras da malária humana. 11

Figura 5. Representação esquemática da MSP-1 de *Plasmodium*. Blocos conservados entre as espécies (ICB) de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. yoelii.* 17

Figura 6. Representação esquemática da proteína AMA-1 de *Plasmodium* destacando os fragmentos resultantes da clivagem proteolítica 19

Figura 7. Representação esquemática das proteínas MSP3α e MSP3β 23

Figura 8. Mapa mostrando a localização do estado do Acre e indicando o município de Acrelândia (Ramal do Granada no PAD), Pedro Peixoto 29

Figura 9. Comparação da resposta de anticorpos IgG contra um painel de proteínas recombinantes em indivíduos expostos à malária 42

Figura 10. Comparação dos valores individuais de IR de anticorpos IgG contra as diferentes proteínas recombinantes em soros de indivíduos expostos à malária 44

Figura 11. Correlação entre o reconhecimento das diversas proteínas recombinantes por soros de indivíduos expostos à malária 45

Figura 12. Porcentagem de soros positivos contra as quatro proteínas recombinantes em relação ao tempo de residência (em anos) na área de estudo e a influência da idade nos diferentes grupos 47

Figura 13. Análise comparativa da resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes em estudo quanto à frequência de episódios prévios de malária 48

Figura 14. Comparação da reatividade dos anticorpos contra proteínas recombinantes de *P. vivax* em 392 amostras de soros de indivíduos expostos à malária residentes em áreas com diferentes níveis de transmissão 51

Figura 15. Comparação da reatividade dos anticorpos antiproteínas recombinantes de *P. vivax* em 372 amostras de soros de indivíduos expostos à malária com diferentes genótipos quanto ao antígeno Duffy 53

Figura 16. Porcentagem de soros positivos contra as proteínas recombinantes de *P. vivax* durante a infecção aguda no seguimento. 54

Figura 17. Avaliação comparativa dos títulos de anticorpos IgG contra proteínas recombinantes de *P. vivax* em 92 amostras de soros coletadas durante o seguimento. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aminoácidos (AA), sistema de expressão e linhagem de micro-organismo utilizado para expressão das proteínas de *P. vivax* 35

Tabela 2. Resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β, de acordo com a presença ou a ausência de parasitemia na linha de base do estudo de coorte 43

Tabela 3. Níveis de intensidade de resposta de anticorpos IgG em amostras de indivíduos coletadas durante episódios de malária por *P. vivax* no seguimento longitudinal 57

Tabela 4. Níveis de intensidade de resposta de anticorpos IgG em amostras de indivíduos coletadas durante a linha de base do estudo de coorte 80

LISTA DE ABREVIATURAS

AMA	Antígeno de membrana apical
Amp	Ampicilina
2-ME	2- mercaptoetanol
BSA	Albumina sérica bovina
CHAPSO	*3-([3-Cholamidopropyl]dimethylammonio)-2-hydoxy-1-propanesulfonate*
Clr	Cloranfenicol
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	*Enzyme linked immunosorbent assay*
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
HCl	Ácido clorídrico
His_6	Cauda de seis resíduos de histidina
Ig	Imunoglobulina
IPA	Incidência Parasitária Anual
IPTG	*Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside*
IR	Índice de reatividade
LB	Luria Bertani
MSP	Proteína de superfície de merozoíto

OPD	*a-Phenylenediamine*
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
RBP	*Reticulocyte Binding Proteins*
rpm	Rotações por minutos
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

RESUMO

Cumbane, V. S.; Soares, I. S. Dissertação de Mestrado. Resposta de anticorpos contra proteínas recombinantes baseadas em antígenos de merozoítos de *Plasmodium vivax* em indivíduos de uma comunidade rural da Amazônia brasileira. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. p. 83, 2011.

Nos últimos anos, estudamos vários aspectos da resposta imune naturalmente adquirida em indivíduos de diferentes áreas endêmicas da Região Amazônica expostos à malária. Para isso, utilizamos proteínas recombinantes baseadas em antígenos de formas sanguíneas de *P. vivax*, os quais têm sido considerados candidatos à vacina contra a malária *vivax*. No presente trabalho, nossos estudos imunoepidemiológicos concentraram-se em 396 indivíduos de uma comunidade rural da Amazônia ocidental brasileira, localizada no Estado do Acre, com o objetivo de realizar um estudo transversal e longitudinal da resposta de anticorpos contra um painel de proteínas recombinantes derivadas de merozoítos de *P. vivax* ($MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β). Para isso, os soros desses indivíduos foram testados por ELISA quanto ao reconhecimento das quatro proteínas recombinantes. As proporções de indivíduos na linha de base com anticorpos IgG contra $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β foram de 59,8%, 50,0%, 23,5% e 26,5%, respectivamente. Dentre esses indivíduos, apenas 10,9% tinham infecções por *P. vivax*, *P. falciparum* ou malária mista. No grupo de infectados por *P. vivax*, a proporção de respondedores foi maior para as proteínas recombinantes $MSP1_{19}$ e AMA-1, atingindo 78,6%, em ambos os casos. A proporção de indivíduos com anticorpos para cada uma das proteínas associou-se com o maior tempo de exposição à malária, exceto para a MSP3β. Além disso, a positividade foi mais alta nas áreas de maior risco de transmissão. Não observamos associações relevantes entre o genótipo do antígeno Duffy dos indivíduos e presença de anticorpos para as proteínas estudadas. No estudo longitudinal, observamos um aumento da prevalência de respondedores durante a parasitemia patente, sendo de 81,9%, 80,9%, 31,9% e 48,9% para a $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β, respectivamente. Em conclusão, nossos resultados confirmam a alta antigenicidade dessas proteínas, o que pode ser de grande importância para futuros ensaios clínicos na região.

Palavras-chave: Malária humana, *Plasmodium vivax*, resposta de anticorpos.

Abstract

Cumbane, V. S.; Soares, I. S. Master thesis. Antibody response against recombinant proteins based on *Plasmodium vivax* merozoite antigens in individuals from a rural community of the Brazilian Amazonia.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. p. 83, 2011.

In recent years we studied various aspects of the naturally acquired immune response in individuals from different endemic areas of the Amazon region exposed to malaria. For this purpose we used recombinant proteins based on *P. vivax* blood stage antigens considered candidates for a vaccine against *vivax* malaria. In the present study, we focused on 396 individuals from a rural community in western Brazilian Amazon located at the state of Acre. We conducted a transversal and longitudinal study of the antibody response to a panel of recombinant proteins representing *P. vivax* merozoites surface antigens ($MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α and MSP3β). The sera of these individuals were tested by ELISA for the recognition of the four antigens mentioned above. The proportions of individuals at the baseline with IgG antibodies to $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α and MSP3β were 59.8%, 50.0%, 23.5% and 26.5%, respectively. Among these individuals, 10.9% had patent malaria infections with either *P. vivax* or *P. falciparum* or both. Among individuals with patent *P. vivax* infection, the frequency of responders was high for $MSP1_{19}$ and AMA-1, (78.6% in both cases). Except in the case of MSP3β, the proportion of individuals with antibodies to each protein correlated with the time of malaria exposure. Also, the positivity was higher in areas of higher transmission levels. No relevant association was found between the Duffy genotypes and presence of antibodies to the different antigen. In longitudinal study, we observed an increased prevalence of responders during patent parasitemia, 81.9% 80.9% 31.9% and 48.9% to $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α and MSP3β, respectively. In conclusion, our results confirm the high antigenicity of these proteins, which can be of great importance for future clinical trials in the region.

Keywords: Human malaria, *Plasmodium vivax*, Antibody response

I. INTRODUÇÃO

1. Considerações sobre a epidemiologia da malária no mundo e no Brasil

A malária é uma infecção parasitária que permanece associada à elevada morbidade, à considerável mortalidade e ao impacto socioeconômico significativo nos países afetados. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a malária ocorre em mais de 100 países e territórios (OMS, 2009). Estima-se que cerca de 3,2 bilhões de pessoas (40% da população mundial) vivem em áreas de risco para a doença, onde de 250 a 500 milhões de pessoas são infectadas anualmente e, destas, de 1 a 3 milhões morrem, principalmente crianças menores de 5 anos e mulheres grávidas.

Desde 1970, a erradicação da malária é foco da saúde pública em nível mundial. Por tal motivo eleva-se o interesse no mapeamento das regiões globais de alto risco, com o intuito de melhor aplicar os fundos já existentes, identificando as necessidades específicas dos territórios, a fim de melhorar a distribuição e a administração de medicamentos e métodos profiláticos (GUERRA; SNOW; HAY, 2006).

A distribuição de casos entre as espécies de *Plasmodium* que oferecem risco ao ser humano é bastante heterogênea. Cinco espécies de *Plasmodium* são importantes na transmissão da malária humana: *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi,* todas pertencentes ao filo Apicomplexa, à família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. O *P. falciparum* é a espécie predominante no mundo, seguida pelo *P. vivax* (Figura 1).

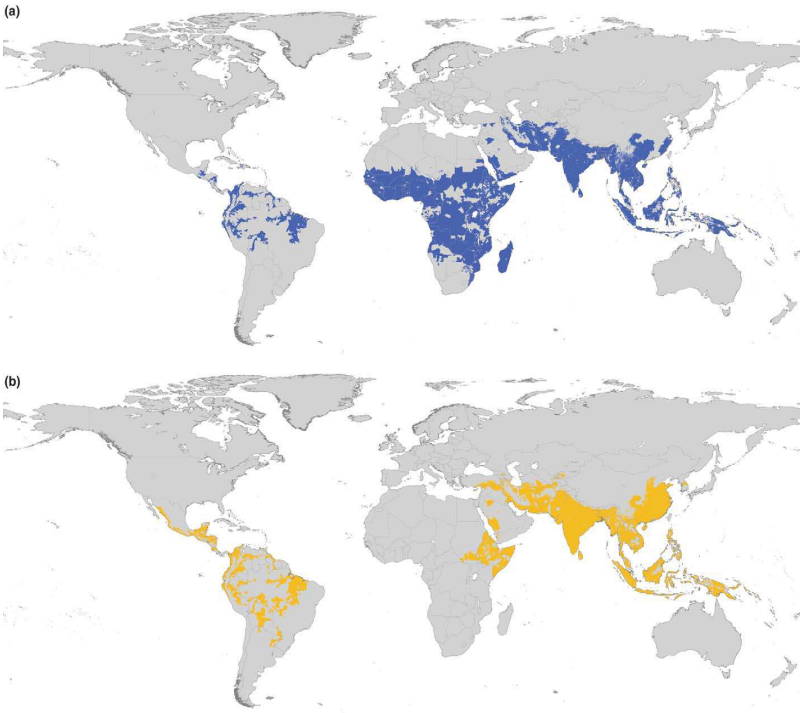


Figura 1: Distribuição global de *P. falciparum* e *P. vivax* em 2005. (A) Distribuição de *P. falciparum;* (B) Distribuição de *P. vivax* (GUERRA et al., 2005).

A maior prevalência de casos ocorre na África, no Brasil, na Índia e no Sri Lanka (OMS, 2004; GOOD et al., 2005). Em 2009, o número de casos de malária estimados pela OMS foi de cerca de 225 milhões. A região Africana contribui com 85%, seguida pelo Sudoeste da Ásia (10%), enquanto 4% correspondem às regiões do Mediterrâneo Oriental. Destes casos, estima-se que ocorram cerca de 781.000 mil mortes, das quais 89% na África, 6% no Mediterrâneo Oriental e 5% no Sudoeste da Ásia (OMS, 2010).

Nas Américas a doença ocorre em 21 países e territórios, sendo que 20% da população total vivem em locais de risco. Os relatos de casos na região diminuíram de 1,18 milhões, em 2000, a 526.000, em 2009, sendo que quatro países representaram 90% dos casos reportados em 2009 (Brasil, Colômbia, Haiti e Perú) (OMS, 2010).

Segundo Mueller e colaboradores (2009), de 80 a 300 milhões dos casos notificados pela OMS estão relacionados ao *P. vivax* e apresentam manifestações clínicas que variam de assintomática e leve a infecções crônicas que, em alguns casos, evoluem a doenças graves e até mesmo à morte. O aumento dos casos de malária associados à espécie de *P. vivax* está relacionado ao surgimento de cepas do *P. vivax* resistentes às drogas e de vetores resistentes aos inseticidas.

Desta forma, as recentes notificações de casos graves e letais por esta espécie justificam a necessidade de maiores investimentos e esforços no desenvolvimento de novas medidas profiláticas, dentre as quais destacamos uma vacina contra o *P. vivax*. Neste contexto, existem apenas duas candidatas a vacinas contra o *P. vivax* em testes clínicos e outras poucas se encontram em estudos pré-clínicos, o que contrasta com as diversas vacinas em ensaios pré-clínicos e clínicos contra o *P. falciparum* (MUELLER et al., 2009).

Segundo o Ministério da Saúde, mais de 60% do território brasileiro possui condições propícias à transmissão da doença (FREITAS et al., 2007). O principal vetor no Brasil é o mosquito da espécie *Anopheles darlingi,* que está amplamente distribuído no país. Aproximadamente 99,9% dos casos ocorrem na região da Amazônia Legal, que compreende os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. A Amazônia apresenta características climáticas, ambientais, ecológicas e socioeconômicas extremamente favoráveis à transmissão da malária, mas não há distribuição homogênea da doença na região, uma vez que a doença está associada ao processo de ocupação e exploração natural (OLIVEIRA-FILHO & MARTINELLI, 2009). Em 2008, seis estados da região amazônica concentraram as notificações de malária: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima. Nestes estados a

grande maioria dos casos é referente aos residentes da zona rural, mas há registros também nas áreas urbanas, de cerca de 15%. O risco de contrair a doença não se mostra uniforme, sendo avaliado através da Incidência Parasitária Anual (IPA), que estratifica as áreas de transmissão em alto risco-IPA, maior que 49,9 casos de malária/1.000 habitantes; médio risco-IPA, entre 10 e 49,9 casos/1.000 habitantes; baixo risco-IPA, de 0,1 a 9,9 casos/1.000 habitantes; e zero ou sem risco (revisto por SARAIVA et al., 2009) (Figura 2).

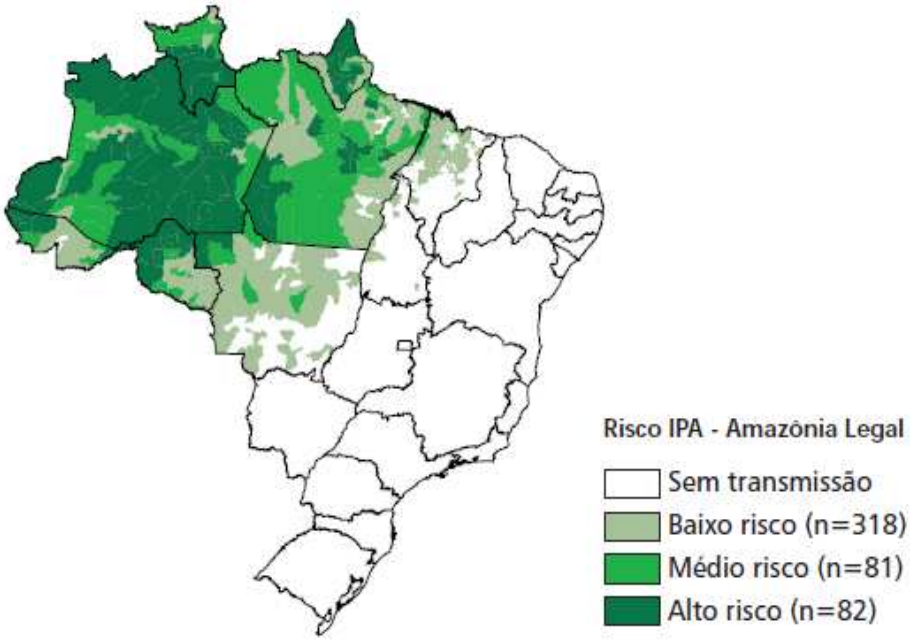


Figura 2: Mapa de risco da malária por município de infecção, Amazônia Legal, 2008. (Incidência Parasitária Anual: IPA) Baixo risco: IPA < 10; médio risco IPA 10-49; alto risco IPA ≥ 50 (p://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31086&janela=2 (Acessado em 19/ 10/ 2009).

As populações migrantes com escassa imunidade e moradias precárias geralmente possuem as condições mais propícias para a infecção. As florestas tropicais condizem com as áreas de alto risco, pois a população está mais exposta e há maior densidade de mosquitos transmissores. Populações mais antigas,

residentes em florestas menos densas, com infraestrutura social mais desenvolvida, possuem níveis elevados de proteção; logo, apresentam médio risco de contraírem a doença, pois têm menos densidades de *A. darlingi*, com reativação focal e predomínio de *P. vivax.* As áreas de baixo risco são aquelas com incidência de malária instável, apresentando populações com infraestrutura social bem desenvolvida, onde a transmissão foi interrompida, mas ainda conserva o potencial de surtos da doença. As áreas sem risco são aquelas com ausência de fatores epidemiológicos necessários para a transmissão de malária (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

2. Epidemiologia da malária no estado do Acre

O estado do Acre é atualmente responsável por 8,5% dos casos de transmissão de malária que ocorrem na Amazônia Legal (Ministério da Saúde 2009). Em 2008, o município de Acrelândia apresentou Incidência Parasitária Anual de 40,7 casos/1.000 habitantes. O número de lâminas positivas registradas no Acre em 1990 foi de 14.455, chegando a 36.063 no ano de 1995, e em 1997 diminuiu para 6.125. De forma semelhante ao que ocorreu no resto da Amazônia, houve aumento significativo em 1999, com mais de 23.000 casos, representando aumento de quase 300% no número de notificações (DA SILVA-NUNES et al., 2008).

Os dados do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária apontaram elevação no número de lâminas positivas no estado do Acre, em 2004, o qual contribuiu em até 86,9% dos casos de malária registrados na Amazônia Legal. Em 2005, foram registrados cerca de 57.242 casos e, em 2006, este número chegou a 93.863 casos. Apesar deste considerável aumento, em 2008, houve

redução de 54% dos casos, totalizando 27.705 registros (Figura 3, Ministério da Saúde, 2009).

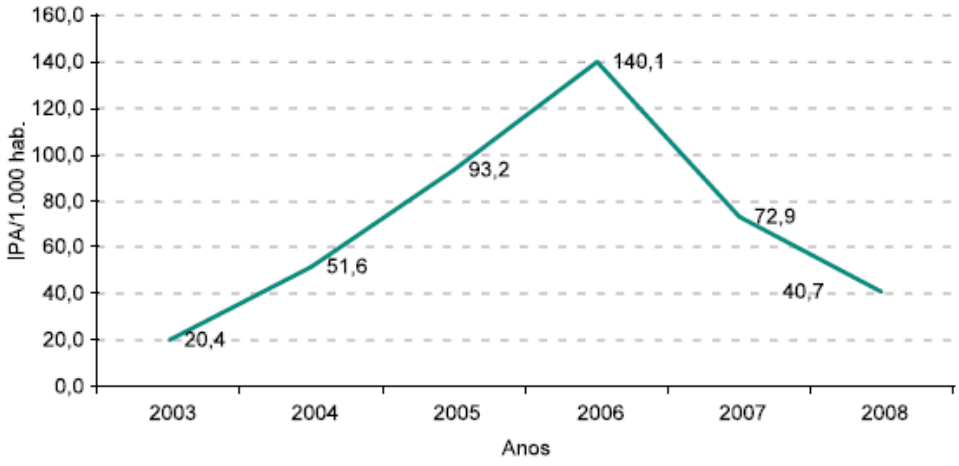


Figura 3: Incidência parasitária anual (IPA) de malária por mil habitantes. Acre, 2003 a 2008 (Ministério da Saúde, 2009).

A diminuição da malária foi atribuída a várias ações, entre elas a expansão da rede de diagnóstico, que passou de 1.182 para 3.217 laboratórios associados, representando acréscimo de 172,2% entre 1999 e 2007; a detecção e o tratamento oportuno dos pacientes; assim como a inclusão de novos fármacos no esquema terapêutico. Além destas ações, o Ministério da Saúde mantém um projeto piloto no estado do Acre, com distribuição e utilização de mosquiteiros impregnados com inseticidas de longa duração.

Em estudos prévios realizados em comunidades do Acre foi demonstrado que a presença de infecção sintomática, tanto por *P. vivax* como por *P. falciparum*, foi mais frequente em indivíduos jovens e naqueles com menor período de residência na Amazônia. Os indivíduos mais velhos e com maior tempo de residência na área endêmica apresentavam frequentemente infecções

assintomáticas tanto por *P. vivax* como por *P. falciparum* (DA SILVA-NUNES et al., 2008).

3. O ciclo de vida do parasito e aspectos clínicos da doença

O ciclo do parasito inicia-se pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles* infectado, o qual inocula o parasito nas formas de esporozoítos na derme durante o repasto sanguíneo. Estudos recentes em modelo animal mostraram que, após a picada do mosquito, os esporozoítos permanecem na derme durante certo período, que pode ser de até 6 horas, apesar da sua alta motilidade. Aproximadamente 70% dos parasitos inoculados deixam a derme no intervalo de uma hora e atingem a corrente sanguínea, pela qual alcançam o fígado. Os 30% restantes entram nos vasos linfáticos, com movimentos de deslizamento lateral, nos quais poderão ser reconhecidos pelas células do sistema imune, nos gânglios linfáticos, e uma pequena porção pode desenvolver-se para a forma extraeritrocítica (AMINO et al., 2006; DOOLAN et al., 2009).

No caso de *P. vivax* e *P. ovale,* algumas formas do parasita, denominadas hipnozoítos, podem permanecer dormentes ou latentes no fígado por períodos que variam entre 1 mês a 1-2 anos. O indivíduo infectado com estas formas latentes apresenta manifestações clínicas da doença posteriores ao tratamento, mesmo que não tenham tido novo contato com o mosquito transmissor.

No interior de hepatócitos infectados, foram identificadas também estruturas denominadas merossomos, que abrigam vários merozoítos e garantem a liberação destes para a circulação sanguínea (STURM et al., 2006). Há evidências

de que os merossomos atuam protegendo a célula infectada da morte por apoptose, ao inibir a exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática das células infectadas e retendo os níveis de cálcio (Ca^{2+}) intracelulares no plasma. A fosfatidilserina é também um sinalizador para as células fagocíticas e, segundo o exposto acima, as células infectadas são protegidas da fagocitose e de células do sistema imune (STURM et al., 2006).

