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

Avaliação da resposta imune de anticorpos contra proteínas recombinantes derivadas do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *Plasmodium vivax* em indivíduos de áreas endêmicas de malária do Brasil

Bruno Corrêa Múfalo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2007

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

Avaliação da resposta imune de anticorpos contra proteínas recombinantes derivadas do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *Plasmodium vivax* em indivíduos de áreas endêmicas de malária do Brasil

Bruno Corrêa Múfalo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2007

Bruno Corrêa Múfalo

Avaliação da resposta imune de anticorpos contra proteínas recombinantes derivadas do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *Plasmodium vivax* em indivíduos de áreas endêmicas de malária do Brasil

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Irene da Silva Soares
Orientadora/ presidente

Sandro Rogério de Almeida
1º. examinador

Érika Martins Braga
2º. examinador

São Paulo, 26 de outubro de 2007.

Trabalho realizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro concedido pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Instituto do Milênio de Desenvolvimento e Tecnologia em Vacinas (IMTEV) - CNPq.

"Por mais crítica que seja a situação e as circunstâncias em que te encontrares, não te desesperes. Nas ocasiões em que tudo inspira temor, nada deves temer. Quando estiveres cercado de todos os perigos, não deves temer nenhum. Quando estiveres sem nenhum recurso, deves contar com todos. Quando fores surpreendido, surpreende o inimigo."

Sun Tzu

Dedicatória

A Deus, por fazer minha vida adquirir um sentido real, me proteger de todo o mal e me ensinar a caminhar.

Aos meus pais pela amizade, carinho, ensino, amor incondicional, incentivo ao estudo e apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos pela amizade, carinho e incentivo.

Às minhas amigas Carol Jimenez e Andréia Gomes, pela amizade, carinho e apoio científico.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Irene da Silva Soares pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, pela confiança em mim depositada e pela sua contribuição em minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Maurício Martins Rodrigues, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP-CINTERGEN por ter sido o responsável por me acolher e encaminhar para a Dra Irene Soares e também tornar viável o desenvolvimento desse projeto, disponibilizando seu laboratório para a realização das purificações em meu estudo.

Ao Prof. Dr. Sandro R. de Almeida e Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira, pelas sugestões e críticas na banca prévia.

A Profa. Dra. Erika M. Braga, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por ceder as amostras provenientes do município de Terra Nova do Norte (MT).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos de bancada: Carol, Andréia, Mayara, Ricardo, Vanessa, Juliana, Wesley e Mariana, pelo companheirismo, força de trabalho e alegria nos momentos oportunos. Nós nos encontraremos lá na frente!!!

Aos técnicos e amigos: Vanessa, Sônia, Alberto e Maurício, pela cooperação nos mais diversos assuntos e trabalho técnico/administrativo.

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

As funcionárias: Dorley, Claudinha, Carmem, Rose, Ana, Sueli, Dora e Edna pela amizade, simpatia, cafezinhos, controles, conselhos, etc.

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

SUMÁRIO

Lista de figuras. v

Lista de tabelas. vii

Lista de abreviaturas. viii

Resumo. x

Summary. xi

I. Introdução 1

1. Breve história, etiologia da malária e ciclo biológico do parasita 2

2. Epidemiologia da malária no mundo e no Brasil. 6

3. Perspectivas de controle da malária a partir do desenvolvimento de vacinas contra as formas sanguíneas do parasita 10

4. Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1). 11

4.1. Estrutura, função e polimorfismo 11

4.2. Papel dos anticorpos contra AMA-1 na imunidade contra a malária 16

4.3. Propriedades imunogênicas 18

(A) imunização experimental e no homem 18

(B) resposta imune humana contra proteínas recombinantes baseadas em AMA-1 de *P. vivax* 20

II. Objetivos 22

1. Objetivo Geral. 23

2. Objetivos Específicos. 23

III. Material e Métodos 24

1. População e áreas de estudo 25

2. Composição das soluções, tampões e meios de cultura utilizados 26

2.1. Soluções e tampões para eletroforese em gel de agarose (eletroforese de DNA) 26

2.2. Soluções e tampões para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) 26

2.3. Meios para cultura de bactérias 27

2.4. Tampões utilizados para obtenção das proteínas a partir dos sobrenadantes dos extratos bacterianos 27

2.5. Tampões utilizados para obtenção das proteínas a partir dos precipitados dos extratos bacterianos (corpos de inclusão) 28

2.6. Soluções e tampões para "immunoblotting" 28

2.7. Soluções e tampões para ensaios imunoenzimáticos (ELISA) 29

3. Construção dos plasmídios recombinantes contendo os diferentes domínios do gene que codifica a proteína AMA-1 de *P. vivax* 29

4. Expressão e purificação das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 32

4.1. Estabelecimento das condições de expressão das proteínas recombinantes em pequena escala 32

4.2. Expressão das proteínas recombinantes em média escala e padronização do protocolo de purificação 32

4.2.1. Expressão da proteína recombinante DII a partir do sobrenadante bacteriano (solúvel) 33

4.2.2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes DI, DIII, DI-II e DII-III a partir do precipitado bacteriano (corpos de inclusão) 34

5. Detecção das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 por "immunoblotting" utilizando soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1 ou anti-His. 35

6. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos humanos 36

6.1. Detecção de anticorpos IgG por ELISA 36

6.2. Detecção de anticorpos específicos das subclasses de IgG 37

6.3. Detecção de anticorpos IgM por ELISA. 38

7. Análise estatística 38

IV. Resultados 39

1. Construção dos plasmídios recombinantes contendo os genes que codificam os diferentes domínios de AMA-1 de *P. vivax*.. 40

2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes baseadas em AMA-1 de *P. vivax*. 40

3. Análise do reconhecimento imune das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 de *P. vivax*. 42

3.1. Reconhecimento das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 pelo anticorpo monoclonal anti-His e soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1. 42

3.2. Reconhecimento das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 por anticorpos IgM e IgG de indivíduos com infecção patente por *P. vivax* 46

3.3. Análise do efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgG contra as cinco proteínas recombinantes baseadas em AMA-1 de *P. vivax* 53

3.4. Determinação das subclasses de anticorpos IgG anti-AMA-1 durante a infecção patente 55

V. Discussão 56

VI. Conclusões 67

VII. Referências bibliográficas 69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do *Plasmodium*. 5

Figura 2. Estrutura da proteína AMA-1 de *Plasmodium*... 14

Figura 3. Seqüência de aminoácidos (aa) correspondentes ao ectodomínio da proteína AMA-1. 31

Figura 4. Análise em SDS-PAGE 15% das proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1 após purificação. 41

Figura 5. Análise das proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1 por immunoblotting. 43

Figura 6. Estabelecimento das condições de ligação na placa de ELISA das proteínas recombinantes baseadas em AMA-1. 44

Figura 7. Comparação do reconhecimento das proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1 pelo anticorpo monoclonal anti-His. 46

Figura 8. Prevalência de anticorpos IgM contra as proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1. 47

Figura 9. Prevalência de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1. 49

Figura 10. Ensaio de inibição por ELISA. 51

Figura 11. Ensaio de inibição por ELISA. 52

Figura 12. Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes baseadas nos domínios de AMA-1. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de casos de malária e variação do período, por UF de notificação, Amazônia Legal, 1999 a 2006. 9

Tabela 2 - Sumário de vacinações experimentais utilizando AMA-1 como antígeno. 21

Tabela 3 - Sumário das estratégias de obtenção das proteínas recombinantes baseadas nos diferentes domínios de AMA-1 de *P. vivax*. 31

Tabela 4 - Determinação das subclasses de IgG específicas capazes de reconhecer as proteínas recombinantes AMA-1. 55

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
β-ME	β-mercaptoetanol
A	Absorbância
Anti-His	Anticorpo monoclonal contra a cauda de histidina
DAB	3,3-diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPMix	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DO	Densidade óptica
Ig	Imunoglobulina
Kb	Quilo pares de bases
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase pela transcriptase reversa
M	Molar
mg	Miligrama
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MSP	“Merozoite Surface Protein”
N	Normal
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio bibásico
NaH_2PO_4	Fosfato de sódio monobásico
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
OPD	σ-Phenylenediamine
Pb	Pares de bases
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
rpm	Rotações por minutos
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TAE Tampão Tris-Acetato-EDTA
TEMED N,N,N',N' tetrametil etilenodiamida
Tris Hidroximetilaminometano
vol/vol volume/volume
µg Micrograma
µL Microlitro
µM Micromolar
AMA-1 "Apical Membrane Antigen 1"
Amp Ampicilina
BSA Albumina sérica bovina
CHAPSO 3-([3-Cholamidopropyl]dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propanesulfonate
$C_6H_8O_7$ Ácido cítrico
dp Desvio-padrão
DBP "Duffy Binding Protein"
DTT Ditiotreitol
EDTA Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
GSSG Glutationa oxidada
GSH Glutationa reduzida
HCl Ácido clorídrico
H_2O_2 Peróxido de hidrogênio
H_2SO_4 Ácido sulfúrico
HIS_6 Cauda de seis resíduos de histidina
IPTG "Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside"
IR Índice de reatividade
kDa Quilo Dalton
LB Luria Bertani
L Litro

RESUMO

O Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *Plasmodium sp* tem sido sugerido como candidato a compor uma vacina contra a malária. No presente estudo geramos cinco proteínas recombinantes baseadas em diferentes regiões do ectodomínio de AMA-1 de *Plasmodium vivax*, o qual compreende os domínios I a III, com intuito de mapear regiões particularmente imunogênicas da proteína. Cada uma das cinco proteínas recombinantes foi expressa em *Eschericha coli* a partir do vetor pET-28a em fusão com a cauda de histidina e purificadas por cromatografia de afinidade. As diferentes proteínas recombinantes foram comparadas, por ELISA, quanto ao reconhecimento por anticorpos IgM, IgG e subclasses de IgG de 100 indivíduos infectados por *P. vivax* procedentes de áreas endêmicas do Estado do Pará e 32 indivíduos não infectados que relataram terem sido acometidos de mais de 10 episódios prévios de malária procedentes do município de Terra Nova do Norte (MT). As freqüências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM foram mais baixas e variaram de 4% (DIII) a 36% (DII-III). Por outro lado, as freqüências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG para DI, DII, DIII, DI-II e DII-III foram 13%, 65%, 12%, 59% e 58%, respectivamente. Podemos observar que as proteínas recombinantes contendo o DII foram particularmente imunogênicas durante a infecção natural. Com o objetivo de avaliar se os epítopos reconhecidos nas cinco proteínas baseadas nos diferentes domínios estão expostos na proteína recombinante correspondente ao ectodomínio (DI-III) gerada previamente, realizamos ensaios de inibição por ELISA utilizando placas sensibilizadas com a proteína DI-III. Nossos resultados sugerem a presença de um maior número de epítopos comuns entre as proteínas recombinantes baseadas nos domínios I-II e ectodomínio de AMA-1. Além disso, observamos que a proporção de indivíduos que apresentaram anticorpos contra DII, DI-II e DII-III aumentou de acordo com o maior número de exposições prévias ao *P. vivax*. As subclasses de IgG que predominaram contra todas as proteínas foram IgG1, IgG3 e IgG4. Em conjunto, nossos resultados sugerem que as proteínas recombinantes contendo o DII podem ser exploradas em futuros estudos de indução de imunidade protetora contra malária *vivax* em primatas não-humanos.

SUMMARY

The Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1) of *Plasmodium sp* has been suggested as a vaccine candidate against malaria. Herein, to identify novel antigenic epitopes on the *Plasmodium vivax* AMA-1 ectodomain, we have generated five recombinant proteins, comprising domains I to III. All recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli* using the pET-28a vector system fused to hexa-histidine tag for purification by affinity chromatography. Recognition of recombinant proteins by antibodies was evaluated using a panel of sera collected from one-hundred *P. vivax*-infected patients resident in the State of Pará and from thirty-two non-infected individuals, living in the State of Mato Grosso and who have faced a minimum of ten malaria episodes. ELISA analyses demonstrated that protein recognition was highly dependent on IgG antibodies, raging from 13%, 65%, 12%, 59% up to 58%, respectively for DI, DII, DIII, DI-II and DII-III domains. Indeed, we have noticed a lower frequency of recognition, ranging from 4% (DIII) to 36% (DII-III), by sera from those individuals that presented IgM antibodies. Collectively, these data suggest that the DII domain is particularly immunogenic during natural infections. Next, to verify whether the epitopes recognized in these five different recombinant proteins were also expressed in a recombinant protein spanning domains I through III (DI-III), we carried out ELISA inhibition assays using plates coated with the DI-III recombinant protein. Our findings revealed the presence of a higher number of common epitopes among recombinant proteins based on domains I-II and the AMA-1 ectodomain. Moreover, we observed that the proportion of individuals who had presented antibodies against DII, DI-II and DII-III domains increased according to the previous number of *P. vivax* episodes. Overall, IgG1, IgG3 and IgG4 antibodies were prevalent to all proteins. Taken together, our results demonstrated that DII domain is highly recognized, mainly by IgG antibodies; and open promising perspectives to use this region as an experimental vaccine in non-human primates capable to induce protective immunity against *vivax* malaria.

