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

Estudo da resposta imune naturalmente adquirida contra
proteínas recombinantes correspondentes a antígenos de
estágios assexuados sanguíneos de *Plasmodium vivax*

Tatiane Rodrigues de Oliveira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Irene da Silva Soares
Co-orientador:
Prof. Dr. Hernando Del Portillo

São Paulo
2006

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011632

Ficha Catalográfica

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

Oliveira, Tatiane Rodrigues de
O48e Estudo da resposta imune naturalmente adquirida contra
proteínas recombinantes correspondentes a antígenos de estágios
assexuados sanguíneos de *Plasmodium vivax* / Tatiane Rodrigues
de Oliveira. -- São Paulo, 2006.
106p.

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

Orientador: Soares, Irene da Silva

Co-orientador: Del Portillo, Hernando

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

616.9362079 CDD

Tatiane Rodrigues de Oliveira

**Estudo da resposta imune naturalmente adquirida contra
proteínas recombinantes correspondentes a antígenos de
estágios assexuados sanguíneos de *Plasmodium vivax***

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Irene da Silva Soares
Orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 24, fev. de 2006

Trabalho realizado no Departamento
de Análises Clínicas e Toxicológicas
da Universidade de São Paulo -
USP, com auxílio financeiro
concedido pela FAPESP.

**"O único homem que está isento de erros, é
aquele que não arrisca acertar".**

Albert Einstein

Ao meu marido Sergio Rodriguez, pelo carinho,
companheirismo e apoio para a superação dos
obstáculos deste trajeto.

E em especial para "meu bebê"
Júlia, por me ensinar que ser mãe é um estado de
supremação e para ser feliz basta ter seu sorriso
todos os dias - AMO VOCÊ

À memória de meu avô João,
"Não morrem os que deixam afeto como herança"

À minha mãe Cleuza, por estar sempre ao meu
lado nos momentos mais difíceis desta
caminhada.

À minha "vozinha" Maria, pelo seu carinho
e incentivo constante na minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Irene da Silva Soares inicialmente pela nossa amizade de longa data, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, pela confiança a mim depositada e principalmente por sua contribuição na minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Hernando del Portillo pela co-orientação valiosa e por tornar viável o desenvolvimento desse projeto disponibilizando seu laboratório para a geração dos plasmídeos recombinantes (VIR) utilizados neste trabalho.

À Dra. Carmen Fernandez-Becerra, pela amizade e colaboração na etapa de subclonagem e expressão das proteínas recombinantes (VIR).

As amigas de bancada: Maria Helena (Jabota) e Carol por disponibilizarem as proteínas AMA-1 e His₆-MSP1₁₉ utilizadas nos ensaios sorológicos neste projeto.

As minhas amigas Andréia e Juliana, pela enorme amizade e colaboração no estabelecimento da metodologia de solubilização e purificação das proteínas VIR. Não sei o que seria de mim sem vocês...Valeu!

Aos amigos de bancada Ricardo, Bruno e Juliana (ICB-II) pelo carinho e companheirismo.

A Profa. Dra. Dulcinéia Abdalla, Ana Campa coordenadora e vice-coordenadora do Programa de Pós-graduação, Adelaide Vaz, da disciplina de Imunologia, e ao Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, da disciplina de Micologia, por terem permitido a utilização de equipamentos de seus laboratórios.

A Profa. Dra. Maristela Gomes da Cunha da UFPa e a equipe do Instituto Evandro Chagas, pelo apoio durante minha viagem ao Pará na seleção dos pacientes e coleta de amostras de sangue para os ensaios de proliferação humana.

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Análises Clínicas pela amizade e convivência diária.

SUMÁRIO

Lista de figuras.	. xiii
Lista de tabelas.	. xv
Lista de abreviaturas.	. xvi
Resumo.	. xviii
Abstract.	. xx
I. Introdução.	. 01
1. Etiologia da malária e ciclo biológico do parasita.	. 02
2. Epidemiologia da malária no mundo e no Brasil.	. 04
3. Perspectivas de controle da malária a partir do desenvolvimento de vacinas contra as formas sanguíneas do parasita: principais alvos.	. 05
4. Variação antigênica em malária.	. 14
II. Objetivos.	. 21
1. Objetivos gerais.	. 22
2. Objetivos específicos	. 22
III. Materiais e Métodos.	. 23
1. População e áreas de estudo.	. 24
1.1. Amostras de sangue de indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> procedentes de diferentes áreas endêmicas da Região Amazônica.	. 24
1.2. Amostras de sangue de indivíduos que tiveram malária clínica recente.	. 25
1.3. Indivíduos saudáveis.	. 26
2. Composição das soluções, tampões e meios de cultura utilizados.	. 27
2.1. Soluções e tampões para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%).	. 27

2.2. Soluções e tampões para eletroforese em gel de agarose (eletroforese de DNA).	27
2.3. Soluções e tampões para ensaios imunoenzimáticos (ELISA).	27
2.4. Tampões utilizados na purificação das proteínas VIR.	28
2.5. Tampões utilizados para a purificação da proteína His ₆ -AMA.	28
2.6. Meios de cultura.	29
3. Construção dos plasmídios recombinantes.	29
3.1. Subclonagem dos genes correspondentes ao exon 2 das subfamílias VIR em vetores de expressão.	29
3.2. Construção do plasmídio recombinante correspondente à proteína AMA-1 de <i>P. vivax</i> .	30
4. Expressão e purificação das proteínas recombinantes utilizadas nos ensaios imunológicos <i>in vitro</i> .	30
4.1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes VIR em fusão com GST.	31
4.2. Expressão e purificação da proteína recombinante AMA-1 em fusão com His ₆ .	32
5. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos humanos.	33
5.1. Detecção de anticorpos IgG por ELISA.	33
5.2. Detecção de anticorpos específicos das subclasses de IgG.	34
5.3. Detecção de anticorpos IgM por ELISA.	35
6. Ensaios de proliferação linfoblástica para análise da resposta imune celular humana contra as proteínas VIR.	35
6.1. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico.	35
6.2. Ensaio de proliferação celular através da incorporação de [³ H-methyl]- timidina ([³ H]-TdR).	36
7. Imunização de camundongos com as proteínas recombinantes VIR e análise da reatividade cruzada entre os anticorpos contra as diferentes subfamílias VIR.	37

7.1. Esquema de imunização de camundongos para obtenção de soros policlonais anti-VIR.	37
7.2. Detecção de anticorpos IgG após imunização de camundongos com as proteínas recombinantes VIR por ELISA	37
8. Ensaio de proliferação linfoblástica para a análise da imunidade celular de camundongos após imunização com as diferentes proteínas recombinantes VIR.	38
8.1. Esquema de imunização de camundongos para obtenção de células dos nódulos linfáticos.	38
8.2. Ensaio de proliferação celular através da incorporação de [³ H-methyl]- timidina ([³ H]-TdR).	39
9. Análise estatística.	39
IV. Resultados.	40
1. Construção dos plasmídios recombinantes.	41
1.1. Obtenção dos plasmídios recombinantes correspondentes ao exon 2 das subfamílias <i>vir</i> em vetores para expressão em <i>E. coli</i> .	41
1.2. Obtenção do plasmídio recombinante contendo o gene que codifica a proteína AMA-1 de <i>P. vivax</i> .	41
2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.	42
2.1. Estabelecimento das condições de expressão e purificação das proteínas recombinantes VIR.	42
2.2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes AMA-1.	43
3. Avaliação comparativa do reconhecimento das proteínas recombinantes VIR, AMA-1 e MSP1 ₁₉ por anticorpos IgG.	46
4. Avaliação comparativa do reconhecimento das proteínas recombinantes correspondentes as subfamílias VIR por anticorpos do tipo IgM.	47
5. Análise simultânea das respostas de anticorpos IgM e IgG contra as proteínas recombinantes correspondentes às subfamílias VIR.	53
6. Análise do efeito do número de episódios prévios de malária na resposta por anticorpos contra as proteínas recombinantes correspondentes as subfamílias VIR, AMA-1 e MSP1 ₁₉ .	56

7. Detecção das subclasses de anticorpos IgG específicos durante infecção patente.	. 60
8. Resposta proliferativa contra as proteínas recombinantes VIR e His ₆ -MSP1 ₁₉ em indivíduos expostos recentemente à malária por <i>P. vivax</i>	. 60
9. Imunização de camundongos com as proteínas recombinantes (VIR) e análise da reatividade cruzada de anticorpos policlonais anti-VIR.	. 64
9.1. Avaliação da resposta de anticorpos contra as diferentes proteínas recombinantes VIR.	. 64
9.2. Análise da reatividade cruzada entre os anticorpos contra as diferentes subfamílias VIR.	. 65
10. Avaliação da resposta proliferativa de células de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes VIR e His ₆ -MSP1 ₁₉	. 70
V. Discussão.	. 73
VI. Conclusões.	. 85
VII. Referências bibliográficas.	. 87
VIII. Anexos.	. 106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de purificação da proteína recombinante VIR produzidas a partir de <i>E. coli</i> .	. 44
Figura 2. Análise em SDS-PAGE 12% das etapas de purificação da proteína AMA-1.	. 45
Figura 3. Análise comparativa da reatividade de soros de indivíduos com malária patente por <i>P. vivax</i> contra as diferentes proteínas recombinantes VIR, AMA-1 e MSP1 ₁₉ .	. 48
Figura 4. Análise comparativa dos valores individuais dos níveis de anticorpos IgG presente nas amostras de soros de indivíduos com infecção patente contra as diferentes proteínas recombinantes	. 49
Figura 5. Prevalência de anticorpos IgM contra as proteínas recombinantes correspondentes as subfamílias VIR	. 50
Figura 6. Comparação dos valores individuais de IR de anticorpos IgM anti-VIR detectados nos soros de 199 indivíduos com malária vivax.	. 51
Figura 7. Análise da reatividade de soros de indivíduos com malária patente contra as proteínas recombinantes VIR.	. 55
Figura 8. Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes VIR, AMA-1 e MSP1 ₁₉ .	. 58
Figura 9. Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgM contra as proteínas recombinantes VIR.	. 59
Figura 10. Determinação das subclasses de IgG específicas capazes de reconhecer as proteínas recombinantes VIR.	. 62
Figura 11. Respostas proliferativas das CMSP após estimulação <i>in vitro</i> com as proteínas recombinantes VIR e MSP1 ₁₉ em indivíduos expostos ou não à malária por <i>P. vivax</i> .	. 63

Figura 12. Análise comparativa da imunogenicidade das proteínas recombinantes VIR em camundongos após a primeira (A) e segunda dose (B). . 67

Figura 13. Análise da reatividade cruzada entre os anticorpos obtidos após imunização de camundongos com as diferentes proteínas recombinantes VIR. . 68

Figura 14. Análise da reatividade cruzada de anticorpos anti-VIR por ELISA em camundongos imunizados. . 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais proteínas identificadas e caracterizadas em merozoítas de <i>P. vivax</i> .	07
Tabela 2. Dados cadastrais disponíveis dos pacientes de áreas endêmicas utilizados nos ensaios sorológicos.	26
Tabela 3. Sumário dos plasmídios recombinantes contendo os genes correspondentes às subfamílias VIR, AMA-1 e MSP1 ₁₉ de <i>P. vivax</i> utilizados neste estudo.	30
Tabela 4. Frequência de respondedores e Índice de Reatividade (IR) (em mediana) de anticorpos IgG e IgM dos soros de indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> contra as diferentes proteínas recombinantes.	52
Tabela 5. Frequência de indivíduos que apresentam anticorpos IgG anti-VIR de acordo com a procedência das amostras analisadas.	54
Tabela 6. Frequência de indivíduos que apresentam anticorpos IgM anti-VIR de acordo com a procedência das amostras analisadas.	56
Tabela 7. Avaliação da resposta imune celular de camundongos BALB/c através de ensaio de proliferação linfoblástica após imunização com as proteínas recombinantes correspondentes as subfamílias VIR e His ₆ -MSP1 ₁₉ .	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	absorbância
ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
AMA-1	Antígeno 1 de membrana apical
Amp	Ampicilina
BSA	Albumina Sérica Bovina
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1 propanesulfonate
CMSP	células mononucleares do sangue periférico
ConA	Concanavalina A
cpm	contagens por minuto
C ₆ H ₈ O ₇	Ácido cítrico
dp	desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
GST	Glutathiona S-transferase
GSSG	Glutathiona oxidada
GSH	Glutathiona reduzida
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfônico
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
His ₆	cauda de seis resíduos de histidina
³ H-TdR	[³ H-methyl]- timidina
IE	Índice de estimulação
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactoside
IR	Índice de reatividade
kDa	quilo dalton
LB	Luria Bertani
L	litro

MSP-1	Proteína 1 da superfície de merozoítas
M	molar
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio bibásico
OPD	σ-Phenylenediamine
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase pela transcriptase reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
s.c	subcutânea
T.A	temperatura ambiente
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TEMED	N,N,N', N' tetrametil etilenodiamida
Tris	Hidroximetilaminometano
VIR	Proteínas variantes de <i>P. vivax</i>
2-ME	2-mercaptoetanol
μg	micrograma
μl	microlitro
μCi	microcurie

RESUMO

No presente estudo, avaliamos a resposta imune naturalmente adquirida ao *Plasmodium vivax* em indivíduos de áreas endêmicas de malária utilizando proteínas recombinantes baseadas em três antígenos de formas assexuadas sanguíneas do parasita: Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1), região C-terminal da Proteína 1 de Superfície do Merozoíta (MSP1₁₉) e Antígenos Variantes de *P. vivax* (VIR). Sete proteínas recombinantes correspondentes a quatro subfamílias VIR (A, B, C e E) foram incluídas neste estudo. Inicialmente, as diferentes proteínas recombinantes foram comparadas, por ELISA, quanto ao reconhecimento por anticorpos IgM, IgG e subclasses de IgG de 200 indivíduos infectados por *P. vivax* procedentes dos estados do Pará e Rondônia. As frequências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM ou IgG anti-VIR durante a infecção foram de 29,6% e 26,0%, respectivamente. Não observamos predomínio de determinadas subclasses de IgG na resposta imune anti-VIR, com exceção da subfamília C que foi predominantemente reconhecida por anticorpos da subclasse IgG1. Em contraste, as frequências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG para as proteínas AMA-1 e MSP1₁₉ foram significativamente mais altas (57,0% e 90,5%, respectivamente).

A resposta imune celular aos antígenos VIR foi avaliada por ensaios de proliferação *in vitro* com células mononucleares de indivíduos recentemente expostos ao *P. vivax*. Não observamos respostas proliferativas significativas a estes antígenos quando comparamos o grupo de indivíduos exposto ao *P. vivax* com o grupo não exposto.

Posteriormente, avaliamos o padrão de reatividade cruzada entre anticorpos e células T contra as quatro subfamílias VIR através da imunização experimental de camundongos BALB/c com cada uma das proteínas na presença de adjuvante de Freund. Os títulos de anticorpos IgG dos animais imunizados contra cada proteína recombinante foram detectados por ELISA de inibição. Altos títulos de anticorpos específicos contra as proteínas VIR foram obtidos após a 2ª dose de imunização. Além

disso, observamos que o esquema de imunização utilizado, constituído por duas doses seqüenciais de cada uma das proteínas recombinantes VIR, foi capaz de induzir anticorpos de reatividade contra as diferentes subfamílias VIR.

Complementamos estes estudos avaliando a resposta proliferativa de células de nódulos linfáticos de camundongos imunizados e re-estimuladas *in vitro* com cada uma das proteínas VIR. Os resultados demonstraram que as proteínas VIR contêm epítomos específicos e de reatividade cruzada para células T. Estes dados sugerem fortemente a presença de epítomos comuns entre esses antígenos e mostram que o esquema de imunização utilizado pode servir como base para futuros estudos de indução de imunidade protetora contra malária *vivax* em primatas não humanos.

ABSTRACT

In the present study, we evaluated comparatively the acquired immune response to *Plasmodium vivax* in individuals from endemic areas of malaria using recombinant proteins based on three antigens from asexual blood stages of the parasite: Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1), C-terminal region of the Merozoite Surface Protein1 (MSP1₁₉), and Variant Antigens of *P. vivax* (VIR). Seven recombinant proteins corresponding to the four VIR subfamilies (A, B, C and E) were included in this study. Initially, the different recombinant proteins were compared by ELISA with regard to the recognition by IgM, IgG, and IgG subclass of antibodies from 200 individuals with patent infection from the States of Pará and Rondônia. The frequencies of individuals that presented IgM or IgG antibodies anti-VIR during the infection were 29.6% or 26.0%, respectively. We did not observe predominance of any IgG subclass during immune response anti-VIR, except in the case of the C subfamily which was predominantly recognized by IgG1 subclass. In contrast, the frequencies of the individuals that presented IgG antibodies to AMA-1 e MSP1₁₉ were significantly higher (57.0% and 90.5%, respectively).

The cellular immune response to VIR antigens was evaluated by *in vitro* proliferative assays in mononuclear cells of the individuals recently exposed to *P. vivax*. We did not observe significantly proliferative responses to these antigens when we compared malaria exposed and non exposed individuals.

Subsequently, we evaluated the pattern of cross recognition between antibodies and T cell against four VIR subfamilies after experimental immunization of BALB/c mice with each one of the proteins emulsified with Complete Freund's adjuvant. The IgG antibody titers of the mice immunized against each one of the recombinant proteins were detected by inhibition ELISA. High specific titers against VIR proteins were obtained after the second immunizing dose. Most importantly, we observed that the immunization schedule constituted by two sequential doses of each one of

the VIR recombinant proteins were able to induce cross-reactive antibodies against the different VIR subfamilies.

These studies were complemented by lymphocyte proliferative response analysis of the immunized mice after an in vitro stimulation with each one of the VIR proteins. Our results demonstrated that the VIR proteins presented specific and cross-reactive epitopes recognized by T cells. These data strongly suggested of the commons epitopes are present and showed that this schedule of immunization may be used as basis for future studies aimed at inducing protective immunity against *vivax* malaria in non human primates.

I. INTRODUÇÃO

1. Etiologia da malária e ciclo biológico do parasita.

A malária é causada por protozoários intracelulares pertencentes ao filo Apicomplexa, gênero *Plasmodium*, o qual é constituído por mais de 100 espécies, sendo que apenas quatro infectam o homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*.

O *Plasmodium* apresenta um ciclo biológico caracterizado por uma fase sexuada, que ocorre na fêmea do mosquito *Anopheles*, e três etapas de reprodução assexuada, sendo que uma ocorre no hospedeiro invertebrado e as outras duas no hospedeiro vertebrado. O ciclo de vida no hospedeiro vertebrado inicia com a inoculação de esporozoítas na corrente sanguínea durante o repasto sanguíneo do mosquito. Os esporozoítas migram rapidamente para o fígado e invadem os hepatócitos transformando-se em esquizontes hepáticos. Estes se multiplicam por esquizogonia e originam milhares de merozoítas (ciclo pré-eritrocítico). No caso de *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítas permanecem em estado de latência nos hepatócitos sendo assim denominados de hipnozoítas, formas responsáveis pelas recaídas tardias da infecção (KROTOSKI *et al.*, 1982).

Após o rompimento dos hepatócitos, o processo de invasão de eritrócitos pelos merozoítas liberados na circulação sanguínea, provavelmente é similar entre as espécies de *Plasmodium*, caracterizando assim o início do ciclo assexuado sanguíneo (ciclo eritrocítico). Entretanto, certas diferenças na biologia das duas principais espécies que infectam o homem podem esclarecer os padrões distintos da doença observados em indivíduos infectados por *P. falciparum* ou *P. vivax*. Ao contrário do *P. falciparum*, que invade eritrócitos de todas as idades, o *P. vivax* invade e se multiplica exclusivamente em eritrócitos jovens (reticulócitos). Além disso, em *P. vivax* este processo é completamente dependente da presença do grupo sanguíneo Duffy presente nos reticulócitos e de seu ligante denominado "Duffy Binding Protein" (DBP), o qual é expresso nos micronemas dos merozoítas (BARNWELL *et al.*, 1989).

Uma vez iniciado o ciclo eritrocítico, o parasita promove uma série de mudanças morfológicas na membrana da célula infectada, provocadas tanto

por um aumento na permeabilidade e alterações na composição química da mesma, quanto pela inclusão no citoesqueleto e na superfície celular de proteínas derivadas do parasita (revisto por SHERMAN *et al.*, 2004).

Nos eritrócitos/reticulócitos, os merozoítas originam os trofozoítas que amadurecem e se dividem por esquizogonia, gerando os esquizontes sanguíneos. Os merozoítas liberados pela ruptura da célula sanguínea podem invadir novos eritrócitos mantendo assim o ciclo. Esta fase de ruptura dos eritrócitos infectados é responsável pelo paroxismo da malária caracterizado por febre, náuseas, cefaléia e outros sintomas (GOLGI, 1889). Os sintomas associados ao paroxismo são específicos para cada espécie de parasita (KARUNAWEEERA *et al.*, 2003). Em *P. falciparum*, as manifestações graves tais como: malária cerebral, malária placentária e anemia estão associadas com o processo de sequestramento e "rosetting" que podem levar os indivíduos infectados ao óbito. Por outro lado, embora a infecção por *P. vivax* raramente seja letal, têm sido relatados em países da América do Sul (Colômbia) e Asiáticos (Paquistão, Tailândia e Índia) um aumento no número de casos de complicações graves que incluem principalmente malária cerebral (VALECHA *et al.*, 1992; GONZÁLEZ *et al.*, 2000), síndrome respiratória (CARLINI *et al.*, 1999), edema pulmonar (MUNTEIS *et al.*, 1997; PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1998) e insuficiência renal (AHMAD *et al.*, 1989). Estes sinais clínicos são consequência de uma resposta imune exacerbada desenvolvida pelo hospedeiro contra o parasita (KARUNAWEEERA *et al.*, 2003).