Os merozoítos liberados na corrente sanguínea possuem vida curta e altamente suscetível à fagocitose, portanto evitam o contato com macrófagos e rapidamente invadem os glóbulos vermelhos, iniciando o ciclo assexuado eritrocitário (BAER et al., 2007). O estágio eritrocitário é o responsável pelas manifestações clínicas. Os merozoítos, após invadirem os eritrócitos, transformam-se em trofozoítos jovens e, posteriormente, em trofozoítos maduros e esquizontes que, por esquizogonia, originarão outros merozoítos capazes de infectar novos eritrócitos.

A fase eritrocítica do parasita coincide com a patogenia e as manifestações clínicas da malária, caracterizadas por síndromes febris cíclicas (paroxismo malárico), que variam de 48 a 72 horas, de acordo com a espécie, acompanhadas de mal-estar, cefaleia, cansaço, mialgia, entre outros. O início dos sinais clínicos pode variar, dependendo da espécie, de 7 a 15 dias (BAER et al., 2007).

No hospedeiro invertebrado, o ciclo inicia-se quando macrogametócitos e microgametócitos são ingeridos pela fêmea durante a hematofagia no ser humano. No estômago do mosquito ocorre uma fase sexuada, resultando na formação de um zigoto (oocineto), que posteriormente migra para se posicionar nas microvilosidades do intestino. Assim, por esporogonia, resultam em oocistos com formas infectantes

(esporozoítos). Os esporozoítos liberados migram para as glândulas salivares do mosquito e poderão ser inoculados em um novo hospedeiro vertebrado (REY, 2008) (Figura 4).

O *P. falciparum* infecta os eritrócitos em qualquer fase de vida, ao passo que o *P. vivax* somente invade os reticulócitos. Além disso, indivíduos que não possuem o antígeno Duffy em suas hemácias são altamente resistentes à infecção por *P. vivax*, pois este atua como ligante para uma proteína encontrada no complexo apical (micronemas) de *P. vivax*, denominada “Duffy Binding Protein” (DBP) (CHITNIS et al., 1996). Indivíduos Duffy-negativos, fenótipo predominante na África Ocidental, foram considerados, durante muito tempo, refratários à infecção por *P. vivax*. Entretanto, nos últimos anos surgiram evidências de transmissão de *P. vivax* em indivíduos Duffy-negativos de uma população do Quênia (RYAN et al*.,* 2006), do Brasil (CAVASINI et al., 2007) e da República do Congo (CULLETON et al., 2009*)*.

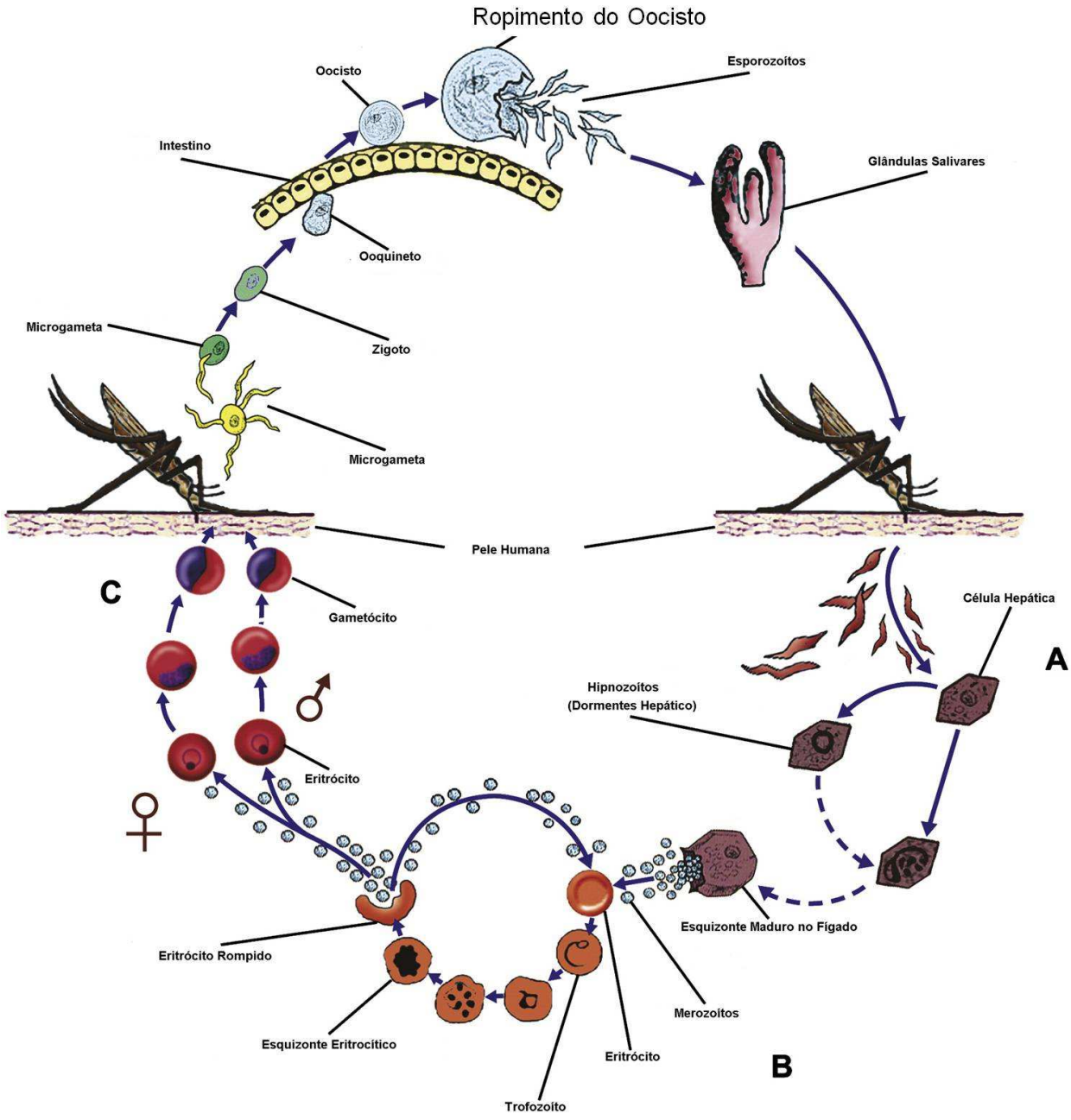


Figura 4: Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* causadoras da malária humana. Fase assexuada pré-eritrocítica ou hepática (A), ciclo eritrocítico (B) e fase esporogônica sexual (C). A forma de hipnozoíto ocorre apenas em *P. vivax* e *P. ovale.* Adaptado do site http://www.luc.edu/biology/williamson.shtml (acessado em 09 de agosto de 2010).

4. Aspectos imunológicos da malária

Os primeiros estudos feitos em humanos, que mostraram que é possível adquirir imunidade protetora contra a malária mediada por anticorpos, foram publicados na década de 1960. Estes estudos demonstraram que a transferência passiva de soros de indivíduos hiperimunes foi capaz de controlar a parasitemia em indivíduos não imunes (revisto por DOOLAN et al., 2009). Assim, a imunidade adquirida à malária está relacionada ao estágio assexuado sanguíneo do parasita. Sua aquisição é lenta para os indivíduos que vivem em áreas endêmicas, podendo levar mais de cinco anos para se desenvolver (revisto por BETTIOL et al., 2010). Crianças de até aproximadamente seis meses de idade têm menor risco de desenvolver a doença, pois anticorpos recebidos passivamente da mãe durante a gestação são capazes de neutralizar o parasita e impedir a manifestação de sintomas. Porém, quando esses anticorpos são perdidos a criança passa a ser um dos maiores alvos da doença em consequência do seu sistema imune não ser suficientemente desenvolvido.

A partir dos cinco anos de idade as crianças começam a desenvolver gradualmente a imunidade, que, apesar de não impedir o estabelecimento de novas infecções, confere a redução no número de parasitas infectantes, a diminuição das sintomatologias clínicas da doença e a redução da mortalidade. Diversos antígenos são expressos nos diferentes estágios do parasita, os quais estimulam o sistema imune do hospedeiro. Condições relacionadas ao hospedeiro, como o desenvolvimento do sistema imunológico, a idade e os mecanismos genéticos de resistência, podem facilitar ou dificultar a aquisição de imunidade e as condições de

transmissão a que esse indivíduo é exposto, bem como os fatores relacionados ao parasita, entre estes a espécie, a variação antigênica e outros.

Estudos sugerem que a aquisição de imunidade ocorre devido à exposição cumulativa ao agente infeccioso, medida pela idade nas comunidades estáveis (BULL & MARSH, 2002). A exposição repetida dos indivíduos ao *Plasmodium* é um dos mecanismos capazes de induzir imunidade, a qual controla a parasitemia na fase sanguínea, reduzindo assim os sintomas clínicos e as complicações graves da doença em regiões endêmicas de malária (CROMPTON et al., 2010).

Como mencionado anteriormente, os anticorpos são importantes mediadores da imunidade adquirida contra a malária, pois promovem a inibição da invasão das hemácias pelos merozoítos, opsonizam merozoítos para a fagocitose, bloqueando a invasão dos parasitas intraeritrocíticos, e ajudam na inibição celular dependente de anticorpos (GOOD et al., 2005). Além disso, os anticorpos podem neutralizar o efeito tóxico associado com a ruptura dos esquizontes, o paroxismo sintomático (calafrios e febre).

Apesar disso, os fatores que controlam o desenvolvimento de imunidade adquirida eficaz após a infecção natural permanecem pouco conhecidos. Nesse contexto, é importante a identificação de antígenos do parasita que possam ser utilizados em estudos imunoepidemiológicos visando melhora na compreensão da imunidade naturalmente adquirida à malária. Os antígenos de superfície de merozoítos, MSP-1, MSP-2, MSP-3, MSP-4, MSP-5, MSP-8, RAP1/2, AMA-1 e EBA-175, são os principais alvos nessas funções, pois estão implicados com o processo de invasão dos eritrócitos (FOWKES et al., 2010). Tais evidências imunológicas não são aplicáveis a crianças menores de 5 anos e em países de baixa transmissão da

doença, pois os indivíduos que não estão expostos constantemente aos vetores infectados perdem a imunidade protetora de forma gradativa e, consequentemente, ficam vulneráveis ao *Plasmodium,* podendo desenvolver as formas graves da doença (MISHRA et al., 2007).

A imunidade à malária é espécie e estágio específico, portanto é necessário desenvolver uma vacina para cada estágio do parasita ou uma vacina combinada contendo antígenos das diferentes fases do parasita (GOOD et al., 1998). Uma vacina para a fase pré-eritrocítica da malária preveniria a infecção pelos esporozoítos ou eliminaria os hepatócitos infectados. Por outro lado, uma vacina baseada em antígenos do estágio eritrocítico reduziria o número de células infectadas e, por conseguinte, a mortalidade. Já uma vacina contra o estágio sexuado bloquearia a transmissão para o vetor, assim como a transmissão para indivíduos que vivem em comunidades isoladas (sem vacinações) e que poderiam entrar em contato com o *Plasmodium* através de visitantes infectados.

Diversas estratégias baseadas em antígenos sintéticos, proteínas e microrganismos recombinantes, ou DNA plasmidial das diferentes formas evolutivas do parasito, como estágios hepáticos e eritrocíticos, visam induzir imunidade protetora eficaz contra malária através de vacinação (MURHANDARWATI et al., 2008; CUMMINGS et al., 2009; HUAMAN et al., 2009). Entretanto, apesar do grande avanço nessa área nos últimos anos, alguns obstáculos, como a complexidade do ciclo biológico, o alto polimorfismo de antígenos alvos e a incapacidade da maioria das vacinas de proporcionar memória imunológica de longa duração no hospedeiro, têm dificultado a obtenção de uma vacina esterilizante.

5. Antígenos de formas sanguíneas candidatos à vacina

5.1. Proteína 1 de Superfície do Merozoíto (MSP-1)

A MSP-1 é uma proteína de 200 kDa, majoritariamente expressa na superfície do merozoíto durante a esquizogonia sanguínea, na forma de multicomponentes do processo proteolítico; no entanto, a importância biológica da MSP-1 para a sobrevivência do parasita permanece desconhecida. Parasitos *nocaute* para o gene da MSP-1 mostraram-se inviáveis, o que sugere que esta proteína é importante para a sua sobrevivência (O'DONNELL et al., 2001). Durante a invasão das células sanguíneas, o precursor da MSP-1 é processado por duas clivagens proteolíticas, sendo que a primeira origina quatro fragmentos 83 kDa, 30 kDa, 38 kDa e 42 kDa. Entre a liberação de merozoítos e a invasão do eritrócito propriamente dita, o fragmento C-terminal de 42 kDa ligado à membrana inicia uma segunda clivagem, originando o fragmento de 33 kDa, que é liberado na corrente circulatória, e o fragmento carboxila-terminal de 19 kDa ($MSP1_{19}$), considerado como precursor no início do ciclo eritrocítico subsequente (BLACKMAN et al., 1990). Existem evidências de que apenas o fragmento de 19 kDa permanece ancorado à membrana pela fração glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo carreado para dentro dos eritrócitos. Isto se repete nas fases iniciais do ciclo eritrocítico subsequente (HOLM et al., 1997; BRANCH et al., 1998; GOOD & DOOLAN, 1999; LAZAROU et al., 2009, MAZUMDAR et al., 2010).

O gene que codifica a MSP-1 de *P. vivax,* cepa Belém, que é conhecido por *Pv*200, codifica 1.726 aminoácidos, os quais apresentam várias características similares a ortólogos de outras espécies de *Plasmodium,* tais como peptídeo sinal, sequências de âncora de GPI, resíduos de cisteínas conservados (região C-

terminal), sítios de N-glicosilação e 23 resíduos de glutamina em linha (DEL PORTILLO et al., 1991). A comparação das sequências de nucleotídeos dos genes da MSP-1 de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. yoelii* revelou a existência de 10 regiões conservadas entre as espécies (ICB) alternando com regiões de maior diversidade (Figura 5). Também foram aproximadas três regiões conservadas entre apenas *P. vivax* e *P. falciparum,* denominados blocos conservados (CB) 3, 7 e 9. A $PvMSP1_{19}$ que se insere na região C-terminal da PvMSP-1 é denominada de bloco 10 (ICB10).

Putaporntip et al. (2002) estabeleceram outra classificação para os blocos que compõem a estrutura da PvMSP-1 (cepa Belém), na qual revelou a existência de seis blocos variáveis, com 445 aa (2, 4, 6, 8, 10 e 12), intercalados a sete blocos conservados com 1.306 aa (1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13), sendo que a $PvMSP1_{19}$ é representada pelo bloco 13, correspondente ao ICB10 (BASTOS, 2007) contendo dois domínios semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF), região que parece estar funcionalmente relacionada à interação entre merozoíto e eritrócito. Egan et al. (1996) observaram, em crianças, que anticorpos contra um dos motivos do fator de crescimento epidermal de $PfMSP1_{19}$ estavam fortemente associados com resistência à malária clínica e com níveis elevados de parasitemia. Assim, a $PvMSP1_{19}$ vem despertando grande interesse como candidata vacinal, pela sua alta imunogenicidade em infecções naturais e experimentais. Imunizações em macacos com a $MSP1_{19}$ de *P. cynomolgi* resultaram em resposta com elevado número de anticorpos e proteção eficaz contra a infecção com as formas sanguíneas do parasita após desafio (PERERA et al., 1998).

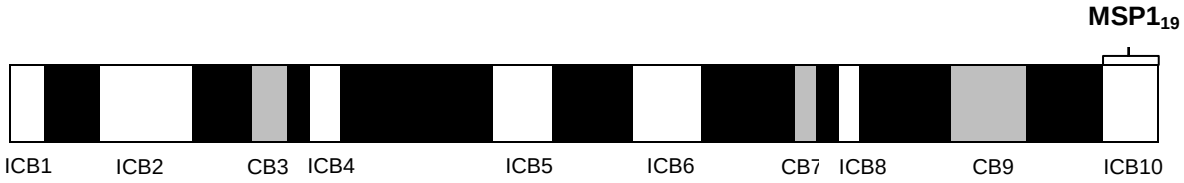


Figura 5: Representação esquemática da MSP-1 de *Plasmodium*. Blocos conservados entre as espécies (ICB) de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. yoelii.* Com > 48% de similaridade de aminoácidos = em branco; blocos conservados (CB) apenas entre as espécies de *P. falciparum* e *P. vivax* com > 50% de aminoácidos similares = em cinza; blocos polimórficos com < 45% aminoácidos similares = em preto. Adaptado de DEL PORTILLO et al. (1991).

Além disso, altos títulos de anticorpos específicos têm sido observados em estudos pré-clínicos após imunizações experimentais em camundongos (SACHDEVA et al., 2004). Estudos transversais realizados na Amazônia brasileira mostraram que indivíduos com malária *vivax* aguda, e/ou prévia exposição, frequentemente apresentam altos títulos de anticorpos contra a PvMSP-1$_{19}$ (SOARES et al., 1997, 1999a, 1999b; CUNHA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2003, 2005; MORAIS et al., 2005; BARBEDO et al., 2007; BASTOS et al., 2007). Devido à elevada capacidade antigênica desta proteína recombinante, ensaios para a detecção de anticorpos específicos por ELISA (LIM et al., 2002; RODRIGUES et al., 2003) e Dot-ELISA (COELHO et al., 2007) foram posteriormente desenvolvidos como métodos de diagnóstico de infecções recentes pelo *P. vivax.*

5.2. Antígeno 1 de membrana apical (AMA-1)

O Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) é expresso na superfície de merozoítos de todas as espécies de *Plasmodium*. Concentrando-se no pólo apical do merozoíto, apresenta de 556 a 563 aminoácidos em todas as espécies de *Plasmodium* (revisto por REMARQUE et al., 2008). O processo de translocação de AMA-1 para a superfície do merozoíto é acompanhado de um precursor de 83 kDa

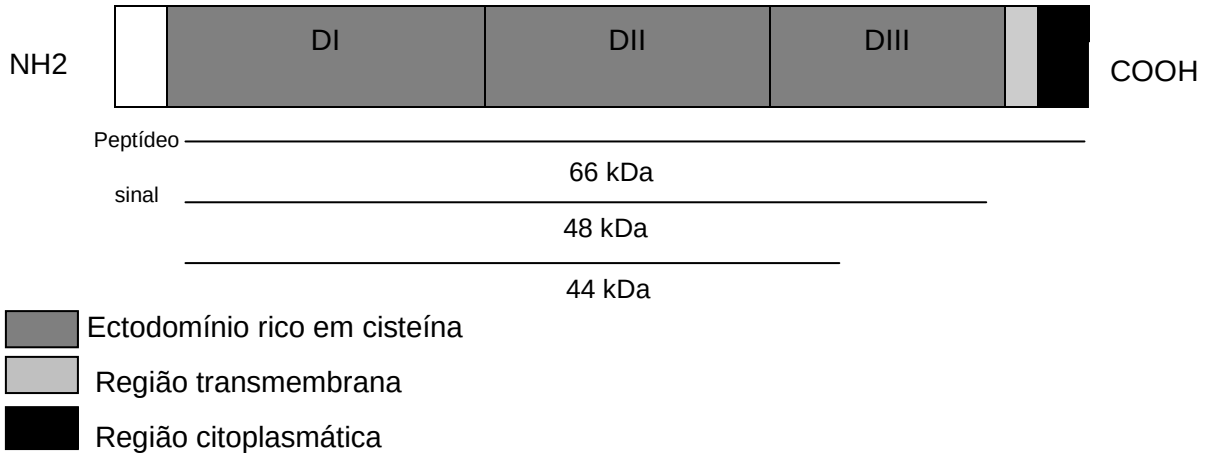
presente nos micronemas do pólo apical do merozoíto que, quando clivado pela região N-terminal anteriormente à invasão de eritrócitos, gera uma proteína madura de 66 kDa, que é transportada para a superfície do merozoíto. Uma vez na superfície de merozoítos, um segundo processo de clivagem ocorre, dando origem à um fragmento de 48 kDa, que forma a maior parte do ectodomínio, e um fragmento com 44 kDa com a quebra no domínio III (Figura 6). O significado biológico do segundo processamento de clivagem ainda não está bem claro. No entanto, sugere-se que os eventos de processamento e redistribuição de AMA-1 podem ser necessários para invasão das células do hospedeiro (TRIGLIA et al., 2000; MITCHELL et al., 2004; DUTTA et al., 2005).

A AMA-1 é formada por três regiões: transmembrânica, citoplasmática e ectodomínio (HOWELL et al., 2001). O ectodomínio se caracteriza pela presença de três domínios distintos (domínios I, II e III), que possuem 16 resíduos de cisteína, formando 8 ligações dissulfídicas. A estrutura tridimensional de AMA-1 de *P. vivax* revelou que os domínios I e II formam módulos “PAN”, que definem a superfamília de proteínas implicadas na acoplagem do receptor de ligação entre proteína-proteína e proteína-carboidrato durante a invasão (PIZARRO et al., 2005).

Há evidências de que AMA-1 participa na reorientação e na ligação do merozoíto no momento de invasão do eritrócito. Além disso, foi demonstrado que AMA-1 do *P. falciparum* pode ser expressa em micronemas de esporozoítos e anticorpos anti-AMA-1 inibem a invasão do parasito, sugerindo assim que a proteína está envolvida na invasão de hepatócitos (SILVIE et al., 2004). Desta maneira, o desenvolvimento de uma vacina baseada na proteína AMA-1 poderia ser eficiente contra infecções na fase pré-eritrocítica e sanguínea, uma vez que esta proteína está presente nos esporozoítos e merozoítos (SILVIE et. al., 2004).

Treeck et al. (2009) caracterizaram a AMA-1 como uma das fortes candidatas ao desenvolvimento de uma vacina, pois anticorpos direcionados contra a proteína preveniram a invasão dos eritrócitos. Outras evidências indicam que anticorpos que interferem na clivagem proteolítica e no processo de redistribuição da proteína inibem a invasão dos hepatócitos e dos eritrócitos pelos esporozoítos e merozoítos, respectivamente (DUTTA et al., 2005).

Os mecanismos pelos quais a imunização com AMA-1 confere a proteção ainda não são bem conhecidos, mas incluem a produção de anticorpos que bloqueiam a entrada dos merozoítos nos eritrócitos, a inibição do crescimento do parasito e a promoção de uma resposta do tipo celular direcionada contra o parasita (HUAMAN et al., 2009). Estudos em modelos animais e *in vitro* demonstraram que anticorpos contra AMA-1 podem reduzir substancialmente a multiplicação do parasito e proteger contra infecções letais (revisto por REMARQUE et al., 2007).



F**igura 6: Representação esquemática da proteína AMA-1 de *Plasmodium,* destacando os fragmentos resultantes da clivagem proteolítica** (adaptado de HOWELL et al., 2001).