I. INTRODUÇÃO

1. Breve história, etiologia da malária e ciclo biológico do parasita.

A descoberta de que a malária é uma hemoparasitose aconteceu em 1880, quando o francês Louis Alphonse Laveran conseguiu observar organismos em movimento ao examinar, a fresco, o sangue de um paciente com a doença. Em 1891, a presença e a morfologia desses parasitas puderam ser demonstradas em esfregaços sangüíneos corados por um método desenvolvido por Romanowsky. A transmissão da doença, no entanto, só foi elucidada em 1897, por Ronald Ross, que identificou a participação de mosquitos como vetores da doença e descreveu o ciclo do parasita no hospedeiro invertebrado (revisto por WHITE NJ, 1996).

Os parasitas causadores da malária pertencem ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. Das mais de 200 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros (RICH & AYALA, 2003), somente quatro parasitam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, este último ocorrendo apenas em regiões restritas do continente Africano.

O *Plasmodium* apresenta um ciclo biológico caracterizado por uma fase sexuada, que ocorre na fêmea do mosquito do gênero *Anopheles,* e três etapas de reprodução assexuada, sendo que uma ocorre no hospedeiro invertebrado e as outras duas no hospedeiro vertebrado. O ciclo de vida no hospedeiro vertebrado se inicia com a inoculação de esporozoítas na derme durante o repasto sangüíneo do mosquito. Foi demonstrado recentemente, em modelo murino, que após a picada do mosquito, os esporozoítas, mesmo apesar de sua alta motilidade, eles permanecem na derme durante um longo período de tempo (podendo ultrapassar 7 horas após a picada), realizando movimentos aleatórios e de padrão tortuoso. No intervalo de uma hora, aproximadamente 50% dos esporozoítas deixam a derme. Dentre estes, 70% atingem os vasos sangüíneos dirigindo-se para o fígado invadindo hepatócitos,

enquanto os 30% restantes invadem os vasos linfáticos. Estes esporozoítas levados através dos vasos linfáticos apresentam um movimento de deslizamento lateral, sendo detectados posteriormente nos linfonodos, onde entram em contato com células do sistema imune e apenas uma pequena porcentagem se desenvolve na forma exoeritrocítica (AMINO *et al.*, 2005).

No interior dos hepatócitos, os esporozoítas se transformam 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 parasitas permanecem em estado de latência nos hepatócitos, sendo assim denominados hipnozoítas, formas responsáveis pelas recaídas da malária alguns meses depois da infecção primária. Estudos muito recentes demonstraram que os hepatócitos, cada um contendo por volta de 10.000 merozoítas, modificam-se para formar as estruturas denominadas merosomas, cheias de parasitas, as quais migram para a circulação sangüínea conseguindo escapar dos fagócitos. O envoltório dos merosomas, constituído de hepatócitos mortos, deveria normalmente sinalizar para que ocorresse a fagocitose; porém, os parasitas inibem a exposição da fosfatidilserina na superfície. Desta forma, os merosomas parecem assegurar a migração dos parasitas para a corrente sangüínea e sua evasão da imunidade do hospedeiro (STURM *et al.*, 2006). Invadindo os eritrócitos, inicia-se a segunda etapa do ciclo assexuado do parasita (ciclo eritrocítico).

É importante ressaltar que, ao contrário do *P. falciparum*, que invade eritrócitos jovens e maduros, o *P. vivax* infecta e se multiplica exclusivamente em eritrócitos jovens (reticulócitos). O *P. vivax* invade células que expressam o grupo sangüíneo Duffy, que funciona como ligante para uma proteína encontrada no complexo apical (micronemas) de *P. vivax*, denominada “Duffy Binding Protein”

(DBP) (BARNWELL *et al*., 1989). Entretanto, recentemente surgiram evidências de transmissão de *P. vivax* em indivíduos Duffy negativos em populações do Quênia (RYAN *et al.,* 2006) e do Brasil (CAVASINI *et al*., 2007*).*

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 de proteínas derivadas do parasita no citoesqueleto e na superfície celular (revisto por SHERMAN *et al*., 2004).

Nos eritrócitos/reticulócitos, os merozoítas originam os trofozoítas que amadurecem e se dividem por esquizogonia, gerando os esquizontes sangüíneos. Os merozoítas liberados pela ruptura da célula sangüínea podem invadir novos eritrócitos mantendo assim o ciclo. A Figura 1 representa uma ilustração do ciclo de vida do *Plasmodium* (Adaptado de <http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/16cm05/1116/16protists.htm>. Acesso em 24 de novembro 2006).

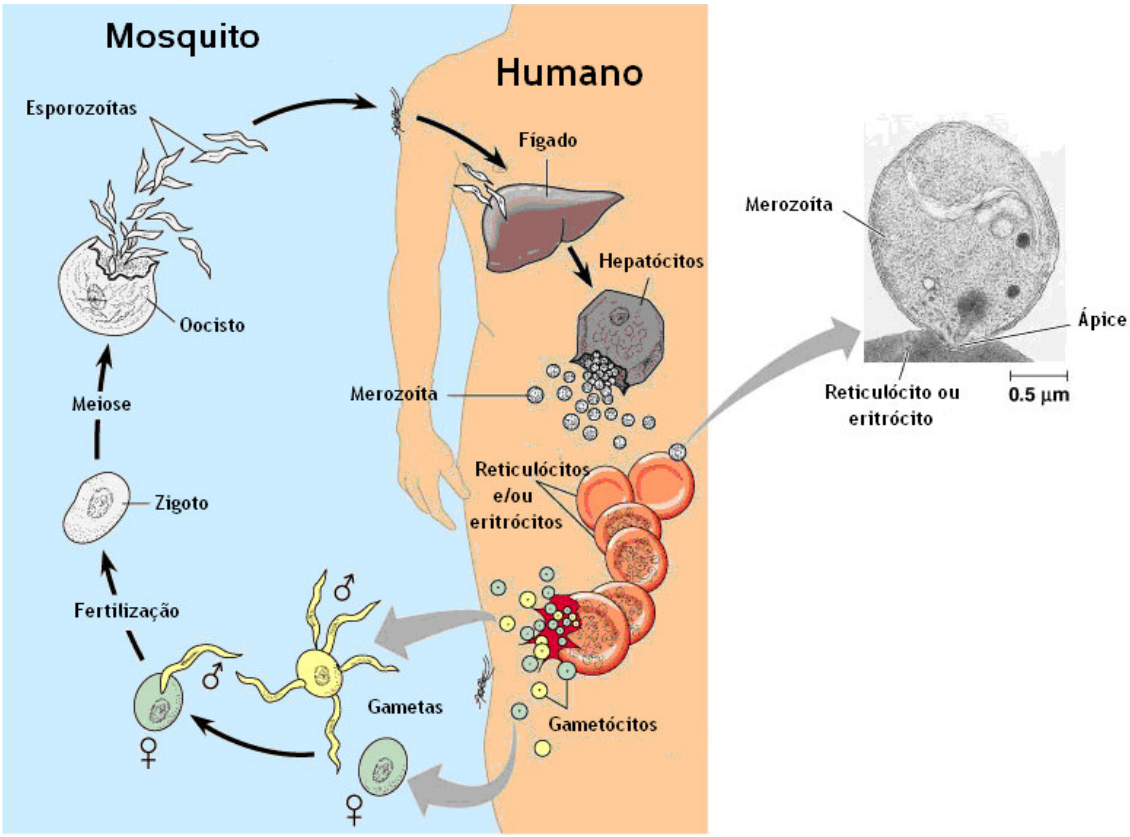


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do *Plasmodium*.

A principal característica clínica da malária em indivíduos não-imunes é o paroxismo malárico, constituído por febre, calafrios e cefaléia. Na malária causada pelo *P. vivax* a febre se repete com periodicidade de 48 horas e a infecção não costuma evoluir com aparecimento de complicações sistêmicas, daí ser chamada de febre terçã benigna. Por outro lado, na malária causada pelo *P. falciparum*, a febre é intermitente com periodicidade irregular, se repete a cada 48 horas e tem características de febre terçã maligna, pois a infecção tende a evoluir com complicações. Entretanto, a periodicidade febril é pouco comum nos dias atuais, em decorrência de tratamento precoce, realizado ainda na fase de assincronismo das esquizogonias sangüíneas.

Embora a infecção por *P. vivax* raramente seja letal, têm sido relatados em países da América do Sul (Brasil e Colômbia) e da Ásia (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; LACERDA *et al*., 2006), edema pulmonar (MUNTEIS *et al*., 1997; PUKRITTAYAKAMEE *et al*., 1998; LACERDA *et al*., 2006) e insuficiência renal (AHMAD *et al.,* 1989; LACERDA *et al*., 2006). No caso específico do Brasil, há relatos de formas graves e letais por *P. vivax*. As principais complicações causadas pelo *P. vivax* (relatadas entre os anos de 2001 e 2003) são: alterações hematológicas, ruptura esplênica, alterações renais e pulmonares (LACERDA *et al*., 2006).

Após um certo período de replicação assexuada, parte das formas sangüíneas se diferencia em gametócitos masculinos e femininos e estes são ingeridos durante um novo repasto sangüíneo pela fêmea do *Anopheles* em indivíduos infectados. O processo de fertilização entre os gametas que ocorre no hospedeiro invertebrado origina o oocineto que, ao migrar para a parede intestinal, transforma-se em oocisto, multiplicando-se por esporogonia e originando 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 o principal fator de sustentação da dificuldade econômica nas sociedades mais pobres do mundo e é responsável por 2% da mortalidade global (BREMAN *et al*., 2004; SACHS & MALANEY, 2002). Atualmente, a malária afeta

cerca de 300 a 500 milhões de pessoas (WHO, 2005), causando entre 700.000 e 2,7 milhões de mortes anualmente. Aproximadamente 2,4 bilhões de pessoas estão expostas à infecção principalmente por *P. falciparum* e *P. vivax,* o que corresponde a cerca de 40% da população mundial, tornando-se a principal causa de morbidade e mortalidade em áreas da África, Ásia, Oriente Médio, América do Sul, América Central e Oceania. Porém, esta distribuição é desigual, pois a maioria das mortes acontece na África entre crianças menores de cinco anos de idade e em gestantes. Em média, três crianças morrem a cada minuto como resultado da infecção por *P. falciparum*, a mais letal das espécies (GIERSING *et al.*, 2005).

O *P. vivax* é a segunda mais prevalente espécie causadora de malária no mundo, representando anualmente cerca de 80 milhões de casos, ocorrendo principalmente no Oriente Médio, Ásia, oeste do Pacífico, América do Sul e América Central. Nas Américas, o *P. vivax* está presente em 20 países. A maioria dos casos de malária *vivax* da América do Sul ocorre na Colômbia e Brasil. Individualmente, a Colômbia representa 65% dos casos clínicos reportados anualmente (HIGGS & SINA, 2005). De modo geral, na América do Norte e Sul, a intensidade de transmissão é geralmente de baixa a moderada e a espécie predominante é o *P. vivax*. Porém, na Guiana, Guiana Francesa e no Suriname, a intensidade de transmissão é muito alta e a espécie predominante é o *P. falciparum* (MENDIS *et al.*, 2001).

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 do Brasil.

No Brasil, até o ano de 1988, o número de casos de malária causada por *P. falciparum* e *P. vivax* era similar, 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. Mais de 99% dos casos de malária ocorrem na região da Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) (FUNASA, MS, 2003). Estudos epidemiológicos associam a expansão da doença nos últimos anos ao processo migratório da população, ocasionado pelo desenvolvimento intensificado da Amazônia principalmente nas décadas de 1970 e 1980 (MARQUES *et al.*, 1986), proporcionando impacto socioeconômico sobre essas regiões (CAMARGO *et al.*, 1994). A década de 1990 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), que visa impedir a mortalidade e reduzir a morbidade e perdas socioeconômicas em razão da doença. Entretanto, na Tabela 1, que apresenta o número de casos notificados na Amazônia Legal de 1999 a 2006, pode-se verificar que, apesar de a redução até 2002 ter sido expressiva, houve a partir desse ano um progressivo aumento, refletindo as dificuldades na sustentação das estratégias até então utilizadas para o controle da malária.

Em 2006 foram registrados 540.047 casos de malária no Brasil, sendo o *P. vivax* responsável por 73,4% destes casos, o que corresponde a aproximadamente 396.000 casos de malária desta espécie. A distribuição dos casos de malária registrados demonstra que a ocorrência da doença não é homogênea, pois os estados do Amazonas, Rondônia, Pará e Acre foram responsáveis por 87,9% dos

casos. A variação de 2006 em relação a 2005 mostra redução de casos em sete estados, entretanto os estados do Acre e Amapá apresentaram um aumento de 63,4% e 3,8%, respectivamente. A maior redução foi no estado do Tocantins, em torno de 47% (Tabela 1).

Tabela 1. Número de casos de malária e variação do período, por UF de notificação, Amazônia Legal, 1999 a 2006.