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

2. Epidemiologia da malária no mundo e no Brasil.

A malária é uma infecção parasitária de importância global que se constitui em um problema de saúde pública que, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004) atinge mais de 100 países. Aproximadamente 2,4 bilhões de pessoas estão expostas a infecção principalmente por *P. falciparum* e *P. vivax*, o que corresponde à cerca de 40% da população mundial, tornando-se a principal causa de morbidade e mortalidade em países tropicais e subtropicais. São registrados anualmente cerca de 350-500 milhões de casos de malária que resultam em aproximadamente 1 milhão de mortes, sendo que cerca de 70% destas ocorrem na África, principalmente em crianças menores de cinco anos e mulheres grávidas infectadas por *P. falciparum* (OMS, 2004).

Embora a mortalidade por *P. vivax* seja considerada muito baixa, quando comparada à infecção por *P. falciparum*, sua morbidade é significativa e provavelmente crescente devido ao desenvolvimento de resistência do parasita à droga cloroquina (revisto por SUH *et al.*, 2004), representando um problema de saúde pública em vários países, incluindo o sudeste da Ásia, Índia e Brasil.

No Brasil, as espécies que causam a malária são *P. vivax*, *P. falciparum* e, menos frequentemente, *P. malariae*. Até o ano de 1988, o número de casos de malária causada por *P. falciparum* e *P. vivax* eram similares no país, entretanto, a partir de 1999 houve um aumento significativo do número de casos de malária *vivax* em relação à malária *falciparum*, atingindo 80% dos casos. Aproximadamente 99,5% dos casos de malária ocorrem na região da Amazônia Legal (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – FUNASA, 2002). Estudos epidemiológicos associam a expansão da doença nos últimos 30 anos ao processo migratório da população, ocasionado pelo desenvolvimento intensificado da Amazônia principalmente nas décadas de 70 e 80 (MARQUES *et al.*, 1986), proporcionando um impacto sócio-econômico sobre essas regiões (CAMARGO *et al.*, 1994). A década de 90 foi marcada por um aumento da incidência da doença a níveis superiores a 500 mil casos/anuais, o que colocou em risco o

desenvolvimento da região Amazônica (FUNASA, 2002). Porém, uma redução significativa começou a ser observada após a implantação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM, 2000), o qual visa impedir a mortalidade e reduzir a morbidade e perdas sócio-econômicas devido à doença.

Mesmo com os avanços obtidos com a implantação do Plano de Controle da Malária, entre os anos de 2002 e 2003 foi observado um aumento de 17,9% na incidência de casos de malária nas áreas endêmicas. No ano de 2004, foram registrados 410.475 casos de malária no Brasil, sendo o *P. vivax* responsável por aproximadamente 75% destes casos (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – SVS, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Os estados que registraram um aumento da incidência da doença foram o Amazonas, Rondônia e Pará, demonstrando que mesmo com a implantação de ações de controle da doença elaboradas pelo Estado, a malária continua sendo um problema de saúde pública no Brasil, principalmente no norte do país.

3. Perspectivas de controle da malária a partir do desenvolvimento de vacinas contra as formas sanguíneas do parasita: principais alvos.

O controle da malária no mundo feito através de medidas de redução vetorial por meio de inseticidas e tratamentos profiláticos individuais ou ao nível de população, contribuiu para uma significativa redução de incidência da doença nas décadas de 40 e 50 (WENSDORFER & MCGREGOR, 1988). Entretanto, nos últimos anos o número de casos de malária registrado tem aumentado como consequência direta do surgimento de parasitas resistentes às drogas comumente utilizadas e de vetores resistentes aos inseticidas. Adicionais a estes aspectos estão mudanças climáticas, instabilidades políticas de natureza sócio-econômicas e migração populacional.

Visando impedir a expansão da malária, são necessários além da manutenção de programas permanentes de controle que contribuem para

minimizar os efeitos graves da mesma, novos investimentos na busca de estratégias de controle e informação sobre a doença. Neste contexto, acredita-se que o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra malária seria uma estratégia interessante que poderia ajudar no controle da morbidade ou mortalidade da doença nas áreas endêmicas.

Embora a complexidade do ciclo biológico do parasita, polimorfismo antigênico, estratégias de escape imune e a biologia dos vetores são indícios que dificultariam o desenvolvimento de uma vacina, algumas evidências sugerem esta como parte integrante de uma estratégia de controle da malária. Neste sentido, nos últimos anos, um significativo progresso tem sido obtido na caracterização, a nível molecular, de antígenos de *Plasmodium*, assim como na compreensão dos mecanismos imunológicos capazes de eliminar as diferentes formas do parasita (revisto por MAHANTY *et al.*, 2003 e GOOD *et al.*, 2004).

Durante o processo de invasão dos eritrócitos as formas sanguíneas do parasita ficam expostas ao sistema imune e, portanto, antígenos presentes na superfície dos merozoítas ou nas organelas do pólo apical (roptrias e micronemas), bem como antígenos exportados para a membrana plasmática da célula hospedeira induzem resposta imune que posteriormente podem impedir a manutenção do ciclo sanguíneo. Os estudos iniciais visando uma melhor compreensão sobre a imunidade na malária foram conduzidos a partir do isolamento, clonagem e sequenciamento de genes que codificam antígenos imunologicamente relevantes de *Plasmodium*. Estes estudos permitiram a obtenção de proteínas recombinantes representando diferentes regiões destas moléculas, as quais estão sendo utilizadas em estudos imuno-epidemiológicos e imunizações experimentais. Além disso, recentes avanços na área genômica obtidos com a finalização do projeto genoma de *P. falciparum*, assim como as análises proteômicas têm propiciado a caracterização de novos antígenos e estudo das funções biológicas. Em conjunto, estas se tornam estratégias atraentes para uma melhor compreensão da resposta imune humana e o desenvolvimento de uma nova geração de vacina contra a malária

denominada de "Genomes-to-Vaccines" que se baseia em traduzir informações genômicas do parasita, tentando reproduzir a proteção induzida pelo organismo total através das proteínas derivadas de *Plasmodium* e epítomos que são alvos de resposta imune protetora (revisto por DOOLAN *et al.*, 2003).

A tabela 1 apresenta os principais antígenos expressos em merozoítas de *P. vivax* cujos respectivos genes foram clonados e seqüenciados. Nesta introdução iremos dar enfoque principal aos antígenos que foram estudados durante o desenvolvimento deste projeto.

Tabela 1: Principais proteínas identificadas e caracterizadas em merozoítas de *P. vivax*.

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

Proteína 1 da superfície de merozoítas (MSP-1).

A invasão de eritrócitos é um importante passo no ciclo biológico do parasita da malária e as proteínas que intervêm nesta etapa são importantes candidatos para o desenvolvimento de uma vacina. Entre os antígenos de superfície de merozoítas já caracterizados, a Proteína 1 da Superfície de

Merozoítas (MSP-1) é um dos mais promissores alvos para compor uma vacina.

A MSP-1 é sintetizada inicialmente como um precursor de 200 kDa durante o estágio de esquizogonia e, posteriormente processada por clivagem proteolítica em vários fragmentos, onde somente parte da porção C-terminal permanece na superfície do merozoíta. A primeira etapa de clivagem origina quatro fragmentos de 83, 30, 38 e 42 kDa, o fragmento de 42 kDa (MSP1₄₂) sofre uma segunda etapa de clivagem originando dois fragmentos de 33 e 19 kDa em um processo dependente de cálcio (GARMAN *et al.*, 2003). A clivagem proteolítica descrita acima não tem sido demonstrada em *P. vivax*, porém especula-se que um mecanismo de processamento similar à MSP-1 de *P. falciparum* ocorra em *P. vivax* devido à similaridade dos sítios de reconhecimento das proteases (LONGACRE *et al.*, 1994). Durante a invasão de eritrócitos somente o fragmento de 19 kDa C-terminal (MSP1₁₉) permanece ancorado a membrana através da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) sobre a superfície dos merozoítas, durante a invasão aos eritrócitos (revisto por BLACKMAN, 2004).

A importância biológica da MSP-1 para a sobrevivência do parasita permanece desconhecida, entretanto tentativas de deletar o gene da *msh-1* resultaram em parasitas inviáveis, o que sugere sua importância na sobrevivência do parasita (O' DONNEL *et al.*, 2000).

O gene que codifica a MSP-1 de *P. vivax* apresenta várias similaridades com os genes de outras espécies de *Plasmodium*. A comparação entre as seqüências de nucleotídeos de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. yoelii* revelaram a existência de blocos conservados entre as espécies (ICBs) alterando com regiões de maior diversidade (DEL PORTILLO *et al.*, 1991). Duas famílias alélicas foram inicialmente definidas pelas seqüências de nucleotídeos das cepas de *P. vivax* Belém e Salvador/Sal-1 com uma similaridade global entre elas de 81% (DEL PORTILLO *et al.*, 1991; GIBSON *et al.*, 1992). A análise da estrutura primária da MSP-1 destas duas cepas do parasita permitiu a definição de regiões conservadas, semi-conservadas e

variáveis na molécula. Estas regiões estão esquematizadas na figura a seguir.

A estrutura da MSP1₁₉ de diferentes espécies de *Plasmodium* consiste de dois domínios, cada um contendo de 4 a 6 resíduos de cisteínas configurados de maneira semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF) (MORGAN *et al.*, 1999; CHITARRA *et al.*, 1999; GARMAN *et al.*, 2003). A estabilidade da molécula é dada por 5 ou 6 ligações dissulfídicas que recentemente foi demonstrado estarem envolvidas na inibição do processamento do antígeno, devido à resistência apresentada a clivagem pela enzima asparagina endopeptidase (AEP) *in vitro*. Esta inibição está correlacionada com uma diminuição do desenvolvimento da resposta por anticorpos *in vivo* em infecção por *P. chabaudi* (HENSMANN *et al.*, 2004).

Diversos estudos demonstraram que anticorpos que reconhecem a MSP1₁₉ de *P. falciparum* podem inibir o processo de invasão de merozoítas (BLACKMAN *et al.*, 1990; CHANG *et al.*, 1992; CHAPEL & HOLDER, 1993). Esses anticorpos estão divididos em três categorias com base em sua capacidade de interferir com o processo de invasão, são eles: os anticorpos que inibem o processamento secundário da MSP-1, os anticorpos bloqueadores que interferem na ligação dos anticorpos inibitórios permitindo o segundo processamento e conseqüentemente a invasão. A indução deste tipo de anticorpo pode constituir um mecanismo de escape imune para evitar a ação dos anticorpos protetores (HOLDER *et al.*, 1999). E por último, os

anticorpos neutros que se ligam a molécula, mas não apresentam uma função definida (DEKKER *et al.*, 2004).

Em *P. vivax*, recentemente foi demonstrado que soros de pacientes expostos naturalmente ao parasita foram capazes de bloquear o "binding" de células COS-7 transfectadas com a MSP1₁₉ a eritrócitos humanos *in vitro* (HAN *et al.*, 2004). Os anticorpos contra os domínios EGF (1 e 2) foram definidos como os principais alvos para o bloqueio da citoaderência da célula transfectada aos eritrócitos (HAN *et al.*, 2004).

Ao contrário de *P. falciparum*, que apresenta um grande número de interações receptores-ligantes entre merozoítas e superfície de eritrócitos (DOLAN *et al.*, 1991; ADAMS *et al.*, 2001), em *P. vivax* é conhecido somente o receptor Duffy para invasão em eritrócitos humanos. Porém, um novo mecanismo de invasão envolvendo a MSP1₁₉ a novos ou múltiplos receptores para uma interação estável vem sendo proposto por HAN *et al.* (2004).

Estudos imuno-epidemiológicos caracterizando a resposta imune naturalmente adquirida contra proteínas recombinantes derivadas das regiões N- ou C-terminal da MSP-1 de *P. vivax* têm sido realizados em diversas áreas endêmicas de malária da região amazônica brasileira (LEVITUS *et al.*, 1994; SOARES *et al.*, 1997, 1999a, 1999b; RODRIGUES *et al.*, 2003, MORAIS *et al.*, 2005). O primeiro estudo realizado avaliou a resposta de anticorpos IgG e IgM em indivíduos da área endêmica de Rondônia contra 10 proteínas recombinantes derivadas da região N-terminal da MSP-1 em fusão com a glutathion S-transferase (LEVITUS *et al.*, 1994). Foi observado que as proteínas recombinantes correspondentes às regiões de "overlapping" entre blocos conservados interespecies e blocos polimórficos foram mais antigênicas.

Posteriormente, foram estudados diversos aspectos da resposta imune celular e de anticorpos contra proteínas recombinantes derivadas das regiões N e C-terminal da MSP-1 de *P. vivax* em indivíduos de áreas endêmicas de malária da região amazônica brasileira (SOARES *et al.*, 1997, 1999a, 1999b; RODRIGUES *et al.*, 2003; MORAIS *et al.*, 2005). Inicialmente,

o reconhecimento imune celular e por anticorpos contra a MSP-1 de *P. vivax* em indivíduos recentemente expostos do Estado do Pará foi avaliado utilizando 11 proteínas recombinantes correspondentes às regiões N- e C-terminais da molécula. A proteína recombinante contendo apenas 111 aminoácidos representando a região C-terminal (MSP1₁₉) foi a mais reconhecida tanto por anticorpos como por células T (SOARES *et al.*, 1997).

A longevidade da resposta gerada contra a MSP1₁₉ recombinante também foi determinada pelos títulos de anticorpos persistentes após dois meses de tratamento e revelou uma diminuição significativa dos mesmos, o que permitiu especulações sobre um possível aumento no risco de re-infecção desses indivíduos (SOARES *et al.*, 1999b). Por outro lado, outros estudos demonstraram que a resposta de anticorpos contra uma proteína recombinante correspondente a região C-terminal da MSP-1 (MSP1₄₂) persistiu por 7 anos após breve exposição dos indivíduos ao *P. vivax* na ausência de re-infecções ou re-exposições à transmissão (BRAGA *et al.*, 1998). Recentemente, a persistência de anticorpos anti-MSP1₁₉ foi avaliada nesta mesma população e os resultados demonstraram que a longevidade da resposta ao antígeno diminui após 7 anos de exposição quando comparada com a resposta de anticorpos gerada após 8 meses da infecção, entretanto 28% dos indivíduos analisados mantêm anticorpos detectáveis (MORAIS *et al.*, 2005).

A partir dos resultados iniciais obtidos com a proteína recombinante derivada da MSP1₁₉ de *P. vivax* demonstrando que esta região é altamente antigênica, foram gerados outros plasmídios recombinantes para expressão em bactérias e leveduras contendo o gene que codifica a MSP1₁₉, com o intuito de estabelecer qual das proteínas expressas apresentaria uma melhor conformação reconhecida por soros humanos de indivíduos expostos ao *P. vivax* (CUNHA *et al.*, 2001; SOARES & RODRIGUES, 2002). As quatro proteínas recombinantes geradas foram recentemente utilizadas para desenvolvimento de um ensaio sorológico para diagnóstico de malária *vivax* na população brasileira (RODRIGUES *et al.*, 2003). Além disso, a imunização de camundongos com a MSP1₁₉ recombinante produzida a partir

de diferentes vetores de expressão em bactérias (CUNHA *et al.*, 2001; ROSA *et al.*, 2004) ou leveduras (SOARES & RODRIGUES, 2002) foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos.

Em conjunto, esses resultados sugerem o uso da MSP1₁₉ de *P. vivax* como parte de uma vacina multi-estágio e espécie, em função de sua imunogenicidade observada em humanos e modelo animal.

Antígeno 1 de membrana apical (AMA-1).

AMA-1 apresenta características estruturais de uma proteína integral de membrana do tipo I, subdividida em três domínios distintos (I, II e III) que em *P. falciparum* estão separados por oito pontes dissulfídicas formadas por 16 resíduos de cisteínas, seguido por um domínio transmembrana e por uma curta cauda citoplasmática na região C-terminal (PETERSON *et al.*, 1989). Em *P. vivax*, a proteína AMA-1 apresenta 19 resíduos de cisteínas ao longo de seus 562 aminoácidos que se apresentam conservados em *P. fragile* e *P. knowlesi* (CHENG & SAUL, 1994) (ver esquema abaixo)

Esta proteína é sintetizada durante a esquizogonia, como um precursor de 66 kDa nas espécies de *Plasmodium* que infectam roedores, humanos e primatas não humanos. Por outro lado, em *P. falciparum*, AMA-1 é sintetizada como um precursor de 83 kDa (revisto por GAUR *et al.* 2004).

Em *P. falciparum*, antes da translocação da proteína do complexo apical [roptrias (NARUM & THOMAS, 1994) e micronemas (HEALER *et al.*,

2002)] para a superfície dos merozoítas esta sofre uma clivagem proteolítica que resulta na remoção da região N-terminal, originando uma proteína de 66 kDa. Paralelamente, ao processo de relocação da molécula na superfície do parasita, duas novas clivagens na região C-terminal ocorrem, dando origem a um fragmento de 44 kDa ou de 48 kDa dependendo do possível sítio de ação da protease (HOWELL *et al.*, 2003).

Embora o gene que codifica a proteína AMA-1 seja altamente conservado entre as espécies de *Plasmodium* (FIGTREE *et al.*, 2000), foram observadas variações significativas entre os alelos de *P. falciparum* (KOCKEN *et al.*, 2000; POLLEY & CONWAY, 2001; CORTES *et al.*, 2003). Este polimorfismo que resulta na substituição de aminoácidos, indica que AMA-1 sofre pressões imunes que resultam na diversificação da conformação dos epítomos impedindo assim a invasão de merozoítas a novos eritrócitos (HEALER *et al.*, 2004).

Embora a importância funcional desta proteína permaneça desconhecida, dados apontam o envolvimento de AMA-1 no processo de invasão dos eritrócitos. Esta interpretação é sustentada, pela demonstração que anticorpos contra AMA-1 de *P. knowlesi* são capazes de inibir a invasão de merozoítas (THOMAS *et al.*, 1994) e que peptídeos derivados de PfAMA-1 inibem a interação entre merozoítas e eritrócitos (LI *et al.*, 2002). Além disso, células COS-7 transfectadas com AMA-1 de *P. yoelii* se ligam a eritrócitos (FRASER *et al.*, 2001). Recentemente, MITCHELL *et al.* (2004) demonstraram que AMA-1 de *P. knowlesi* não participa da ligação inicial dos merozoítas a superfície do eritrócito, esta pode ser responsável pela reorientação dos merozoítas ou ainda pela junção de contato parasita-célula dependente da participação dos antígenos Duffy. Além dessas possíveis funções apresentadas, estudos sugerem o papel de AMA-1 na invasão a hepatócitos, uma vez que foi demonstrado que micronemas de esporozoítas expressam a proteína com similar processo de clivagem proteolítica e translocação apresentado por merozoítas (revisto por BLACKMAN, 2004).

A inclusão de AMA-1 como constituinte de uma vacina contra a malária é sustentada por evidências de estudos em modelo animal e no

homem. Inicialmente, foi demonstrado que a imunizações de macacos *Rhesus* com a proteína nativa de *P. knowlesi* foi capaz de conferir proteção contra a infecção (DEANS *et al.*, 1988). Posteriormente, a imunização de macacos *Saimiri* com AMA-1 de *P. fragile* foi capaz de induzir proteção após o desafio com *P. falciparum* (COLLINS *et al.*, 1994). Em *P. vivax*, a proteína expressa em *Pichia pastoris*, demonstrou ser altamente imunogênica em primatas (KOCKEN *et al.*, 1999).

O primeiro estudo de resposta imune naturalmente adquirida contra AMA-1 de *P. vivax* foi conduzido recentemente pelo nosso grupo em indivíduos com infecção patente de diferentes regiões endêmicas do estado do Pará (RODRIGUES *et al.*, 2005). Duas proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 (produzidas em bactérias ou leveduras) foram altamente reconhecidas por anticorpos de indivíduos naturalmente expostos, sendo IgG1, a subclasse de anticorpos predominante.

4. Variação antigênica em malária.

Alterações antigênicas induzidas pelo parasita na superfície de eritrócitos infectados são expostas a resposta imune do hospedeiro durante o ciclo eritrocítico e podem constituir um importante alvo para a imunidade protetora adquirida. Neste contexto, os primeiros estudos explorando a variação antigênica em malária demonstraram que a infecção crônica se mantém pela expressão serial de diferentes antígenos e que a imunidade contra a infecção está associada com o desenvolvimento de anticorpos variantes específicos e opsonizantes (revisto por KYES *et al.*, 2001). Por outro lado, antígenos variantes são responsáveis pelo mecanismo de evasão do sistema imune e atuam como um importante fator de virulência por mediar a adesão em distintos receptores endoteliais.