5.3. Proteína 3 de Superfície do Merozoíto (MSP-3)

A MSP-3, proteína solúvel expressa durante a esquizogonia e que também parece estar intimamente associada à superfície merozoíto, é outra possível candidata a compor uma vacina contra as formas sanguíneas do parasita (McCOLL & ANDERS, 1997; GALINSKI et al., 1999, 2001). A MSP-3 de *P. vivax* caracteriza-se por uma família de proteínas de superfície de merozoítos, entre estas as denominadas MSP-3α, MSP3β e MSP3γ (GALINSKI et al., 2001). Nas três proteínas foram observadas estruturas semelhantes, que contêm de 35 a 38% de identidade e 48 a 53% de similaridade (ZAKERI et al., 2006). Análises das sequências de aminoácidos destas proteínas indicam que elas não possuem um domínio hidrofóbico transmembrana, nem uma âncora de GPI (GALINSKI et al., 1999). Todas as três proteínas contêm um domínio central com sequência de aminoácidos rica em alanina (31% para a MSP-3α, 23% para a MSP-3β e 25% para a MSP-3γ), com predição para formar estrutura secundária de forma α-helicoidal e estrutura terciária do tipo “coiled-coil” (GALINSKI et al., 1999; GALINSKI et al., 2001; RAYNER et al., 2004; BURGESS, GARBOCZI, SCHUCK, 2005;). Estas alaninas estão organizadas como motivos *heptads* e preenchem preferencialmente as posições 1 e 4 (**A**XX**A**XXX). As posições 5 e 7 são preferencialmente preenchidas por aminoácidos carregados. Os domínios “coiled-coil” possivelmente contribuem para interação proteína-proteína (GONDEAU et al., 2009) (Figura 7). Evidências indicam que a proteína MSP-3α possui o total de seis regiões promissoras para a formação deste tipo de estrutura terciária.

A sequência primária da proteína MSP-3α de *P. vivax* (PvMSP-3α, cepa Belém) indica que esta é constituída de 845 aminoácidos e tem massa molecular aparente de 150 kDa. A proteína apresenta três regiões: conservada,

semiconservada e polimórfica. Foi demonstrado que o gene codificante da proteína MSP-3α é altamente polimórfico, apresentando regiões de inserção e deleção entre diferentes isolados de *P. vivax* e esta diversidade alélica é amplamente utilizada como marcador para distinguir diferentes infecções em estudos populacionais (BRUCE et al., 1999; ZAKERI et al., 2006). Apesar do elevado grau de polimorfismo da proteína na sua região N-terminal, a região C-terminal da PvMSP-3α se mantém bastante conservada, originando subdomínios envolvidos em dois blocos (Bloco I: porção N-terminal polimórfica e Bloco II: região C-terminal de menor variabilidade), em ambos os subdomínios definidos, há alta probabilidade (quase 100%) para formação de estrutura do tipo "coiled-coil". Estes resultados sugerem que a distribuição do polimorfismo se restringe ao gene, não à função, e requer maiores investigações como candidata à vacina (RAYNER et al., 2002; CUI et al., 2003; MASCORRO et al., 2005).

A proteína MSP-3β é constituída por 33-659 aminoácidos e possui massa molecular aparente de 104 kDa (GALINSKI et al., 2001) (Figura 7). O gene que codifica a MSP-3β é altamente polimórfico em isolados naturais, com predomínio de inserções/deleção na região central rica em alanina (YANG et al., 2006). Acredita-se que a região N-terminal está sob seleção positiva da resposta imune o que explicaria a importância do polimorfismo da proteína. A região C-terminal é menos divergente, incluindo regiões hidrofóbicas com cargas negativas, sofrendo seleção positiva menor (RAYNER et al., 2004). Também foi demonstrado que apesar de o gene que codifica a proteína MSP-3β ser altamente polimórfico, certas propriedades físicas da proteína são mantidas, particularmente a habilidade para formação da estrutura terciária em "coiled-coil" (RAYNER et al., 2004). Estes dados sugerem que a manutenção destes domínios estruturais deve ser importante do ponto de vista

funcional da proteína.

Existem poucas informações sobre a funcionalidade das proteínas MSP-3, mas sabe-se que a região C-terminal destas proteínas de *P. falciparum* é altamente conservada. Estudos identificaram que anticorpos anti-MSP-3 seriam capazes de atuar por ADCI (inibição celular dependente de anticorpos) (SOE et al., 2004; SINGH et al., 2004), mecanismo importante para aquisição de imunidade parcialmente protetora contra a fase sanguínea do parasito (GALINSKI et al., 1999). Já foi demonstrado também que a transferência passiva de IgG anti-MSP-3, presente em soro de indivíduos clinicamente imunes, é capaz de controlar a doença e o nível de parasitemia em indivíduos não protegidos que estão expostos à diversidade geográfica de linhagens do parasita (SINGH et al., 2004; RAYNER et al., 2004).

Em estudos anteriores, avaliamos diversos aspectos da resposta imune humana naturalmente adquirida contra 4 proteínas recombinantes (em fusão com Glutathiona S-transferase - GST) derivadas da MSP-3α (C-terminal) e MSP-3β (N e C-terminal e a proteína inteira) de *P. vivax* (CUNHA, 2001). Estes estudos mostraram que a frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG durante a infecção patente contra pelo menos uma das proteínas recombinantes representando a MSP-3α e MSP-3β foi de 44,2% e 54,8%, respectivamente. Em outro trabalho, utilizando as mesmas proteínas recombinantes produzidas a partir de vetores pET, observamos altas porcentagens de respondedores durante a infecção patente contra pelo menos uma das proteínas recombinantes MSP3α e MSP3β (68,2% e 65,9%), respectivamente (JIMENEZ, 2007).

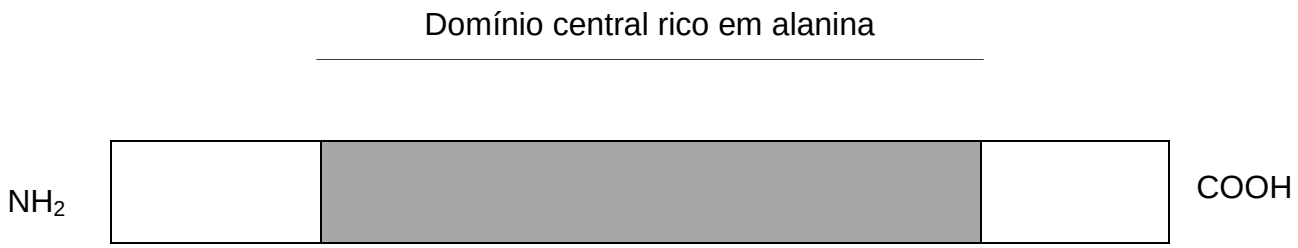


Figura 7: Representação esquemática das proteínas MSP3α e MSP3β. As regiões ricas em alanina e com alta predição para formação de "coiled-coil" estão destacadas em cinza. As cores representam: brancas (regiões conservadas); cinza (regiões altamente polimórficas) (GALINSKI et al., 1999, 2001).

6. Antígenos Duffy

O sistema do grupo sanguíneo Duffy (Fy), recentemente conhecido por antígeno DARC (antígeno Duffy receptor de quimiocinas) foi nomeado para um homem politransfundido hemofílico em 1950, cujo novo anticorpo no soro foi encontrado e consiste de dois principais antígenos Fy^a e Fy^b produzidos pelos codominantes FY*A e FY*B. Os indivíduos Duffy positivos (Fy^+) expressam cinco genótipos comuns [FY*A/FY*A, FY*B/FY*B (homozigoticos), FY*A/FY*B, FY*A/FY*B nulo, e FY*B/FY*B nulo (heterezigoto com dois ou com um alelo expresso)], que definem três fenótipos: Fy (a^+b^+), Fy (a^+b^-), Fy (a^-b^+). Os indivíduos com polimorfismo genético na região promotora do antígeno DARC expressam (FY*B nulo/FY*B nulo ou FY*O), exibindo Duffy negativo com fenótipo $Fy^-Fy(a^-b^-)$, fenótipo encontrado com predominância em negros (CHAUDHURI et al., 1995).

Ensaios experimentais de campo demonstraram que africanos e afroamericanos são altamente resistentes à malária por *P. vivax*, quando desafiados com sangue humano ou mosquitos infectados com número limitado de cepas de *P. vivax* (revisto por MÉNARD et al., 2010). Esta hipótese sustenta-se sobre o fato de

que o genótipo Duffy negativo é a base para a resistência ao *P. vivax*, estabelecendo o paradigma de que o *P. vivax* requer antígeno Duffy positivo para invasão do eritrócito. Recentemente foi demonstrado que indivíduos da Papua Nova Guiné heterozigotos para Fy (+/-) são menos susceptíveis à infecção por *P. vivax* quando comparados aos indivíduos homozigotos (+/+) (KASEHAGEN et al., 2007). Sabe-se que a heterozigosidade (FYA/FY, FYB/FY) diminui o número de sítios antigênicos expressos na superfície do eritrócito em cerca de 50%. No Brasil foram diagnosticados dois casos de infecção por *P. vivax* em indivíduos Duffy negativos (CAVASINI et al., 2007a).

No entanto, outras evidências indicam que a invasão pelas formas hepáticas do *P. vivax* não requer o antígeno DARC, que é expresso na superfície de todos os reticulócitos. Com isso, os indivíduos Duffy, positivo ou negativo, são suscetíveis aos esporozoítos, desenvolvendo a infecção da forma hepática. Quando os merozoítos são liberados para a corrente sanguínea, só os indivíduos Duffy positivos desenvolvem a infecção da forma sanguínea, pois os Duffy negativos não expressam o antígeno DARC e ficam refratários aos estágios sanguíneos de *P. vivax* (MILLER et al., 1976; MAESTRE et al., 2010). Entretanto, recentemente surgiram evidências de transmissão de *P. vivax* em indivíduos Duffy negativos de uma população do Quênia (RYAN et al*., 2006).*

Em estudos prévios realizados no Acre (DA SILVA-NUNES, 2008), foi observado que os genótipos mais frequentes foram FYA/FYA (36,2%), FYB/FYB (21,0%) e FYB/FY (18,5%); enquanto os genótipos menos frequentes foram FYA/FYA (13,3%), FYA/FY (8,7%) e FY/FY (2,3%). Entretanto, nenhuma associação entre nível de expressão de Duffy nos eritrócitos e resposta de anticorpos para antígenos de *P. vivax* foi investigada.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar a resposta de anticorpos contra um painel de proteínas recombinantes derivadas de merozoítos de *P. vivax* em indivíduos de uma comunidade rural do estado do Acre e no seguimento clínico-laboratorial dessa população por 15 meses.

2. Objetivos específicos

2.1. Avaliar a resposta de anticorpos IgG contra as proteínas $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β de *P. vivax* em amostras de indivíduos que participaram do corte transversal (n=396).

2.2. Investigar a associação entre prevalência de anticorpos IgG e as seguintes variáveis epidemiológicas:

a) tempo de residência na área endêmica

b) número de episódios prévios de malária

c) local de residência dos indivíduos

d) fenótipos do antígeno Duffy

2.3. Determinar os títulos de anticorpos IgG contra cada um dos antígenos em indivíduos que se infectaram pelo *P. vivax* durante o seguimento dessa população ao longo de 15 meses (n=41).

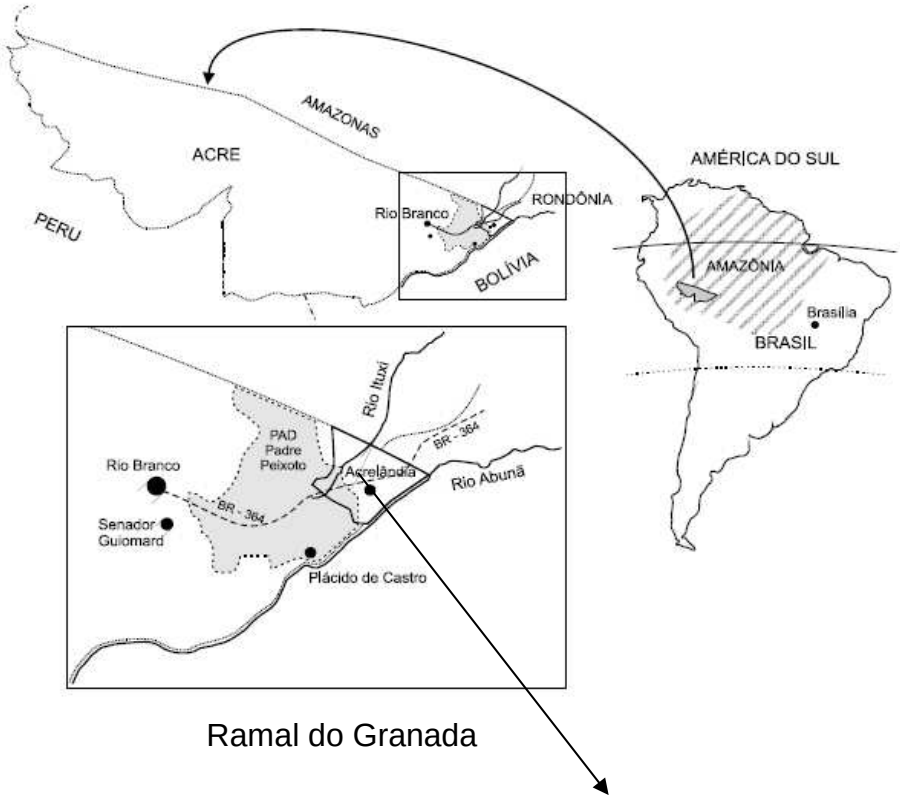
II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Área e população de estudo

O Acre faz parte dos estados da Amazônia Legal. Um Descreto-Lei de 1966 instituiu tratamento especial nos processos de colonização a serem estabelecidos nessa área, para não descaracterização do espaço geográfico (FERREIRA e SALATI, 2005). Neste trabalho, a área de estudo escolhida foi o Ramal do Granada, gleba Q da linha 14 (Km 14 a 30), e também a Reserva da Linha 14, ambos situados a 30-50 km do município de Acrelândia, a 114 km a leste de Rio Branco. Localizada entre os rios Abunã e Iquiri, no Vale do Rio Acre, a área é parte, desde 1982, do Projeto de Assentamento Dirigido (PAD) Pedro Peixoto (Figura 8). A região caracteriza-se por possuir clima equatorial úmido, com período chuvoso, que apresenta média de precipitação de 2.198,5 mm entre dezembro e março (DA SILVA-NUNES et al., 2008).

Segundo a Secretaria Estadual de Saúde do Acre (SESACRE), o município de Acrelândia possui 92 microáreas de notificação de casos de doenças transmissíveis e número maior de notificações de casos de malária. Isto se deve ao aumento de assentamento agrário das populações, levando a incremento na transmissão de malária na região, não somente pelo fato das mudanças ambientais, mas também pela aproximação entre o ser humano e o habitat do vetor. Tanto em 2001 como em 2002, o Ramal do Granada foi a microárea com maior número de notificação de casos de malária (192 em 2001 e 75 em 2002). A linha 14 também é a microárea com maior número de habitantes (415 habitantes cadastrados em 2001 pela coordenação local de controle de endemias). Esta linha foi aberta na década de 1970, no início do PAD Pedro Peixoto.

A escolha da área de estudo baseou-se nas características epidemiológicas, na facilidade de acesso ao local e na existência de três postos de diagnóstico de malária. A transmissão da malária é heterogeneamente distribuída pelo Ramal do Granada, em decorrência dos diferentes padrões de uso da terra e da derrubada de florestas. Em função desses aspectos, a área de estudo foi dividida em quatro setores relativamente homogêneos, com incidência crescente de malária: setor A (do Km 14 ao km 20 do Ramal), setor B (Km 20 a Km 24), setor C (Km 24 a km 30) e setor D (Reserva da linha 14), sendo este último o de maior incidência da doença (Figura 8). Estes índices de incidência foram medidos entre março de 2004 e maio de 2005. O Acre possui cerca de 703.447 habitantes, destes 8.697 residem no município de Acrelândia (IDB, 2008).



Ramal do Granada

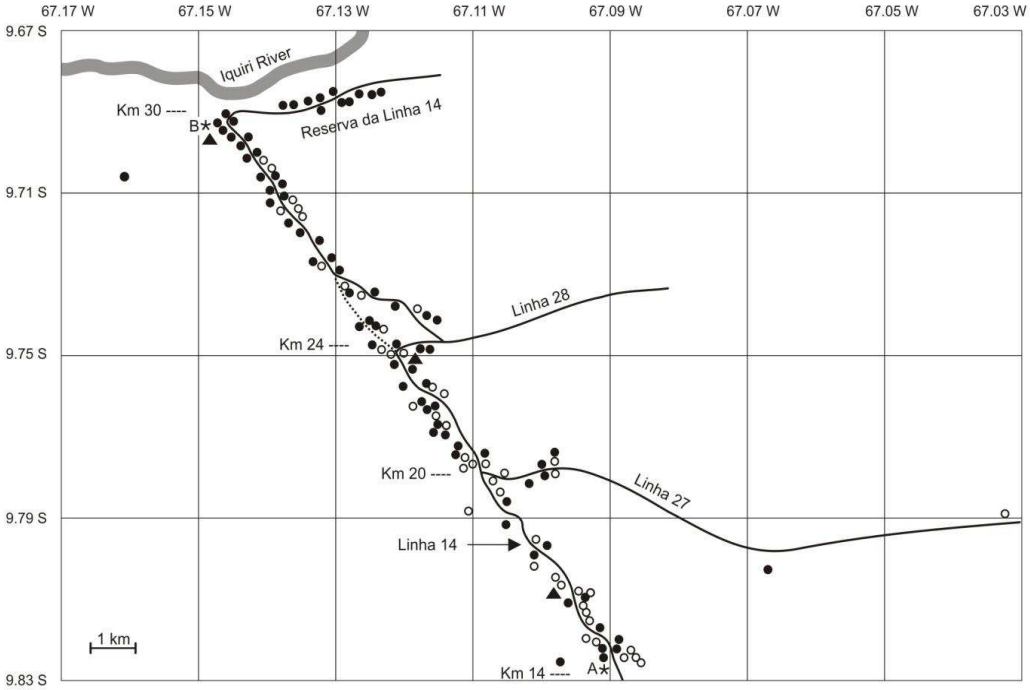


Figura 8: Mapa mostrando a localização do estado do Acre e indicando o município de Acrelândia (Ramal do Granada no PAD), Pedro Peixoto. A localização de cada domicílio é indicada por círculos. Os círculos pretos e brancos indicam, respectivamente, domicílios com e sem casos de malária registrados durante o seguimento longitudinal. Os triângulos pretos indicam os postos de diagnóstico microscópico de malária, mantidos pelo serviço de saúde local, e as estrelas são as habitações usadas para se calcular a distância de cada habitação em relação à casa-índice (revisto por DA SILVA-NUNES et al., 2008).

2. Colheita e manuseio das amostras

2.1. Indivíduos expostos à malária

O total de 396 amostras de soros de indivíduos expostos ao *P. vivax* e *P. falciparum*, residentes em área endêmica, foi coletado no município de Acrelândia, Ramal do Granada, no Estado do Acre, durante o ano de 2004, pela equipe do Dr. Marcelo Urbano Ferreira, do Departamento de Parasitologia (ICB-USP). Este grupo é composto de 219 indivíduos (55,3%), do sexo masculino, e 177 (44,7%), do sexo feminino, com idades entre 2 e 91 anos (média de 27 anos). A partir do total de amostras inicial acima referido, 41 indivíduos (94 amostras), i) *P. vivax* (n= 92), ii) *P.*

falciparum (n= 2) fizeram parte do grupo do seguimento. Pelo período de 15 meses, todos os indivíduos foram mantidos sob vigilância de morbidade, através de visitas diárias (no mínimo 5 vezes/semana) à área de estudo para detectar todos os indivíduos com episódios de malária e outros parâmetros laboratoriais.

Os dados destes indivíduos foram informados em trabalho anterior (DA SILVA-NUNES et al., 2008), o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do ICB-USP, em 19 de julho de 2002. Para a realização do presente estudo, o projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-USP, em 29 de março de 2010.

2.2. Indivíduos sadios

Vinte e nove amostras de soro de indivíduos sadios que nunca estiveram em área endêmica de malária foram utilizadas para o cálculo do "*cut off*" nos ensaios sorológicos. Estas amostras fazem parte da soroteca do laboratório e já foram utilizadas em estudos prévios de nosso grupo (RODRIGUES et al., 2003, 2005; BARBEDO et al., 2007; MUFALO et al., 2008).

3. Composição dos reagentes, soluções e meios de cultura utilizados

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

- Gel de poliacrilamida para eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) – Para 2 géis (minigel).

- 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) - 12 μL.
- 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 - 12μL.
- Gel de separação: acrilamida 15%/Bis-acrilamida 1,5% - 1,25 mL, Trisma base 0,25 M/SDS 0,2% pH 6,8 – 2,5 mL, persulfato de amônio 10% - 100 μL, TEMED - 12μL.
- Tampão de amostra para SDS-PAGE (4x): 10% glicerol; 4% SDS; 100 mM 2-mercaptoetanol (Bio-Rad); 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% de azul de bromofenol (Bio-Rad).
- Tampão de corrida (1x): 35 mM SDS; 160 mM glicina; 25 mM Tris-HCl pH 8,3.
- Solução corante: 1% Coomassie blue R250 (USB); 45% Metanol; 10% ácido acético.
- Solução descorante: 45% Etanol; 10% ácido acético.

3.2. Meios para cultura de bactérias

- LB (Luria Bertani): 2% LB broth base (Invitrogen); 0,5% NaCl (Synth) pH 7,0.
- LB-amp: LB, 100 μg/mL de ampicilina(USB).
- LB-Amp+Clr: LB, 100 μg/mL ampicilina mais 35 mg/mL cloranfenicol (Sigma).
- LB-ágar: LB; 1,5% bacto ágar (BD Biosciences).

3.3. Tampões utilizados para a obtenção da proteína recombinante MSP3β

- Tampão de sonicação**:** 57,5 mM NaH_2PO_4: 3,45 g; 128,7mM NaCl: 3,76 g; pH 7,0

- Tampão de lavagem**:** 57,5 mM NaH_2PO_4: 6,9 g; 128,7 mM NaCl: 7,52 g; 10% Glicerol: 100 g; pH 6,0

- Tampão de eluição (gradiente de imidazol):

Imidazol (mM)*	Volume Imidazol solução estoque (1 M)	Volume de *Wash* Buffer (mL)
0	0	30
30	0,9	29,1
100	3	27
200	6	24

*Em todos os tampões foi adicionado 1 mM de PMSF (Pierce).