UF	Número de casos / Ano								Variação 2005/2006 (%)
	1.999	2.000	2.001	2.002	2.003	2.004	2.005	2.006	
AC	23.730	21.560	7.774	9.216	12.264	31.720	57.242	93.537	63,4
AM	167.722	96.026	48.385	70.223	140.970	147.482	223.892	180.290	-19,5
AP	28.646	35.278	24.487	16.257	16.651	20.671	28.059	29.123	3,8
MA	54.800	78.818	39.507	16.000	11.434	14.470	11.188	9.400	-16,0
MT	10.950	11.767	6.832	7.085	5.022	6.484	8.437	6.577	-22,0
PA	248.233	278.204	186.367	149.088	115.684	109.829	123.422	100.436	-18,6
RO	63.296	54.074	57.679	71.224	93.852	107.166	118.611	100.273	-15,5
RR	36.238	35.874	16.028	8.036	11.819	26.201	31.964	20.036	-37,3
TO	2.031	1.640	1.244	1.130	1.211	850	717	375	-47,7
Total	635.646	613.241	388.303	348.259	408.907	464.873	603.532	540.047	-10,5

Fonte: Sismal, Sivep-Malária/SVS/MS. Dados sujeitos a atualizações

Vários fatores dificultam o controle da endemia da malária, como o meio ambiente nos arredores das florestas onde a infecção é prevalente, condições socioeconômicas precárias da população, a ineficácia dos inseticidas para o controle dos vetores e a resistência dos parasitas à drogas antimaláricas. Visando impedir a expansão da malária, são necessários além da manutenção de programas permanentes de controle, que contribuem para minimizar seus efeitos graves, novas ações de controle do vetor, novas drogas e desenvolvimento de uma vacina segura e eficiente contra a malária.

3. Perspectivas de controle da malária a partir do desenvolvimento de vacinas contra as formas sangüíneas do parasita.

As formas sangüíneas do parasita são as responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Portanto, uma vacina contras estas formas preveniria ou reduziria a morbidade e a mortalidade dessa endemia por meio da eliminação ou redução da carga parasitária.

Embora a complexidade do ciclo biológico do parasita, polimorfismo antigênico, estratégias de escape imune e a biologia dos vetores sejam 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).

Pesquisas na caracterização de antígenos-alvos de *P. vivax* para o desenvolvimento de uma vacina têm sido limitadas primeiramente pela ausência de um sistema eficiente de cultivo do parasita *in vitro* e, segundo, pelas baixas parasitemias obtidas diretamente de pacientes infectados. Porém, os estudos iniciais visando uma melhor compreensão sobre a imunidade na malária foram conduzidos utilizando-se a tecnologia do DNA recombinante, que possibilitou o isolamento, a clonagem e o seqüenciamento de genes que codificam antígenos imunologicamente relevantes de *Plasmodium,* permitindo a obtenção de diversas proteínas recombinantes correspondentes, as quais estão sendo utilizadas em estudos imunoepidemiológicos e imunizações experimentais, visando uma melhor

compreensão da resposta imune humana e o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax* (revisto por SOARES & RODRIGUES, 1998; BARRERO *et al.*, 2005; AREVALO-HERRERA *et al.*, 2005; COLLINS *et al.*, 2006). Além disso, com a recente finalização do projeto genoma de *P. vivax* (CARLTON J., 2005), existe a expectativa de avanços na área proteômica que objetivam a caracterização de novos antígenos e o estudo de suas funções biológicas.

Segundo MILLER *et al.* (1998a; 1998b), a vacinação baseada em moléculas imunogênicas e funcionais do ciclo de vida do parasita, tais como aquelas necessárias para a invasão do eritrócito, tem o potencial de reduzir a mortalidade e a morbidade grave associadas à malária. Desta forma, proteínas presentes na superfície do merozoíta são candidatas a compor uma vacina, pois estas estão acessíveis a anticorpos presentes no plasma que podem bloquear a invasão das células do hospedeiro pelos parasitas.

Entre as proteínas de merozoítas que têm sua função biológica ligada à invasão dos eritrócitos/reticulócitos está o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1).

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

4.1. Estrutura, função e polimorfismo.

AMA-1 de *Plasmodium* é uma proteína transmembrana altamente conservada, do tipo 1 (WATERS *et al.*, 1990), possuindo ortólogos em pelo menos duas espécies do filo Apicomplexa: *Babesia bovis* (GAFFAR *et al.*, 2004) e *Toxoplasma gondii* (DONAHUE *et al.*, 2000; HEHL *et al.*, 2000). No *Plasmodium*, AMA-1 está presente inicialmente nos micronemas e, posteriormente, na superfície

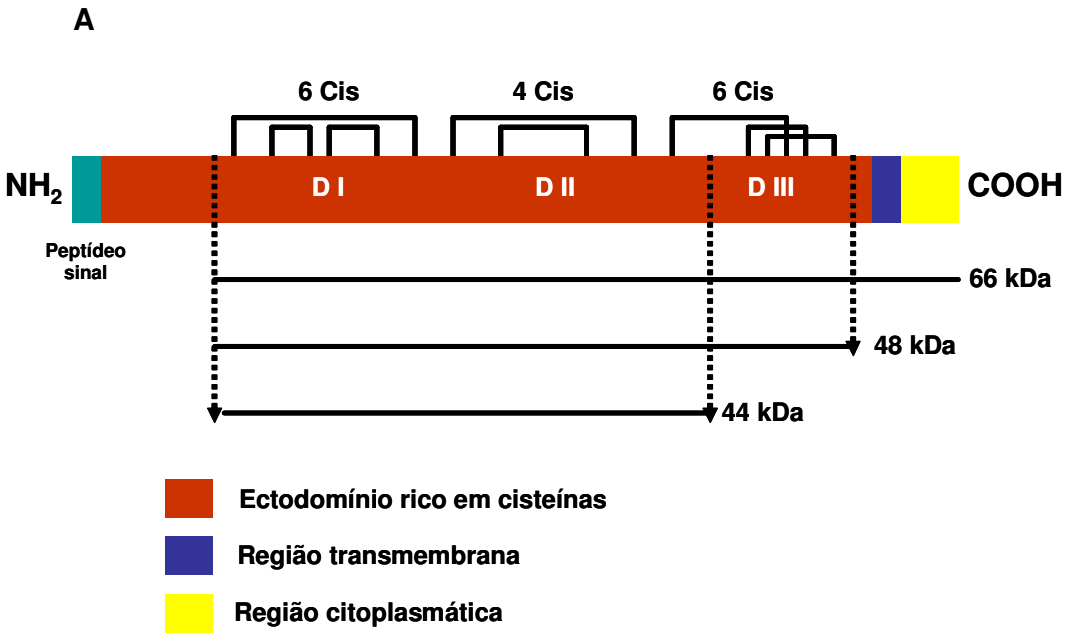
de merozoítas maduros (PETERSON *et al.*, 1989; CREWTHER *et al.*, 1990; NARUM & THOMAS, 1994), enquanto no *Toxoplasma* AMA-1 está isolada nos micronemas (DONAHUE *et al.*, 2000; HEHL *et al.*, 2000). Esta proteína é constituída por uma pro-seqüência, um ectodomínio rico em cisteínas, um domínio transmembrana e uma região citoplasmática (Figura 2A). As pontes dissulfídicas formadas pelos resíduos de cisteínas promovem a separação do ectodomínio em três domínios (I, II e III) (HODDER *et al.,* 1996).

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

Recentemente, a estrutura cristalográfica de AMA-1 de *P. vivax* foi elucidada (PIZARRO *et al.*, 2005) a partir de uma proteína recombinante representando o ectodomínio, produzida na levedura *Pichia pastoris* (KOCKEN *et al.*, 1999) (Figura 2B). A resolução desta estrutura confirmou o tipo de conformação inicialmente

sugerido pela seqüência primária de aminoácidos da proteína, sendo constituída por três domínios que possuem 16 resíduos de cisteína que formam 8 ligações dissulfídicas, dos quais dois (I e II) formam módulos “PAN”, freqüentemente associados a interações proteína-proteína e proteína-carboidrato (PIZARRO *et al.*, 2005). A Figura 2B mostra a ilustração desta estrutura tridimensional.

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



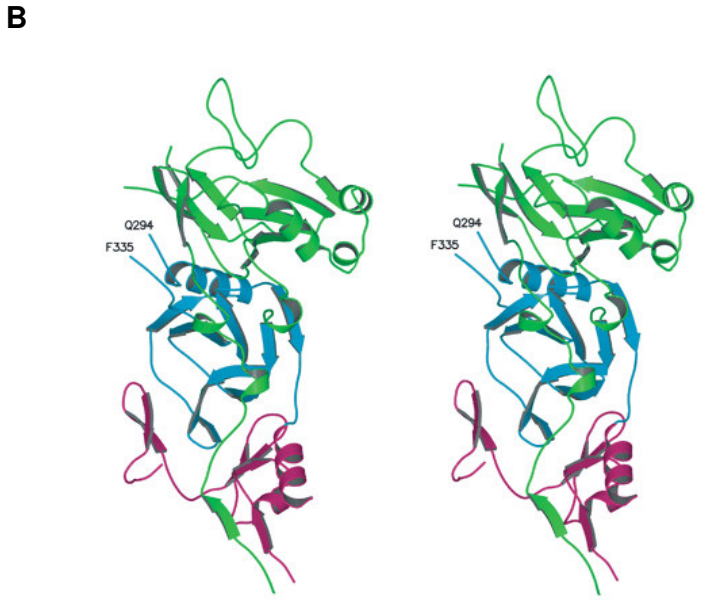


Figura 2. Estrutura da proteína AMA-1 de *Plasmodium.* (A) Representação esquemática da proteína AMA-1 de *Plasmodium* (HOWELL *et al.*, 2003) destacando os fragmentos resultantes da clivagem proteolítica da proteína; **(B)** Ilustração representando a estrutura tridimensional obtida pela análise cristalográfica de uma proteína recombinante baseada no ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax* (PIZARRO *et al.*, 2005). Nesta ilustração em "stereo view", as fitas em *verde* representam a estrutura do domínio I; em *azul*, o domínio II e, em *vermelho*, o domínio III.

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 epítopos impedindo, assim, a invasão de novos eritrócitos pelos merozoítas (HEALER *et al*., 2004).

A comparação da seqüência de nucleotídeos de *ama-1* de *P. vivax* com *ama-1* de *P. knowlesi, P. fragile, P. chabaudi* e *P. falciparum* revelou que a identidade entre a seqüência de *P. vivax* e das demais espécies é, respectivamente, de 86%, 83%, 57% e 52%. A baixa identidade entre a seqüência de nucleotídeos de *ama-1* de *P. falciparum* se deve a uma inserção de 42 aminoácidos na região N-terminal da proteína AMA-1 de *P. falciparum* (CHENG & SAUL, 1994).

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

Em estudos realizados por CHESNE-SECK *et al*. (2005), os autores compararam a estrutura cristal de PvAMA-1 e PfAMA-1 e examinaram a distribuição tridimensional dos sítios polimórficos. Consideraram polimórficos os sítios que tinham pelo menos duas seqüências que diferiam do consenso de aminoácidos. Os autores observaram que todos os sítios polimórficos estão expostos na superfície da proteína e identificaram em PfAMA-1 32 sítios no DI (15,5% do domínio), 11 sítios no DII (8% do domínio), 9 sítios no DIII (8,6% do domínio), demonstrando que o DI é a região mais polimórfica da proteína. No caso específico de PvAMA-1, foram identificados 20 sítios no DI, 12 sítios no DII e 2 sítios no DIII. Em comparação com *P. falciparum*, os estudos sobre diversidade genética demonstram que PvAMA-1 e PfAMA-1 devem estar sob diferentes pressões em termos de seleção imune e estrutural e/ou limitação funcional (GUNASEKERA *et al*., 2007). Esta suspeita tem sido sugerida também por PUTAPORNTIP *et al.* (2001), quando verificaram as diferenças entre PvTRAP e PfTRAP.

No Brasil, um único estudo sobre a diversidade antigênica de AMA-1 de *P. vivax* foi realizado até o presente momento a partir da análise de um fragmento de 414 pb correspondente à região polimórfica do gene (N-terminal) a partir de 20 isolados de *P. vivax* procedentes de diferentes localidades da região Amazônica. Neste estudo foi demonstrado que o gene *ama-1* apresenta um polimorfismo limitado nos isolados do Brasil (RODRIGUES *et al*., 2005).

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

Diversas linhas de evidências indicam papel importante para os anticorpos contra AMA-1 na imunidade contra a malária. Estudos iniciais demonstraram que anticorpos monoclonais contra AMA-1 de *P. knowlesi* são capazes de inibir a

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

O mecanismo pelo qual estes anticorpos protetores agem ainda não está definido, mas dois mecanismos principais de inibição da invasão por anticorpos anti-AMA1 têm sido propostos: i) bloqueio direto da função de AMA-1 (THOMAS *et al*., 1984; DUTTA *et al*., 2005) e ii) “cross-linking” e conseqüente inibição da dispersão de AMA-1 sobre a superfície apical do parasita (DUTTA *et al*., 2003; 2005). O bloqueio direto da função de AMA-1 por anticorpos inibidores da invasão é sugerido com base em observações de que fragmentos Fab dos anticorpos monoclonais R31/C2 (THOMAS *et al*., 1984) e 4G2 (DUTTA *et al*., 2005) são inibidores eficientes da invasão do parasita *in vitro*. A possibilidade de que ambos os mecanismos atuem concomitantemente não é descartada.

KOCKEN *et al*. (1998) mapearam o epítopo de AMA-1 reconhecido por um anticorpo monoclonal (4G2) capaz de inibir a invasão de *P. falciparum in vitro*. Diferentes combinações dos domínios de PfAMA-1 (I-II, II-III, I-II-II e I, II e III separadamente) foram expressas em *Pichia pastoris* e testadas quanto ao

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

4.3. Propriedades imunogênicas.

(A) Imunização experimental e no homem.

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

induzida pela imunização foi considerada efetiva, pois foi capaz de manter a parasitemia baixa em relação ao grupo não imunizado (STOWERS *et al.*, 2002).