A variação antigênica é uma característica descrita em diferentes espécies de *Plasmodium*, incluindo desde parasitas que infectam roedores até primatas. Em *P. falciparum*, três famílias de genes variantes têm sido caracterizadas: *var*, *rif* e *stevor*. Os mais estudados são os genes *var* que codificam para a proteína 1 de membrana de eritrócito de *P. falciparum*

(PfEMP-1) com peso molecular de aproximadamente 220-350 kDa (LEECH *et al.*, 1984), expressa na superfície de eritrócitos infectados em forma de estruturas elétricas densas denominadas "knobs". A organização estrutural dos genes *var* consiste em um primeiro exon que codifica domínios altamente variantes expostos na superfície dos eritrócitos infectados e um pequeno exon 2 altamente conservado que codifica a região denominada de ATS ("acidic terminal sequence") responsável pela associação da proteína PfEMP-1 a proteínas do hospedeiro, tais como, espectrina e actina do esqueleto do eritrócito ou proteínas do parasita como KAHRP ("knob associated-histidine rich protein") (OH *et al.*, 2000). Esta última permite o ancoramento da molécula na superfície dos "knobs". Estas estruturas têm a capacidade de modificar a morfologia celular e de facilitar o seqüestramento dos eritrócitos infectados que contêm as formas maduras do parasita aderindo às células no endotélio dos capilares periféricos (BIGGS *et al.*, 1991). Também promovem a aglutinação com eritrócitos não infectados, fenômeno denominado "rosetting", o qual provoca danos em diversos órgãos por interrupção na irrigação sanguínea (BIGGS *et al.*, 1992).

Nos últimos anos, diversos aspectos da resposta imune naturalmente adquirida contra antígenos variantes de superfície (VSA) de *P. falciparum* têm sido estudados (MARSH *et al.*, 1989; BULL *et al.*, 1998; DODOO *et al.*, 2001). Evidências sugerem que o mecanismo protetor envolvendo essas moléculas se baseia na aquisição de anticorpos variante-específicos que atuam inibindo interações de eritrócitos infectados a receptores endoteliais, permitindo que estes sejam destruídos pelo baço e/ou por meio da opsonização conduzindo a fagocitose de eritrócitos infectados (GROUX & GYSIN, 1990; TEBO *et al.*, 2002).

Estudos imunoepidemiológicos realizados em populações com crianças têm demonstrando que a imunidade protetora desenvolvida contra malária divide-se em três fases: (i) imunidade contra a doença, (ii) imunidade contra a infecção sintomática, (iii) imunidade parcial contra o parasitismo (revisto por SCHOFIELD & GRAU, 2005). O primeiro estudo demonstrando a importância de anticorpos variante-específico no desenvolvimento de uma

resposta protetora ao hospedeiro foi descrito por MARSH e HOWARD (1986), que demonstrou que soros de crianças no período convalescente foram capazes de aglutinar *in vitro* eritrócitos infectados com a cepa de parasita na qual a criança foi exposta, porém não com outras cepas de parasita. Por outro lado, soros de indivíduos adultos da mesma área endêmica eram capazes de aglutinar diversas cepas circulantes na população local, sugerindo que a imunidade desenvolvida é variante específica e está diretamente associada ao número de episódios clínicos de malária.

Estudos *in vitro* utilizando clones de uma única linhagem parental de *P. falciparum* demonstraram que anticorpos variante-específicos são direcionados contra diferentes variantes da PfEMP-1 (BIGGS *et al.*, 1991) e que *P. falciparum* é capaz de promover um "switch" espontâneo na expressão dos antígenos variantes calculado em 2% por cada geração do parasita (BIGGS *et al.*, 1992). Esses anticorpos estão associados à redução do mecanismo de seqüestramento e de adesão de eritrócitos infectados com conseqüente diminuição da carga parasitária através da remoção pelo baço desses eritrócitos, prevenindo assim o desenvolvimento de complicações da malária (cerebral e placentária) (DODOO *et al.*, 2001).

Apesar da variação na seqüência, a porção extracelular da PfEMP-1 apresenta estruturas conservadas que se tornam proeminentes candidatos a compor uma vacina por estarem associadas a interações adesivas. Estas estruturas constituem os seguintes domínios: (i) "Duffy binding-like" (DBL) 1 do tipo α responsável pelo processo de "rosetting" através da ligação ao receptor do complemento CR1 (ROWE *et al.*, 1997) e heparan sulfato (HS)-like glicosaminoglicanas (GAG) (CHEN *et al.*, 1998); (ii) a região de interdomínio rico em cisteína (CIDR) do tipo α ao receptor de superfície endotelial CD36 (BARUCH *et al.*, 1996; BARUCH *et al.*, 1997); (iii) o domínio DBL 2 β juntamente com o domínio C2 responsáveis pela adesão ao receptor endotelial ICAM-1 (SMITH *et al.*, 2000) que tem mostrado um papel importante na malária cerebral (BERENDT *et al.*, 1989; FERNANDEZ-

REYES *et al.*, 1997); (iv) o domínio DBL 3 do tipo γ responsável pela adesão ao sulfato de condroitina A (CSA) (REEDER *et al.*, 1999).

Em paralelo, ao papel desempenhado pela PfEMP-1 de induzir uma imunidade protetora caracterizada pelo reconhecimento e destruição do parasita pelo sistema imune (GUPTA, 2005), evidências demonstram sua capacidade de modular o sistema imune através da simulação do processo de ativação da apoptose devido à ligação da molécula ao receptor CD36 das células dendríticas (URBAN *et al.*, 2001), inibição do processo de fagocitose pelos macrófagos por anticorpos anti-CD36 (AYI *et al.*, 2005), ativação policlonal de células B pelo domínio CIDR-1 α (DONATI *et al.*, 2004), "binding" a linfócitos B "naive" estimulando a secreção de IgM não imune (ROWE *et al.*, 2002) entre outros fatores.

Mesmo atuando como um fator de virulência, várias são as evidências que sugerem a PfEMP-1 como candidata à vacina, entre essas estão: (i) mulheres com múltiplas gestações raramente desenvolvem malária placentária devido ao desenvolvimento de anticorpos que bloqueiam o "binding" de eritrócitos infectados a sulfato de condroitina A (CSA) na placenta (FRIED & DUFFY, 1996); (ii) indivíduos adultos somente desenvolvem a malária cerebral quando não apresentam imunidade adquirida (revisto por GITAU & NEWTON, 2005) e raramente essa se manifesta em indivíduos com mais de 10 anos de exposição ao *P. falciparum*; (iii) a demonstração de que anticorpos de reatividade cruzada reconhecendo epítomos presente na proteína PfEMP-1 conferem proteção (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2003).

Com relação aos genes *rif*, sua organização estrutural consiste em dois exons, sendo o exon 1 codificador de um peptídeo sinal sugerindo o transporte desta proteína para a superfície celular e o exon 2 codificando a maior porção do polipeptídeo (revisto por RASTI *et al.*, 2004). Os genes *rif* codificam as proteínas denominadas RIFINs que são imunogênicas (FERNANDEZ *et al.*, 1999), porém a resposta induzida contra essas proteínas não se apresenta correlacionada a proteção (ABDEL-LATIF *et al.*, 2002). Estas são expressas na fase de trofozoítas e estão localizadas na

superfície da célula infectada. Quanto à função, tem sido sugerido que estas podem atuar como co-fatores no processo de "rosetting" ou da ligação a CDs1 (revisto por KYES *et al.*, 2001).

A terceira família multigênica envolvida na interação hospedeiro-parasita é o gene *stevor*. Semelhante a família dos genes *rif*, os genes *stevor* apresentam dois exons, um primeiro curto e similar entre as famílias e o segundo codificador de seqüências altamente conservadas intercaladas com regiões variáveis. O papel da proteína STEVOR codificada pelo gene, sugere funções adicionais à variação antigênica e escape imune uma vez que esta é expressa em três diferentes estágios do ciclo biológico do parasita. KAVIRATNE *et al.* (2002) demonstraram que a proteína localiza-se nas "Maurer's clefts", estruturas membranosas implicadas no transporte de proteínas do parasita para a superfície de eritrócitos.

Em *P. vivax*, a superfície de reticulócitos infectado apresenta invaginações induzidas pela entrada do parasita (AIKAWA, 1988) que diferem morfológicamente das estruturas observadas nas células infectadas por *P. falciparum*. Essas estruturas apresentam antígenos altamente polimórficos (UDAGAMA *et al.*, 1988) que foram demonstrados através da utilização de soros de pacientes primoinfectados e com múltiplos episódios de malária em ensaios de imunofluorescência contra diferentes isolados naturais de *P. vivax* (MENDIS *et al.*, 1988). Os dados obtidos mostram que repetidas exposições ao parasita conferem imunidade contra um vasto repertório de antígenos variantes presentes nesta espécie, sugerindo que *P. vivax* utiliza o mecanismo de variação antigênica para o estabelecimento da infecção crônica.

Com intuito de identificar antígenos variantes em *P. vivax*, DEL PORTILLO *et al.* (2001) descreveram uma família multigênica, denominada *vir* (*P. vivax* variant genes) através da análise de seqüência de clones teloméricos procedentes de uma biblioteca de YAC (CAMARGO *et al.*, 1997). Foi demonstrado que membros desta família gênica estão preferencialmente localizados na região subtelomérica do cromossomo.

Os genes *vir* estão organizados estruturalmente em 3 exons e codificam proteínas (VIR) com massa molecular entre 26 e 68 kDa que são expressas durante o desenvolvimento intra-eritrocítico do parasita. Estas proteínas são altamente variantes em infecções naturais e estão agrupadas em seis subfamílias (A-F) de acordo com a homologia dos exons 1 e 2, excluindo-se a região transmembrana.

Recentemente FERNANDEZ-BECERRA *et al.* (2005) demonstraram que a expressão dos genes *vir* nos estágios maduros de trofozoítas e esquizontes não são clonais. Ocorrendo, concomitantemente, à transcrição de pelo menos duas diferentes subfamílias nos reticulócitos infectados. Este achado corrobora com dados imunológicos que demonstram ausência de diferenças significativas no reconhecimento das proteínas recombinantes correspondentes às subfamílias VIR por soros de pacientes primoinfectados e com múltiplas infecções. Por outro lado, a imunidade adquirida contra os antígenos variantes de *P. falciparum* está associada ao número de episódios prévios de malária (revisto por KYES *et al.*, 2001).

Embora a função precisa dos genes *vir* não seja conhecida, evidências sugerem o envolvimento destes na variação antigênica e nos mecanismos de escape do parasita através da citoaderência no baço (DEL PORTILLO *et al.*, 2001, 2004). Acredita-se que reticulócitos infectados por *P. vivax* aderem especificamente às células de barreira ("barrier cells") presentes no baço por meio de proteínas correspondentes às subfamílias conservadas que atuariam como ligantes. Por outro lado, estes estariam

protegidos da destruição pelos macrófagos através da expressão de proteínas polimórficas que evitaria a formação de anticorpos opsonizantes. Em paralelo, para compensar a anemia associada com a malária *vivax*, o baço inicia o processo de eritropoiese com liberação de um grande número de reticulócitos jovens que serão infectados por merozoítas livres (DEL PORTILLO *et al.*, 2004).

Os primeiros estudos caracterizando a resposta imune humana naturalmente adquirida contra as proteínas VIR, demonstraram que essas são imunogênicas em infecções naturais (DEL PORTILLO *et al.*, 2001; FERNANDEZ-BECERRA *et al.*, 2005). A partir destes dados, no presente trabalho, nós demos continuidade e aprofundamos as análises de reconhecimento imune das proteínas VIR recombinantes em indivíduos expostos a malária *vivax* procedentes de diferentes áreas endêmicas da Região Amazônica Brasileira. Para feito comparativo, utilizamos dois importantes antígenos de superfície de merozoítas de *P. vivax* (AMA-1 e MSP1₁₉). Além disso, caracterizamos a resposta imune de camundongos contra as proteínas VIR após imunizações experimentais.

II. OBJETIVOS

1. Objetivos Gerais

Avaliar comparativamente a resposta imune naturalmente adquirida contra proteínas recombinantes baseadas em antígenos de estágios assexuados sanguíneos de *P. vivax* em indivíduos de áreas endêmicas de malária. Estes estudos serão complementados pela análise comparativa da resposta imune de camundongos após imunização com cada uma das proteínas recombinantes.

2. Objetivos específicos

2.1. Expressar em *E. coli* as proteínas recombinantes derivadas do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) e região C-terminal da Proteína 1 de Superfície do Merozoíta de *P. vivax* (MSP1₁₉).

2.2. Gerar e expressar em *E. coli* proteínas recombinantes correspondentes ao exon 2 de 4 subfamílias (A-E) de antígenos variantes codificados pelos genes *vir*.

2.3. Avaliar comparativamente o reconhecimento imune das proteínas recombinantes AMA-1, MSP1₁₉ e VIR por anticorpos e células T em indivíduos expostos ao *P. vivax*.

2.4. Avaliar o padrão de reatividade cruzada entre os anticorpos contra as proteínas recombinantes correspondentes às subfamílias VIR através da imunização experimental de camundongos com cada uma das proteínas recombinantes.

2.5. Caracterizar a resposta imune celular dos camundongos imunizados com as proteínas recombinantes VIR.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. População e áreas de estudo.

Um total de 261 amostras de sangue foi incluído neste estudo. Amostras de soros de 200 indivíduos infectados pelo *P. vivax* procedentes da Região Amazônica foram utilizadas nos ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-VIR, anti-AMA-1 e anti-MSP1₁₉. Estas amostras já estavam disponíveis e foram utilizadas em estudos anteriores sobre a resposta imune humana a MSP-1 (SOARES *et al.*, 1997, 1999b RODRIGUES *et al.*, 2003), AMA-1 (RODRIGUES *et al.*, 2005) e VIR (DEL PORTILLO *et al.*, 2001; FERNANDEZ-BECERRA *et al.*, 2005). Dados como sexo, idade e número de episódios anteriores de malária foram solicitados durante a coleta das amostras e estão apresentados na Tabela 2. Além destas, amostras de sangue total de 27 indivíduos que tiveram malária clínica recente foram coletadas e utilizadas nos ensaios de proliferação celular.

Um grupo constituído de 34 amostras de indivíduos adultos sadios sem história clínica de malária foi selecionado e utilizado para o estabelecimento do "cutoff" nos ensaios de sorologia (n=20) e como grupo controle nos ensaios de linfoproliferação humana (n=14).

A Comissão de Ética em Pesquisa da FCF/USP aprovou este estudo e todas as amostras de sangue foram coletadas mediante esclarecimento sobre o projeto e aqueles que concordaram, voluntariamente, em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

1.1. Amostras de sangue de indivíduos infectados por *P. vivax* procedentes de diferentes áreas endêmicas da Região Amazônica.

a) Belém, PA.

Sessenta e quatro amostras de soros de indivíduos com malária causada por *P. vivax* foram coletadas no Ambulatório de Malária do Instituto Evandro Chagas/Fundação Nacional de Saúde (Belém, Pa) sob a responsabilidade do Dr. José Maria de Souza. Cinco mililitros de sangue foram coletados de cada paciente em tubos "Vacutainer" (Labnew) sem anticoagulante após o

diagnóstico de malária causada por *P. vivax* (comprovado pela presença de parasitemia) e antes do início do tratamento quimioterápico. O sangue permaneceu a temperatura ambiente até a separação do soro. O sangue foi centrifugado e alíquotas de soro serão mantidas a -20°C .

b) Outras localidades endêmicas de malária do Estado do Pará.

Um total de 32 amostras procedentes da localidade de São Jorge, município de Igarapé-Açu, Estado do Pará, foram coletadas e gentilmente cedidas pela Dra. Maristela Gomes da Cunha da Universidade Federal do Pará. Outras 61 amostras foram coletadas em 3 municípios do Estado do Pará (Marabá, Itaituba e Tailândia), pelo Dr. Ricardo Machado do Instituto Evandro Chagas/FUNASA.

c) Porto Velho, Rondônia.

Quarenta e três amostras de soros foram cedidas pelo Prof. Dr. Hernando del Portillo do Instituto de Ciências Biomédicas - USP e por Joana D'Arc Neves do CEPEN - Centro de Pesquisa em Medicina Tropical.

1.2. Amostras de sangue de indivíduos que tiveram malária clínica recente.

As amostras de sangue para os ensaios de proliferação celular foram obtidas de 27 indivíduos que tiveram malária clínica recente (2 semanas até 3 meses após o tratamento quimioterápico). Vinte mililitros de sangue foram coletados de cada indivíduo em tubos "Vacutainer" contendo heparina sódica. As coletas foram realizadas em dezembro/2004 e maio/2005, no município de Augusto Corrêa, Estado do Pará. Após a coleta, o sangue foi transportado para São Paulo à temperatura ambiente (t.a) e os procedimentos para ensaios de proliferação celular foram iniciados no máximo 48 horas depois.

1.3. Indivíduos sadios.

Dezessete amostras de indivíduos adultos sadios sem história clínica de malária foram cedidas pelo Dr. Orlando C. Ferreira Jr, do Departamento de Hemoterapia, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP. Estas amostras foram testadas com o objetivo de estabelecer o "cutoff" para cada proteína recombinante por ELISA. Amostras de sangue total de 14 indivíduos sadios que nunca estiveram em área endêmica de malária foram coletadas no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, e utilizadas como controles negativos dos ensaios de proliferação linfoblástica.

Tabela 2. Dados cadastrais disponíveis dos pacientes de áreas endêmicas utilizados nos ensaios sorológicos.

Área de estudo	Número de indivíduos	Dados dos pacientes		
		% de indivíduos do sexo masculino	Idade (média $\pm$ dp)	nº de episódios prévios de malária
Belém	64	68,8	26,3 $\pm$ 12,1	0 a > 4
Marabá	21	71,4	32,0 $\pm$ 12,3	0 a > 4
Itaituba	20	75,0	29,9 $\pm$ 10,6	0 a > 4
Tailândia	20	80,0	30,9 $\pm$ 17,7	0 a > 4
Rondônia	43	60,5	30,3 $\pm$ 11,3	0 a > 4
São Jorge	32	62,5	20,3 $\pm$ 15,7	0 a 1*

* 90,6% são primoinfectados

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

2.1. Soluções e tampões para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%).

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

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

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

2.3. Soluções e tampões para ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

- Tampão carbonato 0,05 M: 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃ pH 9,6
- PBS: 8 mM NaH₂PO₄, 2,3 mM Na₂HPO₄, 130 mM NaCl pH 7,4
- PBS-Tween: PBS, 0,05% Tween 20 (Fluka Chemie)
- Tampão fosfato-citrato: 0,2 M NaH₂PO₄, 0,2 M C₆H₈O₇ pH 5,0
- Soluções de bloqueio:
Para ensaios com soros humanos: PBS, 5% de leite desnatado (Molico)

Para ensaios com soros de camundongos: PBS, 5% de leite desnatado (Molico), 2,5% de BSA (Sigma)

Solução de revelação: 1 mg/ml de OPD (Sigma), 0,03% (vol/vol) de H₂O₂ diluído em tampão fosfato-citrato

2.4. Tampões utilizados na purificação das proteínas VIR.

- Tampão de lise: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 µg/ml lisozima (Sigma) e 0,05 volumes de PIC (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma)
- Tampão de eluição: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 120 mM NaCl, 6,7 mg/ml GSH (Sigma)
- Tampão de diálise: PBS, 1 mM PMSF (Pierce)

2.5. Tampões utilizados para a purificação da proteína His₆-AMA.

- Tampão de lise: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2 mM PMSF e 200 µg/ml de lisozima
- Tampão de lavagem dos corpos de inclusão: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5% CHAPS (Pierce)
- Tampão de solubilização: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 8 M uréia e 10% glicerol
- Tampão de equilíbrio: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 8 M uréia, 10% glicerol e 5 mM Imidazol (USB)
- Tampão de "refolding": 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 10% glicerol, 20 mM Imidazol, 0,5 mM GSSG (Sigma), 5 mM GSH (Sigma), 0,1% de Triton X-100 e uréia (6 a 1 M)
- Tampão de eluição: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 10% glicerol, 250 mM Imidazol, 0,5 mM GSSG, 5 mM GSH, 0,1% de Triton X-100
- Tampão de diálise: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 50% glicerol, 0,1 mM DTT (Invitrogen)

2.6. Meios de cultura.

Meios para cultura de bactérias:

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

Meio para cultura de células humanas:

- RPMI completo: RPMI 1640 (Invitrogen), 10 mM Hepes (Sigma), 0,2% NaHCO₃ (Synth), 100 U/ml de uma solução de penicilina e estreptomicina (Invitrogen), 2 mM L-glutamina, 1% mistura de aminoácidos não essenciais, piruvato de sódio 1 mM (todos obtidos da Invitrogen), β-mercaptoetanol 0,05 mM (Bio-Rad) e 10% de soro humano normal (pool) previamente inativado por 30 min a 56°C.

3. Construção dos plasmídios recombinantes.

3.1. Subclonagem dos genes correspondentes ao exon 2 das subfamílias VIR em vetores de expressão.

As seqüências de nucleotídeos correspondentes ao exon 2 das subfamílias *vir* (A-E) foram obtidas por amplificação (RT-PCR) do cDNA a partir do RNAm extraído de um isolado natural de *P. vivax* procedente do Estado de Rondônia. A reação de RT-PCR foi realizada com oligonucleotídeos contendo o sítio para a enzima de restrição *EcoRI*. Os produtos da amplificação foram clonados inicialmente no vetor pGEM (Promega) para análise da seqüência do DNA, e, posteriormente os diferentes fragmentos foram purificados e inseridos nos vetores pGEX-3X (ou pGEX-4T, Amersham Biosciences) para expressão das proteínas recombinantes em fusão com a Glutathiona S-transferase (GST). Esta etapa do projeto foi realizada no laboratório do Dr. Hernando del Portillo

(Departamento de Parasitologia - ICB/USP) com a colaboração da Dra. Carmen Fernandez Becerra.