- Tampão de diálise para estoque da proteína (em PBS 2L)

3.4. Tampões utilizados para obtenção da proteína recombinante AMA-1 a partir dos precipitados dos extratos bacterianos (corpos de inclusão)

- Tampão de lise: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 10 mM EDTA; 200 µg/mL Lisozima (Sigma); 2 mM PMSF
- Tampão de lavagem do precipitado: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5% CHAPSO (SIGMA)
- Tampão de solubilização: 20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 6 M Uréia; 10% Glicerol
- Tampão de equilíbrio: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl; 6 M Ureia; 5 mM Imidazol; 10% Glicerol
- Tampão de lavagem: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl; 6 M Ureia; 20 mM Imidazol; 10% Glicerol
- Tampão de “refolding”: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl; 20 mM Imidazol; 10% Glicerol; 0,5 mM GSSG; 5 mM GSH; 0,1% Triton X; ureia (6 M, 4 M, 2 M, 1 M, 0,5 M e 0 ureia)
- Tampão de eluição: Tris-HCl 20 mM pH 8,0; 0,5 M NaCl; 10% Glicerol; 0,5 mM GSSG; 5 mM GSH; 0,1% Triton X; 300 mM Imidazol
- Tampão de diálise para estoque da proteína: 50 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 50% Glicerol; 0,1 mM DTT; 1 mM PMSF

3.5. Soluções e tampões para ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

- Tampão para sensibilização das placas: Tampão Carbonato 0,05M (Synth), pH 9,6
- PBS: 8 mM NaH_2PO_4, 2,3 mM Na_2HPO_4, 130 mM NaCl pH final 7,4
- PBS-Tween: PBS, 0,05% Tween 20 (USB)
- Tampão fosfato-citrato: 0,2 M NaH_2PO_4 (Synth), 0,2 M $C_6H_8O_7$ (Synth) pH final 4,5-5,0
- Soluções de bloqueio: PBS, 5% de leite em pó desnatado (Molico®), 2,5% de BSA (Sigma)
- Solução de revelação: σ-Phenylenediamine (OPD, Sigma) 2 mg/mL, 0,03% (vol/vol) de H_2O_2, diluídos em tampão fosfato-citrato (pH 4,5-5,0)

4. Obtenção das proteínas recombinantes em bactérias para uso nos ensaios imunológicos *in vitro*

4.1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes

4.1.1. Região C-terminal da MSP-1 ($MSP1_{19}$) e MSP3α (FP-1)

As proteínas recombinantes $MSP1_{19}$ e MSP3 foram produzidas previamente em *E. coli* (JIMENEZ, 2007) e já estavam disponíveis para este estudo. A seguir, descreveremos o protocolo de expressão das demais proteínas recombinantes utilizadas nesse projeto. A tabela 1 apresenta um sumário das características de cada uma destas proteínas.

Tabela 1 – Aminoácidos (AA), sistema de expressão e linhagem do microrganismo utilizado para expressão das proteínas recombinantes de *P. vivax*

Proteína	AA	Sistema de expressão	Linhagem	Referência
$MSP\text{-}1_{19}$	1615-1704	Bactéria (*E. coli)*	BL21 DE3	CUNHA et al. (2001)
AMA-1	43-445	Bactéria (*E. coli)*	BL21 DE3	RODRIGUES et al. (2005)
MSP-3α (FP-1)	359–798	Bactéria (*E. coli)*	BL21 DE3	JIMENEZ et al. (2008)
MSP-3β (FP-3)	35-654	Bactéria (*E. coli*)	Rosetta DE3	JIMENEZ et al. (2008)

4.1.2. Ectodomínio de AMA-1

A expressão e a purificação da proteína recombinante AMA-1 foram realizadas como descrito previamente por Rodrigues et al. (2005), com algumas modificações. As bactérias recombinantes (*E. coli* BL21 DE3), transformadas com o plasmídio pHis-AMA-1, foram cultivadas em meio LB-Amp (100 ug/mL) por 16 horas a 37°C. A seguir, a cultura foi diluída (1:25) em LB-Amp e incubada a 37°C até atingir densidade óptica (DO_{600}) entre 0,5 e 0,6. As bactérias foram induzidas com 0,1 mM de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, Fermentas), por 3 horas. Após este período, as células foram precipitadas por centrifugação (3.500 rpm/15 minutos/4°C) e ressuspensas em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 200 μg/ml de lisozima, 2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Pierce), seguido de 2 ciclos de sonicação (Branson Sonifier mod. 450, EUA) de 1 minuto e 1 ciclo de 30 segundos (potência 4). O extrato bacteriano foi centrifugado (10.000 rpm/30 min/4°C) e ambas as frações (precipitado e sobrenadante) foram analisadas 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 2 mercaptoetanol (2-ME). O precipitado contendo a proteína (corpos de inclusão) foi lavado por 4 vezes em tampão de lavagem com 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 0,5% CHAPSO. Após as lavagens, o precipitado, contendo a proteína sob forma de corpos de inclusão, foi ressuspendido em tampão de solubilização contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 6 M ureia, 20 mM imidazol, 10% glicerol, seguido de incubação por 2 horas, em banho-maria a 37°C. Após esse período, o material foi centrifugado (14.000 rpm/30 min/4℃) e a eficiência da solubilização foi analisada em SDS-PAGE 12%.

O sobrenadante contendo a proteína solubilizada foi aplicado lentamente por 2 vezes em resina de níquel (Ni Sepharose^{TM} High Performance - Amersham Biosciences) previamente equilibrada com tampão de equilíbrio contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 6 M ureia, 5 mM imidazol, 10% glicerol. Em seguida, a resina foi lavada com tampão de lavagem com 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5% CHAPSO. Posteriormente, uma segunda lavagem foi efetuada com o tampão de “refolding” (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 10% glicerol, 20 mM imidazol, 0,1% triton, 0,5 mM GSSH, 5 mM GSH) constituído por concentrações decrescentes de ureia (6 M, 4 M, 2 M, 1 M, 0,5 M e 0 ureia). Para a eluição da proteína, a resina foi incubada com o tampão de "refolding" sem a presença do agente desnaturante, ureia, porém acrescida de imidazol 300 mM. O material eluído foi analisado em SDS-PAGE 12% e, posteriormente, as frações contendo a proteína foram dialisadas contra o tampão de diálise com 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,1 mM DTT, 1 mM PMSF e 50% glicerol durante a noite, sob agitação, a 4℃. A concentração das proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando o reagente *Protein Assay – Dye Reagent Concentrate* (BioRad).

4.1.3. MSP3β inteira (FP-3)

A expressão e a purificação da MSP3β foram realizadas conforme descrito anteriormente por Jimenez et al. (2008), com algumas modificações. Bactérias recombinantes da linhagem Rosetta (DE3) foram cultivadas em meio LB contendo os antibióticos ampicilina (100 μg/mL) e cloranfenicol (35 mg/mL). A cultura foi mantida a 37°C durante a noite, sob agitação a 200 rpm. A seguir, a cultura foi diluída (1:50) e incubada a 37°C até atingir uma OD entre 0,6 e 0,8. As bactérias foram induzidas com IPTG 0,1 mM, por 4 horas. Após este período, as células foram precipitadas por centrifugação (3.500 rpm/30 minutos/4°C) e o sedimento foi ressuspendido em tampão de sonicação, com 10 mg/mL de lisozima e 1 mM PMSF, seguido de sonicação em potência 15% (5) por 4 ciclos de 3 minutos. O extrato bacteriano foi centrifugado (15.000 rpm/30 minutos/4°C) e ambas as frações (precipitado e sobrenadante) foram analisadas por separação eletroforética em SDS-PAGE 12%.

O sobrenadante contendo a proteína solúvel foi aplicado duas vezes em resina de níquel (Ni Sepharose^{TM} High Performance - Amersham Biosciences), previamente equilibrada por 1 hora em tampão de sonicação. Em seguida, a resina foi lavada em tampão de lavagem e as proteínas que se ligaram à coluna foram submetidas a gradiente de eluição, utilizando-se tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (0, 30, 100, 200 e 400 mM). As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE 12% e coradas por azul de Coomassie. O material eluído foi dialisado contra PBS, durante a noite, sob agitação constante a 4℃. A concentração das proteínas foi determinada como descrito no item 4.1.2.

5. **ELISA para detecção de anticorpos IgG**

A detecção de anticorpos IgG anti-$MSP1_{19}$, anti-AMA-1, anti-MSP3α e anti-MSP3β foi feita por ELISA, conforme descrito por Rodrigues et al. (2003). A concentração de cada proteína recombinante foi ajustada para 4 μg/mL para $MSP1_{19}$ e AMA-1 e 2 μg/mL para MSP3α e MSP3β em tampão carbonato de sódio 0,05 M, de acordo com o reconhecimento pelo anticorpo monoclonal anti-His, GE Healthcare. Em seguida, foram adicionados 50 μL, por cavidade, a microplacas de ELISA (High binding, Costar, New York, EUA). Após incubação durante a noite, à temperatura ambiente, as placas foram lavadas e incubadas em solução de bloqueio (Leite Molico® 5%, BSA 2,5%), por 2 horas a 37℃. I nicialmente, as amostras (soro) foram diluídas 1:100 na solução de bloqueio e 50 μL de cada amostra foram adicionados por poço em duplicata. Em todos os ensaios com as proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* ($MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β) foi feita uma incubação prévia por 1 hora dos soros com extrato de bactérias para adsorção dos anticorpos inespecíficos. As placas foram novamente incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem das placas, outra incubação foi realizada por 1 hora, com 50 μL por poço, de uma solução contendo IgG de cabra anti-IgG (Sigma) humano conjugado à peroxidase (1:5.000) em solução de bloqueio. A reação enzimática foi revelada pela adição de 1 mg/mL de σ-Phenylenediamine (OPD, Sigma) diluído em tampão fosfato-citrato contendo peróxido de hidrogênio. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μL de uma solução contendo H_2SO_4 4N. A Densidade Ótica (DO) foi determinada em leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA), usando comprimento de onda de 492 nm (DO_{492}).

A média da duplicata dos valores de DO_{492} obtidos contra as proteínas recombinantes de *P. vivax* foi subtraída dos valores individuais de DO_{492} obtidos nas cavidades sem adição da proteína. A absorbância discriminante entre os resultados positivos e negativos (*cut off*) foi estabelecida pela média das absorbâncias produzidas por amostras de 29 indivíduos sem história clínica de malária, acrescida de três desvios. As amostras do seguimento com DO_{492} acima do *cut off* para as proteínas recombinantes foram posteriormente testadas em diluições seriadas até a diluição de 1:102.400, com finalidade de determinar o título de anticorpos IgG. O título foi estabelecido como sendo a última diluição que apresentava a DO_{492} acima de 0,1. Todos os ensaios foram realizados com soros controles positivos e negativos. O índice de reatividade (IR) foi calculado dividindo-se a média da absorbância de cada amostra pelo valor do *cut off*, sendo os soros com IR $\geq$ 1 considerados positivos.

6. Análise estatística

As frequências de respondedores obtidas nos ensaios sorológicos foram comparadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2) em tabelas de contingência (2x2), com correção de Yates (http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html) e pelo teste do qui-quadrado para tendências (GraphPad Prism versão 5.0). Os valores dos índices de reatividade dos anticorpos específicos contra as diferentes proteínas foram comparados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis (GraphPad Prism versão 5.0) e por regressão simples linear (SigmaPlot 10). Os títulos de anticorpos foram comparados utilizando-se o teste one-Way ANOVA (GraphPad Prism versão 5.0).

III. RESULTADOS

1. Avaliação comparativa da resposta de anticorpos IgG contra um painel de proteínas recombinantes de *P. vivax* em indivíduos expostos à malária (linha de base do estudo de coorte)

As proteínas recombinantes $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β foram avaliadas por ELISA quanto ao reconhecimento por anticorpos IgG em 396 soros de indivíduos que fizeram parte de uma linha de base (corte transversal) realizado no município de Acrelândia durante o ano 2004. A frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra pelo menos uma das proteínas recombinantes foi de 79,3%. Quando comparamos cada proteína recombinante individualmente, observamos que as proteínas $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β foram reconhecidas por 59,8%, 50,0%, 23,5% e 26,5% dos soros, respectivamente (figura 9). Os resultados mostram que a proporção de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra a proteína $MSP1_{19}$ foi maior em relação à prevalência contra AMA-1 (teste χ^2, $p < 0{,}001$). Por outro lado, as proporções de respondedores contra as duas proteínas foram superiores às observadas contra as proteínas MSP3α e MSP3β (teste χ^2, $p < 0{,}001$, em todos os casos). Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparamos as proporções de respondedores para as proteínas MSP3α e MSP3β ($p > 0{,}05$). Um sumário do perfil de intensidade de resposta obtido para cada uma das proteínas recombinantes encontra-se apresentado no Anexo I.

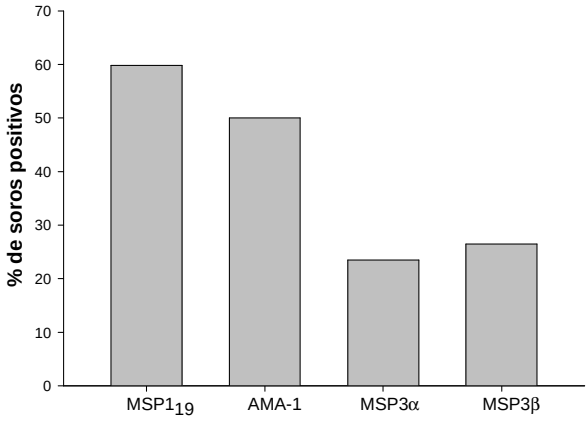


Figura 9: Comparação da resposta de anticorpos IgG contra um painel de proteínas recombinantes em indivíduos expostos à malária. Amostras de soro de 396 indivíduos expostos à malária foram analisadas por ELISA quanto à presença de anticorpos IgG contra as quatro proteínas recombinantes indicadas. Todas as amostras foram testadas na diluição 1:100, em duplicata. Os valores de *cut off* obtidos para cada proteína recombinante foram de 0,247, 0,254, 0,221 e 0,285 para MSP1$_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β, respectivamente.

Entre os 396 indivíduos da linha de base, apenas 43 (10,9%) estavam infectados por *P. vivax*, *P. falciparum* ou tinham malária mista. Com o objetivo de comparar a resposta de anticorpos IgG entre os grupos infectados e não infectados, os 396 indivíduos foram agrupados de acordo com a presença ou ausência de infecção e espécie infectante. Como podemos observar na tabela 2, as frequências de indivíduos respondedores para as proteínas MSP1$_{19}$ e AMA-1 foram mais altas entre os indivíduos infectados por *P. vivax*, atingindo 78,6%, em ambos os casos. Quando comparamos as frequências de indivíduos respondedores para a proteína MSP3α, observamos que estas foram mais altas nos grupos de indivíduos com infecção por *P. vivax* e malária mista, em relação aos indivíduos infectados por *P. falciparum* e indivíduos não infectados (teste χ^2, $p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências de respondedores para a MSP3β nos quatro grupos investigados (teste χ^2, $p > 0,05$).

Tabela 2. Resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β, de acordo com a presença ou a ausência de parasitemia na linha de base do estudo de coorte

Presença ou ausência de infecção	Nº de indivíduos	Número de respondedores (%)			
		$MSP1_{19}$	AMA-1	MSP3α	MSP3β
NI	353	211 (59,7)	172 (48,7)	79 (22,4)	90 (25,5)
Pv	14	11 (78,6)	11 (78,6)	7 (50)	5 (35,7)
Pf	17	10 (58,9)	9 (52,9)	3 (17,6)	6 (35,3)
Mista	12	5 (41,7)	6 (50)	6 (50)	3 (25)
TOTAL	**396**	**237 (59,8)**	**198 (50)**	**95 (23,9)**	**104 (26,3)**

A figura 10 apresenta os valores individuais de níveis de anticorpos IgG contra cada uma das proteínas em estudo, expressos como Índice de Reatividade (IR). Podemos observar que os IR de anticorpos IgG obtidos contra $MSP1_{19}$ e AMA-1 foram significativamente maiores do que os obtidos para MSP3α e MSP3β (teste Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre valores de IR de anticorpos contra as proteínas recombinantes $MSP1_{19}$ e AMA-1, assim como entre os valores de IR obtidos contra as proteínas MSP3α e MSP3β (teste Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

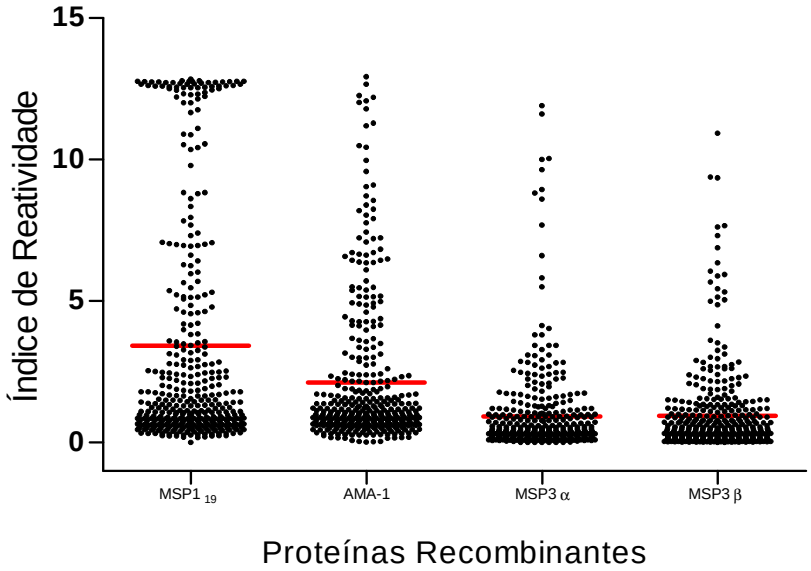


Figura 10: Comparação dos valores individuais de IR de anticorpos IgG contra as diferentes proteínas recombinantes em soros de indivíduos expostos à malária. Cada símbolo representa a reatividade individual das amostras de soro testadas em duplicata por ELISA na diluição de 1:100 contra as proteínas recombinantes indicadas. O IR foi calculado pela média das absorbâncias de cada soro/*cut off.* A linha horizontal representa a média do IR obtida para cada proteína recombinante.

A figura 11 mostra a análise das correlações entre valores individuais de IR obtidos com as quatro proteínas recombinantes de *P. vivax.* Nestes gráficos podemos observar que o mais alto coeficiente de determinação (r^2) foi obtido quando foram comparadas as reatividades de anticorpos entre as proteínas recombinantes $MSP1_{19}$ *versus* AMA-1 (r^2 = 0,481) e pelo par das proteínas recombinantes MSP3α *versus* MSP-3β (r^2= 0,458). Em contrapartida, coeficientes de determinação mais baixos foram observados quando comparamos o reconhecimento das proteínas AMA-1 *versus* MSP3α, $MSP1_{19}$ *versus* MSP3β, AMA-1 *versus* MSP3β e $MSP1_{19}$ *versus* MSP3α (r^2= 0,302; r^2= 0,269; r^2= 0,269 e r^2= 0,202), respectivamente.

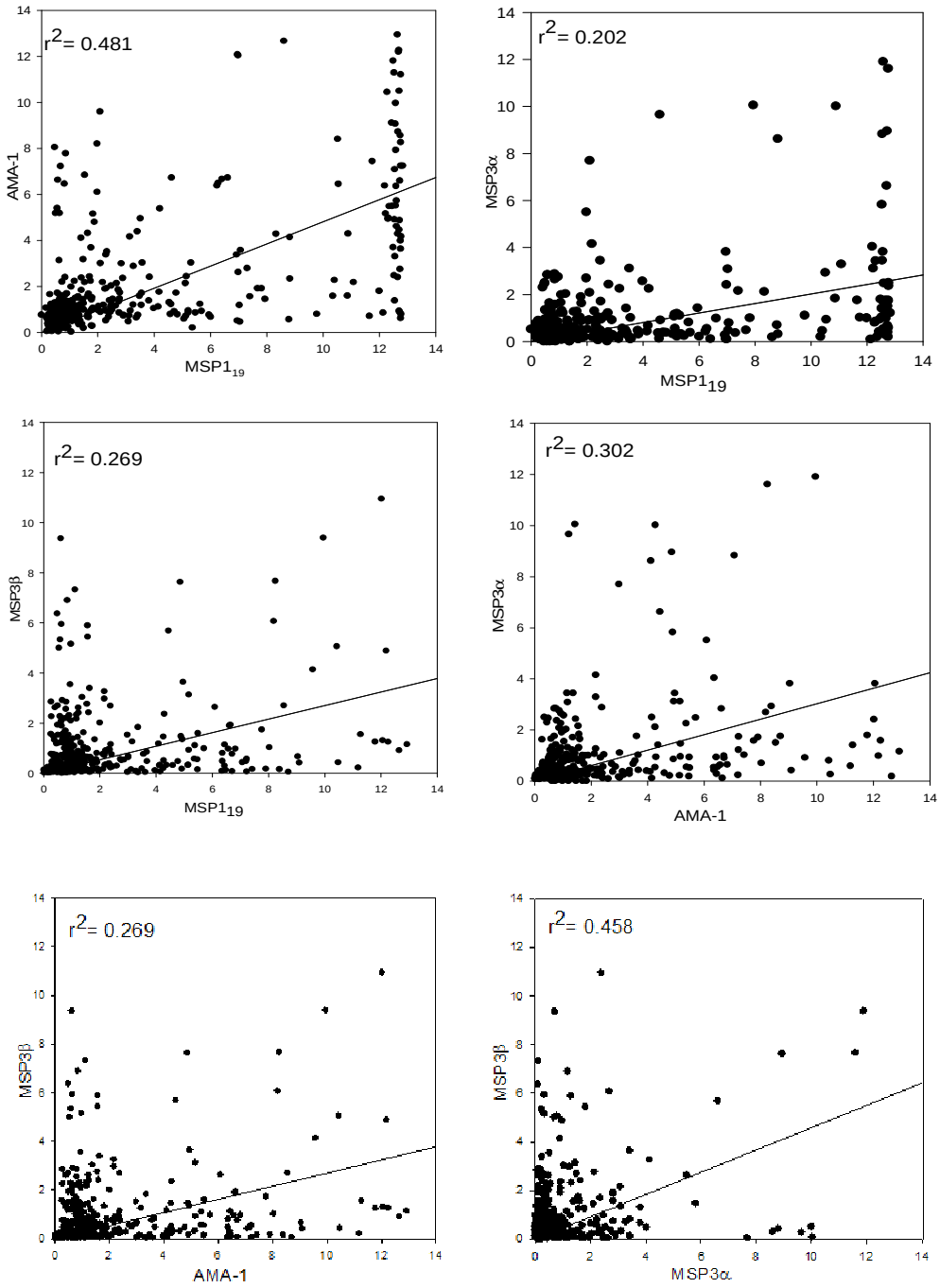


Figura 11: Correlação entre o reconhecimento das diversas proteínas recombinantes por soros de indivíduos expostos à malária. Todas as amostras foram testadas na diluição 1:100, em duplicata. Os símbolos representam o índice de reatividade de cada amostra para duas proteínas recombinantes simultaneamente. Os valores de coeficiente de determinação (r^2) estão indicados em cada painel. $MSP1_{19}$ *versus* AMA-1 e MSP3α *versus* MSP3β (teste Kruskal-Wallis $p > 0,05$), $MSP1_{19}$ *versus* MSP3α, $MSP1_{19}$ *versus* MSP3β, AMA-1 *versus* MSP3α e AMA-1 *versus* MSP3β (teste Kruskal-Wallis $p < 0,05$).