Com base nestes resultados promissores, foram realizados estudos clínicos de Fase I utilizando uma formulação baseada nesta proteína emulsificada na presença do adjuvante Alhydrogel, demonstrando que esta foi bem tolerada e capaz de induzir anticorpos do tipo IgG especificamente dirigidos contra PfAMA-1 em 92% dos indivíduos após três imunizações (MALKIN *et al.*, 2005). Por outro lado, em um segundo teste clínico de fase I, utilizando-se PfAMA-1 emulsificada em adjuvante Montanide ISA720, SAUL *et al.* (2005) observaram que somente 6 dos 29 indivíduos vacinados soroconverteram. Destes, somente 1 desenvolveu altos títulos de anticorpos. Os autores atribuíram os resultados desapontadores a uma possível perda na potência da formulação vacinal durante o curso do estudo e acreditam ser importante conduzir outros testes clínicos de vacinação utilizando PfAMA-1.

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

A Tabela 2 apresenta um sumário das imunizações experimentais baseadas em AMA-1 realizadas até o presente momento utilizando, como antígenos, tanto proteína nativa purificada como DNA plasmidial e proteínas recombinantes, obtidas a partir de diferentes sistemas de expressão (bactérias, levedura, baculovírus). Os

resultados obtidos reforçam a importância desta proteína para compor, junto com outras proteínas, uma vacina contra a malária.

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

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. Posteriormente, outros estudos caracterizando a resposta imune humana naturalmente adquirida contra PvAMA-1 foram realizados em áreas endêmicas de malária do Brasil (OLIVEIRA *et al.* 2006; MORAIS *et al*., 2006) e Sri Lanka (WICKRAMARACHCHI *et al*., 2006) confirmando que esta proteína é altamente imunogênica em infecções naturais. É importante ressaltar que estudos realizados em áreas endêmicas de malária demonstraram que anticorpos específicos para o ectodomínio de AMA-1 de *P. falciparum* (POLLEY *et al.,* 2004) e *P. vivax* (MORAIS *et al.* 2006) estão significativamente associados com a redução de risco de malária clínica.

No presente trabalho nos propusemos a dar continuidade a estes estudos avaliando a resposta imune de anticorpos naturalmente adquirida em indivíduos de áreas endêmicas de malária da Região Amazônica contra proteínas baseadas nos diferentes domínios de AMA-1 de *P. vivax* a fim de mapear regiões particularmente antigênicas da proteína.

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

Espécie	Modelo animal	Tipo de antígeno	Resultado	Referência
P. knowlesi	Macaco	Proteína nativa	Proteção contra a infecção	DEANS *et al*. (1988)
P. fragile	Macaco	Proteína recombinante	Proteção contra a infecção	COLLINS *et al*. (1994)
P. chabaudi	Camundongo	Proteína recombinante	Proteção contra a infecção	CREWTHER *et al*. (1996)
P. chabaudi	Camundongo	Proteína recombinante	Proteção contra a infecção	ANDERS *et al*. (1998)
P. vivax	Camundongo	DNA plasmidial	Anticorpos reconhecem a proteína nativa por imunofluorescência	ROGERS *et al*. (1999)
P. vivax	Macaco	Proteína recombinante	Altamente imunogênica em macacos	KOCKEN *et al*. (1999)
P. yoelii	Camundongo	Proteína nativa	Proteção contra a infecção	NARUM *et al*. (2000)
P. falciparum	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de inibir a invasão de eritrócitos *in vitro*	HODDER *et al*. (2001)
P. falciparum	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de inibir a invasão de eritrócitos por parasitas homólogos	KOCKEN *et al*. (2002)
P. falciparum	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de inibir o crescimento do parasita	KENNEDY *et al*. (2002)
P. falciparum	Macaco	Proteína recombinante	Proteção contra a infecção	STOWERS *et al*. (2002)
P. falciparum	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de inibir a invasão de eritrócitos por parasitas homólogos	DUTTA *et al*. (2002)
P. falciparum	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de inibir o crescimento do parasita	LALITHA *et al*. (2004)
P. falciparum	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de inibir a invasão de eritrócitos *in vitro*	DUTTA *et al*. (2005)

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral.

Caracterizar a resposta imune naturalmente adquirida contra proteínas recombinantes derivadas do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *Plasmodium vivax* em indivíduos de áreas endêmicas de malária a fim de mapear regiões particularmente antigênicas da proteína.

2. Objetivos específicos.

2.1 Gerar em *E. coli* cinco proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios da proteína AMA-1 de *P. vivax;*

2.2 Avaliar comparativamente, por ELISA, o reconhecimento imune das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 por anticorpos IgM, IgG e subclasses de IgG;

2.3 Verificar se existe correlação entre a resposta de anticorpos IgG e o número de episódios prévios de malária.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. População e áreas de estudo.

Um total de 132 amostras de sangue foi incluído neste estudo. Amostras de soro de 100 indivíduos infectados pelo *P. vivax* procedentes de diferentes localidades do Estado do Pará foram utilizadas nos ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-AMA-1. Estas amostras já estavam disponíveis e foram utilizadas em estudos anteriores sobre a resposta imune humana a AMA-1 (RODRIGUES *et al.*, 2005). As outras 32 amostras de sangue foram coletadas de indivíduos não-infectados que tinham relatado terem acima de 10 episódios prévios de malária procedentes do município de Terra Nova do Norte (MT). Estas amostras foram gentilmente cedidas pela Dra. Érika Braga e já haviam sido utilizadas em estudos anteriores (BRAGA *et al.*, 2002; CERÁVOLO *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2006).

Doze amostras de sangue de indivíduos adultos sadios sem história clínica de malária foram cedidas pelo Dr. Orlando C. Ferreira Júnior, do Departamento de Hemoterapia do Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP. Somadas a estas, treze amostras de sangue de indivíduos adultos sadios que nunca estiveram em área endêmica de malária foram coletadas no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Estas amostras foram testadas com o objetivo de estabelecer o “cutoff" para cada proteína recombinante por ELISA.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da FCF/ USP em 24/04/2006.

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

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

- Gel de agarose: 1% agarose (Invitrogen); TAE (1x); 1 μg/mL brometo de etídio (Invitrogen).
- TAE (Tris-Acetato-EDTA)(1x): 40 mM Tris-acetato; 1 mM 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.

2.2. Soluções e tampões para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%).

- 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 de 5 mL).
- Tampão de amostra para SDS-PAGE (4x): 10% glicerol; 4% SDS; 100 mM 2-mercaptoetanol (Bio-Rad); 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% de azul de bromofenol (Bio-Rad).
- Tampão de corrida (1x): 35 mM SDS; 160 mM glicina; 25 mM Tris-HCl pH 8,3.
- Solução corante: 1% Coomassie blue R250 (USB); 45% Metanol; 10% ácido acético.
- Solução descorante: 45% Etanol; 10% ácido acético.

2.3. Meios para cultura de bactérias.

- LB (Luria Bertani): 2% LB broth base (Invitrogen); 0,5% NaCl (Synth) pH 7,0.

- LB-kan: LB; 30 µg/mL de kanamicina (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 $MgCl_2$; 20 mM glicose.

2.4. Tampões utilizados para obtenção das proteínas a partir dos sobrenadantes dos extratos bacterianos.

Tampões	Proteína (DII)
Tampão de lise	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 1mg/mL Lisozima; 1 mM PMSF
Tampão de equilíbrio (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl
Tampão de lavagem (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 1 mM PMSF; 20% Glicerol; pH final 7,0
Tampão de eluição (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 1 mM PMSF; 20% Glicerol; 250 – 400 mM Imidazol; pH final 7,0
Tampão de diálise (cromatografia de troca iônica)	20 mM Tris-HCl; 1 mM PMSF
Tampão de diálise para estoque da proteína	PBS; 1 mM PMSF

2.5. Tampões utilizados para obtenção das proteínas a partir dos precipitados dos extratos bacterianos (corpos de inclusão).

Tampões	AMA-1 DI, DIII, DI-II e DII-III
Tampão de lise	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 200 mM NaCl; 10 mM EDTA; 200 µg/mL Lisozima; 1 mM PMSF
Tampão de lavagem dos corpos de inclusão	10 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 1% Chapso
Tampão de solubilização	10 mM Tampão Fostato de Sódio; 500 mM NaCl; 8 M Uréia; 10% Glicerol
Tampão de equilíbrio (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 8 M Uréia; 5 mM Imidazol; 10% Glicerol
Tampão de lavagem (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 8 M Uréia; 5 mM Imidazol; 10% Glicerol
Tampão de "refolding" (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol; 10% Glicerol; 0,5 mM GSSG; 5 mM GSH; 0,1% Triton
Tampão de eluição (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 10% Glicerol; 0,5 mM GSSG; 5 mM GSH; 0,1% Triton; 300 mM Imidazol
Tampão de diálise para estoque da proteína	50 mM Tampão Fosfato de Sódio; 150 mM NaCl; 50% Glicerol; 0,1 mM DTT; 1 mM PMSF

2.6. Soluções e tampões para "immunoblotting".

- Tampão de transferência: 160 mM glicina (Synth); 25 mM Trizma base (Invitrogen); 20% metanol (Merck).

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

- Solução de bloqueio para ensaios com soros de camundongos: PBS; 5% de leite em pó desnatado (Molico®); 2,5% de BSA (Sigma).

- Solução de revelação: 3,3- Diaminobenzidina (DAB, Sigma) 5 mg, H_2O_2 (Merck) 10 µL, diluídos em PBS.

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

- Tampão para sensibilização das placas: glicina (Synth) 160 mM, Trizma base (Invitrogen) 25 mM, metanol (Merck) 20%.
- PBS: 8 mM NaH_2PO_4, 2,3 mM Na_2HPO_4, 130 mM NaCl pH final 7,4.
- PBS-Tween: PBS, 0,05% Tween 20 (USB).
- Tampão fosfato-citrato: 0,2 M NaH_2PO_4 (Synth), 0,2 M $C_6H_8O_7$ (Synth) pH final 4,5-5,0.
- Soluções de bloqueio:

  Para ensaios com soros humanos: PBS, 5% de leite em pó desnatado (Molico®).

  Para ensaios com soros de camundongos: PBS, 5% de leite em pó desnatado (Molico®), 2,5% de BSA (Sigma).
- Solução de revelação: σ-Phenylenediamine (OPD, Sigma) 1 mg/mL, 0,03% (vol/vol) de H_2O_2, diluídos em tampão fosfato-citrato.

3. Construção dos plasmídios recombinantes contendo os diferentes domínios do gene que codifica a proteína AMA-1 de *P. vivax*.

As seqüências de nucleotídeos correspondentes aos diferentes domínios de *ama-1* de *P. vivax* foram obtidas através da amplificação pela PCR a partir do plasmídio recombinante pHIS-AMA-1 (RODRIGUES *et al.,* 2005), o qual contém o gene que codifica os aminoácidos 43 a 487, correspondentes aos domínios I a III (ectodomínio) de AMA-1. As reações da PCR foram realizadas com

oligonucleotídeos contendo sítios de restrição enzimática específicos para a subclonagem no vetor pET-28a (Novagen) em fusão com His_6 (N-terminal). Os oligonucleotídeos desenhados de forma a inserir as seqüências de interesse no vetor de expressão anteriormente citado foram os seguintes:

Gene	Seqüência	Polaridade	Enzimas
i	CGCGGATCCCCTACCGTTGAGAGAAGC	Senso	*Bam*HI/ *Sac*I
	ACGGAGCTCCTAGGGGCATTTTTTATCCCAATC	Antisenso	
ii	CGCGGATCCCGTAAAAATTTAGGAAACGCC	Senso	*Bam*HI/ *Eco*RI
	CTCGAATTCCTACTCCGGGCCTACTTCTTG	Antisenso	
iii	CGCGGATCCTTCCCCTGCAGCATATATAAA	Senso	*Bam*HI/ *Eco*RI
	CTCGAATTCCTATAGTAGCATCTGCTTGTTCGA	Antisenso	
i-ii	CGCGGATCCCCTACCGTTGAGAGAAGC	Senso	*Bam*HI/ *Sac*I
	ACGGAGCTCCTACTCCGGGCCTACTTCTTG	Antisenso	
ii-iii	CGCGGATCCCGTAAAAATTTAGGAAACGCC	Senso	*Bam*HI/ *Eco*RI
	CTCGAATTCCTATAGTAGCATCTGCTTGTTCGA	Antisenso	

Oligonucleotídeos adquiridos da IDT, Coralville, EUA.

Após a amplificação dos genes que codificam os diferentes domínios de AMA-1, os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o kit Geneclean II (Q-BIOgene). Posteriormente, os insertos purificados ligados inicialmente no vetor comercial pMOS*Blue* (Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante para a análise da seqüência de DNA. Os clones recombinantes foram selecionados por análise de restrição enzimática das preparações de plasmídios obtidas em pequena escala.

Posteriormente, os insertos foram removidos do vetor pMOS*Blue* através de digestão com as enzimas apropriadas. Os insertos purificados foram ligados no vetor pET-28a digerido com as mesmas enzimas. As colônias foram selecionadas através

de análises de restrição enzimática quanto à presença e orientação do inserto. A Tabela 3 apresenta com mais detalhes um sumário das etapas relatadas acima.