3.2. Construção do plasmídio recombinante correspondente à proteína AMA-1 de *P. vivax*.

A sequência de nucleotídeos correspondente aos aminoácidos 43 a 487 de AMA-1 foi obtida por PCR a partir do DNA genômico de um paciente infectado pelo *P. vivax* procedente de Belém, Pará. Foram utilizados oligonucleotídeos contendo sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI ou *Xho*I. O produto de PCR foi inserido no vetor pMOS*Blue* (Amersham Biosciences) e a sequência de nucleotídeos dos clones obtidos foi confirmada através de reação de seqüenciamento. Posteriormente, o inserto foi removido do plasmídio recombinante (pMOS/AMA-1) por digestão com as enzimas de restrição apropriadas e subclonado no vetor pHIS (pET-22b, modificado por SHEFFIELD *et al.*, 1999) para obtenção da proteína em fusão com His₆ (RODRIGUES *et al.*, 2005)

As informações sobre as proteínas recombinantes (vetores de origem, de expressão e clones obtidos) utilizados neste estudo estão apresentadas na Tabela 3.

4. Expressão e purificação das proteínas recombinantes utilizadas nos ensaios imunológicos *in vitro*.

A proteína recombinante GST-MSP1₁₉ foi produzida previamente e já estava disponível para este estudo SOARES *et al.* (1999c). Esta proteína foi utilizada nos ensaios sorológicos de camundongos. Quanto à proteína recombinante His₆-MSP1₁₉, esta tem sido produzida rotineiramente em nosso laboratório pela estudante de doutorado Maria Carolina Sarti Jimenez de acordo como descrito anteriormente (CUNHA *et al.*, 2001). Esta proteína foi utilizada em todos os ensaios de resposta imune humoral (humana) e celular (humana e de camundongos). Para o estabelecimento das condições de obtenção das demais proteínas recombinantes envolvidas neste projeto,

realizamos estudos dose-resposta com IPTG (Eppendorf), cinética de tempo e temperatura de indução.

Tabela 3. Sumário dos plasmídios recombinantes contendo os genes correspondentes às subfamílias VIR, AMA-1 e MSP1₁₉ de *P. vivax* utilizados neste estudo.

Gene	Vetor de origem	Vetor de expressão	Seqüências adicionais	Clones estudados
Subfamília <i>vir A</i>	pGEM	pGEX-3X	GST (N-term)	A4
Subfamília <i>vir B</i>	pGEM	pGEX-3X	GST (N-term)	B10
Subfamília <i>vir C</i>	pGEM	pGEX-3X	GST (N-term)	C1/C2/C16
Subfamília <i>vir E</i>	pGEM	pGEX-3X	GST (N-term)	E5/E8
<i>ama-1</i>	pMOS	pET-22b	His ₆ (N-term)	<i>clone 9</i>
<i>mSP1₁₉</i> *	pGEX-ICB10	pET-14b pGEX-3X	His ₆ (N-term) GST (N-term)	-

* Os plasmídios recombinantes contendo o gene correspondente a MSP1₁₉ já estavam disponíveis: pGEX-GST-MSP1₁₉ (SOARES *et al.*, 1999c) e pET-14b-His₆-MSP1₁₉ (CUNHA *et al.*, 2001).

4.1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes VIR em fusão com GST.

As bactérias recombinantes foram cultivadas em meio LB-amp (100 µg/ml) por 16 horas a 37°C, sob agitação. A seguir, a cultura foi diluída (1:50) em novo meio LB-amp e incubada a 37°C até atingir uma absorbância (ABS₆₀₀) de 1.0. As bactérias foram induzidas pela adição de 2 mM IPTG por 16 horas a 18°C, com exceção do clone VIR-C16 que foi induzido com 0,1 mM de IPTG. Após este período, as bactérias foram centrifugadas (5.000 rpm/30 min/4°C) e o precipitado ressuspenso em tampão de lise, seguido

de incubação no gelo por 15 min. Em seguida, adicionamos 1% Triton X-100 e as bactérias foram lisadas em banho de gelo por sonicação com auxílio de um sonicador (Branson Sonifier mod.450, EUA) sob a condição de 5 ciclos de 30 segundos cada.

A suspensão bacteriana foi centrifugada (5.000 rpm/30 min/4°C) por 2 vezes e o sobrenadante contendo a proteína solúvel foi aplicado em resina de glutathiona (Amersham Biosciences) previamente equilibrada com o mesmo tampão descrito acima. Após incubação a resina foi lavada 6 vezes sendo cada lavagem com 25 vol de PBS. As proteínas foram eluídas pela adição de uma solução contendo 20 mM de glutathiona reduzida (Sigma), após 40 min de incubação, sob agitação. Após centrifugação a 2.500 rpm por 3 min, o sobrenadante foi coletado e o processo repetido por mais 4x com incubações de 15 min. As frações eluídas foram analisadas em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE 12%) e, posteriormente dialisadas contra PBS contendo 1 mM PMSF durante a noite, a 4°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de BRADFORD (1976).

4.2. Expressão e purificação da proteína recombinante AMA-1 em fusão com His₆.

A expressão e purificação da proteína recombinante His₆-AMA-1 a partir de *E. coli* foi realizada conforme descrevemos recentemente (RODRIGUES *et al.*, 2005). As bactérias recombinantes (BL21, DE3) foram cultivadas em meio LB-amp por 16 horas a 37°C. A seguir, a cultura foi diluída (1:50) em LB-amp e incubada a 37°C até atingir uma absorbância (ABS₆₀₀) entre 0,4-0,6. Para a indução, foi acrescentado 0,1 mM IPTG, por 3 horas. Após este período, as células foram precipitadas por centrifugação (8.000 rpm/15 min/4°C) e ressuspensas em tampão de lise. As bactérias foram lisadas em banho de gelo por sonicação (3 ciclos de 30 segundos). O extrato bacteriano foi centrifugado (10.000 rpm/30 min/4°C) e as frações obtidas (precipitado e sobrenadante) foram analisadas por separação eletroforética em SDS-PAGE a 12% utilizando equipamento "Mini

PROTEAN[®] 3 cell" (Bio-Rad, EUA), em condição redutora, na presença de 2-ME e corado por azul de Coomassie.

O precipitado contendo a proteína foi lavado por 2 vezes em tampão de lavagem e ressuspendido em tampão de solubilização seguido de incubação por 2 horas, a 37°C sob agitação. Em seguida o material foi centrifugado como anteriormente e a eficiência da solubilização analisada em SDS-PAGE a 12%.

A proteína denaturada foi aplicada em resina de níquel (Ni^{+2} -NTA, Quiagen) ou de cobalto Talon (BD Biosciences) previamente equilibrada com tampão de equilíbrio. Em seguida a resina foi lavada com o mesmo tampão acima acrescido de 20 mM Imidazol e posteriormente, lavada com o tampão de "refolding" constituído de concentrações decrescentes de uréia (6 a 1 M). As proteínas que se ligaram à coluna foram eluídas em tampão de "refolding" sem a presença do agente denaturante, porém com 250 mM Imidazol. O material eluído foi analisado em SDS-PAGE a 12% e dialisado contra tampão de diálise durante a noite, sob agitação, a 4°C.

5. Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos humanos.

5.1. Detecção de anticorpos IgG por ELISA.

A detecção de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉, anti-AMA-1 e anti-VIR foi feita por ELISA conforme descrito por SOARES *et al.* (1997) e RODRIGUES *et al.* (2005), com algumas modificações. A concentração das proteínas recombinantes e GST foi ajustada para 2 µg/ml em tampão carbonato 0,05 M pH 9,6. Em seguida, foram adicionados 50 µl por poço a microplacas de ELISA (High binding, Costar). Após incubação durante a noite a temperatura ambiente (t.a), as placas foram lavadas com PBS-Tween e incubadas em solução de bloqueio, por 2 horas a 37°C. Inicialmente as amostras (soro ou plasma) foram diluídas 1:100 na solução de bloqueio seguido da adição de 10% de extrato de *E. coli* para adsorção dos anticorpos inespecíficos e posterior incubação por 1 hora. Em seguida, 50 µl de cada amostra foram

adicionados por poço em duplicata e, incubadas durante 2 horas à t.a. Após lavagem das placas, uma outra incubação foi realizada por 1 hora com 50 µl por poço de uma solução contendo IgG de cabra anti-IgG humano conjugado a peroxidase (específico para a porção Fc da IgG, Sigma) diluído 1:16.000 em solução de bloqueio. A reação enzimática foi revelada pela adição de solução contendo OPD como descrito no item 2.3. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µl de uma solução contendo H₂SO₄ 4N. A ABS foi determinada em um leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA) usando comprimento de onda de 492 nm (ABS₄₉₂).

Os valores individuais de ABS₄₉₂ obtidos contra as proteínas recombinantes VIR foram subtraídos dos valores individuais de ABS₄₉₂ obtidos contra GST. A absorbância discriminante entre os resultados positivos e negativos ("cutoff") foi estabelecida pela média das absorbâncias produzidas por amostras de 15 indivíduos sem história clínica de malária, acrescida de três desvios padrões. O índice de reatividade (IR) foi calculado dividindo-se a média da absorbância de cada amostra pelo valor do "cutoff", sendo os soros com IR ≥ 1, considerados positivos.

5.2. Detecção de anticorpos específicos das subclasses de IgG.

O ELISA foi realizado como descrito no item anterior, exceto que: i) as amostras (soro ou plasma) foram diluídas 1:25 na solução de bloqueio; ii) os anticorpos secundários foram anticorpos monoclonais de camundongos específicos para as diferentes subclasses de IgG humana (Sigma). Os monoclonais anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 ou anti-IgG4 foram diluídos, respectivamente, 1:3.000, 1:1.000, 1:1.000 e 1:500 em solução de bloqueio, conforme estabelecido previamente. Após 1 hora de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes e incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5.000. A revelação foi feita como descrita no item acima e os "cutoff" foram estabelecidos através da média das absorbâncias produzidas por amostras

de soros de 20 indivíduos sem história clínica de malária, acrescidos de 3 desvios padrões.

5.3. Detecção de anticorpos IgM por ELISA.

A detecção de anticorpos IgM foi feita conforme descrito acima no item 5.1 com algumas modificações: i) o anticorpo secundário foi um anticorpo monoclonal de camundongo específico para IgM (específico para a cadeia μ , Sigma) diluído 1:10.000 em solução de bloqueio, ii) após novas lavagens as placas foram incubadas novamente com anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:5.000. A revelação foi realizada como descrito no item 5.1 e os valores individuais de ABS_{492} obtidos contra as proteínas recombinantes VIR foram subtraídos dos valores individuais de ABS_{492} obtidos contra GST. A absorbância discriminante entre os resultados positivos e negativos ("cutoff") foi estabelecida pela média das absorbâncias produzidas por amostras de 17 indivíduos sem história clínica de malária, acrescida de três desvios padrões sendo qualquer valor acima considerado positivo.

6. Ensaios de proliferação linfoblástica para análise da resposta imune celular humana contra as proteínas VIR.

6.1. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico.

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) usadas nos ensaios de proliferação celular foram separadas por gradiente de densidade de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) por centrifugação. O sangue heparinizado foi diluído 1:2 em PBS e adicionado lentamente sobre a solução de Ficoll-Paque na proporção de 1:2,5. Os tubos foram centrifugados a 2.500 rpm por 20 min a t.a. O plasma foi coletado e estocado a -20°C para serem usados em ensaios sorológicos. O anel de células mononucleares, formado na interface entre o plasma e o Ficoll-Paque, foi removido com uma pipeta Pasteur e transferido para tubos de plásticos de 15 ml. As células foram lavadas 3 vezes em PBS a 2.000 rpm por 5 min a

t.a e, ao final, ressuspensas em 1 ml de meio RPMI completo. A viabilidade das células foi avaliada pela exclusão do corante azul de Trypan (Invitrogen) na diluição 1:10. A concentração de células foi estimada em câmara de Neubauer e ajustada para 1×10^6 /ml em meio RPMI completo.

6.2. Ensaio de proliferação celular através da incorporação de [³H-methyl]- timidina ([³H]-TdR).

As células foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato (Corning) na concentração de 1×10^6 /ml em um volume final de 200 μ l na presença dos antígenos recombinantes: VIR-A4, VIR-B10, VIR-C1, VIR-E5, GST e His₆-MSP1₁₉ nas concentrações finais de 10,0 e 2,0 μ g/ml. Como controle positivo, as células foram estimuladas com 25 μ g/ml do mitógeno ConA (Sigma). As culturas foram mantidas a 37°C, sob atmosfera contendo 5% de CO₂ durante 6 dias, com exceção das placas controles (ConA) que foram estimuladas por 3 dias. Dezoito horas antes da coleta das células em membrana de fibra de vidro (Perkin Elmer), foi adicionado 1 μ Ci de ³H-TdR (Amersham Biosciences) em cada cavidade. A radioatividade incorporada foi medida em um β -cintilador utilizando líquido de cintilação (Wallac). Os resultados foram expressos como índice de estimulação (IE) calculado pela média das triplicatas em contagens por minuto (cpm) das culturas estimuladas pelas proteínas recombinantes VIR, dividida pela média das triplicatas em cpm das culturas estimuladas com GST. As culturas estimuladas com a MSP1₁₉ e ConA tiveram o IE calculado através da média das triplicatas em cpm das culturas contendo o antígeno ou o mitógeno respectivamente, dividido pela média das triplicatas em cpm das culturas sem antígeno. Indivíduos foram considerados como respondedores quando apresentavam IE > 2,5 em uma das duas concentrações.

7. Imunização de camundongos com as proteínas recombinantes VIR e análise da reatividade cruzada entre os anticorpos contra as diferentes subfamílias VIR.

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa nº 15) aprovou este estudo que se apresenta de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

7.1. Esquema de imunização de camundongos para obtenção de soros policlonais anti-VIR.

Grupos de 3 a 4 camundongos, fêmeas, da linhagem BALB/c foram imunizados na base da cauda, por via subcutânea (s.c), com 5 µg de cada uma das proteínas recombinantes VIR ou GST emulsificadas em Adjuvante Completo de Freund (ACF). Um dos grupos de animais foi imunizado com a proteína GST-MSP1₁₉ como controle. Após 3 semanas, os animais receberam um reforço com 5 µg da mesma proteína emulsificada em Adjuvante Incompleto de Freund (AIF), injetado s.c. na base da cauda. Dez dias após a primeira e segunda dose, os animais foram sangrados pela veia caudal. O sangue foi centrifugado, o soro separado e estocado a -20°C até o momento do uso.

7.2. Detecção de anticorpos IgG após imunização de camundongos com as proteínas recombinantes VIR por ELISA.

A detecção de anticorpos IgG anti-VIR e anti-MSP1₁₉ nos soros dos camundongos imunizados foi realizada por ELISA essencialmente como descrito no item 5.1 para IgG humana, introduzindo-se as seguintes modificações: i) 2,5% BSA foi adicionado a solução de bloqueio; ii) os soros de camundongos foram previamente incubados com a proteína recombinante GST solúvel na concentração de 50 µg/ml por 1 hora antes de serem adicionados às placas, com o intuito de bloquearmos os anticorpos anti-GST e detectarmos somente os anticorpos anti-VIR; em seguida, os

soros foram adicionados às placas e uma nova incubação foi realizada por mais 1 hora a t.a; iii) o anticorpo secundário conjugado a peroxidase foi IgG de cabra anti-IgG de camundongo diluído 1:5.000. Os soros obtidos após a primeira e a segunda dose foram analisados em diluições seriadas (de 1:200 a 1:102.400). O título individual foi determinado como sendo a maior diluição do soro que apresentava ABS_{492} maior do que 0,1. Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos em $\log_{10} \pm$ desvio padrão (dp).

Para a análise da reatividade cruzada foi feito um “pool” com os soros dos animais de cada grupo imunizado. Os resultados foram expressos das seguintes formas: (i) títulos de anticorpos em $\log_{10} \pm$ dp, (ii) ABS_{492} na diluição 1:6.400, a qual foi selecionada por melhor discriminar a especificidade dos soros policlonais gerados.

8. Ensaios de proliferação linfoblástica para a análise da imunidade celular de camundongos após imunização com as diferentes proteínas recombinantes VIR.

8.1. Esquema de imunização de camundongos para obtenção de células dos nódulos linfáticos.

Camundongos BALB/c foram imunizados com uma dose de 10 μ g das proteínas recombinantes VIR, His₆-MSP1₁₉ ou GST emulsificadas em ACF, por via subcutânea na base da pata. Os grupos de animais controles foram constituídos por camundongos imunizados com a proteína His₆-MSP1₁₉ e PBS. Após 14 dias da imunização os camundongos foram sacrificados e os linfonodos poplíteos e inguinais foram isolados e homogeneizados em meio RPMI para liberação das células mononucleares. Restos celulares foram removidos após sedimentação espontânea por 10 min a t.a. Após 3 lavagens em meio RPMI a 1.700 rpm por 5 min a t.a, as células foram ressuspensas em 1 ml de meio RPMI completo e a viabilidade avaliada utilizando azul de Trypan na diluição 1:10. A concentração de células foi estimada por câmara de Neubauer e ajustada para $1,25 \times 10^6$ /ml de meio completo.

8.2. Ensaio de proliferação celular através da incorporação de [³H-methyl]- timidina ([³H]-TdR).

Células viáveis dos nódulos linfáticos foram cultivadas em placas de 96 cavidades de fundo chato em triplicata na concentração de $2,5 \times 10^6$ em 200 μ l de RPMI completo na presença de cada uma das seis proteínas recombinantes correspondentes às subfamílias VIR (exceto VIR-C2), além das proteínas GST e His₆-MSP1₁₉ na concentração final de 2,0 μ g/ml. Células estimuladas com ConA na concentração de 2,0 μ g/ml foram utilizadas como controle positivo do ensaio. As culturas foram mantidas por 4 dias a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂, com exceção da placa controle que foi estimulada por 3 dias. Aproximadamente 18 horas antes da coleta das células, as mesmas foram pulsadas com 1 μ Ci de ³H-TdR em cada cavidade. A incorporação de ³H-TdR foi estimada como descrito no item 6.2. Os resultados foram expressos como IE, calculado pela média das triplicatas em cpm das culturas estimuladas pelas proteínas recombinantes VIR, dividida pela média das triplicatas em cpm das culturas estimuladas com GST. As culturas estimuladas com ConA, GST e MSP1₁₉, tiveram o IE calculado através da média das triplicatas em cpm das culturas contendo o antígeno, dividido pela média das triplicatas em cpm das culturas não estimuladas.

9. Análise estatística

As frequências de respondedores obtidas nos ensaios sorológicos e de proliferação celular foram comparadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2) em tabelas de contigência (2x2), com correção de Yates (GraphPad Prism 4.0). Os valores dos índices de reatividade dos anticorpos específicos contra as diferentes proteínas recombinantes foram comparados pelo teste estatístico Mann-Whitney (GraphPad Prism versão 4.0). Os valores dos títulos de anticorpos ($\log_{10}$) dos diferentes grupos de camundongos imunizados foram comparados pelo teste estatístico ANOVA. (VassarStats, <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>), sendo considerados significativos valores de $P < 0,05$.

IV. RESULTADOS

1. Construção dos plasmídios recombinantes.

1.1. Obtenção dos plasmídios recombinantes correspondentes ao exon 2 das subfamílias *vir* em vetores para expressão em *E. coli*.

Inicialmente, o nosso objetivo foi gerar pelo menos dois plasmídios recombinantes correspondentes a cada uma das subfamílias (A-E) em fusão com a GST, sendo que alguns plasmídios (clones A4, C2 e E5) já estavam disponíveis no laboratório do Dr. Hernando del Portillo (Departamento de Parasitologia – ICB-USP), onde esta etapa do projeto foi desenvolvida.

As seqüências de nucleotídeos correspondentes ao exon 2 das respectivas subfamílias foram obtidas previamente por amplificação (RT-PCR) do cDNA a partir do RNAm extraído de um isolado natural de *P. vivax* coletado na área endêmica de Rondônia. Os produtos do RT-PCR foram clonados inicialmente no vetor pGEM para análise da seqüência do DNA e, posteriormente, os insertos foram removidos por digestão com as enzimas de restrição apropriadas e inseridos nos vetores de expressão pGEX-3X (ou pGEX-4T) em fusão com GST. Diversos plasmídios recombinantes correspondentes a cada uma das subfamílias foram gerados, entretanto, apenas cinco destes foram capazes de expressar as respectivas proteínas de fusão, após indução com IPTG: *vir-b10*, *vir-c1*, *vir-c16*, *vir-d1* e *vir-e8*. Após sequenciamento do DNA, o plasmídio recombinante correspondente à subfamília *vir-d* foi excluído deste estudo, pois a análise da seqüência de nucleotídeos revelou que este pertencia à subfamília *vir-e*. Desta forma, este estudo foi limitado à expressão e purificação das proteínas correspondentes as seguintes subfamílias: VIR-A (clone A4), VIR-B (clone B10), VIR-C (clones C1, C2 e C16) e VIR-E (clones E5 e E8).