2. Efeito do tempo de residência (em anos) na área endêmica de malária sobre a resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes de *P. vivax*

Com a finalidade de avaliar se a frequência de respondedores contra as proteínas recombinantes em estudo aumenta de acordo com a exposição cumulativa à malária, 392 indivíduos, que informaram o tempo de residência na área em estudo, foram subdivididos em cinco grupos: i) 0-5 anos (n=49), ii) 6-10 anos (n=97), iii) 11-15 anos (n=77) iv) 16-20 anos (n=88), v) >20 anos (n=81). Os dados da figura 12 mostram uma tendência de aumento da prevalência de respondedores para as proteínas $MSP1_{19}$ (χ^2=9,8, $p < 0,05$), AMA-1 (χ^2=26,4, $p < 0,0001$) e MSP3α (χ^2=9,7, $p < 0,05$) em função do maior tempo de residência na área endêmica. Por outro lado, para a proteína MSP3β, não observamos essa tendência (χ^2=9,0, $p > 0,05$).

Quanto à influência da idade, observamos que, no grupo de indivíduos com tempo de residência na área endêmica entre 0 e 5 anos, 34,7% do total eram crianças, com prevalência de respondedores de 12,2%, 4,1%, 14,3% e 2% contra as proteínas $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β, respectivamente (Figura 12). No grupo de indivíduos que residiam na área endêmica por 6-10 anos, 53,6% dos indivíduos eram crianças, com porcentagens de respondedores contra as proteínas $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β de 30,9%, 24,7%, 12,4% e 13,4%, respectivamente. Para o grupo de indivíduos com tempo de residência entre 11 e 15 anos, apenas 6,5% do grupo eram crianças, com porcentagens de respondedores de 2,6%, 2,6%, 0 e 1,3% contra as proteínas $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β, respectivamente. Desta forma, concluímos que apesar do elevado número de crianças nos grupos que residiam há menos tempo na área endêmica, o porcentual de respondedores nessa faixa etária foi ainda expressivo.

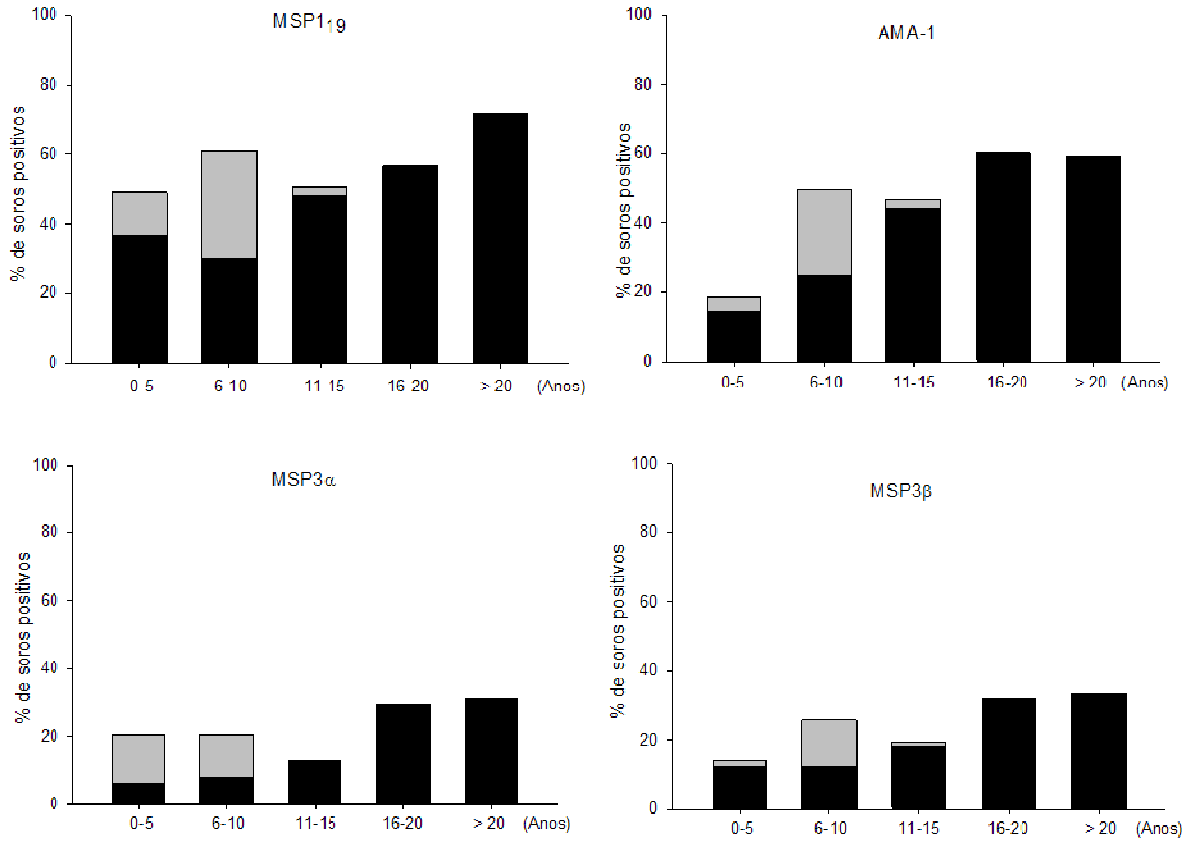


Figura 12: Porcentagem de soros positivos contra as quatro proteínas recombinantes em relação ao tempo de residência (em anos) na área de estudo e a influência da idade nos diferentes grupos. Os indivíduos (n=392) que informaram o tempo de residência na área em estudo foram subdivididos em 5 grupos: i) 0-5 anos (n=49), ii) 6-10 anos (n=97), iii) 11-15 anos (n=77) iv) 16-20 anos (n=88), v) >20 anos (n=81). As partes destacadas em cinza nas barras representam as porcentagens de crianças respondedoras dentro de cada faixa etária.

3. Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos contra as proteínas recombinantes de *P. vivax*

Com intuito de verificar se a frequência de respondedores contra as proteínas aumenta de acordo com o número de episódios prévios de malária, 392 indivíduos, que informaram a sua história clínica de malária, foram distribuídos em cinco grupos: i) NI não infectados (n=235), ii) 1 episódio (n=68), iii) 2 episódios (n=38), iv) 3 episódios (n=15) v) 4 ou > 4 episódios (n=36). Como pode ser

observado na figura 13, observamos uma tendência de aumento da prevalência de respondedores de acordo com o maior número de episódios de malária apenas para a proteína $MSP1_{19}$ (χ^2=10,3, p < 0,05). Entretanto, para as proteínas AMA-1 (χ^2=3,5, p > 0,05), MSP3α (χ^2=6,7, p > 0,05) e para a proteína MSP3β (χ^2=1,4, p > 0,05), não observamos essa tendência.

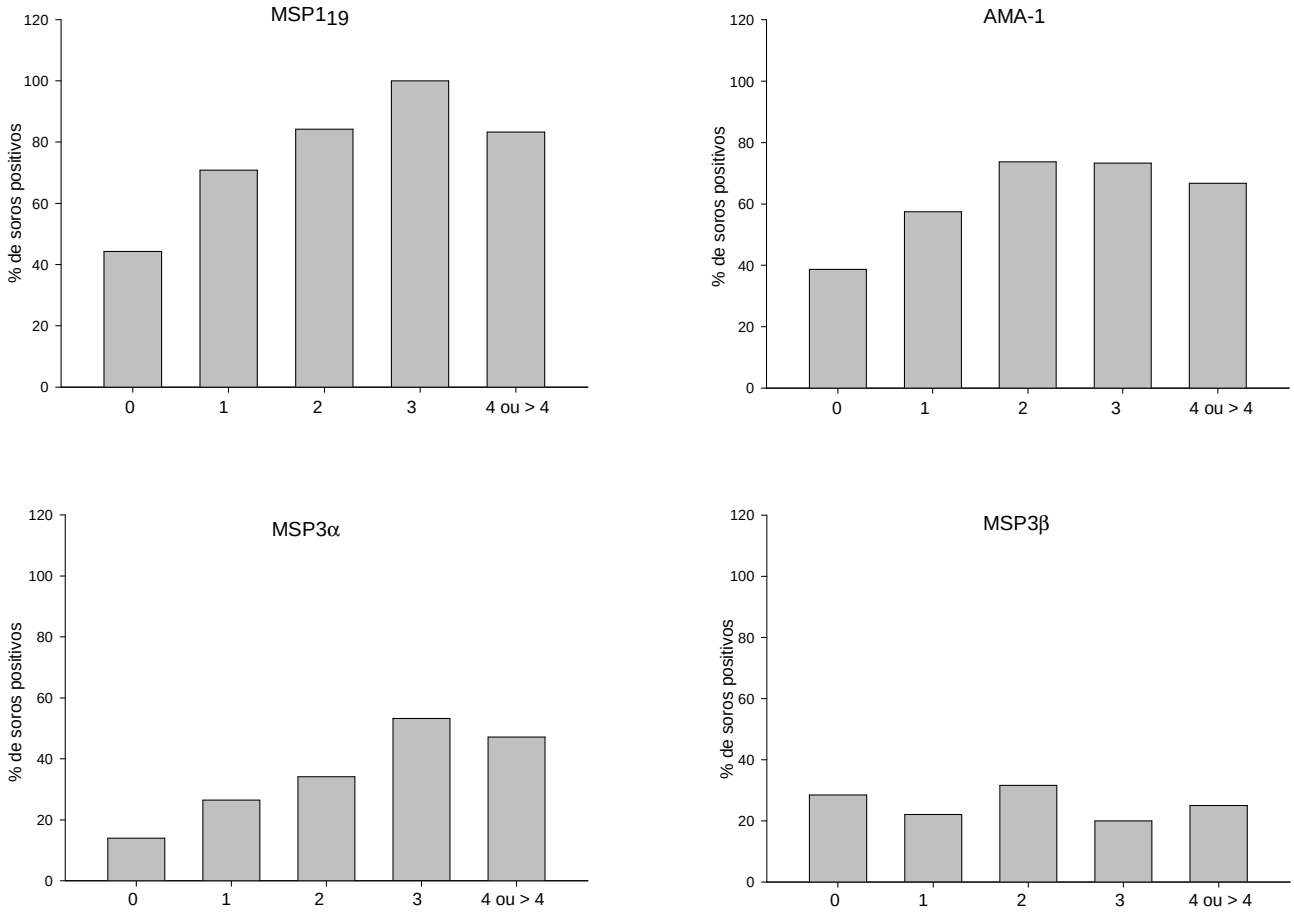


Figura 13: Análise comparativa da resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes em estudo quanto à frequência de episódios prévios de malária. Os indivíduos sem episódios de malária e os que informaram o número de malária prévia na área em estudo (n=392) foram subdivididos em 5 grupos: i) Sem episódios prévios de malária (n=235), ii) 1 episódio (n=68), iii) 2 episódios (n=38), iv) 3 episódios (n=15) v) 4 ou > 4 episódios (n=36). Foram consideradas nessa análise infecções prévias por qualquer espécie *P. vivax, P. falciparum* e malária mista (*P. vivax* e *P. falciparum*).

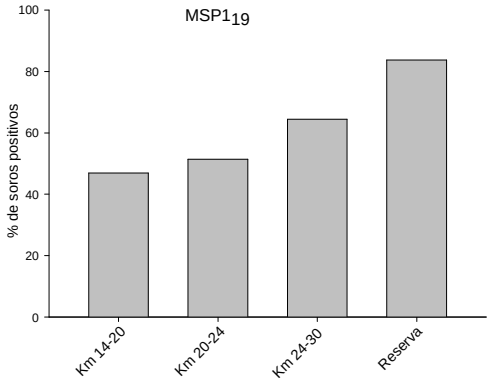
4. Avaliação comparativa da reatividade de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes de *P. vivax* em indivíduos que residem em locais com diferentes riscos de transmissão de malária

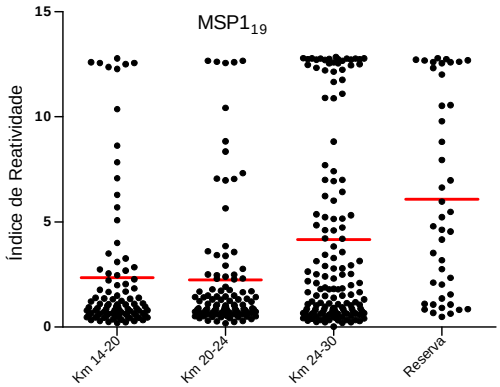
Com o intuito de avaliar se a resposta de anticorpos específicos varia em função do local de moradia dos indivíduos, já que as amostras foram coletadas de regiões com diferentes riscos de transmissão, agrupamos os 392 indivíduos conforme as respectivas residências na Amazônia rural (Figura 14): Km 14-20 corresponde à área de baixo risco (n= 98); Km 20-24, local de médio risco (n= 105); Km 24-30 área de médio risco (n= 146); e a área de reserva, de alto risco de transmissão (n= 43). Quando fizemos a análise comparativa entre os diferentes grupos de indivíduos, observamos que as proporções de indivíduos que apresentaram anticorpos anti-$MSP1_{19}$ foram significativamente mais altas na área de alto risco de transmissão (reserva), quando comparadas com as áreas de baixo (Km 14-20) e médio risco (Km 20-24 e Km 24-30) (teste χ^2, $p < 0,05$). Um perfil semelhante foi observado na reatividade contra AMA-1, exceto que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos os grupos reserva *versus* Km 24-30 (teste χ^2, $p < 0,05$). Para a proteína MSP3α, as proporções de todos os grupos diferem entre si, exceto grupo Km 14-20 *versus* grupo Km 20-24 e reserva *versus* Km 24-30 (teste χ^2, $p < 0,05$). No caso específico da MSP3β, não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos (teste χ^2, $p > 0,05$, em todos os casos). Quando aplicamos o teste qui-quadrado para tendências, confirmamos que a proporção de respondedores para as proteínas $MSP1_{19}$, AMA-1 e MSP3α tende a aumentar em função dos indivíduos residirem em áreas de mais alto risco de transmissão ($p < 0,001$, em todos os casos).

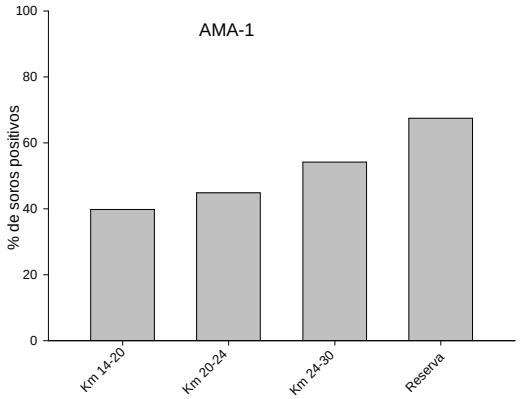
De forma semelhante, quando analisamos os níveis de anticorpos para as proteínas em estudo, observamos que índices de reatividade mais elevados foram detectados nos indivíduos residentes na área de maior risco (reserva), quando comparados com os residentes nas demais áres, exceto para a proteína MSP3β. Os dados de prevalência de respondedores e níveis de anticorpos estão apresentados na figura 14.

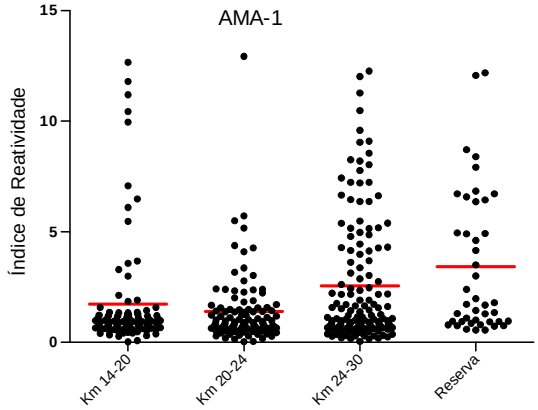
5. Avaliação comparativa do reconhecimento imune das proteínas recombinantes de *P. vivax* em indivíduos com diferentes genótipos de antígeno Duffy

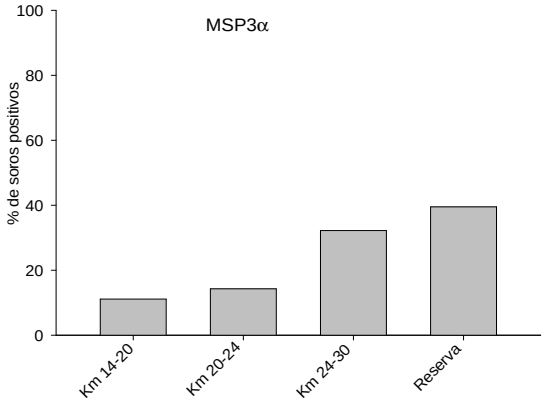
Com intuito de avaliar se o genótipo do antígeno Duffy influencia na reatividade aos antígenos em estudo, 384 indivíduos foram agrupados de acordo com a tipagem molecular do grupo sanguíneo Duffy realizada previamente (DA SILVA-NUNES, 2008): Fy^aFy^a (n= 51), Fy^bFy^b (n= 81), Fy^aFy^b (n= 133), Fy^aFy (n= 37), Fy^bFy (n= 71) e FyFy (n= 11). Na figura 15 observa-se que 11 indivíduos que não expressam o antígeno Duffy nas hemácias foram encontrados, os quais correspondem ao fenótipo FyFy. Neste grupo nota-se que um pequeno porcentual de indivíduos apresenta anticorpos contra as proteínas $MSP1_{19}$, AMA-1 e MSP3β (18,2%). Entretanto, em geral os índices de reatividade observados para as três proteínas foram baixos com apenas um indivíduo (ID409) apresentando IR > 5 para a proteína $MSP1_{19}$. É interessante ressaltar que este mesmo indivíduo respondeu para mais outras duas proteínas (AMA-1 e MSP3β) e o mesmo relatou ter tido mais de 4 episódios prévios de malária. Os demais indivíduos sorologicamente positivos não relataram terem tido episódios prévios de malária.

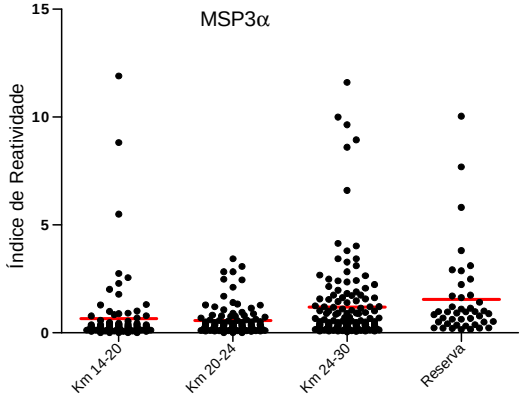

MSP1$_{19}$
% de soros positivos
100
80
60
40
20
0
Km 14-20
Km 20-24
Km 24-30
Reserva

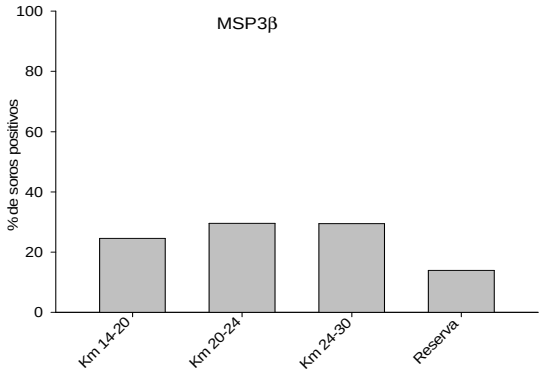

MSP1$_{19}$
Índice de Reatividade
15
10
5
0
Km 14-20
Km 20-24
Km 24-30
Reserva


AMA-1
% de soros positivos
100
80
60
40
20
0
Km 14-20
Km 20-24
Km 24-30
Reserva


AMA-1
Índice de Reatividade
15
10
5
0
Km 14-20
Km 20-24
Km 24-30
Reserva


MSP3α
% de soros positivos
100
80
60
40
20
0
Km 14-20
Km 20-24
Km 24-30
Reserva


MSP3α
Índice de Reatividade
15
10
5
0
Km 14-20
Km 20-24
Km 24-30
Reserva


MSP3β
% de soros positivos
100
80
60
40
20
0
Km 14-20
Km 20-24
Km 24-30
Reserva

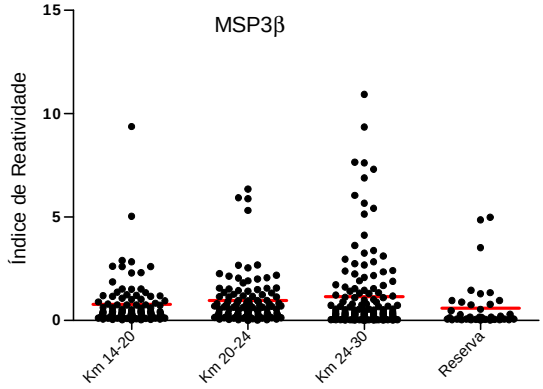
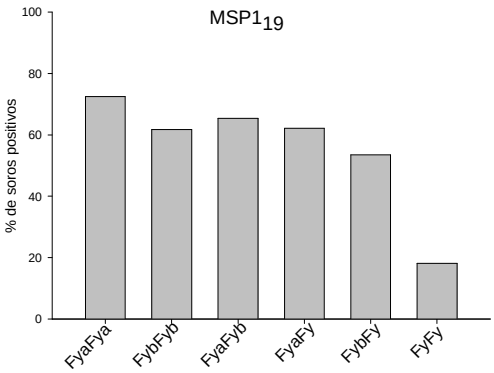
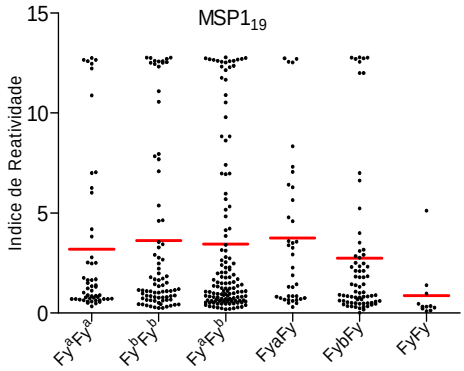
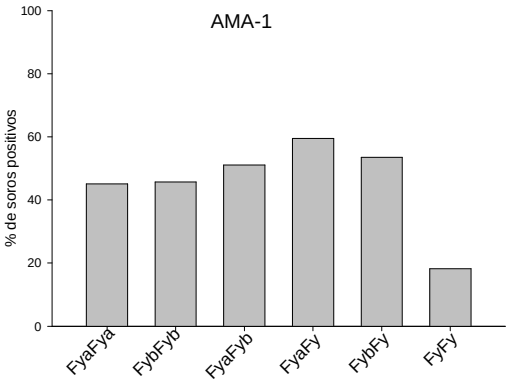

MSP3β
Índice de Reatividade
15
10
5
0
Km 14-20
Km 20-24
Km 24-30
Reserva

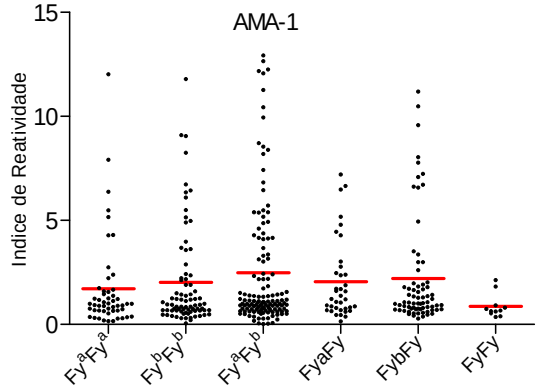
Figura 14: Comparação da reatividade dos anticorpos contra proteínas recombinantes de *P. vivax* em 392 amostras de soros de indivíduos expostos à malária residentes em áreas com diferentes níveis de transmissão. Os indivíduos com local de residência confirmado foram subdivididos em quatro grupos: i) Km 14-20 (n=98), ii) Km 20-24 (n=105), iii) Km 24-30 (n=146), iv) Reserva (n=43). Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra obtidos contra as proteínas recombinantes indicadas. A linha horizontal representa a média do IR obtida para cada proteína recombinante.