Tabela 3. Sumário das estratégias de obtenção das proteínas recombinantes baseadas nos diferentes domínios de AMA-1 de *P. vivax.*

Domínio de AMA-1	Pares de base	Vetor de clonagem	Sítios enzimáticos	Vetor de expressão	Aminoácidos (aa)
DI	618	pMOS	*Bam*HI/*Sac*I	pET-28a	206 (43-248)
DII	411	pMOS	*Bam*HI/ *Eco*RI	pET-28a	137 (249-385)
DIII	306	pMOS	*Bam*HI/ *Eco*RI	pET-28a	102 (386-487)
DI-II	1029	pMOS	*Bam*HI/*Sac*I	pET-28a	343 (43-385)
DII-III	717	pMOS	*Bam*HI/ *Eco*RI	pET-28a	239 (249-487)

A Figura 3 apresenta a seqüência de aminoácidos que compõem o ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax*. As seqüências codificantes para os diferentes domínios estão destacadas com as cores: verde (Domínio I), azul (Domínio II) e vermelha (Domínio III).

PTVERSTRMSNPWKAFMEKYDIEKTHSSGVRVDLGEDAEVENAKYRIPAGRCPVFGKGIVIENSAVSFLTPVATG
DQRLKDGGFAFPNANDHISPMTIANLKARYKDNVEMMKLNDIALCRTHAASFVMAGDQNSSYRHPAVYDEKEKT
CHMLYLSAQENMGPRYCSPDAQNRDAVFCFKPDKNESFENLVYLSKNVRNDWDKKCPRKNLGNAKFGLWVDG
NCEEIPYVKEVEAKDLRECNRIVFEASASDQPTQYEEEMTDYQKIQQGFRQNNREMIKSAFLPVGAFNSDNFKSK
GRGFNWANFDSVKKKCYIFNTKPTCLINDKNFIATTALSHPQEVGPEFPCSIYKDEIEREIKKQSRNMNLYSVDGER
IVLPRIFISNDKESIKCPCEPERISNSTCNFYVCNCVEKRAEIKENNQVVIKEEFRDYYENGEEKSNKQMLL

Figura 3. Seqüência de aminoácidos (aa) correspondentes ao ectodomínio da proteína AMA-1.

4. Expressão e purificação das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1.

4.1. Estabelecimento das condições de expressão das proteínas recombinantes em pequena escala.

A expressão e purificação das proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1 de *P. vivax* foram realizadas como descrito recentemente por RODRIGUES *et al*. (2005), introduzindo-se as modificações necessárias de acordo com a solubilidade de cada proteína. Resumidamente, bactérias *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) foram transformadas com cada um dos plasmídios recombinantes e as condições ótimas de lise e expressão foram estabelecidas em pequena escala de crescimento bacteriano (10 mL). Estudos dose-resposta de IPTG (0,01 mM, 0,1 mM e 1 mM), cinética de tempo (3h e 16h) e temperatura de indução (30ºC e 37ºC) foram realizados para cada uma das proteínas recombinantes. Além disso, diversos tampões de lise bacteriana foram testados: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl e 20 mM Tampão fosfato, 0,5 M NaCl. Em todos os tampões foram adicionados 1 mg/mL de Lisozima (Sigma) e 1 mM de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, PIERCE).

4.2. Expressão das proteínas recombinantes em média escala e padronização do protocolo de purificação.

Uma vez estabelecidas as melhores condições de expressão para cada uma das proteínas recombinantes em pequena escala, estas foram produzidas em média escala (1 L) com a finalidade de se estabelecer as condições de purificação para cada uma delas. Resumidamente, as bactérias recombinantes foram cultivadas em

meio LB-kan por 16 horas a 37ºC. A seguir, a cultura foi diluída (1:25) em LB-kan e incubada a 37ºC, sob agitação a 200 rpm até atingir uma densidade óptica (DO_{600}) entre 0,5 e 0,6. As bactérias foram então induzidas pela adição de 0,1 mM de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, Invitrogen) por 3h a 37ºC. Após este período, as células foram precipitadas por centrifugação (3.500 rpm/ 15 min/ 4ºC) e ressuspendidas em tampão de lise (20 mM Fosfato de sódio pH 8,0, 0,5 M NaCl, 1 mM PMSF e 1 mg/mL de Lisozima). As bactérias foram lisadas em banho de gelo com auxílio de um sonicador (Branson Sonifier mod. 450, EUA). Foram aplicados 10 ciclos de sonicação de 60 segundos em pulso constante e intervalos de 1 minuto entre os pulsos para que não houvesse demasiada elevação térmica do extrato bacteriano. Em seguida, o extrato bacteriano foi centrifugado (14.000 rpm/ 60 min/ 4ºC) e as frações foram, então, separadas em precipitado e sobrenadante, sendo posteriormente analisadas por separação eletroforética em SDS-PAGE 15%.

4.2.1. Expressão da proteína recombinante DII a partir do sobrenadante bacteriano (solúvel).

Após a centrifugação e separação das frações em precipitado e sobrenadante, o último, o qual continha a proteína recombinante DII, foi submetido a uma nova centrifugação (14.000 rpm/ 30 min/ 4ºC) para a retirada de resíduos provenientes do extrato bacteriano. O sobrenadante obtido foi aplicado lentamente em resina de níquel (Ni Sepharose™ High Performance – Amersham Biosciences) previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio. Em seguida a resina foi lavada com o tampão de lavagem e submetida a um gradiente linear de imidazol (15 a 400 mM) em resina de níquel. Após passagem pela mesma, as alíquotas foram recuperadas em volume de 2 mL e analisadas em SDS-PAGE 15% para o

estabelecimento da concentração ideal de imidazol para a eluição da proteína recombinante.

A proteína DII passou por uma etapa de purificação adicional por cromatografia de troca iônica. Resumidamente, após a eluição as alíquotas contendo a proteína DII foram dialisadas contra o tampão de diálise (20 mM Tris-HCl, 1 mM PMSF). Após filtração em membrana de 0,22 μm (Millipore), a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q (Amersham Biosciences) ou UNO Q 12 (BioRad), equilibrada com 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, acoplada ao sistema AKTA™prime (Amersham Biosciences). A proteína foi eluída por um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl neste mesmo tampão. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE 15% e aquelas que continham a proteína foram reunidas e dialisadas contra PBS contendo 1 mM PMSF.

4.2.2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes DI, DIII, DI-II e DII-III a partir do precipitado bacteriano (corpos de inclusão).

Os precipitados dos extratos bacterianos contendo as proteínas recombinantes DI, DIII, DI-II ou DII-III AMA-1 (corpos de inclusão) foram submetidos a etapas de lavagem por 4x com o tampão de lavagem e, após este procedimento, foram ressuspendidas em tampão de solubilização seguido de incubação por 2 horas, a 37ºC, sob agitação constante de 200 rpm. Em seguida o material foi centrifugado a 4ºC como anteriormente e a eficiência da solubilização foi analisada em SDS-PAGE 15%.

O sobrenadante contendo a proteína solubilizada foi aplicado lentamente em resina de níquel previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio. Em seguida a resina foi lavada com o tampão de lavagem. Após esta etapa, a resina foi submetida

à passagem do tampão de “refolding” constituído de concentrações decrescentes de uréia (8 a 0 M). Para a eluição das proteínas, a resina foi incubada com o tampão de “refolding” sem a presença do agente desnaturante, acrescido de um gradiente linear de imidazol (15 mM a 400 mM). As alíquotas foram recuperadas em volumes de 2 mL e analisadas em SDS-PAGE 15% para o estabelecimento da concentração ideal de imidazol para a eluição de cada uma das proteínas recombinantes. Posteriormente, o material eluído contendo cada uma das proteínas foi dialisado contra tampão de diálise durante a noite, sob agitação, a 4ºC.

A concentração de todas as proteínas utilizadas neste estudo foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando o reagente Protein Assay – Dye Reagent Concentrate (BioRad).

5. Detecção das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 por “immunoblotting” utilizando anticorpo monoclonal contra a cauda de histidina (anti-His) ou soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1.

Após a separação eletroforética, as proteínas recombinantes foram transferidas para membrana de nitrocelulose (NC)(Hybond N, Amersham Biosciences) a uma voltagem de 100 V por 60 minutos usando equipamento “Mini Trans-Blot” (Bio-Rad). A eficiência da transferência foi feita pela coloração da membrana de NC com Ponceau-S. Em seguida, a membrana de NC foi incubada por aproximadamente 16 horas a 4ºC, em solução de bloqueio. Após este período, a membrana foi incubada por 1 hora, a temperatura ambiente (t.a.), com o anticorpo monoclonal anti-His (Amershan Biosciences) ou com o soro policlonal de camundongo contra a proteína PV66/AMA-1 gerada em leveduras, que nos foi cedida previamente pelo Dr. Clemens Kocken (RODRIGUES *et al.*, 2005), diluídos em solução de bloqueio (1:1000 e 1:500,

respectivamente). Após três lavagens de 10 min com PBS/ Tween 20 a 0,05%, foi realizada uma incubação por 1h a t.a. com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:2.000 e a revelação feita com DAB (3,3-Diaminobenzidina, Sigma) e peróxido de hidrogênio em PBS ou por quimioluminescência utilizando *kit* ECL Western Blotting Analyses System (Amersham Biosciences).

6. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos humanos.

6.1. Detecção de anticorpos IgG por ELISA.

A detecção de anticorpos IgG anti-AMA-1 foi feita por ELISA conforme descrito por RODRIGUES *et al.* (2005), com algumas modificações. A concentração de cada proteína recombinante foi ajustada para 6 μg/mL (DI-II), 4 μg/mL (DI e DIII), 2 μg/mL (DII) ou 1 μg/mL (DII-III) em tampão contendo 160 mM glicina, 25 mM Trizma base e 20% metanol de acordo com o reconhecimento pelo anticorpo monoclonal anti-His. 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 20 a 0,05% e incubadas em solução de bloqueio por 2 horas a 37ºC. Inicialmente, as amostras (soro) foram diluídas 1:100 na solução de bloqueio. 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 à peroxidase (específico para a porção Fc da IgG, Sigma) diluído 1:8.000 em solução de bloqueio. A reação enzimática foi revelada pela adição de 1 mg/mL de OPD diluído em tampão

fosfato-citrato, pH 4,8 contendo 0,03% (vol/ vol) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de uma solução contendo ácido sulfúrico (H_2SO_4) 4 N. A densidade ótica (DO) foi determinada em um leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA) usando filtro principal de 492 nm e filtro diferencial de 630 nm.

A absorbância discriminante entre os resultados positivos e negativos ("cutoff") foi estabelecida pela média das absorbâncias produzidas por amostras de 25 indivíduos sem história clínica de malária, acrescida de cinco desvios-padrão. O índice de reatividade (IR) foi calculado dividindo-se a média da absorbância de cada amostra pelo valor do "cutoff", sendo as amostras com IR $\geq$ 1, consideradas positivas.

6.2. Detecção de anticorpos específicos das subclasses de IgG.

O ELISA foi realizado como descrito no item anterior, exceto que os anticorpos secundários foram anticorpos monoclonais de camundongo específicos para as diferentes subclasses de IgG humana (Sigma). Os monoclonais anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 ou anti-IgG4 foram diluídos, respectivamente, 1:2.000, 1:500, 1:2.000 e 1:2.000 em solução de bloqueio, conforme estabelecido previamente.

Após 1 hora de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes e incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) na diluição de 1:2.000. A revelação foi feita como descrito no item anterior e os "cutoff" foram estabelecidos através da média das absorbâncias produzidas por amostras de soro de 25 indivíduos sem história clínica de malária, acrescidos de 3 desvios-padrão.

6.3. Detecção de anticorpos IgM por ELISA.

A detecção de anticorpos IgM foi feita conforme descrito anteriormente no item 6.1 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 1:3.000. A revelação foi realizada como descrito no item 6.1. A absorbância discriminante entre os resultados positivos e negativos ("cutoff") foi estabelecida pela média das absorbâncias produzidas por amostras de 25 indivíduos sem história clínica de malária, acrescida de cinco desvios-padrão sendo qualquer valor acima considerado positivo.

7. Análise estatística.

As freqüências de respondedores obtidas nos ensaios foram comparadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2), em tabelas de contingência (2x2), com correção de Yates (VassarStats) (Disponível em: <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.htm>. Acesso em 05 de janeiro 2007). 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). O efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgG foi analisado pelo teste do χ^2 de tendência linear Mantel Haenszel (OpenEpi) (Disponível em: <http://www.openepi.com/Menu/OpenEpiMenu.htm>. Acesso em 14 de agosto 2007).

IV. RESULTADOS

1. Construção dos plasmídios recombinantes contendo os genes que codificam os diferentes domínios de AMA-1 de *P. vivax*.

A seqüência de nucleotídeos correspondente aos aminoácidos 43 a 487 de AMA-1 foi obtida previamente por amplificação a partir do DNA genômico de um paciente infectado por *P. vivax* procedente de Belém, Pará (RODRIGUES *et al*., 2005). Para o presente estudo, os genes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1 (DI, DII, DIII, DI-II e DII-III) foram obtidos por PCR a partir do plasmídio recombinante pMOS-AMA-1 previamente gerado e inserido no vetor de expressão pET-28a para expressão das proteínas recombinantes em fusão com His_6 a partir de *E. coli* como descrito em Materiais e Métodos.