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

A seqüência de nucleotídeos correspondente aos aminoácidos 43 a 487 de AMA-1 foi obtida por PCR a partir do DNA genômico de um paciente infectado por *P. vivax* procedente de Belém, Pará. O produto desta

amplificação por PCR foi inicialmente inserido no vetor pMOS para sequenciamento do DNA e, posteriormente, subclonado no vetor de expressão pHIS (pET-22b) para expressão das proteínas recombinantes em fusão com His₆ a partir de *E. coli*.

2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.

2.1. Estabelecimento das condições de expressão e purificação das proteínas recombinantes VIR.

Os plasmídios recombinantes foram transformados em bactérias *E. coli* da linhagem BL21(DE3) e os clones obtidos foram expandidos e induzidos com IPTG para expressão das proteínas recombinantes correspondentes, inicialmente em pequena escala. Após lise da cultura bacteriana e obtenção das frações protéicas (sobrenadantes e precipitados), estas foram submetidas à SDS-PAGE 12% e coloração por azul de Coomassie. Todas as proteínas recombinantes foram detectadas nos precipitados dos extratos bacterianos caracterizando a formação de corpos de inclusão com massas moleculares aproximadas de: VIR-A4 – 42 kDa, VIR-B10 – 47 kDa, VIR-C1 e VIR-C2 – 52 kDa, VIR-C16 – 54 kDa, VIR-E5 e VIR-E8 – 59 kDa (Figura 1A e B).

A fim de obter as proteínas recombinantes VIR em condições apropriadas para os estudos imunológicos trabalhamos intensivamente na tentativa de obter pelo menos parte destas, sob forma solúvel. Como descrito no item Materiais e Métodos, as condições de obtenção dos diferentes recombinantes VIR foram estabelecidas através da indução em baixas temperaturas (18°C) e utilização de altas concentrações de IPTG (0,1-2,0 mM). Utilizando esta estratégia, fomos capazes de estabelecer as condições de expressão e purificação em larga escala de todos os recombinantes VIR a partir dos sobrenadantes dos extratos bacterianos. Em seguida, as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando resina contendo glutathiona. Nas condições de expressão e purificação estabelecidas, o rendimento final das proteínas

recombinantes solúveis sempre foi muito baixo e variou entre 0,1 – 0,25 mg/L de cultura, uma vez que a maior parte da proteína produzida permanecia sob forma de corpos de inclusão. A expressão das proteínas VIR sob forma solúvel foi confirmada por “immunoblotting” utilizando soro policlonal de camundongo anti-GST (dados não mostrados). A Figura 1C mostra o padrão de migração em SDS-PAGE 12% de todas as proteínas recombinantes VIR após purificação por cromatografia de afinidade.

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

A proteína recombinante His₆-AMA-1 expressa a partir de *E. coli* foi produzida em nosso laboratório conforme estabelecido recentemente por RODRIGUES *et al.* (2005). As etapas de expressão, solubilização, “refolding” e purificação da proteína AMA-1 foram realizadas como descrito em Materiais e Métodos. A Figura 2 apresenta as diferentes etapas do processamento do precipitado bacteriano até a solubilização da proteína recombinante a partir dos corpos de inclusão. Durante a etapa de purificação na resina foi feito “refolding” parcial, caracterizado pela retirada decrescente de uréia da amostra seguindo, ao final do processo, por diálise contra uma solução contendo 50% glicerol para que fosse evitada a agregação da proteína purificada. Mesmo utilizando esta estratégia parte da proteína agrega e necessita ser removida por centrifugação (dados não mostrados).

Figura 1. Etapas de purificação das proteínas recombinantes VIR produzidas a partir de *E. coli*. A. Após indução com IPTG, precipitados e sobrenadantes obtidos após lise bacteriana foram submetidos à SDS-PAGE 12% e corados com azul de Coomassie. 1-2. VIR-A4, 3-4. VIR-B10, 5-6. VIR-C1, 7-8. VIR-C2, B. 9-10. VIR-C16, 11-12. VIR-E5, 13-14. VIR-E8. C. Perfil de migração das proteínas recombinantes VIR purificadas por cromatografia de afinidade, em resina contendo glutathiona. 1. GST, 2. VIR-A4, 3. VIR-B10, 4. VIR-C1, 5. VIR-C2, 6. VIR-C16, 7. VIR-E5, 8. VIR-E8.

Figura 2. Análise em SDS-PAGE 12% das etapas de purificação da proteína AMA-1. A. Diferentes etapas do processamento do precipitado bacteriano até a solubilização da proteína: 1. extrato total, 2. sobrenadante após sonicação, 3. sobrenadante da 1ª lavagem, 4. sobrenadante da 2ª lavagem, 5. sobrenadante do precipitado solubilizado, 6. precipitado pós-solubilização. **B.** perfil de migração da proteína recombinante purificada.

3. Avaliação comparativa do reconhecimento das proteínas recombinantes VIR, AMA-1 e MSP1₁₉ por anticorpos IgG.

Com a finalidade de avaliarmos comparativamente o reconhecimento imune das proteínas recombinantes VIR, AMA-1 e MSP1₁₉ por anticorpos IgG, um total de 200 amostras de soros coletadas de indivíduos durante a infecção patente por *P. vivax*, procedentes de diferentes áreas endêmicas do Estados do Pará e Rondônia foram analisadas por ELISA.

Como demonstrado na Figura 3A a frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos contra cada uma das proteínas recombinantes testadas foi de: VIR-A4=11,0%, VIR-B10=11,0%, VIR-C1=11,5%, VIR-C2=17,5%, VIR-C16=2,0%, VIR-E5=10,0%, VIR-E8=2,5%, AMA-1=57,0% e MSP1₁₉=90,5%. A análise estatística revelou que a proporção de indivíduos respondedores para as proteínas recombinantes VIR foi significativamente menor do que as proporções obtidas para AMA-1 e MSP1₁₉ ($P<0,05$, em ambos os casos). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa nas proporções de indivíduos que reconheceram as diferentes proteínas recombinantes VIR ($P>0,05$). A proporção de indivíduos respondedores para a MSP1₁₉ foi significativamente maior do que a de indivíduos respondedores para AMA-1 ($P<0,05$).

Quando comparamos a frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra pelo menos uma das proteínas recombinantes representando cada subfamília VIR (A, B, C ou E), observamos que a subfamília C foi a mais antigênica sendo reconhecida por 22,5% dos soros testados quando comparada com as demais subfamílias ($P<0,05$, Figura 3B).

A Figura 4 apresenta os valores individuais de níveis de anticorpos IgG contra as diferentes proteínas recombinantes, expressos como Índice de Reatividade (IR). Podemos observar que os IRs obtidos para as proteínas recombinantes AMA-1 e MSP1₁₉ foram significativamente maiores do que os obtidos para as proteínas VIR ($P<0,001$). Os valores de IR obtidos para a proteína MSP1₁₉ foram significativamente maiores do que os obtidos para AMA-1 ($P<0,001$). Quando comparamos os valores de IR entre as proteínas

VIR, observamos que a proteína VIR-C2 apresentou os maiores valores quando comparada com as demais subfamílias ($P<0,001$), exceto quando comparada com as proteínas recombinantes VIR-A4 e B10 ($P>0,05$). Por outro lado, os valores de IR para as proteínas VIR-C16 e VIR-E8 foram estatisticamente mais baixos quando comparados aos obtidos para as demais proteínas VIR ($P<0,001$). Um sumário destes dados encontra-se apresentado na Tabela 4.

4. Avaliação comparativa do reconhecimento das proteínas recombinantes correspondentes as subfamílias VIR por anticorpos do tipo IgM.

As baixas frequências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG anti-VIR poderiam ser explicadas por um atraso no “switch” de resposta de anticorpos IgM para IgG. Para responder esta questão, analisamos por ELISA, as mesmas amostras de soros quanto à presença de anticorpos IgM VIR-específicos.

Nossos resultados demonstram que as frequências de indivíduos respondedores para cada uma das proteínas recombinantes VIR foram de: VIR-A4=18,1%, VIR-B10=9,0%, VIR-C1=6,0%, VIR-C2=11,1%, VIR-C16=15,1%, VIR-E5=13,1% e VIR-E8=15,1% (Figura 5A). Da mesma forma como observado em relação às respostas de anticorpos IgG anti-VIR, as proporções de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM contra cada proteína recombinante VIR foram igualmente baixas, não havendo um predomínio significativo de resposta para nenhuma das proteínas VIR.

Quando comparamos as respostas de anticorpos IgM contra pelo menos uma das proteínas recombinantes representando cada subfamília VIR (A, B, C e E), observamos que a proteína correspondente a subfamília B (VIR-B10) foi reconhecida por uma fração significativamente menor de indivíduos (9,0%) em relação às demais subfamílias ($P<0,05$). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa na proporção de soros que reconhecem as proteínas VIR-A, VIR-C e VIR-E (18,1%, 18,6% e 17,6%, respectivamente) ($P>0,05$) (Figura 5B).

Figura 3. Análise comparativa da reatividade de soros de indivíduos com malária patente por *P. vivax* contra as diferentes proteínas recombinantes VIR, AMA-1 e MSP1₁₉. Soros de 200 indivíduos foram analisados quanto à presença de anticorpos IgG específicos por ELISA. Os soros foram testados na diluição de 1:100, em duplicata. **A.** Frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra cada uma das proteínas recombinantes correspondentes as diferentes subfamílias VIR. **B.** Frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra pelo menos uma das proteínas recombinantes representando cada subfamília VIR.

Figura 4. Análise comparativa dos valores individuais dos níveis de anticorpos IgG presente nas amostras de soros de indivíduos com infecção patente contra as diferentes proteínas recombinantes. A linha tracejada indica o limite de positividade (IR=1). IR= Índice de reatividade (média da absorbância do soro testado/"cutoff").

Figura 5. Prevalência de anticorpos IgM contra as proteínas recombinantes correspondentes as subfamílias VIR. Amostras de soro de 199 indivíduos com infecção patente por *P. vivax* foram analisadas por ELISA quanto a presença de anticorpos IgM específicos. Todas as amostras foram testadas na diluição 1:100, em duplicata. **A.** Frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM contra cada uma das proteínas recombinantes correspondentes as diferentes subfamílias VIR. **B.** Frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM contra pelo menos uma das proteínas recombinantes representando cada subfamília.

Como observado na Figura 6 e Tabela 4, as análises dos níveis de anticorpos IgM VIR-específicos expressos como IR revelaram que os valores de IR obtidos para a proteína VIR-E5 foram significativamente maiores do que os valores obtidos para as demais subfamílias, exceto quando comparados com as proteínas VIR-A4 e VIR-E8 ($P<0,05$). Por outro lado, os valores de IR obtidos para a proteína VIR-B10 foram significativamente mais baixos quando comparados com os valores obtidos para as demais proteínas VIR ($P<0,0001$).

Figura 6. Comparação dos valores individuais de IR de anticorpos IgM anti-VIR detectados nos soros de 199 indivíduos com malária vivax. A linha tracejada indica o limite de positividade (IR=1). IR= Índice de reatividade (média da absorbância do soro testado/"cutoff").

Tabela 4. Frequências de respondedores e Índices de Reatividade (IR) (em mediana) de anticorpos IgG e IgM dos soros de indivíduos infectados por *P. vivax* contra as diferentes proteínas recombinantes

Proteínas recombinantes									
	VIR-A4	VIR-B10	VIR-C1	VIR-C2	VIR-C16	VIR-E5	VIR-E8	AMA-1	MSP1 ₁₋₁₉
No. de amostras positivas para IgG (%)	22 (11,0)	22 (11,0)	23 (11,5)	35 (17,5)	4 (2,0)	20 (10,0)	5 (2,5)	114 (57,0)	181 (90,5)
IR	0,33	0,35	0,28	0,40	0,23	0,29	0,17	1,22	10,9

Proteínas recombinantes						
	VIR-A4	VIR-B10	VIR-C1	VIR-C2	VIR-C16	VIR-E8
No. de amostras positivas para IgM (%)	36 (18,1)	18 (9,0)	12 (6,0)	22 (11,1)	30 (15,1)	26 (13,1)
IR	0,55	0,04	0,39	0,45	0,51	0,61
						0,55

5. Análise simultânea das respostas de anticorpos IgM e IgG contra as proteínas recombinantes correspondentes às subfamílias VIR.

As proteínas recombinantes VIR foram analisadas comparativamente em relação ao reconhecimento imune por anticorpos IgM e IgG utilizando-se os dados apresentados nas Figuras 3 e 5. Verificamos que a proporção de respondedores que apresentaram anticorpos IgM foi significativamente maior para as proteínas VIR-C16 e VIR-E8 do que a frequência de respondedores que apresentaram anticorpos IgG para as mesmas proteínas ($P < 0,05$). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na frequência de respondedores analisados quanto à presença destes isotipos para as demais subfamílias VIR ($P > 0,05$) (Figura 7A).

A Figura 7B apresenta a comparação da análise da prevalência de anticorpos IgM e IgG dos indivíduos testados contra pelo menos um dos clones de cada subfamília. Observamos que não houve diferença significativa na prevalência desses tipos de anticorpos, o que sugere que essas proteínas induzem uma similar participação destes isotipos na resposta imune ($P > 0,05$).

Quando analisamos estes dados com relação à procedência dos indivíduos, observamos que a maior frequência entre os indivíduos que apresentaram anticorpos IgG foi obtida entre os procedentes do município de Tailândia (55,0%) e a menor foi no município de São Jorge (12,5%) (Tabela 5). Por outro lado, em relação às proporções de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM, a maior frequência de respondedores foi observada entre os indivíduos procedentes de Rondônia que foi de 38,1% e a menor frequência foi observada entre as amostras do município de Tailândia, cuja positividade foi de 20,0% (Tabela 6).

A fim de complementar estes estudos, analisamos as respostas de anticorpos IgG e IgM em relação às demais informações disponíveis de cada uma das populações: sexo, idade e número de episódios prévios de malária que estão contidas na Tabela 2 do item Materiais e Métodos. Entretanto, observamos que não existe correlação entre presença de anticorpos IgG e IgM com sexo e idade (dados não mostrados). Os resultados com relação ao

número de episódios prévios de malária estão apresentados no item 6, a seguir.

Tabela 5. Frequência de indivíduos que apresentam anticorpos IgG anti-VIR de acordo com a procedência das amostras analisadas.

Área de estudo	Número de indivíduos	Número de amostras positivas (%)				
		VIR A4	VIR B10	VIR C	VIR E	Total
Belém	64	4 (6,3)	6 (9,4)	18 (28,1)	6 (9,4)	20 (31,3)
Marabá	21	5 (23,8)	5 (23,8)	4 (19,0)	5 (23,8)	6 (28,0)
Itaituba	20	3 (15,0)	1 (5,0)	3 (15,0)	3 (15,0)	5 (25,0)
Tailândia	20	6 (30,0)	6 (30,0)	11 (55,0)	2 (10,0)	11 (55,0)
São Jorge	32	4 (12,5)	4 (12,5)	4 (12,5)	4 (12,5)	4 (12,5)
Porto Velho	43	0	0	5 (11,6)	1 (2,3)	6 (14,0)
TOTAL	200	22 (11,0)	22 (11,0)	45 (22,5)	21 (10,5)	52 (26,0)

Figura 7. Análise da reatividade de soros de indivíduos com malária patente contra as proteínas recombinantes VIR. Amostras de soro de 199 indivíduos com infecção patente por *P. vivax* foram analisadas por ELISA quanto a presença de anticorpos IgM e IgG. **A.** Frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos (IgM ou IgG) específicos contra cada uma das proteínas recombinantes correspondentes às diferentes subfamílias VIR. **B.** Frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos específicos que reconhecem pelo menos uma das proteínas recombinantes representando cada subfamília.

Tabela 6. Frequência de indivíduos que apresentam anticorpos IgM anti-VIR de acordo com a procedência das amostras analisadas.

Área de estudo	Número de indivíduos	Número de amostras positivas (%)				
		VIR A4	VIR B10	VIR C	VIR E	Total
Belém	64	7 (10,9)	6 (9,4)	5 (7,8)	8 (12,5)	13 (20,3)
Marabá	21	7 (33,3)	1 (4,8)	5 (23,8)	0	7 (33,3)
Itaituba	20	4 (20,0)	4 (20,0)	4 (20,0)	6 (30,0)	7 (35,0)
Tailândia	20	3 (15,0)	4 (20,0)	1 (5,0)	4 (20,0)	4 (20,0)
São Jorge	32	6 (18,8)	3 (9,4)	10 (31,3)	7 (21,9)	12 (37,5)
Porto Velho	42	9 (21,4)	0	12 (28,6)	10 (23,8)	16 (38,1)
TOTAL	199	36 (18,1)	18 (9,0)	37 (18,6)	35 (17,6)	59 (29,6)

6. Análise do efeito do número de episódios prévios de malária na resposta por anticorpos contra as proteínas recombinantes correspondentes as subfamílias VIR, AMA-1 e MSP1₁₉.

Com o objetivo de avaliar um possível efeito “boost” resultante da exposição aos antígenos de formas sanguíneas de *P. vivax*, analisamos as frequências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG e IgM contra as diferentes subfamílias VIR, AMA-1 e MSP1₁₉ em relação ao número de episódios prévios de malária. Desta forma, 186 indivíduos que informaram o número de episódios prévios de malária foram divididos em 3 grupos: i) primoinfectados (n=97), ii) indivíduos que tiveram de 1 ou 2 episódios prévios (n=36) e iii) indivíduos que tiveram 3 ou mais episódios prévios de malária (n=53). Não foi possível formar grupos de indivíduos com mais de 10 malárias, pois o número destes seria muito pequeno.

Como podemos observar na Figura 8 (A e B), as frequências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG para cada uma das proteínas

recombinantes VIR não aumentam de acordo com o número de exposições prévias ao *P. vivax* ($P>0,05$). Por outro lado, em relação à AMA-1, observamos uma diferença estatisticamente significativa quando comparamos os grupos de indivíduos primoinfectados com o grupo de indivíduos que apresentavam de 1 a 2 episódios de malária e indivíduos com mais de 3 episódios da doença ($P<0,05$). A diferença entre as proporções de indivíduos respondedores que compõem os grupos de 1 a 2 ou mais de 3 episódios de malária não foi estatisticamente significativa ($P>0,05$). Para a proteína MSP1₁₉ a resposta imune de anticorpos IgG desenvolve-se rapidamente após uma primeira exposição, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos estudados ($P>0,05$). O mesmo tipo de análise foi feito em relação às respostas de anticorpos IgM específicos para as proteínas VIR. Como pode ser observada na Figura 9 (A e B), a proporção de indivíduos respondedores se mantém com o maior número de exposições à malária, padrão este que corresponde a um perfil de resposta primária a cada novo contato com o parasita.

Figura 8. Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes VIR, AMA-1 e MSP1₁₉. Das 200 amostras de soros analisadas na Figura 3, 186 indivíduos que informaram o número de episódios prévios de malária foram divididos em três grupos de acordo como indicado na legenda da figura. **A.** Frequências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG para cada proteína recombinante VIR, AMA-1 e MSP1₁₉ de acordo com o número de episódios prévios de malária. **B.** Frequências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra pelo menos uma das proteínas recombinantes representando cada subfamília VIR bem como AMA-1 e MSP1₁₉ de acordo com o número de episódios prévios de malária.

Figura 9. Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgM contra as proteínas recombinantes VIR. Dos indivíduos com infecção patente por *P. vivax* analisados na Figura 4, cento e oitenta e seis que informaram o número de episódios prévios de malária foram divididos em três grupos. **A.** Frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM para cada proteína recombinante VIR de acordo com o número de episódios prévios de malária. **B.** Frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM contra pelo menos uma das proteínas recombinantes representando cada subfamília VIR de acordo com o número de episódios prévios de malária.

7. Detecção das subclasses de anticorpos IgG específicos durante infecção patente.

Para avaliar a subclasse de IgG produzida contra os antígenos VIR e, conseqüentemente, poder determinar a função biológica destes anticorpos, analisamos as subclasses de IgG das amostras de soros positivos. Os resultados mostram que apenas a proteína VIR-C2 foi reconhecida predominantemente por uma das subclasses de IgG. Os dados da Figura 10A mostram que 41,2% dos soros testados apresentam anticorpos da subclasse IgG1 que reconhecem esta proteína. Em relação às respostas contra as demais proteínas VIR, não houve predomínio de nenhuma das subclasses de anticorpos IgG. Quando comparamos as proporções de respondedores contra pelo menos uma das proteínas recombinantes representando cada subfamília (A, B, C ou E), foi observado que a subfamília C foi predominantemente reconhecida por anticorpos da subclasse IgG1 (38,6%). Quanto às respostas contra as demais subfamílias observamos que não há um predomínio específico de uma determinada subclasse de IgG na participação da resposta imune contra esses antígenos (Figura 10B).

8. Resposta proliferativa contra as proteínas recombinantes VIR e His₆-MSP1₁₉ em indivíduos expostos recentemente à malária por *P. vivax*.

Com intuito de avaliar a possível participação das proteínas VIR na indução da resposta imune celular em indivíduos expostos naturalmente à infecção, realizamos ensaios de proliferação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) em indivíduos que tiveram malária recentemente. As células foram testadas em cultura na presença de quatro proteínas recombinantes VIR (A4, B10, C1 e E5), além da MSP1₁₉ e GST, como controles. Devido à limitação na obtenção das proteínas recombinantes VIR, selecionamos para este experimento pelo menos um representante de cada subfamília VIR, que apresentava a quantidade necessária para realização dos experimentos na ocasião.