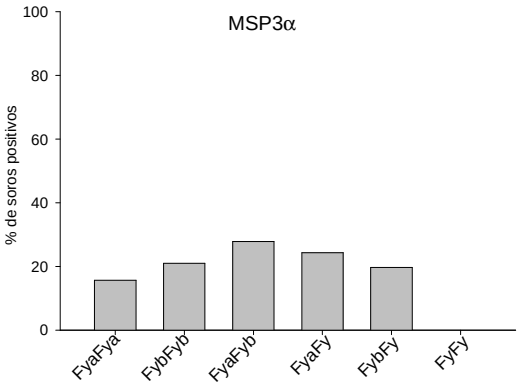
Não encontramos associação entre as frequências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra as proteínas investigadas e a distribuição dos fenótipos sanguíneos Duffy positivos na população estudada (homozigoto ou heterozigoto para o alelo Fy com apenas um alelo funcional), exceto para a MSP3β nas comparações Fy^bFy^b *versus* Fy^aFy^b e Fy^bFy^b *versus* Fy^bFy (teste χ^2, $p < 0,01$ em todos os casos). Entretanto, na comparação dos índices de reatividade dos respectivos grupos não observamos diferenças estatisticamente significativas (teste Kruskal-Wallis $p > 0,05$, em todos os casos). Por outro lado, quando comparamos a prevalência de respondedores entre os indivíduos com fenótipo Duffy positivo *versus* Duffy negativo, as diferenças estatisticamente significativas mais relevantes foram para a proteína $MSP1_{19}$ nas comparações Fy^aFy^a, Fy^bFy^b, e Fy^aFy^b *versus* FyFy (teste χ^2, $p < 0,01$ em todos os casos) e Fy^aFy *versus* FyFy (teste χ^2, $p < 0,05$). Não identificamos nenhum indivíduo FyFy sorologicamente positivo para a proteína MSP3α.

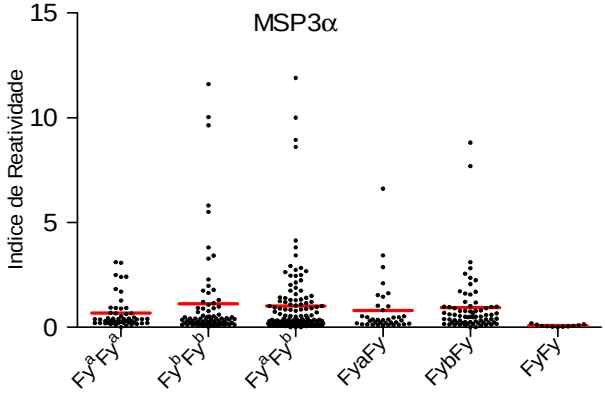

MSP1$_{19}$
% de soros positivos
100
80
60
40
20
0
FyaFya
FybFyb
FyaFyb
FyaFy
FybFy
FyFy

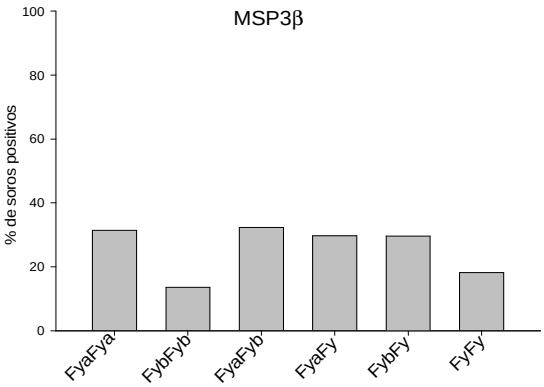

MSP1$_{19}$
Indice de Reatividade
15
10
5
0
Fy^aFy^a
Fy^bFy^b
Fy^aFy^b
FyaFy
FybFy
FyFy


AMA-1
% de soros positivos
100
80
60
40
20
0
FyaFya
FybFyb
FyaFyb
FyaFy
FybFy
FyFy


AMA-1
Indice de Reatividade
15
10
5
0
Fy^aFy^a
Fy^bFy^b
Fy^aFy^b
FyaFy
FybFy
FyFy


MSP3α
% de soros positivos
100
80
60
40
20
0
FyaFya
FybFyb
FyaFyb
FyaFy
FybFy
FyFy


MSP3α
Indice de Reatividade
15
10
5
0
Fy^aFy^a
Fy^bFy^b
Fy^aFy^b
FyaFy
FybFy
FyFy


MSP3β
% de soros positivos
100
80
60
40
20
0
FyaFya
FybFyb
FyaFyb
FyaFy
FybFy
FyFy

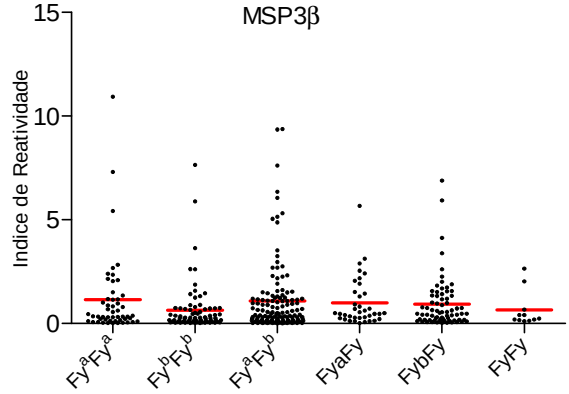

MSP3β
Indice de Reatividade
15
10
5
0
Fy^aFy^a
Fy^bFy^b
Fy^aFy^b
FyaFy
FybFy
FyFy

Figura 15. Comparação da reatividade dos anticorpos anti-proteínas recombinantes de *P. vivax* em 384 amostras de soros de indivíduos expostos à malária com diferentes genótipos quanto ao antígeno Duffy. Os 384 indivíduos que foram fenotipados para o antígeno Duffy foram agrupados como: Fy^aFy^a (n= 51), Fy^bFy^b (n= 81), Fy^aFy^b (n= 133), Fy^aFy (n= 37), Fy^bFy (n= 71) e FyFy (n= 11). Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra obtidos contra as proteínas recombinantes indicadas. A linha horizontal representa a média do IR obtida para cada proteína recombinante.

6. Resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes em estudo durante a infecção aguda por *P. vivax* no seguimento

Com o intuito de verificar o perfil sorológico de indivíduos que tiveram malária ao longo do seguimento longitudinal, analisamos 92 amostras de soros de indivíduos que contraíram uma ou mais infecções por plasmódio em diferentes períodos após o corte transversal. Duas amostras foram positivas para *P. falciparum,* as quais não foram incluídas na análise, por serem de pouca representatividade. Entre as amostras dos indivíduos infectados por *P. vivax*, as porcentagens de positividade para cada proteína recombinante foram de 81,9%, 80,9%, 31,9% e 48,9%, para $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β, respectivamente, confirmando a alta antigenicidade das proteínas $MSP1_{19}$ e AMA-1 na fase aguda da infecção (figura 16).

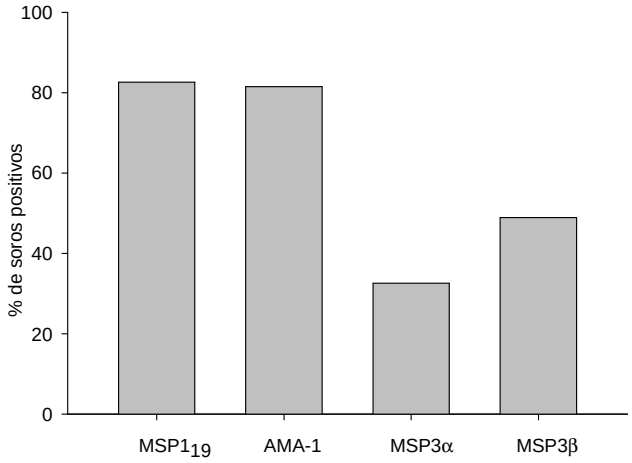


Figura 16: Porcentagem de soros positivos contra as proteínas recombinantes de *P. vivax* durante a infecção aguda no seguimento por *P. vivax*. Foram analisadas 92 amostras de soros obtidos de indivíduos que tiveram malária *vivax* na área em estudo. As amostras foram testadas por ELISA, como descrito na legenda da figura 9.

A fim de avaliar comparativamente os títulos de anticorpos IgG contra cada uma das quatro proteínas recombinantes em 41 indivíduos da linha de base, que tiveram malária nos 15 meses de seguimento, as respectivas amostras foram agrupadas da seguinte forma: i) T0, amostras da linha de base; ii) T1, amostras coletadas durante o primeiro episódio de malária; T2, amostras coletadas durante o segundo episódio de malária; iii) T3 ou > 3, amostras coletadas a partir do terceiro episódio de malária. Como pode ser observado na figura 17, altos títulos de anticorpos foram detectados para as proteínas em estudo, atingindo $\log_{10} \geq 5$ para as proteínas $MSP1_{19}$, AMA-1 e MSP3β. Entretanto, não observamos diferenças estatisticamente significativas quando comparamos os títulos de anticorpos no T0 *versus* T1, T1 *versus* T2 e T2 *versus* T3 ($p > 0,05$, ANOVA). Para efeito ilustrativo, os índices de reatividade das respectivas amostras na diluição 1:100 estão resumidos na tabela 3.

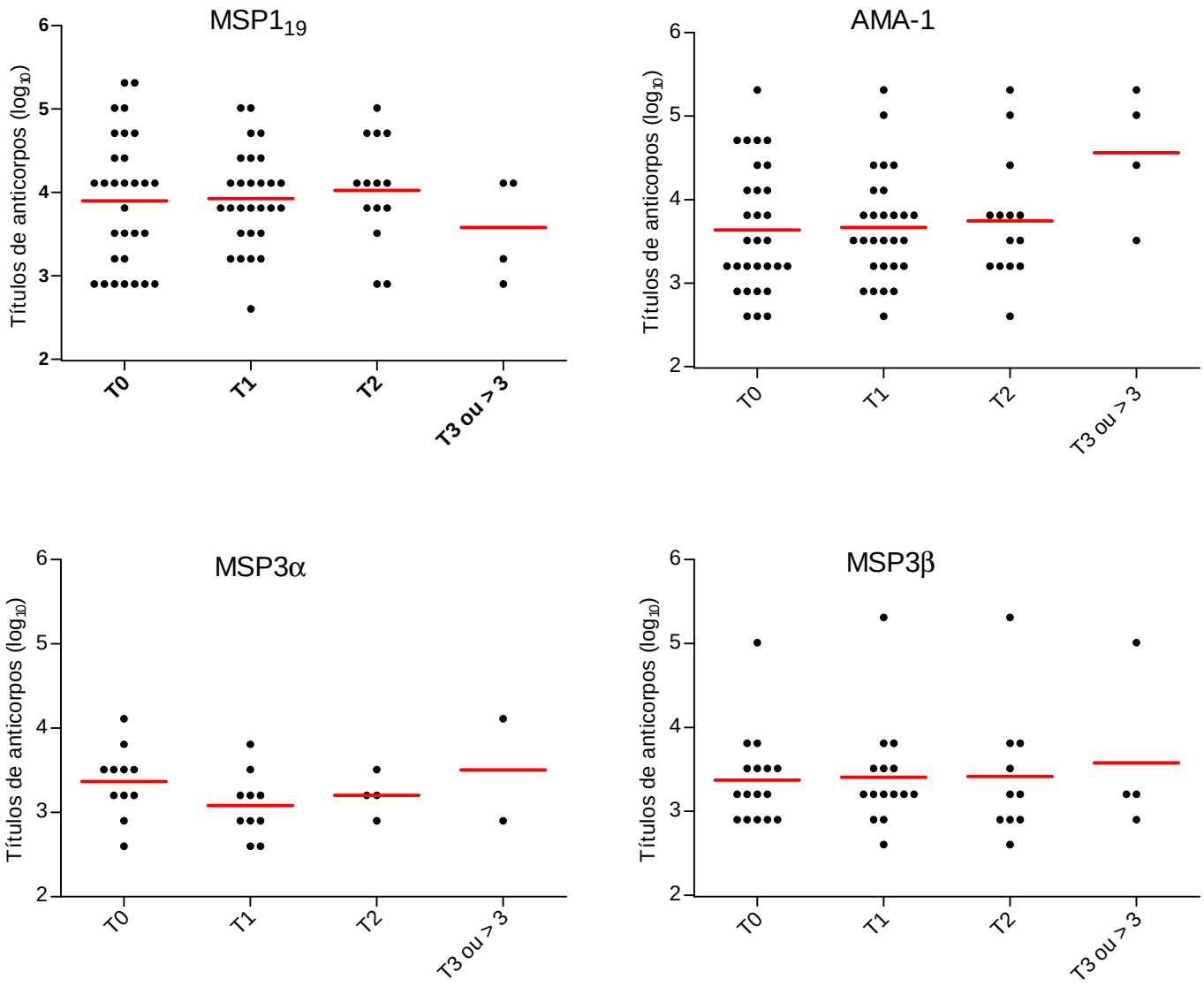


Figura 17: Avaliação comparativa dos títulos de anticorpos IgG contra proteínas recombinantes de *P. vivax* em 92 amostras de soros coletadas durante o seguimento. As amostras foram agrupadas como: i) T0, amostras da linha de base com exame parasitológico negativo, ii) indivíduos que tiveram 1, 2, 3 ou mais episódios de malária por *P. vivax* no seguimento (T1, T2 e T3 ou >3). As amostras foram analisadas por ELISA em diferentes diluição a partir de 1:100. Cada símbolo representa os títulos de anticorpos de cada amostra de soro para as proteínas recombinantes indicadas. A linha horizontal representa a média dos títulos de anticorpos obtidos para cada proteína recombinante.

Tabela 3. Níveis de intensidade de resposta de anticorpos IgG em amostras de indivíduos coletadas durante episódios de malária por *P. vivax* no seguimento longitudinal

ID	Idade	TR	MP	MC	Tempo	$MSP1_{19}$	AMA-1	MSP3α	MSP3β
40	59	22	2Pf		T0				
					T1				
42	26	22		Pv	T0				
					T1				
					T2				
141	19	18	2Pf		T0				
					T1				
145	44	7			T0				
					T1				
183	33	33			T0				
					T1				
					T2				
187	38	16			T0				
					T1				
220	11	11			T0				
					T1				
248	22	7	1 (Pf+Pv)		T0				
					T1				
250	37	5		Pv	T0				
					T1				
					T2				
264	20	20	1 (Pf+Pv)		T0				
					T1				
267	9	8	1 Pf+1Pv		T0				
					T2				
271	49	19			T0				
					T1				
277	15	10	3Pf+1Pv		T0				
					T1				
290	48	48		Pv	T0				
					T1				
					T2				
291	33	23	1Pf	Pf	T0				
					T2				
312	19	19	1Pf		T0				
					T1				
316	27	5	2Pf		T0				
					T1				
					T2				
326	35	1	2Pf		T0				
					T1				
					T4				
339	40	10			T0				
					T2				
347	41	10	1Pf		T0				
					T1				

ID	Idade	TR	MP	MC	Tempo	$MSP1_{19}$	AMA-1	MSP3α	MSP3β
356	34	10	1Pf	Pv	T0				
					T1				
					T2				
372	33	11	4Pf+ 4Pv	Pv	T0				
					T1				
					T2				
					T3				
373	13	8	6Pf		T0				
					T1				
380	65	40	11 mistas		T0				
					T2				
					T4				
388	27	27	1Pv		T0				
					T1				
395	39	5	5Pf+1Pv		T0				
					T1				
396	14	5	3Pf		T0				
					T1				
398	31	5	5Pf+2Pv		T0				
					T1				
405	18	18	2Pf		T0				
					T1				
409	29	29	4Pv		T0				
					T1				
417	38	12	7Pf+1Pv	Pv	T0				
					T1				
					T5				
419	16	10	9Pf+1Pv		T0				
					T1				
424	24	4	2Pv		T0				
					T1				
438	17	17			T0				
					T1				
439	70	70		Pv	T0				
					T1				
440	17	17	2Pf		T0				
					T1				
443	23	4	11Pf+1Pv		T0				
					T1				
459	50	9	1Pf +1Pv		T0				
					T2				
463	19	9	1Pv		T0				
					T2				
484					T0				
					T2				
520	24	15			T0				
					T1				
					T2				

Noventa e duas amostras de soros (diluídas 1:100) foram analisadas quanto à presença de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes indicadas. “ID” refere-se ao número de identificação do indivíduo; Idade; TR= representa o tempo de residência do indivíduo (em anos) na região Amazônica; MP= malária prévia; MC= malária durante a coleta; T0 representa amostras coletadas na linha de base (sem parasitemia); T1, T2, T3, T4 e T5 representam amostras coletadas durante a infecção por *P. vivax* contraída ao longo do seguimento. Os valores do índice de reatividade (IR) ≥ 1 foram considerados positivos e estão representados nos quadrantes por intensidade de cores: do mais claro para o mais escuro (IR ≥ 1 a < 2,5; IR ≥ 2,5 a < 5; IR ≥ 5 a < 10 e de IR ≥ 10).

IV. DISCUSSÃO

Estima-se que cerca de 3 bilhões de pessoas no mundo correm risco de contrair malária por *P. vivax.* No Brasil, essa espécie causa mais de 80% dos casos de malária e, nos últimos anos, tem se observado aumento crescente de casos graves e, algumas vezes, fatais (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax,* nossos estudos estão focados em investigar diversos aspectos da resposta imune naturalmente adquirida contra proteínas recombinantes baseadas em antígenos de estágios assexuados sanguíneos do *P. vivax*. Para isso, em estudos prévios, produzimos diversas proteínas recombinantes baseadas na $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β a partir de diferentes sistemas de expressão em *E. coli* (CUNHA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2005; JIMENEZ et al., 2008), em *Saccharomyces cerevisiae* (SOARES et al., 1999c), VICENTIN et al., 2010). Estas proteínas recombinantes foram utilizadas com sucesso em estudos imunoepidemiológicos em indivíduos de áreas endêmicas do Pará, do Mato Grosso e do Amazonas (SOARES et al., 1997, 1999a; RODRIGUES et al., 2003, 2005; MORAIS et al., 2005, 2006; OLIVEIRA et al., 2006; BARBEDO et al., 2007; JIMENEZ, 2007; MUFALO et al., 2008; CERÁVOLO et al., 2009).

No presente trabalho, demos continuidade a esses estudos imunoepidemiológicos concentrando-se em uma comunidade rural do Acre, onde, desde janeiro de 2003, o grupo do Dr. Marcelo U. Ferreira (ICB-USP) tem estudado fatores demográficos, socioeconômicos, ambientais, genéticos e imunológicos associados ao risco de malária e à sua expressão clínica (DA SILVA-NUNES & FERREIRA, 2007; DA SILVA-NUNES et al., 2008). Em conjunto, nossos estudos em colaboração visam contribuir para o estabelecimento das condições necessárias aos ensaios clínicos futuros.

Neste contexto, a resposta de anticorpos contra as proteínas recombinantes $MSP1_{19}$, AMA-1, MSP3α e MSP3β foi avaliada em 396 indivíduos que fizeram parte da linha de base de uma coorte e foram acompanhados do ponto de vista clínico e laboratorial durante 15 meses. Inicialmente, confirmamos que as frequências de indivíduos expostos ao *P. vivax,* que apresentaram anticorpos IgG contra as proteínas $MSP1_{19}$ e AMA-1, foram consideradas expressivas na linha de base, sendo de 59,8% e 50%, respectivamente (figura 9 e tabela 2). Resultados semelhantes já haviam sido demonstrados anteriormente em outros estudos realizados em populações com diferentes níveis de exposição à malária no Brasil (DA SILVA-NUNES et al., 2008; BASTOS et al., 2007; MORAIS et al., 2005, 2006), assim como em outras áreas endêmicas (MEHRIZI et al., 2009; SETH et al., 2010).

Por outro lado, em relação à resposta de anticorpos contra as proteínas da família MSP-3 de *P. vivax*, existem poucos dados na literatura (CUNHA, 2001; JIMENEZ, 2007; LIMA-JUNIOR et al., 2011). As frequências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG para a MSP3α e MSP3β foram de 23,9% e 26,3%, respectivamente (figura 9 e tabela 2), sendo estas frequências mais baixas do que as obtidas anteriormente por Jimenez (2007), analisando amostras de indivíduos durante a infecção patente por *P. vivax* (68,2% de positividade para a MSP3α e 65,9% para a MSP3β). De fato, dentre os indivíduos infectados da linha de base (10,9%) as porcentagens de respondedores contra todas as proteínas foram mais altas, particularmente em indivíduos diagnosticados com malária *vivax*, como pode se observar na tabela 2. Entre os indivíduos infectados por *P. falciparum*, a positividade para as proteínas de *P. vivax* testadas pode ser atribuída a infecções anteriores por essa espécie de parasito.