2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes baseadas em AMA-1 de *P. vivax.*

Após seleção dos plasmídios recombinantes contendo os insertos correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1 na orientação correta, estes foram transformados em bactérias *E. coli* da linhagem BL21(DE3) e induzidos com IPTG para análise da expressão das respectivas proteínas recombinantes, inicialmente em pequena escala. As frações protéicas obtidas após a lise das culturas bacterianas (sobrenadantes e precipitados) foram analisadas em SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie e por “immunoblotting” utilizando anticorpo monoclonal anti-His. As proteínas recombinantes foram detectadas em bom nível de expressão nos sobrenadantes (DII) ou precipitados bacterianos (DI,

DIII, DI-II e DII-III), com massas moleculares aparentes de: DI - 23 kDa, DII - 16 kDa, DIII - 12 kDa, DI-II - 39 kDa e DII-III - 28 kDa (dados não mostrados).

Na etapa subseqüente estabelecemos as condições de solubilização das proteínas recombinantes (que formaram corpos de inclusão) na presença de 8 M de uréia, conforme descrito no item Metodologia. Estas proteínas recombinantes foram obtidas a partir de crescimento bacteriano em média escala (200 mL) e purificadas por cromatografia de afinidade após "refolding" parcial. Por outro lado, a proteína recombinante correspondente ao DII foi obtida sob forma solúvel e purificada em duas etapas: cromatografia de afinidade e de troca iônica. O padrão de migração das proteínas recombinantes purificadas em SDS-PAGE 15% na presença do agente redutor 2-ME e corado com Azul de Coomassie está apresentado na Figura 4. Como podemos observar, em geral estas proteínas migram com um padrão de banda única e com poucos produtos de degradação.

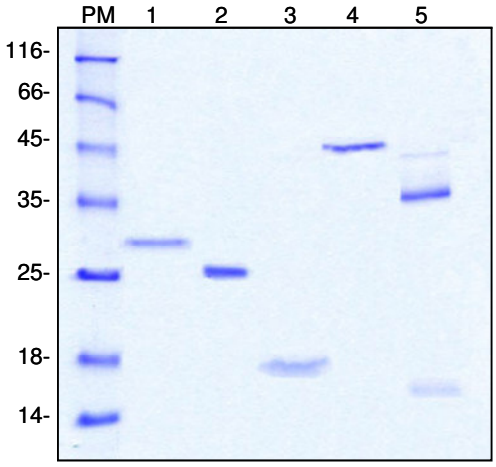


Figura 4. Análise em SDS-PAGE 15% das proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1 após purificação. Padrão de migração dos diferentes domínios de AMA-1 em condições redutoras após coloração com Azul de Coomassie. **PM**: marcador de peso molecular (Fermentas), **1**. DI, **2**. DII, **3**. DIII, **4**. DI-II, **5**. DII-III.

3. Análise do reconhecimento imune das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 de *P. vivax.*

As cinco proteínas recombinantes foram analisadas comparativamente em relação ao reconhecimento pelo anticorpo monoclonal anti-His, soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1 e um painel de 132 soros de pacientes expostos ao *P. vivax.* Inicialmente, foram testadas 100 amostras de soros de indivíduos com parasitemia patente por *P. vivax* procedentes de diferentes localidades endêmicas do Estado do Pará. Outras 32 amostras de soros de indivíduos que tiveram mais de dez episódios de malária causados por *P. vivax* ou *P. falciparum* também foram incluídas neste estudo. Estas amostras foram coletadas em Terra Nova do Norte, MT, região onde, no final da década de 1990, ocorreu transmissão intensa de malária. Durante o período da coleta estes indivíduos não apresentavam parasitemia patente avaliada por gota espessa.

3.1. Reconhecimento das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 pelo anticorpo monoclonal anti-His e soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1.

Inicialmente, observamos que, por immunoblotting, todas as proteínas foram reconhecidas de forma semelhante pelo anticorpo monoclonal anti-His (Figura 5A), exceto DIII, que foi a menos reconhecida. Quando analisamos o reconhecimento de cada uma das proteínas pelo soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1, DI e DIII foram as proteínas menos reconhecidas (Figura 5B). A possibilidade de que só

parte das moléculas apresenta uma conformação apropriada possibilitando o reconhecimento pelo anticorpo não pode ser completamente descartada.

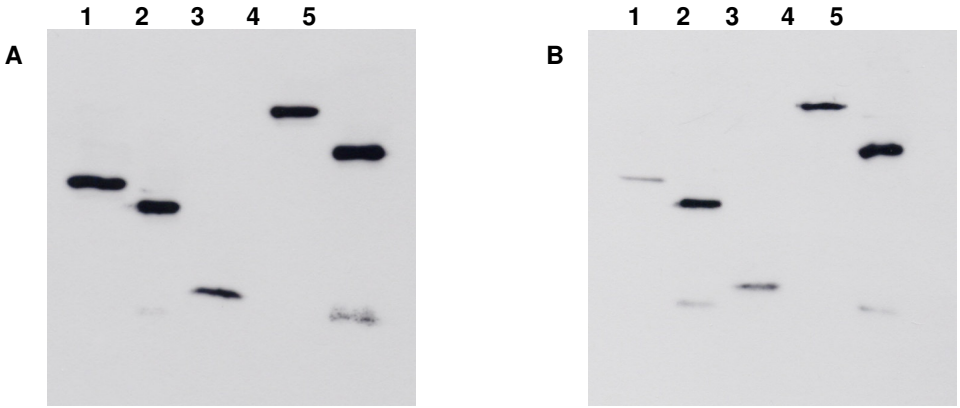


Figura 5. Análise das proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1 por immunoblotting. Reconhecimento imune de cada uma das proteínas recombinantes purificadas pelo anticorpo monoclonal anti-His diluído 1:500 (A) e anticorpo policlonal anti-PV66/AMA-1 diluído 1:1.000 (B). **1**. DI, **2**. DII, **3**. DIII, **4**. DI-II, **5**. DII-III.

Posteriormente, estabelecemos as condições de análise comparativa do reconhecimento imune das proteínas recombinantes, por ELISA, utilizando anticorpo anti-His. Em experimentos preliminares, as placas foram sensibilizadas com 200 ng por poço de cada uma das proteínas diluídas em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6. Nestas condições, as proteínas DII e DII-III foram reconhecidas por diferentes diluições do anticorpo monoclonal anti-His (dados não apresentados). Entretanto, as proteínas DI, DIII e DI-II apresentaram uma DO_{492} muito baixa quando comparadas às demais. Esta diferença no reconhecimento foi interpretada como resultante de uma menor quantidade das proteínas DI, DIII e DI-II que se ligou na placa na presença do tampão carbonato-bicarbonato. A fim de avaliar se a eficiência de ligação à placa poderia ser melhorada pela utilização de tampões alternativos,

selecionamos a proteína DIII diluída na presença de diferentes tampões, incluindo o tampão carbonato-bicarbonato, com pH 9,6, para sensibilização das placas. A Figura 6 mostra o resultado desta análise, na qual podemos observar que apenas na presença dos dois tampões contendo tris e glicina (com ou sem metanol) a proteína DIII foi reconhecida por diferentes diluições do anticorpo monoclonal anti-His.

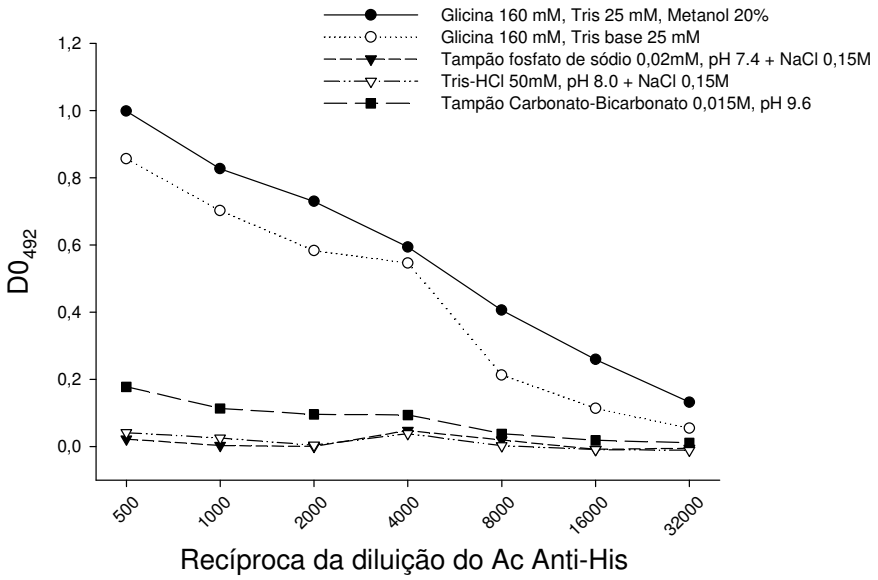


Figura 6. Estabelecimento das condições de ligação na placa de ELISA das proteínas recombinantes baseadas em AMA-1. A placa de ELISA foi sensibilizada com 200 ng da proteína recombinante DIII diluída na presença de cada um dos tampões indicados na legenda. O anticorpo monoclonal anti-His foi utilizado em diferentes diluições a partir de 1:500.

A partir destes resultados, sensibilizamos a placa com 200 ng/poço de cada proteína diluída em tampão contendo 160 mM glicina, 25 mM trizma base, 20% metanol, e avaliamos comparativamente o reconhecimento destas pelo anticorpo monoclonal anti-His. Nestas condições, todas as proteínas foram reconhecidas por diferentes diluições do anticorpo. A partir da DO_{492} obtida após o reconhecimento pelo anticorpo anti-His, a concentração das proteínas na placa foi ajustada

individualmente para que fossem reconhecidas de forma semelhante pelo anticorpo monoclonal. Como pode ser visto na Figura 7, foi necessário utilizarmos concentrações que variaram de 50 ng a 300 ng/poço de cada proteína para que estas fossem reconhecidas de forma semelhante pelo anticorpo anti-His. Apesar disso, ainda houve um reconhecimento menor da proteína DIII, mesmo quando utilizamos 300 ng/poço (dados não mostrados), o que significa que pouca quantidade desta proteína se liga à placa. Por outro lado, a proteína DII-III foi a mais reconhecida pelo anticorpo, mesmo quando utilizamos apenas 50 ng/poço, o que interpretamos como sendo a mais eficiente na ligação a placa em relação às demais.

Com base nestes dados, para os experimentos subseqüentes a concentração de cada proteína recombinante foi ajustada para 6 μg/mL (DI-II), 4 μg/mL (DI e DIII), 2 μg/mL (DII) ou 1 μg/mL (DII-III) para evitar que possíveis diferenças observadas no reconhecimento pelos anticorpos humanos não fossem, equivocadamente, atribuídas a diferenças de disponibilidade das diversas proteínas aderidas à placa.

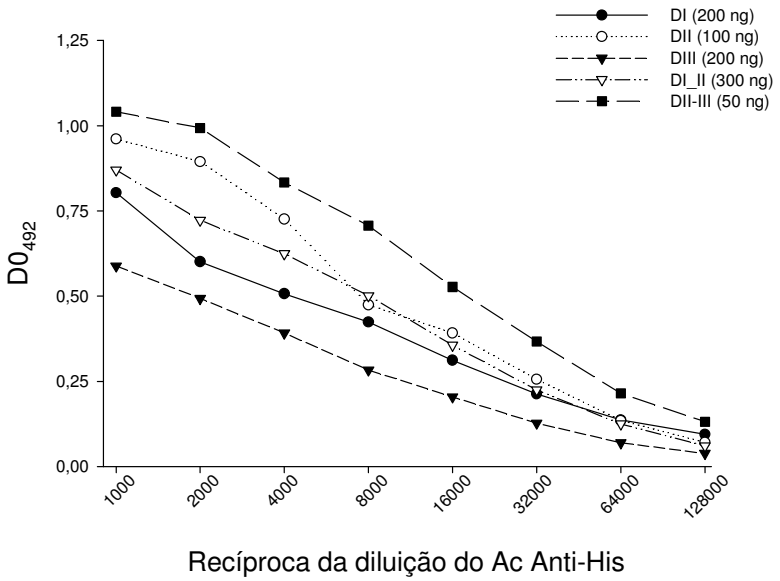


Figura 7. Comparação do reconhecimento das proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1 pelo anticorpo monoclonal anti-His. As placas de ELISA foram cobertas com cada uma das proteínas recombinantes nas concentrações indicadas. O anticorpo monoclonal anti-His foi utilizado em diferentes diluições a partir de 1:1.000.

3.2. Reconhecimento das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 por anticorpos IgM e IgG de indivíduos com infecção patente por *P. vivax*.

Após o estabelecimento das concentrações apropriadas de cada uma das cinco proteínas recombinantes, estas foram avaliadas comparativamente por ELISA com relação ao reconhecimento imune por anticorpos IgM, IgG e subclasses de IgG, utilizando 100 pacientes infectados pelo *P. vivax* procedentes de diferentes áreas endêmicas do Estado do Pará. Estes soros foram também testados contra a proteína recombinante correspondente ao ectodomínio de AMA-1 (DI-III). As freqüências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG ou IgM contra pelo menos um dos cinco domínios foram de 72% e 45%, respectivamente. Como pode ser observado na Figura 8, a freqüência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM para cada

uma das proteínas recombinantes testadas foi de: DI = 10%, DII = 17%, DIII = 4%, DI-II = 23% e DII-III = 36%. A análise estatística revelou que a proporção de indivíduos respondedores para a proteína DII-III foi significativamente maior do que as proporções obtidas para DI, DII e DIII ($P < 0,005$). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa nas proporções de indivíduos que reconheceram as proteínas DI-II e DII-III ($P > 0,05$).