As proteínas recombinantes VIR, His₆-MSP1₁₉ ou GST foram testadas nas concentrações de 10,0 e 2,0 µg/ml. Indivíduos que apresentaram IE>2,5 foram considerados positivos. Os controles neste experimento foram representados pela: (i) estimulação das CMSP de todos os indivíduos com concanavalina A na concentração de 25 µg/ml e (ii) estimulação das CMSP de um grupo de indivíduos sadios que residem em São Paulo. Este segundo controle foi feito com base em dados anteriores de nosso grupo que demonstraram que indivíduos saudáveis nunca foram expostos a antígenos de plasmódio podem apresentar resposta proliferativa contra antígenos recombinantes (SOARES *et al.*, 1997).

Como demonstrado na Figura 11, a frequência de respondedores entre indivíduos expostos a malária foi de 3,7% para VIR-A4 e VIR-C1 e 7,4% para VIR-B10 e VIR-E5. Nenhum dos indivíduos foi respondedor para a proteína recombinante His₆-MSP1₁₉. Estes resultados demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa na frequência de respondedores para as proteínas VIR entre os grupos de indivíduos expostos e sadios ($P>0,05$), o que significa que a resposta proliferativa obtida com células de indivíduos expostos a malária não foi específica além de sugerir que essas proteínas não são capazes de induzirem respostas proliferativas nas culturas de CMSP de indivíduos expostos ao *P. vivax*.

Figura 10. Determinação das subclasses de IgG específicas capazes de reconhecer as proteínas recombinantes VIR. As amostras de soros foram testadas por ELISA utilizando anticorpos monoclonais capazes de detectar IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humana. Todas as amostras foram testadas na diluição 1:25, em duplicata. O “cutoff” obtido para cada uma das subclasses de IgG variou de 0,014-0,067, 0,048-0,289, 0,016-0,089 e 0,014-0,103 para IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, respectivamente. **A.** Freqüência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG subclasses específicos contra cada uma das proteínas recombinantes correspondentes às diferentes subfamílias VIR. **B.** Freqüência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG subclasses específicos contra pelo menos uma das proteínas recombinantes representando cada subfamília.

Figura 11. Respostas proliferativas das CMSP após estimulação *in vitro* com as proteínas recombinantes VIR e MSP1₁₉ em indivíduos expostos ou não à malária por *P. vivax*. As proteínas recombinantes utilizadas nos ensaios de proliferação foram testadas nas concentrações finais de 10,0 e 2,0 µg/ml. Indivíduos foram considerados positivos quando o índice de estimulação (IE) > 2,5 foi obtido em pelo menos uma das duas concentrações quando comparada com a cultura estimulada com a proteína GST (para as proteínas VIR) ou sem estímulo (para a His₆-MSP1₁₉). Os IEs obtidos a partir da estimulação das CMSP de indivíduos expostos respondedores para as proteínas VIR variaram de 2,8 a 4,5. Os IEs obtidos a partir da estimulação com o mitógeno ConA variaram de 15,0 a 178,2 (dados não mostrados).

9. Imunização de camundongos com as proteínas recombinantes (VIR) e análise da reatividade cruzada de anticorpos policlonais anti-VIR.

9.1. Avaliação da resposta de anticorpos contra as diferentes proteínas recombinantes VIR.

A imunogenicidade das diferentes proteínas recombinantes VIR foi avaliada após a imunização de camundongos da linhagem BALB/c. Os animais foram imunizados pela via subcutânea (s.c) com 5 µg de cada uma das proteínas recombinantes VIR e GST-MSP1₁₉ emulsificadas em adjuvante completo de Freund (ACF). Estes animais receberam posteriormente uma segunda dose com as mesmas quantidades de proteínas emulsificadas em adjuvante incompleto de Freund (AIF) e pela mesma via.

Com o intuito de avaliar a resposta de anticorpos específicos induzida por cada proteína recombinante, determinamos os títulos de anticorpos nos soros dos animais após cada dose de imunização. Esta determinação foi feita por ELISA utilizando placa sensibilizada com as respectivas proteínas recombinantes (homólogas) e GST. Para nos certificarmos de que estávamos medindo apenas anticorpos específicos para as proteínas VIR, adicionamos na fase líquida do ensaio de ELISA 50 µg/ml de GST, a fim de adsorver os anticorpos anti-GST gerados pela imunização com a proteína de fusão. A Figura 12A apresenta os resultados expressos como média aritmética dos títulos de anticorpos ($\log_{10}$) de cada grupo imunizado. Observamos que, após a 1ª dose, títulos de anticorpos específicos foram obtidos apenas contra as proteínas VIR-C1, VIR-C2, VIR-E5 e GST-MSP1₁₉. Entretanto, os títulos de anticorpos obtidos contra as proteínas VIR-A4, VIR-B10, VIR-C16 e VIR-E8 não foram específicos, pois não observamos diferença estatisticamente significativa quando estes foram comparados aos obtidos contra GST ($P>0,05$).

Após a segunda imunização, observamos que as respostas de todos os grupos de animais testados foram específicas para as proteínas homólogas (VIR e GST-MSP1₁₉), pois os títulos de anticorpos obtidos contra

as respectivas proteínas foram significativamente mais altos do que os obtidos contra GST ($P < 0,05$). Além disso, os títulos de anticorpos obtidos após a segunda dose foram significativamente mais altos do que após a primeira dose ($P < 0,05$) (Figura 12B). Os resultados do experimento de imunização dos camundongos com as distintas proteínas VIR apresentados a seguir são representativos de um experimento de três realizados com resultados semelhantes.

9.2. Análise da reatividade cruzada entre os anticorpos contra as diferentes subfamílias VIR.

Com o objetivo de avaliar a existência de reatividade cruzada entre os anticorpos contra as proteínas recombinantes correspondentes às diferentes subfamílias VIR, determinamos os títulos de anticorpos a partir do “pool” dos soros dos animais imunizados de cada grupo, por ELISA, utilizando placas sensibilizadas com as proteínas homólogas e heterólogas. Os resultados foram analisados a partir dos valores de ABS_{492} obtidos dos diferentes grupos de animais imunizados contra cada uma das proteínas recombinantes (VIR, GST e GST-MSP1₁₉) na diluição 1:6.400 aonde apenas as respostas específicas (anti-VIR ou anti-MSP1₁₉) estão sendo consideradas (Figura 13) ou como títulos de anticorpos em $\log_{10}$ (Figura 14).

A análise comparativa dos resultados demonstra que:

- (i) A imunização de camundongos com as proteínas recombinantes correspondentes as diferentes subfamílias VIR foi capaz de induzir anticorpos que reconheceram tanto a proteína homóloga como as demais proteínas representando à mesma subfamília ou subfamílias distintas (Figuras 13 e 14);
- (ii) Os animais imunizados com GST não apresentaram níveis significativos de anticorpos contra as proteínas VIR e GST-MSP1₁₉ (Figuras 13 e 14);
- (iii) A imunização com cada uma das proteínas recombinantes VIR e GST-MSP1₁₉ não foi capaz de induzir níveis significativos de anticorpos contra a GST (Figuras 13 e 14), com exceção da

imunização com VIR-E8, que induziu anticorpos anti-GST detectáveis mesmo após a utilização de GST solúvel na concentração de 50 ug/ml (Figura 14).

- (iv) Os camundongos imunizados apenas com adjuvante não apresentaram resposta de anticorpos específicos contra as proteínas VIR, GST e GST-MSP1₁₉ (dados não mostrados).

Figura 12. Análise comparativa da imunogenicidade das proteínas recombinantes VIR em camundongos após a primeira (A) e segunda dose (B). Os animais foram imunizados com duas doses contendo 5 μg de cada proteína recombinante emulsificada em adjuvante de Freund. Após 10 dias de cada imunização os soros dos animais foram testados individualmente, por ELISA, contra a proteína homóloga. Os resultados estão expressos como média de títulos de cada grupo em $\log_{10} \pm$ desvio padrão (dp).

Figura 13. Análise da reatividade cruzada entre os anticorpos obtidos após imunização de camundongos com as diferentes proteínas recombinantes VIR. Cada painel representa a reatividade do pool de soros de cada grupo imunizado contra a proteína recombinante indicada. A resposta de anticorpos foi avaliada por ELISA dez dias após a segunda dose. Os resultados representam os valores de ABS_{492} obtidos na diluição 1:6.400.

Figura 14. Análise da reatividade cruzada de anticorpos anti-VIR por ELISA em camundongos imunizados. O pool dos soros de cada grupo imunizado com as proteínas recombinantes VIR foi testado por ELISA contra as demais proteínas recombinantes VIR, GST e MSP1₁₉. Os resultados estão apresentados como títulos de anticorpos (log₁₀). As linhas pontilhadas em cada painel indicam o log₁₀ da diluição 1.6.400, acima da qual consideramos resposta de anticorpos específica para a proteína na placa.

10. Avaliação da resposta proliferativa de células de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes VIR e His₆-MSP1₁₉.

A fim de verificar se as proteínas recombinantes VIR apresentam epítomos reconhecidos por linfócitos T, avaliamos a resposta proliferativa das células dos nódulos linfáticos de camundongos BALB/c previamente imunizados pela via s.c com 10 µg de cada uma das proteínas recombinantes VIR, GST ou His₆-MSP1₁₉ emulsificadas em ACF. As células foram re-estimuladas *in vitro* na presença de 2,0 µg/ml dos antígenos recombinantes VIR, GST, His₆-MSP1₁₉ ou ConA como controle positivo do ensaio. Como demonstrado na Tabela 7, os resultados estão expressos como índice de estimulação (IE), sendo considerado níveis de estimulação significativos IE ≥ 5,0.

A Tabela 7 demonstra que células de camundongos imunizados com as proteínas VIR foram capazes de proliferar tanto na presença das respectivas proteínas homólogas como na presença das proteínas heterólogas, exceto no caso dos animais imunizados com a proteína recombinante VIR-B10 que não apresentaram respostas proliferativas a nenhum dos antígenos. As respostas proliferativas observadas foram específicas, pois as células não proliferaram na presença de GST. Os resultados obtidos com os animais imunizados com ACF e GST mostraram índices de proliferação significativamente baixos na presença das proteínas VIR (Tabela 7).

A fim de confirmar a especificidade da resposta celular gerada contra as proteínas VIR, foi utilizado como controle adicional células de camundongos imunizados com a proteína His₆-MSP1₁₉. A Tabela 7 mostra que células de camundongos imunizados com a His₆-MSP1₁₉ apresentaram baixos índices de estimulação na presença das proteínas VIR, com exceção de VIR-C16. O controle positivo do ensaio foi feito com células de camundongos BALB/c estimuladas com o mitógeno ConA, cujos valores de estimulação variaram de 39,7 a 158,9 (dados não mostrados).

Juntos, estes resultados demonstram que as proteínas VIR apresentam epítomos específicos e de reatividade cruzada reconhecidos por linfócitos T de camundongos BALB/c.

Os resultados dos ensaios de proliferação linfoblástica com as diferentes proteínas recombinantes apresentados na Tabela 7 são representativos de um experimento de dois realizados, cujos resultados foram semelhantes.

Tabela 7. Avaliação da resposta imune celular de camundongos BALB/c através de ensaio de proliferação linfoblástica após imunização com as proteínas recombinantes correspondentes as subfamílias VIR e His₆-MSP1₁₉.

Grupos de animais imunizados	Proteínas recombinantes							
	GST	VIR-A4	VIR-B10	VIR-C1	VIR-C16	VIR-E5	VIR-E8	MSP1 ₁₉
ACF	1,5	0,7	2,3	1,4	1,6	0,9	1,3	0,6
GST	<u>6,1</u>	0,9	1,6	0,4	1,3	1,0	1,5	1,3
VIR-A4	4,1	<u>14,4</u>	<u>16,3</u>	<u>7,9</u>	<u>14,1</u>	<u>8,7</u>	<u>9,4</u>	0,4
VIR-B10	1,5	0,1	1,8	2,3	0,8	0,5	0,7	0,4
VIR-C1	2,3	<u>45,0</u>	<u>36,3</u>	<u>7,3</u>	<u>15,5</u>	<u>6,5</u>	<u>14,1</u>	1,0
VIR-C16	1,3	<u>14,3</u>	<u>16,3</u>	<u>8,5</u>	<u>10,3</u>	<u>9,6</u>	<u>10,6</u>	1,4
VIR-E5	2,8	<u>18,1</u>	<u>8,2</u>	<u>11,2</u>	<u>15,6</u>	<u>13,3</u>	<u>19,7</u>	0,8
VIR-E8	3,5	<u>22,7</u>	<u>7,1</u>	<u>11,4</u>	<u>17,2</u>	<u>13,4</u>	<u>21,9</u>	1,2
MSP1 ₁₉	0,6	2,5	1,1	2,0	<u>8,2</u>	1,5	3,5	1,5

V. DISCUSSÃO

A caracterização da resposta imune adquirida contra antígenos de *Plasmodium* em populações naturalmente expostas tem papel fundamental na determinação de possíveis alvos constituintes de uma vacina efetiva contra malária. Apesar dos mecanismos imunológicos envolvidos na resposta contra malária ainda não serem totalmente compreendidos, é claro o envolvimento de anticorpos e células T como importante efetores da imunidade adquirida. Evidências obtidas com o estudo de transferência passiva de anticorpos humanos indicam que estes estão envolvidos nos mecanismos de proteção por serem capazes de reduzir a parasitemia durante uma infecção clínica (COHEN *et al.*, 1961). Mesmo após 43 anos deste estudo, ainda não se tem definido os possíveis alvos destes anticorpos protetores. É sabido que boa parte destes anticorpos são gerados contra proteínas de superfície de merozoítas que atuam impedindo a invasão do parasita ao eritrócito (WILSON & PHILLIPS, 1976). Por outro lado, existem evidências que anticorpos contra antígenos variantes de superfície de eritrócitos infectados (VSA) estão envolvidos no processo de opsonização de eritrócitos promovendo assim a proteção contra malária (MARSH *et al.*, 1989; BULL *et al.*, 1998; TEBO *et al.*, 2002).

Diversos estudos têm demonstrado que a imunidade naturalmente adquirida em indivíduos de áreas endêmicas da África é dependente da aquisição de anticorpos IgG contra antígenos clonalmente variantes de superfície (VSA) de *P. falciparum* (MARSH & HOWARD, 1986; BULL *et al.*, 1998; GIHA *et al.*, 1999; OFORI *et al.*, 2002). A detecção de anticorpos VSA-específicos presentes no soro de indivíduos expostos a malária *falciparum* através de ensaios de aglutinação tem sido à base da maioria dos estudos que investigam a associação entre presença de anticorpos anti-VSA e imunidade protetora. Os ensaios de detecção de anticorpos anti-VSA por citometria de fluxo (STAALSOE *et al.*, 1999) ou por ELISA utilizando proteínas recombinantes derivadas da PfEMP-1 (OGUARIRI *et al.*, 2001) ou RIFINS (ABDEL-LATIF *et al.*, 2002, 2003, 2004) também têm sido utilizados. Por outro lado, em relação à imunidade contra antígenos variantes de *P. vivax* em indivíduos de áreas endêmicas expostos a malária, existem poucos

dados na literatura (MENDIS *et al.*, 1988, DEL PORTILLO *et al.*, 2001, FERNANDEZ-BECERRA *et al.*, 2005)

Com base nestas informações, o presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar a resposta imune naturalmente adquirida contra antígenos de formas sanguíneas de *P. vivax* em indivíduos residentes em áreas endêmicas do Brasil. Para isso, avaliamos comparativamente a resposta imune de anticorpos e de células T humanos contra proteínas recombinantes correspondentes às diferentes subfamílias VIR. Para efeito comparativo, incluímos neste estudo duas proteínas recombinantes derivadas de antígenos de merozoítas de *P. vivax* (AMA-1 e MSP1₁₉) anteriormente caracterizadas pelo nosso grupo com sendo altamente imunogênicas em infecções naturais (RODRIGUES *et al.*, 2003, 2005).

Na primeira etapa deste trabalho, um total de oito plasmídios recombinantes foi gerado, sendo sete codificando para as diferentes subfamílias VIR e um contendo o gene que codifica para a proteína AMA-1. Do ponto de vista da expressão, inicialmente todos os vetores geraram proteínas recombinantes insolúveis, sob forma de corpos de inclusão, fato que é muito comum ocorrer com proteínas de *Plasmodium*, quando produzidas a partir de *E. coli*. Na tentativa de obtermos estas proteínas em condições apropriadas para os estudos imunológicos investimos esforços na padronização de métodos de obtenção destas proteínas solúveis. No que se refere às proteínas recombinantes VIR, foi possível obtê-las sob forma parcialmente solúvel utilizando-se a estratégia de indução com IPTG em baixas temperaturas. Por outro lado, a proteína AMA-1 foi obtida somente após solubilização na presença de agente desnaturante, seguindo-se de "refolding" parcial da proteína (RODRIGUES *et al.*, 2005).

Inicialmente, o reconhecimento imune destas proteínas por anticorpos IgG foi avaliado, por ELISA, utilizando 200 soros de pacientes infectados por *P. vivax*. Observamos que as proteínas recombinantes AMA-1 e MSP1₁₉ foram reconhecidas por anticorpos IgG de 57,0% e 90,5% dos indivíduos testados, respectivamente. Por outro lado, a frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra pelo menos uma das sete proteínas

recombinantes VIR foi significativamente menor, sendo de 26,0%. Quando avaliamos as freqüências de indivíduos respondedores para cada proteína recombinante VIR, observamos que estas variaram entre 2,0% e 17,5%. A análise comparativa das freqüências de indivíduos respondedores contra pelo menos um representante de cada subfamília VIR, revelou que a subfamília C foi reconhecida por uma fração maior de indivíduos (22,5%), o que sugere que esta subfamília foi a mais imunogênica em infecções naturais.

Os resultados obtidos com as proteínas AMA-1 e MSP1₁₉ confirmam dados anteriores do nosso grupo que demonstraram que estas são altamente imunogênicas em infecções naturais (CUNHA *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2003, 2005). Entre os fatores que podem contribuir para que estas proteínas sejam altamente reconhecidas por anticorpos de indivíduos com infecção patente por *P. vivax* é o fato de estas serem conservadas em isolados do Brasil, conforme demonstrado pelo nosso grupo (SOARES *et al.*, 1999c; RODRIGUES *et al.*, 2005). Uma outra possível explicação pode estar relacionada com a conformação destas proteínas recombinantes, ou seja, pode ser que estas estejam em uma conformação muito parecida com as respectivas proteínas nativas.

As razões da baixa freqüência de indivíduos com anticorpos IgG obtidos para as proteínas VIR são desconhecidas, porém nossos achados permitem associar este fato a uma possível diminuição da freqüência de células B de memória ocasionadas por um mecanismo denominado de depleção homeostática (GRAU, 2002) que pode ser ativada pelo surgimento de novas células de memória induzidas pelo polimorfismo destas proteínas ou por uma possível ausência de "switch" de resposta de anticorpos IgM para IgG que também esta associada à diversidade antigênica destas proteínas em infecções naturais. Para testar esta segunda hipótese, avaliamos por ELISA, as mesmas amostras de soros quanto à presença de IgM e observamos que as freqüências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM VIR-específicos foram igualmente baixas e variaram de 6,0% a 18,1%. Outra possibilidade para explicar o fato destas proteínas serem

pouco imunogênicas em infecções naturais é que anticorpos humanos reconheçam predominantemente epítopos variáveis entre as diferentes proteínas VIR. É importante ressaltar, que as diferentes proteínas VIR produzidas neste trabalho foram geradas a partir dos genes correspondentes obtidos de um único paciente, o que representa um número extremamente pequeno de proteínas em se tratando de genes que estão presentes em número entre 600-1000 cópias por genoma haplóide (DEL PORTILLO *et al.*, 2001). Por último, não podemos excluir a possibilidade de que as proteínas recombinantes utilizadas, as quais foram geradas em sistema bacteriano de expressão, não estejam na conformação apropriada.

Vários aspectos podem estar associados ao fato de que a subfamília C foi reconhecida por uma maior frequência de respondedores entre esses estão: (i) a localização subcelular, pelo fato de que recentemente FERNANDEZ-BECERRA *et al.* (2005) demonstraram um padrão de fluorescência disperso na superfície de reticulócitos infectados utilizando anticorpos policlonais contra peptídeos representantes da subfamília A, C e E, este achado permite especularmos que a subfamília C possa estar localizada quando comparada com as demais subfamílias preferencialmente na superfície das células infectadas, o que permitiria um maior contato entre proteína-sistema imune, (ii) o alto polimorfismo desta subfamília observado em isolados naturais, que acarreta a produção de anticorpos variante-específicos (DEL PORTILLO *et al.*, 2004), (iii) a presença de peptídeos conservados responsáveis por uma reatividade cruzada dentro da subfamília C (FERNANDEZ-BECERRA *et al.*, 2005), (iv) a possível expressão da subfamília C nos diferentes estágios do ciclo biológico do parasita, uma vez que HALL *et al.* (2005) demonstraram através de estudos proteômicos que algumas proteínas BIR expressas em *P. berghei* podem ser encontradas em diferentes estágios do parasita, é importante ressaltar que famílias multigênicas presentes em *P. chabaudi*, *P. yoelii* e *P. berghei* estão relacionadas aos genes *vir* de *P. vivax* no que diz respeito à seqüência e estrutura (JANSSEN *et al.*, 2002), (v) e acrescida do fato de que incluímos

neste estudo um maior número de proteínas representantes desta subfamília (n=3).