Além das porcentagens de respondedores terem sido mais altas, observamos, pela distribuição dos índices de reatividade, que os níveis de anticorpos contra as proteínas $MSP1_{19}$ e AMA-1 foram mais altos do que para as proteínas MSP3α e MSP3β (figura 10). A análise comparativa do índice de reatividade dos anticorpos IgG, entre os pares de proteínas estudadas, também revelou associação mais alta entre o reconhecimento imune das proteínas $MSP1_{19}$ *versus* AMA-1*,* confirmando que estas proteínas foram imunodominantes em relação as proteínas MSP3α e MSP3β (figura 11). Uma possível explicação para a baixa antigenicidade das proteínas MSP3α e MSP3β seria a diversidade antigênica de ambas as proteínas encontradas em isolados naturais (JIMENEZ, 2007).

Quando avaliamos as associações entre presença de anticorpos contra cada uma das proteínas e o tempo de exposição ao parasito na área endêmica, verificamos uma associação positiva, em alguns dos grupos comparados. Ou seja, de modo geral, a exposição cumulativa, medida pelo tempo de residência na área endêmica, interfere na positividade para as proteínas estudadas, com exceção da MSP3β (figura 12). Em estudos prévios, já havia sido demonstrada a associação positiva entre os níveis de IgG contra a $MSP1_{19}$ e a AMA-1 e o período de residência em diferentes áreas endêmicas na Amazônia (MORAIS et al., 2005, 2006; CERÁVOLO et al., 2005).

A fim de avaliar o efeito da exposição prévia aos antígenos das formas sanguíneas de *P. vivax*, verificamos que as proporções de indivíduos que apresentavam anticorpos IgG contra as proteínas $MSP1_{19}$, AMA-1 e MSP3α tendem a aumentar com o maior número de episódios de malária informados pelos moradores da área em estudo. Porém, nenhum efeito *boost* foi observado para a MSP3β (figura 13). Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo em outras áreas

de transmissão focal de malária, observamos que múltiplos episódios prévios de malária aumentam a frequência de indivíduos sorologicamente positivos contra as proteínas $MSP1_{19}$ (BARBEDO et al., 2007), AMA-1 (MUFALO et al., 2008), MSP3α e MSP3β (JIMENEZ, 2007).

Na avaliação de anticorpos IgG contra as quatro proteínas recombinantes em amostras de indivíduos que residem em locais com diferentes riscos de transmissão observamos maior proporção de respondedores contra todas as proteínas testadas em indivíduos residentes na reserva (alto risco), quando comparada com os demais locais de residência (figura 14). Esse perfil de resposta de anticorpos foi semelhante ao observado previamente por Bastos (2007), para qual o local de residência com maior risco de transmissão foi significativamente associado à positividade para a $MSP1_{19}$.

Pouco se conhece sobre a associação entre grupo sanguíneo Duffy e a aquisição de imunidade ao *P. vivax*. Em um estudo realizado com indivíduos de regiões endêmicas do Brasil, foi demonstrado que duplo heterozigotos para o alelo Fy (fenótipo Fy^aFy^b) apresentam maior risco de infecção por *P. vivax* (CAVASINI et al., 2007). Em contrapartida, outro estudo, realizado em indivíduos asiáticos, demonstrou que a heterozigozidade com apenas um alelo funcional para o antígeno Duffy diminui a susceptibilidade à infecção (KASENHAGEN et al., 2007). Quando avaliamos a prevalência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra as proteínas de *P. vivax* e a distribuição de fenótipos do grupo sanguíneo Duffy na população investigada, verificamos que não houve associação entre presença de um ou dois alelos funcionais e positividade para as proteínas em estudo, exceto em alguns casos para a proteína MSP3β (figura 15). Além disso, quando comparamos as frequências de respondedores nos indivíduos Duffy positivos (Fy^+) *versus*

negativos (Fy^-), observamos que estas foram significativamente mais altas entre os indivíduos Fy^+ somente para a proteína $MSP1_{19}$. O que demonstra que a resposta imune adquirida contra $MSP1_{19}$ é influenciada pelo fenótipo do antígeno Duffy do hospedeiro. Neste contexto, um estudo recente realizado na Colômbia (MAESTRE et al., 2010), no qual foi demonstrado que tanto a frequência quanto a magnitude da resposta de anticorpos contra a PvMSP-1 e a PvDBP foram significativamente mais altas entre indivíduos Fy^+ (16% para a PvMSP-1 e 12% para a PvDBP), quando comparadas a indivíduos Fy^- (8% para a PvMSP-1 e nenhum respondedor para a PvDBP). Um resultado interessante de nossa análise foi que identificamos indivíduos Duffy negativos sorologicamente positivos (18,2%) para a maioria das proteínas estudadas ($MSP1_{19}$, MSP3α e MSP3β). Por outro lado, todos foram não respondedores para uma proteína recombinante derivada da DBP (PvRII) (dados não mostrados).

Dos indivíduos que fizeram parte da linha de base do estudo, apenas 10,4% tiveram malária ao longo do seguimento. Em parte, isso pode ser explicado pela baixa taxa de transmissão de malária nos meses subsequentes, dificultando avaliar se a presença de anticorpos na linha de base estaria associada à resistência ou à susceptibilidade em contrair malária *vivax*. As amostras dos indivíduos que tiveram um ou mais episódios de malária ao longo do seguimento foram agrupadas e avaliamos a reatividade destas contra cada uma das quatro proteínas (figura 16). Os resultados demonstram que durante a infecção patente a prevalência de anticorpos IgG contra as proteínas $MSP1_{19}$, AMA-1 e MSP3β foi significativamente mais alta quando comparada as prevalências encontradas na linha de base (figura 9).

A reatividade destas proteínas também foi estimada pela distribuição dos índices de reatividade (tabela 3) e títulos de anticorpos (figura 17), de acordo com o número de episódios de malária contraídos ao longo do seguimento. Quando os níveis de anticorpos determinados na linha de base (não infectados) foram comparados com os títulos de anticorpos durante cada episódio, não houve diferença significativa nesta distribuição, indicando que a magnitude da resposta de anticorpo foi similar, embora uma tendência de aumento após cada episódio fosse observada em alguns casos.

O efeito da exposição ao parasito sobre o desenvolvimento da resposta imune ao *P. vivax* tem sido pouco explorado. É possível que o desenvolvimento de imunidade seja influenciado pelo maior número de episódios de malária, pela idade do primeiro episódio e pela persistência da resposta de anticorpos contra cada um desses antígenos.

Em conclusão, acreditamos que nosso estudo será de grande importância para estudos futuros de triagem clínica na região. Os resultados obtidos aqui, assim como ensaios pré-clínicos em camundongos, que estão sendo conduzidos pelo nosso grupo, indicam que as proteínas $MSP1_{19}$ e AMA-1 são potenciais candidatos para futuros ensaios clínicos no ser humano.

V. CONCLUSÕES

1. A frequência de indivíduos que participaram da linha de base que apresentaram anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes $MSP1_{19}$ e AMA-1 foi significativamente maior do que para as proteínas MSP3α e MSP3β.

2. Em geral, a positividade para as todas as proteínas estudadas apresentou tendência a se associar com o maior tempo de residência na área endêmica, exceto para a MSP3β.

3. A prevalência de anticorpos contra a proteína $MSP1_{19}$ tende a aumentar após o segundo episódio de malária, alcançando 100% no grupo com três episódios prévios.

4. A maior prevalência de anticorpos para as proteínas estudadas foi encontrada na área da reserva, considerada de alto risco de transmissão de malária.

5. Em geral, não observamos associação entre as frequências de indivíduos com anticorpos IgG contra as proteínas investigadas e a distribuição dos fenótipos sanguíneos Duffy positivos na população estudada (homozigoto ou heterozigoto para o alelo Fy); além disso, identificamos indivíduos que, embora não expressem o antígeno Duffy, foram sorologicamente positivos para as proteínas de *P. vivax*.

6. No estudo longitudinal, observamos um aumento da prevalência de respondedores para as proteínas estudadas durante a parasitemia patente, mas não observamos associação evidente entre presença/ausência de anticorpos na linha de base e resistência/susceptibilidade contra reinfecções.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MENARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nat Med**. v. 12 (2): 220-224, 2006.

BAER, K.; KLOTZ, C.; KAPPE, S. I.; SCHNIEDER, T.; FREVERT, U. Release of hepatic *Plasmodium yoelli* merozoite into the pulmonary microvasculature. **Plos Pathogens**. v. 3 (11): e171, 2007.

BARBEDO M. B.; RICCI R.; JIMENEZ M. C. S.; CUNHA M. G.; YAZDANI S. S.; CHITNIS C. E., RODRIGUES M. M., SOARES I. S. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 102: p. 335-339, 2007.

BASTOS M. S. Polimorfismo antigênico e reconhecimento de regiões variáveis da proteína 1 de superfície de merozoíto de *Plasmodium vivax* (PvMSP-1) por anticorpos naturalmente adquiridos na Amazônia Ocidental Brasileira. **Tese de mestrado**, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação Doenças Infecciosas e Parasitárias, 2007

BASTOS M. S.; NUNES M. S.; MALAFRONTE R. S.; HOFFMANN E. H. E.; WUNDERLICH G.; MORAES S. L.; FERREIRA M. U. Antigenic polymorphism and naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in rural amazonians. **Clin Vaccine Immunol**. v. 14 (10): p. 1249–1259, 2007.

BETTIOL, E.; CARAPAU, D.; GALAN-RODRIGUEZ, C.; OCAÑA-MORGNER, C.; RODRIGUEZ, A. Dual effect of *Plasmodium*-infected erythrocytes on dendritic cell maturation. **Malar J**. v. 9: p. 64, 2010.

BLACKMAN MJ, HEIDRICH HG, DONACHIE S, MCBRIDE JS, HOLDER AA. 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**. v. 172: p. 379-382, 1990.

BRANCH O.; UDHAYAKUMAR V.; HIGHTOWER AW.; OLOO A. J.; HAWLEY W. A.; NAHLEN B. L.; BLOLAND P. B.; KASLOW D. C.; LAL A A. A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. **Am J Trop Med Hyg**. v. 58: p. 211–219, 1998.

BRUCE, M. C.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; SNOUNOU, G.; DAY, K. P. Polymorphism at the merozoite surface protein-3 alpha locus of *Plasmodium vivax*: global and local diversity. **Am J Trop Med Hyg**. v. 61(4): p. 518-525, 1999.

BULL, P. C.; MARSH, K. The role of antibodies to *Plasmodium falciparum* infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. **Trends Microbiol**. v. 10 (2), 2002.

BURGESS, B. R.; SCHUCK, P.; GARBOCZI, D. N. Dissection of Merozoite Surface Protein 3, a Representative of a Family of *Plasmodium falciparum* Surface Proteins, Reveals an Oligomeric and Highly Elongated Molecule. **J Biol Chem**. v. 280 (44): p. 37236–37245, 2005.

CAVASINI, C. E.; MATTOS, L. C.; COUTO, A. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; VALENCIA, S. H.; NEIRAS, W. C.; ALVES, R. T.; ROSSIT, A. R.; CASTILHO, L.; MACHADO, R. L. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amozon region: na exception? **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 101(10): p. 1042-1044, 2007.

CERÁVOLO, I. P.; ROMERO, O. B.; BRAGA, É. M.; FONTES, C. J. F.; BRITO, C. F. A.; SOUZA, J. M.; KRETTLI, A. U.; ADAMS, J. H.; CARVALHO, L. H. Anti–*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. **Am J Trop Med Hyg**. v. 72(6): p. 675-681, 2005.

CERAVOLO, I. P.; SANCHEZ, B. A. M.; SOUSA, T. N. GUERRA, B. M.; SOARES, I. S.; BRAGA, E. M.; MCHENRY, A. M.; ADAMS, J. H.; BRITO, C. F. A.; CARVALHO, L. H. Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. **Clin Exp Immunol.** v. 156: p. 502–510, 2009.

CHAUDHURI, A.; POLYAKOVA, J.; ZBRZEZNA, V.; POGO, A. O. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals. **Am Soc Hem**. v. 85 (3): p. 615-621, 1995.

CHITNIS, C. E.; CHAUDHURI, A.; HORUK, R.; POGO, A. O.; MILLER, L H. Domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. **J Exp Med**. v. 184: p. 1531-1536, 1996.

Ciclo de vida de Plasmódio. http://www.luc.edu/biology/williamson.shtml (acessado em 09 de agosto de 2010).

COELHOA, J. S.; SOARES, I. S.; LEMOS, E. A.; JIMENEZ, M. C. S.; KUDÓ, M. E.; MORAES, S. L.; FERREIRA, A. W.; SANCHEZ, M. C. A. A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous detection of malaria, Chagas disease, and syphilis-specific IgG antibodies. **Diag Microbiol Infect Dis.** v. 58: p. 223–230, 2007.

CROMPTON, P. D.; KAYALA, M. A.; TRAORE, B.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA, A.; WEISS, G. E.; MOLINA, D. M.; BURK, C. R.; WAISBERG, M.; JASINSKAS, A.; TAN, X.; DOUMBO, S.; DOUMTABE, D.; YOUNOUSSOU, K.; NARUM, D. L.; LIANG, X.; DOUMBO, O. K. MILLER, L. H.; DOOLAN, D. L.; BALDI,P.; FELGNER, P. L.; PIERCE, S. K. A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 107 (15): p. 6958-6963, 2010.

CUI, L.; MASCORRO, C. N.; FAN, Q.; RZOMP, K. A.; KHUNTIRAT, B.; ZHOU, G.; CHEN, H.; YAN, G.; SATTABONGKOT, J. Genetic diversity and multiple infections of

Plasmodium vivax malaria in Western Thailand. **Am J Trop Med Hyg**. v. 68 (5): p. 613–619, 2003.

CULLETON, R.; NDOUNGA, M.; ZEYREK,F. Y.; COBAN, C.; CASIMIRO, P. N.; TAKEO, S.; TSUBOI, T.; YADAVA, A.; CARTER, R.; AND TANABE K. Evidence for the Transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of the Congo, West Central Africa. **J Infect Dis**. v. 200: p. 1465–1469, 2009.

CUMMINGS, J. F.; SPRING M. D.; SCHWENK. R. J.; OCKENHOUSE C. F.; KESTER K. E.; POLHEMUS M. E.; WALSH D. S.; YOON, I. K.; PROSPERI, C.; JUOMPAN, L. Y.; LANAR, D. E.; KRZYCH, U.; HALL, B. T.; WARE, L. A.; STEWART, V. A.; WILLIAMS, J.; DOWLER, M.; NIELSEN, R. K.; HILLIER, C. J.; GIERSING, B. K.; DUBOVSKY, F.; MALKIN E.; TUCKER, K.; DUBOIS, M. C.; COHEN, J. D.; BALLOU, W. R.; HEPPNER, Jr. R. D. G. Recombinant liver stage antigen-1 (lSA-1) formulated with AS01 or AS02 is safe, elicits high titer antibody and induces IFN-γ/IL-2 CD4+ T cells but does not protect against experimental *Plasmodium falciparum* infection. **Vaccine** (article in press. Jvac.) v. 963: p. 11–10, 2009.

CUNHA, M. G. Resposta imune humana contra proteínas recombinantes correspondents a antígenos de superfície do merozoítos de *Plasmodium vivax*: ênfase ao desenvolvimento de uma vacina contra malária. **Tese de doutorado**, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2001.

CUNHA, M. G.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP-1_{19} expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine**. v. 12: p. 385–396, 2001.

DA SILVA-NUNES, M. & FERREIRA M. U. Clinical spectrum of uncomplicated malaria in semi-immune Amazonians: beyond the “symptomatic” vs “asymptomatic” dichotomy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 102 (3): p. 341-347, 2007.

DA SILVA-NUNES, M. Fatores de risco, distribuição especial e perspectivas de controle de malaria:estudo longitudinal emu ma comunidade rural da Amazônia (Granado, Acre). **Tese de doutorado**, Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação Relação Patógeno-Hospedeiro, 2008.

DA SILVA-NUNES, M.; CODEÇO T. C.; MALAFRONTE, R. S.; DA SILVA, N. S.; JUNCANSEN, C.; MUNIZ, P. T. AND FERREIRA, M. U. Malaria on the Amazonian Frontier: Transmission Dynamics, Risk Factors, Spatial Distribution, and Prospects for Control. **Am J Trop Med Hyg**. v. 79 (4): p. 624–635, 2008.

DEL PORTILLO, H. A.; LONGACRE, S.; KHOURI, E.; DAVID, P. H. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. **Proc Natl Acad U S A.** v. 88 (9): p. 4030-4034, 1991.

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired immunity to malaria. **Clin Microbiol Rev.** v. 22 (1): p. 13–36, 2009.

DUTTA, S.; HAYNES, J. D.; BARBOSA, A.; WARE L. A.; SNAVELY, J. D.; MOCH, J. K.; THOMAS A. W.; LANAR, D. E. Mode of Action of Invasion-Inhibitory Antibodies Directed against Apical Membrane Antigen 1 of *Plasmodium falciparum.* **Infect Immun**. v. 73 (4): p. 2116–2122, 2005.

EGAN, A. F.; MORRIS, J.; BARNISH, G.; ALLEN, S.; GREENWOOD, B. M.; KASLOW, D. C.; HOLDER, A. A.; RILEY E. M. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C terminal fragment to the merozoite surface antigen, *Pf*MSP-1. **J Infect Dis**. v. 173: p. 765-769, 1996.

FERREIRA A. M. M.; SALATI E. Forças de transformação do ecossistema amazônico. Dossiê amazônia brasileira ii. **Estudos avançados**. v. 19: p. 25-44, 2005.

FOWKES, F. J. I.; RICHARDS, J. S.; SIMPSON, J. A.; BEESON, J. G. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* Malaria: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Med**. v. 7 (1), 2010.

FREITAS, L. F.; CHAVES, G. C.; WANNMACHER, L.; OSORIO-DE-CASTRO, C. G. S. Uncomplicated *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* malaria in Brazil: evidence on single and combined drug treatments recommended by official guidelines. **Cad Saúde Pública**. v. 23 (10), 2007.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Controle da malária. Diretrizes técnicas. Ministério da Saúde. Brasília, 1996.

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

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

GONDEAU, C.; GIAMPIETRO, C.; FRÉDÉRIC, H.; PEUCH, C. L.; BALBO, A.; SCHUCK, P.; KAJAV A. V. The C-terminal domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 self-assembles into α-helical coiled coil tetramer. **Mol Biochem Parasitol**. v. 165: p. 153–161, 2009.

GOOD, M. F.; XU, H., WYKES, M.; ENGWERDA C. R. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. **Annu Rev Immunol**. v. 23: p. 69–99, 2005.

GOOD, M. F.; KASLOW, D. C.; MILLER, L. H. Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. **Annu Rev Immunol**. v. 16: p. 57–87, 1998.

GOOD, M. F.; DOOLAN D. L. Immune effector mechanisms in malaria. **Curr Opin Immunol**. v. 11: p. 412-419, 1999.

GUERRA, C. A.; SNOW, R. W.; HAY, S. I. Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends Parasitol**. v. 22 (8): p. 353-358, 2006.

HOLM I.; NATO F.; MENDIS K. N.; LONGACRE S. Characterization of C-terminal merozoite surface protein-1 baculovirus recombinant proteins from *Plasmodium vivax* and *Plasmodium cynomolgi* as recognized by the natural anti-parasite immune response. **Mol Biochem Parasitol**. v. 89: p. 313–319, 1997.

HOWELL, S. A.; WITHERS-MARTINEZ, C.; KOCKEN, C. H. M.; THOMAS, A. W.; BLACKMAN, M. J. Proteolytic Processing and Primary Structure of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen-1. **J Biol Chem**. v. 276 (33), 2001.

HUAMAN, M. C.; MULLEN, G. E. D.; LONG, C. A.; MAHANTY, M. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 vaccine elicits multifunctional CD4 cytokine-producing and memory T cells. **Vaccine**. v. 27: p. 5239-5248, 2009.

Indicadores e Dados Básicos (IDB) - Brasil **http://www.datasus.gov.br/idb** 2008

JIMENEZ, M. C. Estudos biofísicos, estruturais e imunológicos de proteínas recombinantes correspondentes a antígenos de superfície de merozoítas de *Plasmodium vivax*. **Tese de doutorado**, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Farmácia- Área de Análises Clínicas, 2007.

JIMENEZ, M. C, RAMOS C. H. I.; BARBOSA, J. A. R. G.; GALINSKI M. R.; BARNWELL, J. W.; RODRIGUES, M.; SOARES, I. S. Biophysical characterization of the recombinant merozoite surface protein-3 of *Plasmodium vivax*. **Biochim Biophys Acta**. v. 1780 (7-8): 983-988, 2008.

KASEHAGEN, L. J.; MUELLER, I.; KINIBORO, B.; BOCKARIE, M. J.; REEDER, J. C.; KAZURA, J. W.; KASTENS, W.;.MCNAMARA, D. T, C.; KING, H.;. WHALEN, C. C.; ZIMMERMAN, P. A. Reduced *Plasmodium vivax* Erythrocyte Infection in PNG Duffy-Negative Heterozygotes. **PLoS One**. v. 2(3): p. 336, 2007.

LAZAROU, M.; PATIÑO, J. A. G.; JENNINGS, R. M.; MCINTOSH, R. S.; SHI, J.; HOWELL, S.; CULLEN, E.; JONES, T.; GALLEGOS, J. R. A.; CHAPPEL, J. A.; MCBRIDE, J. S.; BLACKMAN, M. J.; HOLDER, A. A.; PLEASS, R. J. Inhibition of erythrocyte invasion and *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 processing by human IgG1 and IgG3 antibodies. **Infect Immun**. v. 77: p. 5659-5667, 2009.

LIM, K. J.; PARK, J. W.; SOHN, M. J.; LEE, S.; OH, J. H.; KIM, H. C.; BAHK, Y. Y.; KIM, Y. S. A direct sandwich ELISA to detect antibodies against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 could be a useful diagnostic method to identify *Plasmodium vivax* exposed persons. **Parasitol Res**. v. 88: p. 855–860, 2002.

LIMA-JUNIOR, J. C.; JIANG, J.; RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; BANIC, D. M.;. TRAN, T. M.; RIBEIRO, R.Y.; MEYER, V. S. E.; DE-SIMONE, S. G.; SANTOS, F.; MORENO, A.; BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M.R.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. B cell epitope mapping and characterization of naturally acquired antibodies to the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-3α (*Pv*MSP-3α) in malaria exposed individuals from Brazilian Amazon. **Vaccine.** v. 29: p. 1801–1811, 2011.