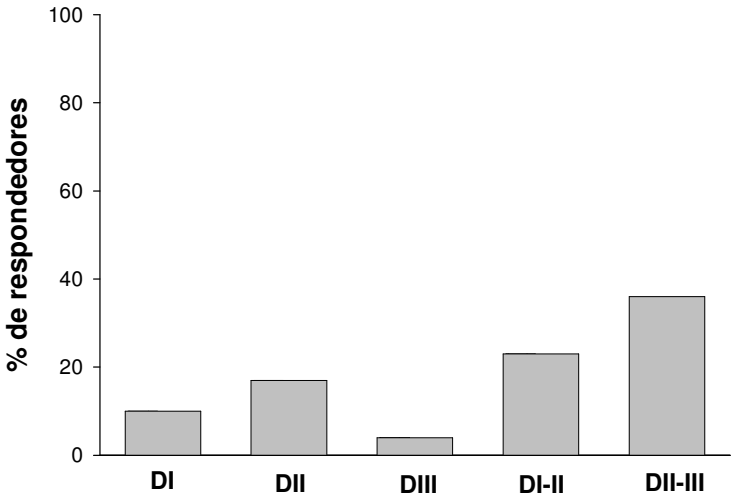


Figura 8. Prevalência de anticorpos IgM contra as proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1. Amostras de soro de 100 indivíduos com infecção patente por *P. vivax* foram analisadas por ELISA quanto à presença de anticorpos IgM específicos. Todas as amostras foram testadas na diluição 1:100, em duplicata.

A Figura 9A apresenta a freqüência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG para cada uma das proteínas recombinantes testadas: DI = 13%, DII = 65%, DIII = 12%, DI-II = 59%, DII-III = 58% e DI-III = 70%. A análise estatística revelou que a proporção de indivíduos respondedores para as proteínas recombinantes DII, DI-II, DII-III e DI-III foi significativamente maior do que as proporções obtidas para DI e DIII ($P < 0,0001$, em todos os casos). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa nas proporções de indivíduos que

reconheceram as proteínas recombinantes DII, DI-II, DII-III e DI-III, assim como entre DI e DIII ($P > 0,05$, em todos os casos).

A Figura 9B apresenta os valores individuais de níveis de anticorpos IgG contra as diferentes proteínas recombinantes, expressos como Índice de Reatividade (IR). Podemos observar que os IR obtidos para as proteínas recombinantes DII, DI-II, DII-III e DI-III foram significativamente maiores do que os obtidos para DI e DIII ($P < 0,0001$, em todos os casos). Quando comparamos os valores de IR entre as proteínas DII, DI-II, DII-III e DI-III, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles, assim como entre DI e DIII ($P > 0,05$, em todos os casos).

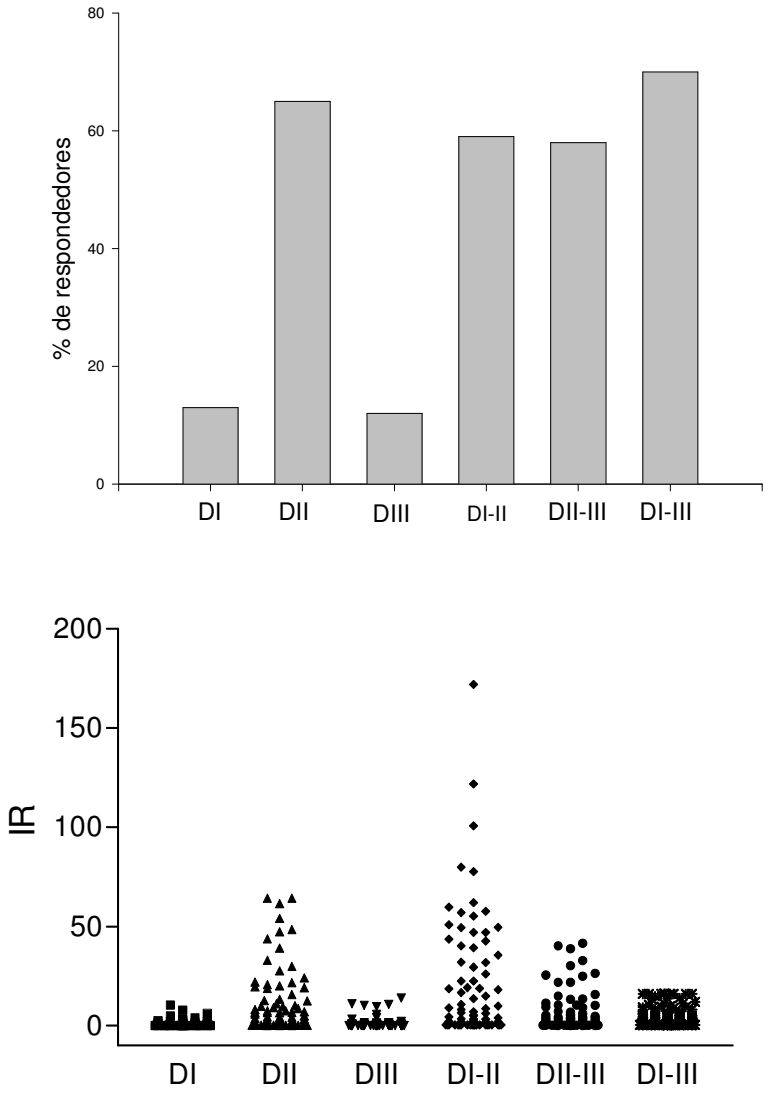


Figura 9. Prevalência de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1. Soros de 100 indivíduos foram analisados quanto à presença de anticorpos IgG específicos por ELISA. Os soros foram testados na diluição de 1:100, em duplicata. **A**. Freqüência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra cada um dos domínios de AMA-1. **B**. Valores individuais dos níveis de anticorpos IgG, expressos em IR, contra os diferentes domínios de AMA-1.

Com o intuito de avaliar se os epítopos reconhecidos nas cinco proteínas recombinantes AMA-1 de *P. vivax* estão expostos na proteína recombinante correspondente ao ectodomínio, realizamos ensaios de inibição, por ELISA, utilizando na placa a proteína recombinante DI-III. Inicialmente, os soros humanos (TAI 1, TAI 7 ou TAI 8 na diluição de 1:2.000) e o soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1 (diluído 1:800) foram incubados previamente com as proteínas DI, DII, DIII, DI-II, DII-III ou DI-III em diferentes concentrações a partir de 10 µg/mL. A Figura 10 mostra as curvas de inibição obtidas. Observamos que, na presença da concentração máxima do inibidor (10 µg/mL), as porcentagens de inibição nos ensaios com os três soros humanos foram de: 21,6 ± 3,7 (DI); 7,2 ± 9,6 (DII); 49,9 ± 0,3 (DIII); 84,4 ± 3,2 (DI-II); 26,0 ± 8,0 (DII-III) e 94,8 ± 2,1 (DI-III). Na presença do soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1, as porcentagens de inibição máxima foram de: 14,4% (DI); 55,5% (DII); 49,9% (DIII); 45,3% (DI-II); 73,7% (DII-III) e 73,1% (DI-III) (Figura 10).

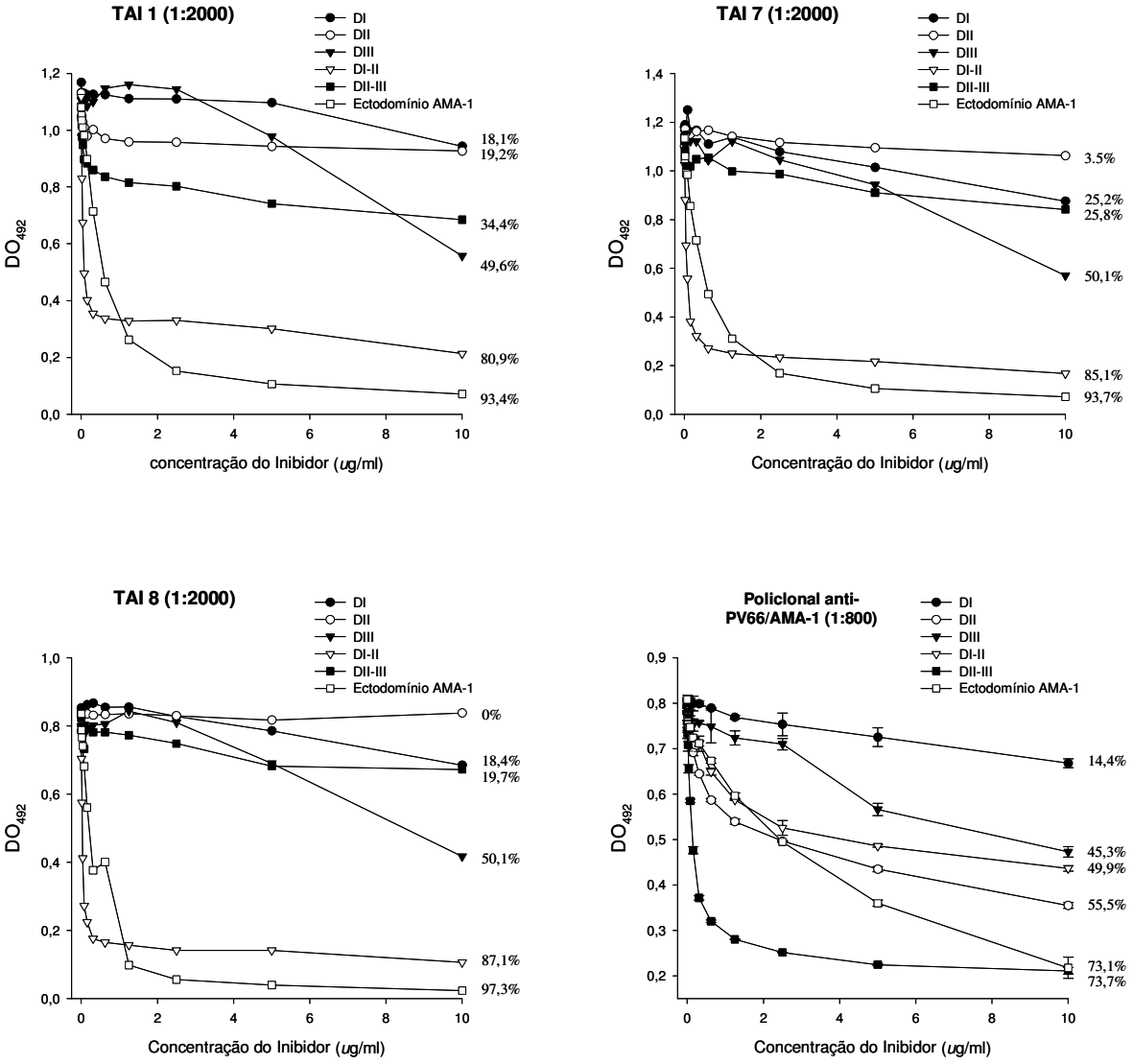


Figura 10. Ensaio de inibição por ELISA. As placas foram sensibilizadas com a proteína recombinante DI-III. As proteínas DI, DII, DIII, DI-II, DII-III e DI-III foram adicionadas em diferentes concentrações (de 0 a 10 µg/mL) após incubação prévia com soros humanos (TAI 1, TAI 7 e TAI 8) ou soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1 nas diluições indicadas em cada painel. As porcentagens representam a média da diferença entre a absorbância na presença de 0 e 10 µg/mL de cada inibidor.

A partir destes resultados, estendemos estes estudos para um número maior de amostras de soros utilizando cada um dos inibidores na concentração de 10 µg/mL mantendo a proteína correspondente ao ectodomínio (DI-III) na placa. A Figura 11 mostra as médias das porcentagens de queda de absorbância para cada um dos domínios. Os resultados obtidos nos ensaios de inibição com soro humano sugerem a presença de um maior número de epítopos comuns entre as proteínas recombinantes baseadas nos domínios I-II e ectodomínio de AMA-1. Por outro lado, quando realizamos os ensaios de inibição com o soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1 observamos que uma maior porcentagem de queda de absorbância foi observada quando utilizamos a proteína DII-III como inibidor. Estas observações podem significar que esta e a proteína PV66/AMA-1 (gerada em leveduras) apresentam epítopos comuns.

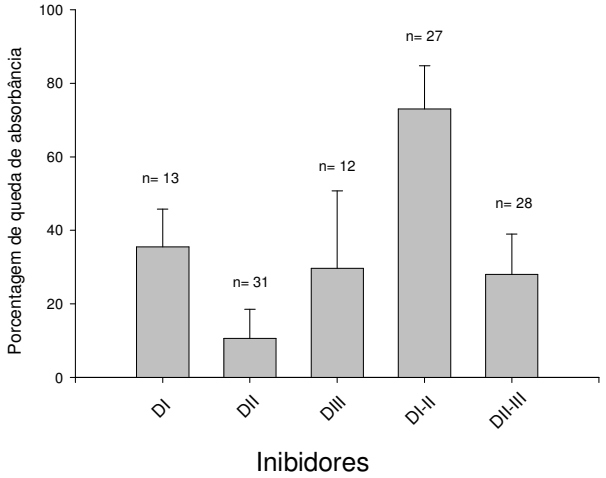


Figura 11. Ensaio de inibição por ELISA. As placas foram cobertas com a proteína recombinante DI-III. As proteínas DI, DII, DIII, DI-II, DII-III e DI-III foram adicionadas na concentração final de 10 µg/mL após incubação prévia com cada um dos soros (o número de soros utilizados está indicado em cada barra) em diluições que variaram de 1:50 a 1:2.000. As porcentagens representam a média de inibição na presença de 10 µg/mL para cada inibidor. Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão da porcentagem de queda de absorbância.