Recentemente, FERNANDEZ-BECERRA *et al.* (2005) analisaram o reconhecimento imune de 22 proteínas recombinantes VIR por anticorpos IgG, através de "immunoblotting", utilizando soros de 32 indivíduos expostos ao *P. vivax* procedentes de Rondônia e observaram que 72% dos indivíduos foram capazes de reagir com pelo menos uma das proteínas recombinantes testadas. Neste estudo as diferentes proteínas VIR foram produzidas a partir de isolados de três pacientes infectados. De forma semelhante aos dados obtidos neste trabalho, as frequências observadas individualmente para cada proteína recombinante representando as diferentes subfamílias foram baixas.

Em *P. falciparum*, tem sido demonstrado que a imunidade adquirida contra VSA esta diretamente associada ao número de episódios prévios de malária (revisto por KYES *et al.*, 2001). Visando demonstrar uma possível associação entre a prevalência de anticorpos IgG e IgM contra as proteínas recombinantes VIR, AMA-1 e MSP1₁₉ e o efeito do número de exposições prévias, dividimos os indivíduos deste estudo em 3 grupos de acordo com o número de episódios prévios relatados. Observamos que a proporção de indivíduos que apresentam anticorpos IgG e IgM anti-VIR não aumenta de acordo com o maior número de exposições ao *P. vivax*, padrão que corresponde a uma resposta primária a cada novo contato com o parasita. Por outro lado, a proporção de IgG para AMA-1 aumenta significativamente a partir de um ou dois episódios prévios de malária e para a proteína MSP1₁₉ a resposta imune de anticorpos IgG avaliada pela soroconversão desenvolve-se rapidamente após uma primeira exposição, estes resultados confirmam dados recentes obtidos anteriormente pelo nosso grupo (RODRIGUES *et al.*, 2003, 2005).

Os resultados obtidos com as proteínas VIR corroboram com os descritos por FERNANDEZ-BECERRA *et al.* (2005), e sugerem que esta ausência de efeito "boost" no desenvolvimento da imunidade contra essas proteínas, pode ser decorrente: (i) do polimorfismo alélico influenciado pela

própria resposta imune adquirida, uma vez que em *P. yoelii* tem sido demonstrado que a re-infecção de animais semi-imunes conduzem a expressão de novos variantes *yir* (CUNNINGHAM *et al.*, 2005), este achado torna se revelante quando consideramos que a família multigênica *yir* é homóloga aos genes *vir* de *P. vivax*, (ii) a expressão não clonal das proteínas VIR atuando como um eficiente mecanismo de evasão da imunidade do hospedeiro, (iii) as características epidemiológicas da região estudada, (iv) e baixa antigenicidade apresentada pelas proteínas VIR contribuindo para a diminuição da memória imunológica.

Estudos têm demonstrado que o balanço de produção de uma determinada subclasse de IgG depende da dinâmica de transmissão do parasita e do estado imune dos indivíduos testados (GARRAUD *et al.*, 2003). Os resultados obtidos com a determinação das subclasses de IgG produzidas contra as proteínas VIR revelaram uma ausência de predomínio de isotipo específico, com exceção da subfamília C, onde anticorpos citofílicos da subclasse IgG1 foram predominantes no reconhecimento. A ausência de polarização para uma determinada subclasse de anticorpo pode estar relacionada com a natureza do antígeno e a intensidade de transmissão da malária na área estudada. Estes fatores podem influenciar a ativação do sistema imune durante o processo de aquisição de imunidade protetora, como demonstrado por TONGREN *et al.* (2006) em um estudo de caracterização das subclasses de anticorpos IgG contra as proteínas MSP-1₁₉, MSP-2, AMA-1 e GPI de *P. falciparum* em indivíduos de diferentes localidades na Tanzânia. Outra possível explicação para esta ausência de polarização é a diversidade de epítomos para células B apresentados durante uma infecção patente com conseqüente ativação policlonal dessas células. Esta hipótese é sustentada pelos dados descritos por GARRAUD *et al.* (2002) que demonstraram através de ensaios de proliferação com CMSP de indivíduos expostos ao *P. falciparum* na presença de IL-2 e IL-10, um perfil de distribuição de subclasses de IgG similar ao mostrado em nosso estudo em resposta a presença de três proteínas recombinantes correspondentes ao bloco 2 da MSP1 de *P. falciparum*.

O estudo da resposta imune celular *in vitro* contra antígenos de *Plasmodium* em indivíduos expostos a malária pode auxiliar na compreensão das interações celulares que ocorrem durante infecções naturais. No homem, é pouco conhecido o papel das células T na imunidade protetora durante o ciclo eritrocítico, porém estudos de co-infecção malária-HIV demonstram que indivíduos infectados com o vírus apresentam aumento dos sintomas da malária e de carga parasitária, por consequência da depleção das células T CD4 (revisto por NDUNGU *et al.*, 2005). Existem também evidências que demonstram a participação de células T CD4 humanas no controle do crescimento *in vitro* de parasitas, bem como no aumento da resistência a infecção pelo *P. falciparum* (revisto por GOOD *et al.*, 2005).

Com o objetivo de avaliar a possível participação das proteínas recombinantes VIR e MSP1₁₉ na indução de resposta imune celular em indivíduos expostos naturalmente à infecção, realizamos ensaios de proliferação celular *in vitro* utilizando CMSP de indivíduos que foram recentemente tratados para malária. Em geral, nossos resultados mostram que as proteínas recombinantes VIR e MSP1₁₉ não foram capazes de induzir níveis significativos de resposta proliferativa em CMSP de indivíduos recentemente expostos ao *P. vivax* quando comparada ao grupo de indivíduos sadios. Esta ausência de resposta proliferativa observada em células de indivíduos expostos a malária quando estimuladas com as proteínas VIR pode ser explicada pelo: (i) extenso repertório antigênico apresentado durante uma infecção que possivelmente pode ser o responsável pela falta de resposta de células de memória, (ii) limitações do ensaio utilizado devido sua baixa sensibilidade, (iii) localização de células T efectoras em órgãos linfóides, (iv) não excluindo fatores genéticos humanos como tipo de HLA e a possibilidade de um efeito imunomodulatório das proteínas VIR.

Esta última observação vem sendo bastante explorada em *P. falciparum*, onde recentes estudos têm revelado que PfEMP-1 e outras moléculas expressas na superfície de eritrócitos infectados participam da

ativação e modulação negativa da resposta imune do hospedeiro, através da supressão de células T de memória (POUNOTIS *et al.*, 2004), inibição da maturação de células dendríticas por meio da interação CD36-eritrócito infectado (revisto por SERGHIDES *et al.*, 2003), indução da ativação das células T regulatórias por um mecanismo envolvendo a citocina IL-10 (ALLSOPP *et al.*, 2002), entre outros fatores.

Em conjunto, nossos resultados constituem o primeiro estudo detalhado de caracterização da resposta imune humana naturalmente adquirida contra as proteínas recombinantes VIR que mostraram ser pouco imunogênicas em infecções naturais.

Na segunda parte deste estudo avaliamos a imunogenicidade das proteínas VIR medida pela presença de anticorpos séricos específicos e respostas linfoproliferativas, como também a possível existência de epítomos de reatividade cruzada entre essas proteínas após imunização de camundongos BALB/c.

A fim de avaliar a resposta de anticorpos específicos induzidos por cada proteína recombinante e a capacidade dessas proteínas induzirem anticorpos de reatividade cruzada, camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados com duas doses de cada uma das proteínas recombinantes (VIR e GST-MSP₁₉, respectivamente) na presença de adjuvante de Freund. Após a primeira e segunda dose de imunização, os soros dos animais foram coletados e testados por ELISA contra as proteínas homólogas. Nossos resultados mostraram que altos títulos de anticorpos foram obtidos após a 2ª dose de imunização. Em paralelo, demonstramos que o esquema de imunização experimental utilizado foi capaz de induzir a produção de anticorpos de reatividade cruzada contra a proteína homóloga e contra representantes de distintas subfamílias (proteínas heterólogas), sugerindo a presença de epítomos comuns entre as diferentes proteínas VIR. Dados similares foram descritos por FERNANDEZ-BECERRA *et al.* (2005), os quais demonstraram que anticorpos policlonais monoespecíficos produzidos em diferentes modelos experimentais após imunização com peptídeos sintéticos contendo epítomos conservados entre as subfamílias são capazes de

reconhecer por "immunoblotting" um "pool" constituído por diferentes proteínas heterólogas.

Em *P. falciparum*, alguns domínios de PfEMP-1 em particular os associados com propriedades adesivas e de virulência podem expressar epítomos conservados, os quais são imunogênicos. Para identificar estes possíveis epítomos de reatividade cruzada, GAMAIN *et al.* (2001) geraram anticorpos monoclonais contra a região do interdomínio rico em cisteínas (CIDR1) da PfEMP-1, a qual é responsável pela adesão de eritrócitos infectados ao receptor CD36. Os anticorpos monoclonais gerados foram capazes de reagir cruzadamente com o domínio CIDR1 da PfEMP-1 expresso em diferentes cepas de *P. falciparum*, tanto em ensaios de aglutinação, como por citometria de fluxo utilizando-se células CHO transfectadas com variantes deste domínio. Posteriormente, GRATEPANCHE *et al.* (2003) confirmaram este achado através do esquema de imunização "prime-boost", onde camundongos BALB/c foram imunizados com três doses de uma combinação constituída por DNA plasmidial codificando para o domínio CIDR1 das cepas MC, FVO e A4tres, seguido de "boost" com três proteínas recombinantes representando os distintos domínios CIDR1 e produzidas em *Pichia pastoris*.

É importante mencionar, que através de um esquema de imunização constituído de duas doses de uma única proteína recombinante VIR, fomos capazes de demonstrar a presença de epítomos de reatividade cruzada nas seqüências das proteínas VIR.

Além da presença de anticorpos séricos específicos e de reatividade cruzada, avaliamos as respostas proliferativas das células dos nódulos linfáticos de camundongos BALB/c imunizados com as proteínas recombinantes VIR em ACF. As células dos animais imunizados com as diferentes proteínas recombinantes VIR e re-estimuladas *in vitro* com a proteína homóloga ou heterólogas apresentaram respostas linfoproliferativas específicas com ausência de resposta ao serem estimuladas com GST e com o controle His₆-MSP1₁₉. Com exceção do grupo imunizado com a proteína VIR-B10, cujas células de linfonodos não foram capazes de

proliferar na presença de nenhuma das proteínas VIR testadas, incluindo a proteína homóloga. Estes resultados mostram que as proteínas VIR apresentam epítomos para células T, os quais foram reconhecidos por linfócitos de animais previamente imunizados tanto com as proteínas homólogas como heterólogas. Estes experimentos confirmam nossos dados de reatividade cruzada de anticorpos que indicam a presença de epítomos comuns entre esses antígenos.

Com relação ao resultado de proliferação celular obtido a partir de linfócitos dos camundongos imunizados com His₆-MSP1₁₉ observamos que estas células apresentaram respostas proliferativas somente quando estimuladas na presença do antígeno VIR-C16. É importante ressaltar, que todos os controles assim como a proteína His₆-MSP1₁₉ utilizados na estimulação das células obtidas de camundongos imunizados com VIR-C16 não induziram níveis significativos de proliferação desses linfócitos, o que sugere que a resposta obtida com linfócitos de camundongos imunizados com His₆-MSP1₁₉ e re-estimulados com VIR-C16 não foi específica

A ausência de resposta proliferativa observada em linfócitos de camundongos imunizados com His₆-MSP1₁₉ quando estimulados com a proteína homóloga vem corroborar dados anteriores de CUNHA *et al.* (2001) que demonstraram a restrição genética do hospedeiro na resposta imune em certas condições experimentais, uma vez que epítomos contidos na seqüência da MSP1₁₉ para células T foram reconhecidos apenas por linfócitos de camundongos da linhagem C57BL/6.

Estudos com espécies de *Plasmodium* que infectam roedores têm mostrado que a imunidade protetora contra o estágio sanguíneo assexuado requer a participação conjunta tanto de anticorpos como de células T CD4. Embora as células T CD4 estejam envolvidas na proteção contra malária, através da liberação de citocinas que ativam outras células efetoras, não esta descartada o seu papel na patogenia de complicações letais. Algumas evidências confirmam o papel ambíguo dessas células na malária. Estudos têm mostrado que camundongos SCID reconstituídos com células T de camundongos imunes controlam o crescimento de *P. chabaudi*, sugerindo

que células T contribuem para essa imunidade (revisto por GOOD *et al.*, 2004). Por outro lado, camundongos esplenectomizados são protegidos de desenvolver malária cerebral devido à depleção de células T CD4 e CD8 (CURFS *et al.*, 1989; HERMSEN *et al.*, 1998).

Em conclusão, nossos dados de reatividade cruzada entre as subfamílias VIR demonstrado após imunizações experimentais com proteínas recombinantes mostram que este esquema de imunização pode servir como base para futuros estudos de indução de imunidade protetora contra malária *vivax* em primatas não humanos.

VI. CONCLUSÕES

1. As proteínas recombinantes correspondentes a AMA-1 e MSP1₁₉ de *P. vivax* foram produzidas em *E. coli* a partir de plasmídios contendo His₆;
2. Sete proteínas recombinantes correspondentes a quatro subfamílias *vir* foram geradas em fusão com GST a partir de *E. coli*;
3. A análise comparativa da prevalência de anticorpos contra as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1₁₉ e VIR em indivíduos com infecção patente por *P. vivax* revelou que a prevalência de anticorpos anti-VIR foi significativamente menor quando comparada às obtidas contra AMA-1 e MSP1₁₉. Além disso, não observamos respostas proliferativas de CMSP significativas a estes antígenos quando comparamos o grupo de indivíduos exposto ao *P. vivax* com o grupo não exposto;
4. Altos títulos de anticorpos VIR-específicos foram obtidos após imunização de camundongos BALB/c com duas doses de cada uma das proteínas recombinantes VIR na presença de adjuvante de Freund. A análise da reatividade cruzada entre os anticorpos gerados nestes animais sugeriu a presença de epítomos comuns entre as diferentes subfamílias VIR;
5. A análise da resposta proliferativa de células de nódulos linfáticos de camundongos imunizados e re-estimuladas *in vitro* com cada uma das proteínas VIR demonstrou que estas contêm epítomos específicos e de reatividade cruzada para células T.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATIF, M. S.; KHATTAB, A.; LINDENTHAL, C.; KREMSNER, P. G.; KLINKERT, M. Q. 2002. Recognition of variant Rifin antigens by human antibodies induced during natural *Plasmodium falciparum* infections. **Infect Immun.** **70**: 7013-7021.

ABDEL-LATIF, M. S.; DIETZ, K.; ISSIFOU, S.; KREMSNER, P. G.; KLINKERT, M. Q. 2003. Antibodies to *Plasmodium falciparum* Rifin proteins are associated with rapid parasite clearance and asymptomatic infections. **Infect Immun.** **71**: 6229-6233.

ABDEL-LATIF, M. S.; CABRERA, G.; KOHLER, C.; KREMSNER, P. G.; LUTY, A. J.; 1-95/C. STUDY TEAM. 2004. Antibodies to rifin: a component of naturally acquired responses to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens on infected erythrocytes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **71**: 179-186.

ADAMS, J. H.; BLAIR, P. L.; KANEKO, O.; PETERSON, D. S. 2001. An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. **Trends Parasitol.** **17**: 297-299.

AIKAWA, M. 1988. Morphological changes in erythrocytes induced by malarial parasites. **Biol.Cell.** **64**: 173-181.

AHMAD, S. H.; DANISH, T.; FARIDI, M. M.; AHMAD, A. J.; FAKHIR, S.; KHAN, A. S. 1989. Renal function in acute malaria in children. **J. Trop. Pediatr.** **35**: 291-294.

AYI, K.; PATEL, S. N.; SERGHIDES, L.; SMITH, T. G.; KAIN, K. C. 2005. Nonopsonic phagocytosis of erythrocytes infected with ring-stage *Plasmodium falciparum*. **Infect. Immun.** **73**: 2559-2563

ALLSOPP, C. E.; SANI, L. A.; REUBSAET, L.; NDUNGU, F.; NEWBOLD, C.; MWANGI, T.; MARSH, K.; LANGHORNE, J. 2002. CD4 T cell responses to a variant antigen of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, erythrocyte membrane protein-1, in individuals living in malaria-endemic areas. **J. Infect. Dis.** **185**: 812-819.

BARNWELL, J.W.; NICHOLS, M.E.; RUBINSTEIN, P. 1989. In vitro evaluation of the role of the Duffy Blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. **J. Exp. Med.** **169**: 1795-1802.

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

BARUCH, D. I.; GORMELY, J. A.; MA, C.; HOWARD, R. J.; PASLOSKE, B. L. 1996. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA** **93**:3497–3502.

BARUCH, D. I.; MA, X. C.; SINGH, H. B.; BI, X.; PASLOSKE, B. L.; 1997. Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. **Blood** **90**:3766–3775

BERENDT, A. R.; SIMMONS, D. L.; TANSEY, J.; NEWBOLD, C. L.; MARSH, K. 1989. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. **Nature.** **341**: 57-59.

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

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

BLACKMAN, M. J. 2004. Proteases in host cell invasion by the malaria parasite. **Cell. Microb.** **6**: 893-903

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

BIGGS, B. A.; GOOZE, L.; WYCHERLEY, K.; WOLLISH, W.; SOUTHWELL, B.; LEECH, J. H.; BROWN, G. V. 1991. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.** **88**: 9171-9174.

BIGGS, B. A.; ANDERS, R. F.; DILLON, H. E.; DAVERN, K. M.; MARTIN, M.; PETERSON, C.; BROWN, G. V. 1992. Adherence of infected erythrocytes to venular endothelium selects for antigenic variant of *Plasmodium falciparum*. **J. Immunol.** **149**: 2047-2054.

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

BULL, P.C., LOWE, B.S., KORTOK, M., MOLYNEUX, C.S., NEWBOLD, C.I., MARSH, K. 1998. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. **Nat. Med.** **4**: 358-360

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

CAMARGO, A. A.; FISHER, K.; LANZER, M.; DEL PORTILLO, H. A. 1997. Construction and characterization of a *Plasmodium vivax* genomic library in yeast artificial chromosomes. **Genomics** **42**: 467-473.

CARLINI, M. E.; WHITE, Jr.; A. C. & ATMAR, R. L. 1999. Vivax malaria complicated by adult respiratory distress syndrome. **Clin. infect. Dis.**, **28**: 1182-1183

CHANG, S. P.; GIBSON, H. L.; LEE-NG, C. T.; BARR, P. J.; HUI, G. S. N. 1992. A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a

recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth. **J. Immunol.** **149**: 548-555.

CHAPPEL, J.A. & HOLDER, A.A. 1993. Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion in vitro recognize the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. **Mol. Biochem. Parasitol.** **60**: 303-312.

CHATTOPADHYAY, R.; SHARMA, A.; SRIVASTAVA, V. K.; PATI, S. S.; SHARMA, S. K.; DAS, B. S. CHITNIS, C. E. 2003. *Plasmodium falciparum* infection elicits both variant-specific and cross-reactive antibodies against variant surface antigens. **Infect. Immun.** **71**: 597-604.

CHENG, Q. & SAUL, A. 1994. Sequence analysis of the apical membrane antigen 1 (AMA-1) of *Plasmodium vivax*. **Mol. Biochem Parasitol.** **65**: 183-184.

CHEN, Q.; BARRAGAN, A.; FERNANDEZ, V.; SUNDSTROM, A.; SCHLICHTERLE, M. 1998. Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*. **J. Exp.Med.** **187**:15–23.

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

COHEN, S.; MCGREGOR, I. A.; CARRINGTON, S. 1961. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature.** **192**: 733-737.

COLLINS, W. E.; PYE, D.; CREWTER, P.E.; VANDENBERG, K. L.; GALLAND, G. G.; SULZER, A. J.; KEMP, D. J.; EDWARDS, S. J.; COPPEL, R. L.; SULLIVAN, J. S.; MORRIS, C. L.; ANDERS, R. F. 1994. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. **Am. J. Med. Hyg.** **51**: 711-719.

CORTES, A.; MELLOMBO, M.; MUELLER, I.; BENET, A.; REEDER, J. C.; ANDERS, R. F. 2003. Geographical structure of diversity and differences between

symptomatic and asymptomatic infections for *Plasmodium falciparum* vaccine candidate AMA-1. **Infect. Immun.** **71**: 1416-1426.

CUNNINGHAM, D. A.; JARRA, W.; KOERNIG, S.; FONAGER, J.; FERNANDEZ-REYES, D.; BLYTHE, J. E.; WALLER, C.; PREISER, P. R.; LANGHORNE, J. 2005. Host immunity modulates transcriptional changes in a multigene family (yir) of rodent malaria. **Mol. Microbiol.** **58**: 636-647.