MAESTRE, A.; MUSKUS, C.; DUQUE, V.; AGUDELO, O.; LIU, P.; TAKAGI, A.; NTUMNGIA, F. B.; ADAMS, J. H.; SIM, K. L.; HOFFMAN, S. L.; CORRADIN, G.; VELEZ, I. D.; WANG, R. Acquired antibody responses against *Plasmodium vivax* infection vary with host genotype for Duffy antigen receptor for chemokines (DARC). **PLoS ONE**. v. 5 (7): p. 11437, 2010.

MASCORRO, C. N.; ZHAO, K.; KHUNTIRAT, B.; SATTABONGKOT, J.; YAN, G.; ESCALANTE, A. A.; CUI, L. Molecular evolution and intragenic recombination of the merozoite surface protein MSP-3alpha from the malaria parasite *Plasmodium vivax* in Thailand. **Parasitology**. v. 131 (1): p. 25-35, 2005.

MAZUMDAR, S.; MUKHERJEE, P.; YAZDANI, S. S.;. JAIN, S. K.; MOHMMED, A.; CHAUHAN, V. S. *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 (MSP-1)–MSP-3 Chimeric Protein: Immunogenicity Determined with Human-Compatible Adjuvants and Induction of Protective Immune Response. **Infect Immun**. v. 78 (2): p. 872– 883, 2010.

McCOLL, D. J.; ANDERS, R. F. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). **Mol Biochem Parasitol**. v. 90: p. 21–31, 1997.

MEHRIZI, A. A.; ZAKERI, S.; SALMANIAN, A.H.; SANATIB, M. H.; DJADID, N. D. IgG subclasses pattern and high-avidity antibody to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in an unstable hypoendemic region in Iran. **Acta Trop.** v. 112: p. 1–7, 2009.

MÉNARD, D.; BARNADAS, C.; BOUCHIER, C.; HENRY-HALLDIN, C.; GRAY, L. R.; RATSIMBASOA, A.; THONIER, V.; CAROD, J.F.; DOMARLE, O.; COLIN, Y.; BERTRAND, O.; PICOT, J.;. KING, C. L.; GRIMBERG, B. T.; MERCEREAU-PUIJALON, O. AND ZIMMERMAN, P. A. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 107 (13): p. 5967–5971, 2010.

MILLER, L. H.; MASON, S. J.; CLYDE, D. F.; MCGINNISS, M. H. The Resistance Factor to *Plasmodium vivax* in Blacks —The Duffy-Blood-Group Genotype, *FyFy*. **N Engl J Med**. v. 295: p. 302-304, 1976.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Aspectos Epidemiológicos.**

http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31086&janela=2 (Acessado em 19/ 10/ 2009).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Sivep-malária, resumo epidemiológico por local de notificação-nacional [banco de dados eletrônico]. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde; disponível em: **http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep-malaria Oct**. **2009**

MISHRA, S. K.; MOHANTY, S.; SATPATHY, S. K. and MOHAPATRA, D. N. Cerebral malaria in adults a description of 526 cases admitted to Ispat General Hospital in Rourkela, India. **Ann Trop Med Parasitol**. v. 101 (3): p. 187–193, 2007

MITCHELL, G. H.; THOMAS, A. W.; MARGOS, G.; DLUZEWSKI, A. R.; BANNISTER, L. H. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoite to host red blood cells. **Infect Immun.** v. 72: p. 154–158, 2004.

MORAIS, C. G.; SOARES, I. S.; CARVALHO, L. H.; FONTES, C. J. F.; KRETTLI, A. U.; BRAGA, E. M. 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**. v. 95: p. 420–426, 2005.

MORAIS, C. G.; SOARES, I. S.; CARVALHO, L. H.; FONTES, C. J. F.; KRETTLI, A. U.; BRAGA, É. M. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. **Am J Trop Med Hyg**. v. 74 (4): p. 582-587, 2006.

MUELLER, I.; MOORTHY, V. S.; BROWN, G. V.; SMITH, P. G.; ALONSO, P.; GENTON, B. Guidance on the evaluation of *Plasmodium vivax* vaccine in populations exposed to natural infection. **Vaccine**. v. 27: p. 5633-5643, 2009.

MÚFALO, B. C.; GENTIL, F.; BARGIERI, D. Y.; COSTA, F. T.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes Infect**. v. 10 (12-13): p. 1266-1273, 2008.

MURHANDARWATI, E. E. H.; BLACK C. G.; WANG L.; WEISMAN, S.; KONING-WARD, T. F.; BAIRD, J. K.; TJITRA, E.; RICHIE, T. L.; CRABB B. S.; COPPEL, R. L. Acquisition of Invasion-Inhibitory Antibodies Specific for the 19-kDa Fragment of Merozoite Surface Protein 1 in a Transmigrant Population Requires Multiple Infections. **J Infect Dis**. v. 198: p. 1212– 1218, 2008.

O'DONNELL RA, DE KONING-WARD TF, BURT RA, BOCKARIE M, REEDER JC, COWMAN AF, CRABB BS. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. **J Exp Med**. v. 193: p.1403-1412, 2001.

OLIVEIRA, T. R.; BECERRA, C. F. M.; JIMENEZ, C. S.; DEL PORTILLO, H. A.; SOARES I. S. Evaluation of the acquired immune responses to *Plasmodium vivax*

VIR variant antigens in individuals living in malaria-endemic areas of Brazil**. Malar J**. v. 5: p. 83, 2006.

OLIVEIRA-FILHO, A. B. E.; MARTINELLI, J. M. Notified cases of malaria in the State of Pará, Brazilian Amazon, from 1998 to 2006. **Epidemiol Serv Saúde**. v. 18 (3), 2009.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, P. L.; RIBEIRO, C. T. D. Malaria in Brazil: an overview. **Malar J**. v. 9: p. 115, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Information on malaria, 2004 monography on the Internet. Geneva: WHO; 2004 [cited 2009 Nov. 20]. Available from: **http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en.**

WORLD MALARIA REPORT – OMS - 2009. **www.who.int/malaria**. (Acessado em 20/01/ 2010).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (World Malaria Day 2010). **http://rbm.who.int/worldmalariaday**. (cited 08/09/2010).

PERERA, K. L. R. L.; HANDUNNETTI, S. M.; HOLM, I.; LONGACRE, S.; MENDIS, K. Baculovirus merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant antigens are highly protective in a natural primate model for human *Plasmodium vivax* malaria. **Infect Immun**. p. 1500–1506, 1998.

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

PUTAPORNTIP, C.; JONGWUTIWES, S.; SAKIHAMA, N.; FERREIRA, M. U.; KHO W. G.; KANEKO, A.; KANBARA, H.; HATTORI, T.; TANABE, K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 99: p. 16348–16353, 2002.

RAYNER, J. C.; CORREDOR, V.; FELDMAN, D.; INGRAVALLO, P.; IDERABDULLAH, F.; GALINSKI, M. R.; BARWELL, J. W. Extensive polymorphism in the *Plasmodium vivax* merozoite surface coat protein MSP-3 alpha is limited to specific domains. **Parasitology.** v. 125 (5): p. 393-405, 2002.

RAYNER J. C.; HUBER C. S.; FELDMAN D.; INGRAVALLO P.; GALINSKI M. R.; BARNWELL J. W. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein PvMSP-3β is radically polymorphic through mutation and large insertions and deletions**. Infect Gen Evol**. v. 4: p. 309–319, 2004.

REMARQUE, E. J.; FABER, B. W.; KOCKEN, C. H. M.; THOMAS, A. W. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends Parasitol**. v. 24 (2): 2008.

REMARQUE, E. J.; FABER, B. W.; KOCKEN, CLEMENS, H. M.; THOMAS, A. W. A Diversity-Covering Approach to Immunization with *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 Induces Broader Allelic Recognition and Growth Inhibition Responses in Rabbits. **Infect Immun**. v. 76 (6): p. 2660–2670, 2008.

REY L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos**.** 2ª Ed., 2008.

RODRIGUES M. C.; CUNHA M. G.; MACHADO R. L.D.; FERREIRA JR O. C.; RODRIGUES M. M.; SOARES I. S. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. **Malar J.** v. 2: p. 39-46, 2003.

RODRIGUES M. H. C.; RODRIGUES K. M.; OLIVEIRA T. R.; CÔMODO N. A.; RODRIGUES M. M.; COCKEN C. H. M.; THOMAS A. W.; SOARES I. S. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **Intern J Parasitol**. v. 35: p. 185-192, 2005.

RYAN, J. R.; STOUTE, J. A.; AMON, J.; DUNTON, R. F.; MTALIB, R.; KOROS, J.; OWOUR, B.; LUCKHART, S.; WIRTZ, R. A.; BARNWELL, J. W.; ROSENBERG, R. Evidence for transmition of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in Western Kenya. **Am J Trop Med Hyg**. v. 75 (4): p. 575-581, 2006.

SACHDEVA, S.; AHMAD, G.; MALHOTRA, P.; MUKHERJEE, P.; CHAUHAN, V. S. Comparison of Immunogenicities of Recombinant *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 19- and 42-kilodalton fragments expressed in *Escherichia coli*. **Infect Immun**. v. 72 (10): p. 5775-5782, 2004.

SARAIVA, M. G. G.; AMORIM, R. D. S.; MOURA, M. A. S.; MARTINEZ-ESPINOSA, F. E.; BARBOSA, M. G. V. Urban expansion and spatial distribution of malaria in the municipality of Manaus, State of Amazonas. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 42 (5): p. 515-522, 2009.

SETH , R. K.; BHAT, A.; RAO, D. N.; BISWAS, S. Acquired immune response to defined Plasmodium vivax antigens in individuals residing in northern India. **Microbes Infect**. v. 12 (3): p. 199-206, 2010.

SILVIE, O.; FRANETICH, J. F.; CHARRIN, S.; MUELLER, M. S.; SIAU, A.; BODESCOT, M.; RUBINSTEIN, E.; HANNOUN, L.; CHAROENVIT, Y.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; GEMERT, G. J. V.; SAUERWEIN, R. W.; BLACKMAN, M. J.; ANDERS, R. F.; PLUSCHKE, G.; MAZIERA, D. A. Role for Apical Membrane Antigen 1 during Invasion of Hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. **J Biol Chem**. v. 279: p. 9490–9499, 2004.

SINGH, S.; SOE, S.; MEJIA, J. P.; ROUSSILHON, C.; THEISEN, M.; CORRADIN, G.; DRUILHE, P. Identification of a Conserved Region of *Plasmodium falciparum*

MSP3 Targeted by Biologically Active Antibodies to Improve Vaccine Design. **J Infect Dis**. v. 190: p. 1010–1018, 2004.

SOARES, I. S.; LEVITUS, G.; SOUZA, J. M.; DEL PORTILLO, H. A.; RODRIGUES, M. M. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. **Infect Immun**. v. 65: p. 1606-1614, 1997.

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

SOARES, I. S.; DA CUNHA, M. G.; SILVA, M. N.; DEL PORTILLO H. A.; RODRIGUES M. M. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. **Am J Trop Med Hyg**. v. 60 (3): p. 357-363, 1999b.

SOARES I. S.; RODRIGUES M. M. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* cadidate $MSP1_{19}$ expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*. **Parasitology**. v. 124: p. 237-246, 1999c.

SOE, S.; THEISEN, M.; ROUSSILHON, C.; AYE, K. S.; DRUILHE, P. Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarily between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. **Infect Immun**. v. 72: p. 247–252, 2004.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J. M.; MERARD, R.; HEUSSLER, V. T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**. v. 313 (5791): p. 1287-1290, 2006.

TRIGLIA, T.; HEALER, J.; CARUANA, S. R.; HODDER, A. N.; ANDERS, R. F.; CRABB, B. S.; COWMAN, A. F. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium species*. **Mol Microbiol**. v. 38: p. 706-718, 2000.

TREECK, M.; ZACHERL, S.; HERRMANN, S.; CABRERA, A.; KONO, M; STRUCK, N. S.; ENGELBERG, K.; HAASE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MIURA, K.; SPIELMANN, T.; GILBERGER, T. W. Functional analysis of the leading malaria vaccine candidate AMA-1 reveals an essential role for the cytoplasmic domain in the invasion process. **PLoS Pathog**. v. 5, 2009.

VICENTIN, E.C.; FRANÇOSO, K. S.; FERREIRA, L. C. S.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Immunogenicity of a malaria vaccine candidate expressed in *Pichia pastoris* and administered in mice using different adjuvant formulations. XII Reunião Nacional de Pesquisa em Malária, XII Brazilian Meeting on Malaria Research. 59, MG, 2010.

YANG, Z.; MIAO, J.; HUANG, Y.; LI, X.; PUTAPORNTIP, C.; JONGWUTIWES, S.; GAO, Q.; UDOMSANGPETCH, R.; SATTABONGKOT, J.; CUI, L. Genetic structures of geographically distinct *Plasmodium vivax* populations assessed by PCR/RFLP analysis of the merozoite surface protein 3β gene. **Acta Trop**. v. 100: p. 205–212, 2006.

ZAKERI, S.; BARJESTEH, H.; DJADID, N. D. Merozoite surface protein-3α is a reliable marker for population genetic analysis of *Plasmodium vivax.* **Malar J**. v. 5: p. 53, 2006.

VII. ANEXOS

ID	M+	$MSP_1$19	AMA-1	MSP3α	MSP3β
1					
2					
3					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
13	*Pf*				
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
23					
24					
25					
26	*Pf*				
27					
32					
33					
35					
36					
37					
38					
39					
40					
41	*Pf*				
42	*Pv*				
43					
44					
45					
47					
50					
52	*Pf*				
53					
54					
55					
56					
57					
58					
59					
60					
62					
63					
64					
65					
66					
67					
68					
69					
70					

ID	M+	$MSP_1$19	AMA-1	MSP3α	MSP3β
71					
72					
74					
76					
77					
78					
80					
81					
82					
83					
84					
85					
86					
88					
89					
90					
91					
92					
93					
94					
95					
96					
97					
98					
99					
100					
102					
103					
104					
107					
108					
109					
110					
111					
112					
113					
114	*Pf*				
115					
118					
119					
120					
121					
124					
125					
126					
129					
130					
131					
132					
133					
134					
135					
136					
137					
138					
139					

ID	M+	$MSP1_{19}$	AMA-1	MSP3α	MSP3β
140					
141	*Pf*				
142					
143					
144					
145	*Pf*				
146					
147					
148					
149					
150					
152					
153					
157					
158					
159					
161					
162					
163					
164					
165					
166					
167					
168					
169					
170					
172					
173					
174					
178					
179					
180					
181					
182					
183					
184					
185					
186					
187					
188					
189					
190					
191					
192					
193					
196					
197					
198					
199					
200	*Pf*				
201					
202					
203					
204	Mt				

ID	M+	$MSP1_{19}$	AMA-1	MSP3α	MSP3β
205					
206					
207					
208	Mt				
209	*Pv*				
210					
214					
215					
216					
217					
218					
219					
220					
221					
223					
224					
225					
226					
227					
228					
229					
230					
231					
232					
235					
236					
237	*Pf*				
238					
240					
241					
244	*Pf*				
245					
246					
247					
248					
249					
250	*Pv*				
253					
254					
255					
256					
257					
259	Pf				
260					
261					
262					
263	*Pf*				
264					
266					
267					
270					
271					
273					
274					

ID	M+	$MSP1_{19}$	AMA-1	MSP3α	MSP3β
276					
277					
278	Mt				
279					
280					
281					
282					
283					
284					
286	*Pv*				
288					
289					
290	*Pv*				
291	*Pf*				
292					
293					
294					
295					
296					
297					
298					
299					
300					
301					
302					
303					
304	Mt				
306	Mt				
307					
308					
309					
310					
311					
312					
313					
315					
316					
318					
319					
321	*Pv*				
322					
323					
324					
325					
326					
327					
328					
329					
330					
332					
333					
334					
335					
336	Mt				
337	*Pf*				
338					

ID	M+	$MSP1_{19}$	AMA-1	MSP3α	MSP3β
339					
340					
341	Mt				
342					
343					
346					
347					
349					
350					
351					
353					
354	*Pf*				
355					
356	*Pv*				
357					
358					
359					
360					
361					
362					
364					
365					
366					
367					
368	*Pv*				
369	*Pv*				
371					
372	*Pv*				
373					
374					
375					
376					
378					
379					
380					
382					
384					
385					
387	Mt				
388	*Pv*				
389	Mt				
390	Mt				
391	*Pv*				
392					
395					
396					
397					
398					
399					
400					
401					
402	*Pf*				
403					
405					
406					
409					

ID	M+	$MSP1_{19}$	AMA-1	MSP3α	MSP3β
410					
411					
412					
414					
415					
417	*Pv*				
419					
421					
424					
426					
427					
429	*Pf*				
431					
432					
433					
434					
438					
439	*Pv*				
440					
441	*Pf*				
442					
443					
446					
450					
451	Mt				
452					
453					
454					
457					
459					
460					
461					

ID	M+	$MSP1_{19}$	AMA-1	MSP3α	MSP3β
462					
463					
465					
466					
473					
477					
478					
479					
484					
504					
508					
509					
510					
512					
514					
517					
518					
519					
520					
524					
525					
526					
527					
528					
529					
531					
536					
537					
538					
539					
540					
563					

Tabela 4. Níveis de intensidade de resposta de anticorpos IgG em amostras de indivíduos coletadas durante a linha de base do estudo de coorte. Anticorpos IgG foram avaliados por ELISA na diluição de 1:100, em 396 amostras de soros frente a vários antígenos de superfície de merozoítos do *P. vivax* "ID" refere-se ao número de identificação do indivíduo; M+ "Malária na linha de base". Para cada antígeno em estudo, foi obtido um *cut off* . Este foi calculado pela média das absorbâncias produzidas de 29 amostras de soros de indivíduos sem história clínica de malária. Os Índices de reatividades (IR) foram calculados dividindo a média de OD pelo *cut off*. Os valores do índice de reatividade (IR) ≥ 1 foram considerados positivos e estão representados nos quadrantes por intensidade de cores: do mais claro para o mais escuro (IR 0 a < 1; IR ≥ 1 a < 2,5; IR ≥ 2,5 a < 5; IR ≥ 5 a < 10 e de IR ≥ 10).

IR

0 a < 1

≥ 1 a < 2,5

≥ 2,5 a < 5,0

≥ 5,0 a < 10,0

≥ 10,0

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/39/2010
Protocolo CEP/FCF/544
CAAE: 0001.0.018.000-10

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	**Estudo longitudinal da resposta de anticorpos contra proteínas recombinantes baseadas em antígenos de merozoítos de *Plasmodium vivax* em indivíduos de uma comunidade rural da Amazônia brasileira**
Pesquisador Responsável:	**Profa Dra Irene da Silva Soares**
Instituição:	FCF-USP
Área Temática Especial:	-
Patrocinadores:	PRONEX – Rede Malária

II - Sumário Geral do Protocolo:

A malária representa um problema de saúde pública em mais de 100 países, nos quais cerca de 3,2 bilhões de pessoas (40% da população mundial) convivem com o risco de infecção. No Brasil, mais de 99% dos casos de malária concentram-se na Amazônia Legal e o Plasmodium vivax é a espécie mais prevalente sendo responsável por 70-80% dos casos. Nos últimos anos, estudamos vários aspectos da resposta imune naturalmente adquirida em indivíduos de diferentes áreas endêmicas da Região Amazônica, expostos a malária. Para isso, utilizamos proteínas recombinantes baseadas em antígenos de formas sanguíneas de P. vivax, os quais têm sido considerados candidatos a vacina contra a malária vivax. No presente projeto estamos propondo realizar um estudo longitudinal da resposta de anticorpos contra um painel de proteínas recombinantes derivadas de merozoítas de P. vivax (MSP-1, AMA-1, MSP-3 e MAEBL) em 400 indivíduos de uma comunidade rural do Estado do Acre. O nosso intuito é investigar a associação entre resposta de anticorpos contra cada um dos antígenos e aquisição de malária no seguimento destes indivíduos ao longo de dois anos. Acreditamos que esse estudo fornecerá informações importantes para o entendimento da imunidade adquirida à malária vivax.

1

Objetivo geral: Avaliar a resposta de anticorpos contra um painel de proteínas recombinantes derivadas de merozoítos de P. vivax (MSP-1, AMA-1, MSP-3 e MAEBL) em 400 indivíduos de uma comunidade rural do Estado do Acre. A associação entre resposta de anticorpos contra cada um dos antígenos e aquisição de malária no seguimento destes indivíduos ao longo de dois anos também será investigada.

Objetivos específicos são:

- Avaliar a resposta de anticorpos IgG contra um painel de proteínas recombinantes derivadas de merozoítos de P. vivax (MSP-1, MSP-3, AMA-1 e MAEBL) em amostras de indivíduos expostos a malária procedentes de uma comunidade rural do Estado do Acre (n=400);
- Determinar os títulos de anticorpos IgG (e subclasses de IgG) contra cada um dos antígenos em indivíduos que se infectaram pelo P. vivax durante o seguimento dessa população ao longo de dois anos (n=53);
- Investigar a associação entre resposta de anticorpos contra cada um dos antígenos e aquisição de malária no seguimento destes indivíduos ao longo de dois anos.

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) - 3091-3622 - Fone / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: cepfcf@usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa

Descrição da Casuística:
Pacientes: as amostras de soro de indivíduos de área endêmica de malária foram previamente coletadas sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, cujo projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do ICB (documento em anexo). As mesmas foram utilizadas em estudos anteriores sobre a resposta imune humana a MSP-1 (BASTOS *et al.*, 2007, NUNES *et al.*, 2008). A área de estudo está muito bem caracterizada do ponto de vista demográfico, sócio-econômico, genético e epidemiológico, portanto consideramos dispensável a coleta de novos soros. No presente projeto, os soros serão testados quanto a reatividade imune (presença de anticorpos) contra as proteínas $MSP1_{19}$, MSP-3, AMA-1 e MAEBL, as quais são consideradas candidatas a vacina contra malária *vivax*.
Grupo controle: serão estudados 29 amostras de soros de indivíduos não residentes em área endêmica e com o histórico negativo da doença. Estas amostras se encontram disponíveis em nosso laboratório e foram utilizadas em estudos anteriores do nosso grupo (Rodrigues et al., 2003, 2005, Múfalo et al., 2008), cujo projeto foi analisado e aprovado pelo CEP da FCF/USP.

III – Situação do Protocolo: APROVADO em 29/03/2010.

.O pesquisador deverá:

- Comunicar ao CEP:
  - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
  - A interrupção do projeto;
- Apresentar relatório parcial em <u>setembro/10</u> e relatório final em <u>abril/11</u>.

2

São Paulo, 30 de março de 2010.

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) - 3091-3622 - Fone / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: cepfcf@usp.br