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

CURFS, J. H.; SCHETTERS, T. P.; HERMSEN, C. C.; JERUSALEM, C. R.; VAN ZON, A. A.; ELING, W. M. 1989. Immunological aspects of cerebral lesions in murine malaria. **Clin. Exp. Immunol.** **75**:136-40

DEANS, J. A.; KNIGHT, A. M.; JEAN, W. C.; WATERS, A. P.; COHEN, S.; MITCHELL, G. H. 1988. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant *Plasmodium knowlesi* 66 kDa antigen. **Parasite Immunol.** **10**: 535-552.

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

DEL PORTILLO, H. A., FERNANDEZ-BECERRA, C., BOWMAN S., OLIVER, K., PREUSS, M., SANCHEZ, C. P., SCHNEIDER N. K., VILLALOBOS, J. M., RAJANDREAM, M-A., HARRIS, D., PEREIRA DA SILVA, L. H., BARREL, B., LANZER, M. 2001. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. **Nature** **410**: 839-842.

DEL PORTILLO, H. A.; LANZER, M.; RODRÍGUEZ-MALAGA, S.; ZAVALA, F.; FERNANDEZ-BECERRA, C. 2004. Variant genes and the spleen in *Plasmodium vivax* malaria. **Int. J. Parasitol.** **34**:1547-1554.

DEKKER, C.; UTHAIPIBULL, C.; CALDER, L. J.; LOCK, M.; GRAINGER, M.; MORGAN, W. D.; DODSON, G. G.; HOLDER, A. A. 2004. Inhibitory and neutral antibodies to *Plasmodium falciparum* MSP119 form ring structures with their antigen. **Mol. Biochem. Parasitol.** **137**: 143-149.

DODOO, D.; STAALSOE, T.; GIHA, H.; KURTZHALS, J. A.; AKANMORI, B. D.; KORAM, K.; DUNYO, S.; NKRUMAH, F. K.; HYIID, L.; THEANDER, T. G. 2001. Antibodies to variant antigens on the surfaces of infected erythrocytes are associated with protection from malaria in Ghanaian children. **Infect Immun.** **69**: 3713-3718

DOLAN, S. A.; MILLER, L. H.; WELLEMS, T. E. 1991. Selection of genetic variants from *Plasmodium* clones. 1991. **Acta Leiden.** **60**: 93-99.

DONATI, D.; ZHANG, L. P.; CHENE, A.; CHEN, Q.; FLICK, K.; NYSTROM, M.; WAHLGREN, M.; BEJARANO, M. T. 2004. Identification of a polyclonal B-cell activator in *Plasmodium falciparum*. **Infect. Immun.** **72**: 5412-5418.

DOOLAN, D. L.; AGUIAR, J. C.; WEISS, W. R. ; SETTE, A.; FELGNER, P. L.; REGIS, D. P.; QUINONES-CASAS, P.; YATES, J. R. 3RD.; BLAIR, P. L.; RICHIE, T. L.; HOFFMAN, S. L.; CARUCCI, D. J. 2003. Utilization of genomic sequence information to develop malaria vaccines. **J. Exp. Biol.** **206**: 3789-3802.

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

FERNANDEZ, V.; HOMMEL, M.; CHEN, Q.; HAGBLOM, P.; WAHLGREN, M. 1999. Small, clonally variant antigens expressed on the surface of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte are encoded by the *rif* gene family and are the target of human immune responses. **J. Exp. Med.** **190**:1393-404

FERNANDEZ-REYES, D.; CRAIG, A. G.; KYES, S. A.; PESHU, N.; SNOW, R. W.; BERENDT, A. R.; MARSH, K.; NEWBOLD, C. L. 1997. A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. **Hum. Mol. Genet.** **6**: 1357-1360.

FERNANDEZ- BECERRA, C.; PEIN, O; OLIVEIRA, T. R.; YAMAMOTO, M. M.; CASSOLA, A. C.; ROCHA, C.; SOARES, I. S.; DE BRAGANÇA-PEREIRA, C. A. DEL PORTILLO, H. A. 2005. Variant proteins of *Plasmodium vivax* are not clonally expressed in natural infections. **Mol. Microbiol.** **58**: 648-658

FIGTREE, M.; PASAY, C. J.; SLADE, R.; CHENG, Q.; CLOONAN, N.; WALKER, J.; SAUL, A. 2000. *Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA 1 and MSP 1 genes. **Mol Biochem Parasitol.** **108**: 53-66.

FRASER, T. S.; KAPPE, S.H.; NARUM, D. L.; VANBUSKIRK, K. M.; ADAMS, J. H. 2001. Erythrocyte-binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. **Mol. Biochem. Parasitol.** **117**: 49-59.

FRIED, M. & DUFFY, P. E. 1996. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. **Science.** **272**: 1502-1504.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA, Ministério da Saúde. 2002. <http://www.funasa.gov.br>

GAMAIN, B.; MILLER, L. H.; BARUCH, D. I. 2001. The surface variant antigens of *Plasmodium falciparum* contain cross-reactive epitopes. **PNAS.** **98**: 2664-2669.

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

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

GALINSKI, M. R.; INGRAVALLO, P.; CORREDOR-MEDINA, C.; AL-KHEDERY, B.; POVOA, M.; BARNWELL, J. W. 2001. *Plasmodium vivax* merozoite surface

proteins-3beta and-3gamma share structural similarities with *P. vivax* merozoite surface protein-3alpha and define a new gene family. **Mol. Biochem. Parasitol.** **115**: 41-53.

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

GARRAUD, O.; PERRAUT, R.; DIOUF, A.; NAMBEI, W.S.; TALL, A.; SPIEGEL, A.; LONGACRE, S.; KASLOW, D. C.; JOUIN, H.; MATTEI, D.; ENGLER, G. M.; NUTMAN, T. B.; RILEY, E. M. MERCEREAU-PUIJALON, O. 2002. Regulation of antigen-specific immunoglobulin g subclasses in response to conserved and polymorphic *Plasmodium falciparum* antigens in an in vitro model. **Infect. Immun.** **70**: 2820-2827.

GARRAUD, O. ; MAHANTY, S. ; PERRAUT, R. 2003. Malaria-specific antibody subclasses in immune individuals: a key source of information for vaccine design. **Trends. Immunol.** **24**: 30-35.

GAUR, D.; MAYER, D. C. G.; MILLER, L. H. 2004. Parasite ligand–host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **Int. J. Parasitol.** **34**: 1413-1429.

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

GIHA, H. A., STAALSOE, T., DODOO, D., ELHASSAN, I. M., ROPER, C., SATTI, G. M. H., ARNOT, D. E., THEANDER, T. G., HVIID, L. 1999. Nine-Year longitudinal study of antibodies to variant antigens on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Infect. Immun.** **67**: 4092-4098

GITAU, E. N.; NEWTON, C. R.; 2005. Review Article: blood-brain barrier in *falciparum* malaria. **Trop. Med Int. Health.****10**: 285-292.

GONZÁLEZ, L.; GUZMÁN, M.; CARMONA, J.; LOPERA, T. & BLAIR, S. 2000. Características clínico-epidemiológicas de 291 pacientes hospitalizados por malaria en Medellín (Colombia). **Acta méd. colomb.**, **25**: 163-170

GOOD, M. F.; STANISIC, D.; XU, H.; ELLIOT, S.; WYKES, M. 2004. The immunological challenge to developing a vaccine to the blood stages of malaria parasites. **Immunol. Rev.** **201**: 254-267.

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

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

GRATEPANCHE, S.; GAMAIN, B.; SMITH, J. D.; ROBINSON, B. A.; SAUL, A.; MILLER, L. H. 2003. Induction of cross-reactive antibodies against the *Plasmodium falciparum* variant protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** **100**: 13007-12.

GRAU, D. 2002. A role for antigen in the maintenance of immunology memory. **Nature.** **2**: 60-66.

GROUX, H & GYSIN, J. 1990. Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. **Res. Immunol.** **141**: 529-542.

GUPTA, S. 2005. Parasite immune escape: new views into host-parasite interactions. **Curr. Opin. Microbiol.** **8**: 428-433.

HAN, H.; PARK, S.; KIM, S.; HWANG, S.; HAN, J.; TRAICOFF, J.; KHO, W.; CHUNG, J. 2004. Epidermal growth factor-like motifs 1 and 2 of *Plasmodium vivax*

merozoïtas surface protein 1 are critical domains in erythrocyte invasion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **320**: 563-570.

HALL, N.; KARRAS, M.; RAINE, J. D.; CARLTON, J. M.; KOOIJ, T. W.; BERRIMAN, M.; FLORENS, L.; JANSSEN, C. S.; PAIN, A.; CHRISTOPHIDES, G. K.; JAMES, K.; RUTHERFORD, K.; HARRIS, B.; HARRIS, D.; CHURCHER, C.; QUAIL, M. A.; ORMOND, D.; DOGGETT, J.; TRUEMAN, H. E.; MENDOZA, J.; BIDWELL, S. L.; RAJANDREAM, M. A.; CARUCCI, D. J.; YATES, J. R. 3rd; KAFATOS, F.C.; JANSE, C. J. BARRELL, B.; TURNER, C. M.; WATERS, A. P.; SINDEN, R. E. 2005. A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. **Science** **307**: 82-86.

HEALER, J.; CRAWFORD, S.; RALPH, S.; MCFADDEN, G.; COWMAN, A. F. 2002. Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. **Infect. Immun.** **70**: 5751-5758.

HEALER, J.; MURPHY, V.; HODDER, A. N.; MASCIANTONIO, R.; GEMMILL, A. W.; ANDERS, R. F.; COWMAN, A. F.; BATCHELOR, A. 2004. Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. **Mol. Microbiol.** **52**: 159-168.

HENSMANN, M.; CHING, L.; MOSS, C.; LINDO, V.; GREER, F.; WATTS, C.; OGUN, S. A.; HOLDER, A. A.; LANGHORNE, J. 2004. Disulfide bonds in merozoite surface protein 1 of the malaria parasite impede efficient antigen processing and affect the *in vivo* antibody response. **Eur. J. Immunol.** **34**: 639-648.

HERMSEN, C. C.; MOMMERS, E.; VAN DE WIEL, T.; SAUERWEIN, R. W.; ELING, W. M. 1998. Convulsions due to increased permeability of the blood-brain barrier in experimental cerebral malaria can be prevented by splenectomy or anti-T cell treatment. **J. Infect. Dis.** **178**: 1225-1227.

HOLDER, A. A.; GUEVARA-PATINO, J. A.; UTHAIPIBULL, C.; SYED, S. E.; LING, I. T.; SCOTT-FINNIGAN, T.; BLACKMAN, M. J. 1999. Merozoite surface protein 1,

immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria. **Parassitologia** **41**: 409-414.

HOWELL, S. A.; WELL, I.; FLECK, S. L.; KETTLEBOROUGH, C.; COLLINS, C. R.; BLACKMAN, M. J. 2003. A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. **J. Biol. Chem.** **278**: 23890-23898.

JANSSEN, C. S.; BARRETT, M. P.; TURNER, C. M.; PHILLIPS, R. S. 2002. A large gene family for putative variant antigens shared by human and rodent malaria parasites. **Proc. Biol. Sci.** **269**: 431-436.

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

KAVIRATNE, M.; KHAN, S. M.; JARRA, W.; PREISER, P. R. 2002. Small variant STEVOR antigen is uniquely located within Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. **Eukaryotic cell.** **1**: 926-935.

KOCKEN, C. H.; DUBBELD, M. A.; VAN DER WEL, A.; PRONK, J. T.; WATERS, A. P.; LANGERMANS, J. A.; THOMAS, A. W. 1999. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. **Infect Immun.** **67**: 43-49.

KOCKEN, C. H.; NARUM, D. L.; MASSOUGBODJI, A.; AYIVI, B.; DUBBELD, M. A.; VAN DER WEL, A.; CONWAY, D. J.; SANNI, A.; THOMAS, A. W. 2000. Molecular characterization of *Plasmodium reichenowi* apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with *P. falciparum* AMA-1, and antibody-mediated inhibition of red cell invasion. **Mol. Biochem. Parasitol.** **109**: 147-156.

KROTOSKI, W. A.; COLLINS, W.E.; BRAY, R. S.; GARNHAM, P. C., COQSWELL, F.B.; GWADZ, R.W.; KILLICK-KENDRICK, R.; WOLF, R.; SINDEN, R.; KOONTZ,

L.C.; STANFILL, P.S. 1982. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. **Am J Trop Med Hyg.** **31**:1291-3.

KYES, S.; HORROCKS, P.; NEWBOLD, C. 2001. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. **Annu. Rev. Microbiol.** **55**: 673-707.

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

LEECH, J. H.; BARNWELL, J. W.; MILLER, L. H.; HOWARD, R. J. 1984. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **J. Exp. Med.** **159**: 1567–1575.

LI, F., DLUZEWSKI, A., COLEY, A. M., THOMAS, A., TILLEY, L., ANDERS, R. F., FOLEY, M. 2002. Phage-displayed peptides bind to the malarial protein apical membrane antigen-1 and inhibit the merozoite invasion of host erythrocytes. **J. Biol. Chem.** **277**: 50303–50310.

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

MAHANTY, S.; SAUL, A.; MILLER, L. H. 2003. Progress in the development of recombinant and synthetic blood-stage malaria vaccines. **J. Exp. Biol.** **206**: 3781-3788.

MARQUES, A. C.; PINHEIRO, E. A.; SOUZA, A. G. 1986. Um estudo sobre a dispersão de casos de malária no Brasil. **Rev. Bras. Mal. D. Trop.** **38**: 51-75.

MARSH, K. & HOWARD, R. J. 1986. Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: expression of diverse and conserved determinants. **Science.** **1986**: 150-153.

MARSH, K. ; OTOO, L. ; HAYES, R. J. ; CARSON, D. C. ; GREENWOOD, B. M. 1989. Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **83**: 293-303.

MENDIS, K. N.; IHALAMULLA, R. I. & DAVID, P. H. 1988. Diversity of *Plasmodium vivax*-induced antigens the surface of infected human erythrocytes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **38**: 42-46

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

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

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

MUNTEIS, E.; MELLIBOVSKY, L.; MARQUEZ, M. A.; MINGUEZ, S.; VAZQUEZ, E.; DIEZ, A. 1997. Pulmonary involvement in a case of *Plasmodium vivax* malaria. **Chest.** **111**: 834-835.

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

NDUNGU, F. M.; URBAN, B. C.; MARSH, K.; LANGHORNE. 2005. Regulation of immune response by Plasmodium-infected red blood cells. **Parasite. Immunol.** **27**: 373-384.

O'DONNELL, R. A.; SAUL, A.; COWMAN, A. F.; CRABB, B. 2000. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-1 across distantly related *Plasmodium* species. **Nature Med.** **6**: 91-95.

OFORI, M. F.; DODOO, D.; STAALSOE, T.; KURTZHALS, J. A.; KORAM, K.; THEANDER, T. G.; AKANMORI, B. D.; HVIID, L. 2002. Malaria-induced acquisition of antibodies to *Plasmodium falciparum* variant surface antigens. **Infect. Immun.** **70**: 2982-2988.

OGUARIRI, R. M.; BORRMANN, S.; KLINKERT, M. Q.; KREMSNER, P. G.; KUN, J. F. 2001. High prevalence of human antibodies to recombinant Duffy binding-like alpha domains of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte membrane protein 1 in semi-immune adults compared to that in nonimmune children. **Infect. Immun.** **69**:7603-7609.

OH, S. S.; VOIGT, S.; FISHER, D.; YI, S. J.; LEROY, P. J.; DERICK, L. H.; LIU, S.; CHISHTI, A. H. 2000. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is anchored to the actin-spectrin junction and knob associated histidine-rich protein in the erythrocyte skeleton. **Mol Biochem Parasitol** **108**: 237-247.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. 2004. <http://www.who.int/tcdr/diseases/malaria/>

PETERSON, M. G.; MARSHALL, V. M.; SMYTHE, J. A.; CREWETHER, P. E.; LEW, A.; SILVA, A.; ANDERS, R. F.; KEMP, D. J. 1989. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. **Mol. Cell. Biol.** **9**: 3151-3154.

POLLEY, S. D & CONWAY, D. J. 2001. Strong diversifying selection on domains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 gene. **Genetics** **158**: 1505-1512.

POUNIOTIS, D. S.; PROUDFOOT, O.; MINIGO, G.; HANLEY, J. L.; PLEBANSKI, M. 2004. Malaria parasite interactions with the human host. **J. Postgrad. Med.** **50**:30-34.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; CHANTRA, A.; VANIJANONTA, S. & WHITE, N. J. 1998. Pulmonary edema in *vivax* malaria. **Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.**, **92**: 421-422

RASTI, N.; WAHLGREN, M.; CHEN, Q. 2004. Molecular aspects of malaria pathogenesis. **F.E.M.S. Immunol. Med. Microbiol.** **41**: 9-26.

REEDER, J. C.; COWMAN, A. F.; DAVERN, K. M.; BEESON, J. G.; THOMPSON, J. K.; ROGERSON, S. J.; BROWN, G. V. 1999. The adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** **96**: 5198-5202.

ROWE, J. A.; SHAFI, J.; KAI, O. K.; MARSH, K.; RAZA, A. 2002. Nonimmune IgM, but not IgG binds to the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and correlates with rosetting and severe malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **66**: 692-699.

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

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

ROSA, D. S.; TZELEPIS, F.; CUNHA, M. G.; SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. 2004. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. **Immunol. Letters** **92**: 259-268.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - SVS, Ministério da Saúde. 2005. <http://dtr2001.saude.gov.br>.

SERGHIDES, L.; SMITH, T. G.; PATEL, S. N.; KAIN, K. C. 2003. CD36 and malaria: friends or foes? **Trends Parasitol.** **19**: 461-469.

SCHOFIELD, L.; GRAU, G.E. 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nat. Rev. Immunol.** **5**: 722-735.

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

SHERMAN, I. W.; EDA, S.; WINOGRAD, E. 2004. Erythrocyte aging and malaria. **Cell. Mol. Biol.** **50**:159-169.

SMITH, J. D.; SUBRAMANIAN, G.; GAMAIN, B.; BARUCH, D. I.; MILLER, L. H. 2000. Classification of adhesive domains in the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family. **Mol. Biochem. Parasitol.** **110**: 293-310.

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

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

SOARES, I.S., CUNHA, M.G., SILVA, M.N., SOUZA, J.M., DEL PORTILLO, H.A.; RODRIGUES, M.M. 1999b. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **60**: 357-363.

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

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

STAALSOE, T.; GIHA, H. A.; DODOO, D.; THEANDER, T. G.; HVIID, L. 1999. Detection of antibodies to variant antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by flow cytometry. **Cytometry**. **35**: 329-36.

SUH, K. N.; KAIN, K. C.; KEYSTONE, J. S. 2004. Malaria. **C. M. A. J.** **170**: 1693-1702.

TEBO, A. E.; KREMSNER, P. G.; LUTY, A. J. 2002. Fc-gamma receptor-mediated phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in vitro. **Clin. Exp. Immunol.** **130**: 300-306.

TONGREN, J. E.; DRAKELEY, C. J.; McDONALD, S. L. R.; REYBURN, H. G.; MANJURANO, A.; NKYA, W. M. M.; LEMNGE, M. M.; GOWDA, C. D.; TODD, J. E.; CORRAN, P. H.; RILEY, E. M. 2006. Target antigen, age and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria. **Infect. Immun.** **74**: 257-264.

THOMAS, A. W.; TRAPE, J. F.; ROGIER, C.; GONÇALVES, A.; ROSARIO, V. E.; NARUM, D. L. 1994. High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **51**: 730-740.

UDAGAMA, P. V.; ATKINSON, C. T.; PEIRIS, J. S.; DAVID, P. H.; MENDIS, K. N.; AIKAWA, M. 1988. Immunoelectron microscopy of Schuffner's dots in *Plasmodium vivax*-infected human erythrocytes. **Am J Pathol.** **131**: 48-52.

URBAN, B. C.; MWANGI, T.; ROSS, A.; KINYANJUI, S.; MOSOBO, M.; KAI, O.; LOWE, B.; MARSH, K.; ROBERTS, D. J. 2001. Peripheral blood dendritic cells in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. **Blood**. **98**: 2859-2861.

VALECHA, N.; BAGGA, A.; CHANDRA, J. & SHARMA, D. 1992. Cerebral symptoms with *P. vivax* malaria. **Indian Pediat.**, **29**: 1176-1178

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

WERNSDORFER, W.; H. & MCGREGOR, S.; I. 1988. Malaria: Principles and Practice. Malariology. Churchill Livingstone, Edinburg.

WILSON, R. J.; PHILLIPS, R. S. 1976. Method to test inhibitory antibodies in human sera to wild populations of *Plasmodium falciparum*. **Nature**. **263**:132-134.

VIII. ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

CERTIFICADO DE DEFESA

Certificamos, para os devidos fins, que o(a) Sr(a). **Tatiane Rodrigues de Oliveira** defendeu, em sessão pública no dia 24 de fevereiro de 2006, a Tese intitulada: "Estudo da resposta imune naturalmente adquirida contra proteínas recombinantes correspondentes a antígenos de estágios assexuados sanguíneos de *Plasmodium vivax*", tendo sido aprovado(a), fazendo jus ao título de **Doutor em Farmácia - Área de Análises Clínicas**.

São Paulo, 24 de fevereiro de 2006.

São Paulo, 24 de fevereiro de 2006.

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
Presidente da Comissão de Pós-Graduação/FCF/USP