3.3. Análise do efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgG contra as cinco proteínas recombinantes baseadas em AMA-1 de *P. vivax.*

Com o objetivo de avaliar um possível efeito "boost" resultante da exposição aos antígenos de formas sangüíneas de *P. vivax*, analisamos as freqüências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra os diferentes domínios de AMA-1 em relação ao número de episódios prévios de malária. Desta forma, 129 indivíduos que informaram o número de episódios prévios de malária foram divididos em 4 grupos: i) primoinfectados (n=44), ii) indivíduos infectados que tiveram entre 1 e 3 episódios prévios (n=31), iii) indivíduos infectados que tiveram 4 ou mais episódios prévios de malária (n=22) e iv) indivíduos não infectados que tiveram 10 ou mais episódios prévios de malária (n=32).

Os dados da Figura 12 mostram que as respostas de anticorpos IgG para os domínios II, I-II e II-III de AMA-1 aumentam de acordo com o número de exposições prévias ao *P. vivax*, uma vez que houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos os grupos de indivíduos primoinfectados que apresentaram anticorpos IgG com os demais grupos de indivíduos respondedores que tiveram episódios prévios de malária ($P < 0,05$, qui-quadrado de tendência). Para os domínios I e III, não houve diferença estatisticamente significativa entre os 4 grupos ($P > 0,05$).

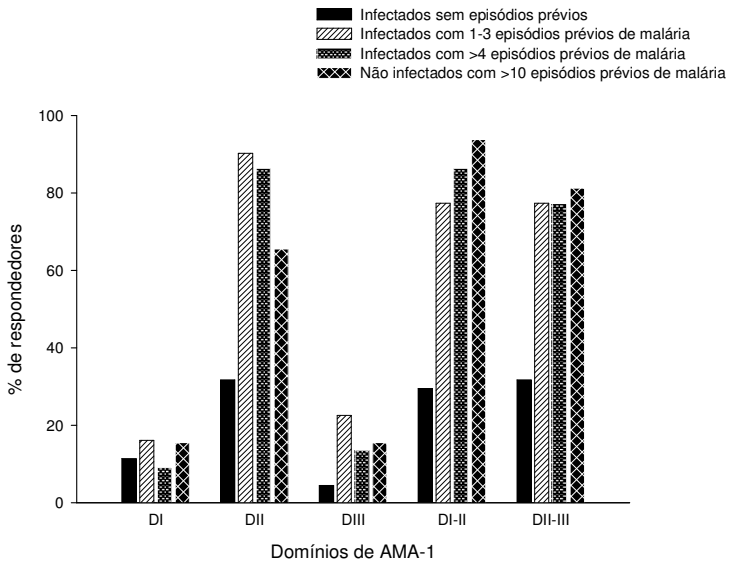


Figura 12. Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes baseadas nos domínios de AMA-1. Das 132 amostras de soros analisadas, 129 indivíduos que informaram o número de episódios prévios de malária foram divididos em quatro grupos, como indicado na figura.

3.4. Determinação das subclasses de anticorpos IgG anti-AMA-1 durante a infecção patente.

Uma vez que a subclasse de IgG produzida contra um antígeno pode determinar a sua participação na resposta imune, analisamos as subclasses de IgG nas amostras de soros positivas contra as cinco proteínas recombinantes baseadas nos domínios de AMA-1. Os resultados obtidos mostram que, durante a infecção patente por *P. vivax*, as subclasses de IgG que predominam contra todas as proteínas foram IgG1, IgG3 e IgG4 (Tabela 4). Uma proporção menor de indivíduos apresentou anticorpos da subclasse IgG2 para cada uma das proteínas.

Tabela 4. Determinação das subclasses de IgG específicas capazes de reconhecer as proteínas recombinantes AMA-1.

Subclasses de IgG	DI	DII	DIII	DI-II	DII-III
IgG1	53,8	46,1	41,7	67,2	30,5
IgG2	0	6,1	8,3	10,3	5,1
IgG3	38,5	36,9	41,7	58,6	25,4
IgG4	53,8	36,9	41,7	41,4	22,1

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 de os mecanismos envolvidos na resposta imune contra malária ainda não serem totalmente compreendidos, está comprovado o envolvimento de anticorpos e células T como 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 46 anos deste estudo, ainda não se definiram os possíveis alvos destes anticorpos protetores.

Atualmente, a maioria dos esforços para se desenvolver uma vacina contra a malária tem se baseado em *P. falciparum*. Exemplo disso é a quantidade de candidatos à vacina sendo analisados em estudos clínicos: 23 para *P. falciparum* e somente 2 para *P. vivax* (HERRERA *et al.*, 2007). Considerando-se que o *P. vivax* vem adquirindo resistência a drogas e sendo associado a casos de malária grave e letal, são urgentemente necessários maiores investimentos e esforços para a identificação de componentes imunogênicos de *P. vivax* visando o desenvolvimento de uma vacina segura e efetiva.

Apesar do desenvolvimento de uma vacina para o *P. vivax* ser um desafio em razão da limitação de investimentos financeiros e dificuldades técnicas, tais como ausência de um sistema de cultivo *in vitro* de parasitas, importantes progressos têm sido observados na identificação e caracterização de diferentes antígenos de *P. vivax* (HERRERA *et al.,* 2007). Dentre os estágios do parasita explorados para o desenvolvimento de vacinas estão: pré-eritrocítico, eritrocítico assexual, eritrocítico sexual e os mistos (aqueles que apresentam proteínas que são expressas em mais

de um estágio do ciclo). No caso específico deste trabalho, demos continuidade ao estudo da antigenicidade da proteína AMA-1 que se enquadra na categoria mista, por ser expressa tanto em esporozoítas, como em merozoítas.

Diversos aspectos da resposta imune humana naturalmente adquirida contra duas proteínas recombinantes (produzidas em bactérias ou leveduras) derivadas de AMA-1 foram estudados anteriormente pelo nosso grupo (RODRIGUES *et al*., 2005). Estes estudos mostraram que: i) estas proteínas recombinantes foram altamente antigênicas sendo reconhecidas por anticorpos IgG de mais de 80% dos indivíduos infectados pelo *P. vivax,* ii) anticorpos citofílicos do tipo IgG1 foram as subclasses de anticorpos que predominaram na resposta imune anti-AMA-1, (iii) múltiplos episódios prévios de malária aumentaram a freqüência de indivíduos sorologicamente positivos contra a proteína recombinante AMA-1 produzida em bactérias. Além disso, demonstramos que o gene *ama-1* de *P. vivax* apresenta limitado polimorfismo em isolados do Brasil (RODRIGUES *et al*., 2005). Mais recentemente, foi demonstrado que anticorpos de indivíduos de áreas endêmicas de malária, específicos para o ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax* (MORAIS *et al*., 2006), estão significativamente associados à redução de risco de malária clínica.

Com base nestas informações, o presente trabalho teve como objetivo gerar cinco novas proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1 de *P. vivax* com o intuito de mapear regiões particularmente antigênicas da proteína, a serem utilizadas em futuros estudos de imunizações pré-clínicas em camundongos e primatas não-humanos. Para efeito comparativo, incluímos neste estudo a proteína recombinante correspondente ao ectodomínio de AMA-1 (DI-III) previamente caracterizada pelo nosso grupo como altamente imunogênica em infecções naturais (RODRIGUES *et al*., 2005).

Inicialmente, as seqüências de nucleotídeos que codificam para os diferentes domínios de PvAMA-1 foram obtidas através de amplificação por PCR a partir do plasmídio recombinante pHIS-AMA-1 (RODRIGUES *et al.,* 2005), o qual contém o gene que codifica os aminoácidos 43 a 487, correspondentes aos domínios I a III de AMA-1. Posteriormente, cada um dos fragmentos de DNA foi inserido no vetor pET-28a para expressão das proteínas em fusão com cauda de histidina. Do ponto de vista da expressão, todos os plasmídios recombinantes geraram boa quantidade de proteína, capazes de serem purificadas até sua homogeneidade. Entretanto, apenas a proteína correspondente ao DII foi obtida sob forma solúvel. As demais foram obtidas sob forma de corpos de inclusão, fato que é muito comum ocorrer com proteínas de *Plasmodium* quando produzidas a partir de bactérias. Essas quatro proteínas recombinantes foram solubilizadas na presença de 8 M Uréia e purificadas após "refolding" parcial das proteínas, conforme descrevemos anteriormente para obtenção do ectodomínio de AMA-1 (RODRIGUES *et al.,* 2005). Estes resultados demonstram que, para o desenvolvimento de proteínas que possam ser usadas em estudos de imunizações pré-clínicas e clínicas, a proteína baseada no domínio II apresenta grande vantagem.

As cinco proteínas recombinantes foram analisadas comparativamente em relação ao reconhecimento por anticorpo monoclonal anti-His, soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1 e um painel de 132 soros de pacientes expostos ao *P. vivax.* Por immunoblotting, todas as proteínas foram reconhecidas de forma semelhante pelo anticorpo monoclonal anti-His (Figura 5A) exceto a DIII, que foi a menos reconhecida. Quando analisamos o reconhecimento de cada uma das proteínas por soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1, observamos que as proteínas DII, DI-II e DII-III foram reconhecidas de forma semelhante (Figura 5B),

sugerindo a presença de epítopos comuns entre estas e a proteína PV66/AMA-1, gerada em leveduras. Por outro lado, DI e DIII foram as proteínas menos reconhecidas. Uma possível explicação para isso seria a possibilidade de que só parte das moléculas apresenta uma conformação apropriada, possibilitando o reconhecimento pelo anticorpo policlonal.

Na etapa subseqüente estabelecemos as condições do ELISA para análise comparativa do reconhecimento imune de cada uma das proteínas recombinantes por anticorpos humanos. A partir da DO_{492} obtida após o reconhecimento pelo anticorpo monoclonal anti-His, a concentração das proteínas na placa foi ajustada individualmente para que fossem reconhecidas de forma semelhante pelo anticorpo monoclonal (Figura 7). Desta maneira, excluímos a hipótese de que possíveis diferenças observadas no reconhecimento das proteínas pelos anticorpos humanos fossem atribuídas a diferenças de disponibilidade das proteínas aderidas à placa de poliestireno.

Estabelecidas as condições ideais do ensaio, demos início aos ensaios com soros humanos. A fim de avaliar comparativamente o reconhecimento imune das proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1 por anticorpos IgM, IgG e subclasses de IgG, um total de 100 amostras de soros de indivíduos infectados por *P. vivax* procedentes de diferentes áreas endêmicas do Estado do Pará foram analisadas por ELISA. Nossos resultados demonstram que as freqüências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM contra cada uma das proteínas recombinantes foram baixas e variaram entre 10 a 36% (Figura 8), o que indica que o “switch” de imunoglobulinas de IgM para IgG ocorre rapidamente após a exposição ao parasita. Quando analisamos as respostas de anticorpos do tipo IgG contra cada uma das cinco novas proteínas recombinantes, observamos que três

delas, as quais contêm o domínio II (II, I-II e II-III) do ectodomínio de AMA-1, foram altamente imunogênicas em infeções naturais, sendo reconhecidas por mais de 50% dos indivíduos durante a infecção patente por *P. vivax* (Figura 9). Estes dados demonstram que o DII é particularmente imunogênico, tanto individualmente, quanto em associação com DI e DIII. Em contraste aos nossos resultados, um estudo semelhante foi realizado previamente com PfAMA-1 e foi demonstrado que proteínas recombinantes representando os domínios separadamente (DI, DII ou DIII) foram pouco imunogênicas em infecções naturais. Além disso, apenas DI-II foi capaz de induzir, em coelhos, anticorpos capazes de inibir o crescimento e invasão de *P. falciparum in vitro* (LALITHA *et al*., 2004).

Recentemente foi mapeado o epítopo reconhecido pelo anticorpo monoclonal anti-PfAMA-1 4G2, o qual é capaz de inibir a invasão de *P. falciparum* (COLLINS *et al.,* 2007). Foi identificado que ele está localizado na base do “loop” do domínio II, o qual é bem conservado entre os ortólogos de *Plasmodium* (FENG *et al.,* 2005), contribuindo para futuros estudos de construção de vacinas de subunidades e também para ajudar a elucidar a função da proteína AMA-1. Juntos, estes dados sugerem que DII é fundamental para a função biológica de AMA-1 e pode ser considerado importante alvo para compor, em associação com outras proteínas, uma vacina contra a malária.

Com o objetivo de avaliar se os epítopos reconhecidos nas proteínas correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1 de *P. vivax* estão expostos na proteína recombinante correspondente ao ectodomínio, realizamos ensaios de ELISA por inibição, utilizando na placa a proteína DI-III. Os resultados obtidos com 31 amostras de soros indicam que, na concentração máxima de cada um dos inibidores, as porcentagens médias de inibição sugerem a presença de um maior

número de epítopos comuns entre as proteínas recombinantes baseadas nos domínios I-II e ectodomínio de AMA-1 (dados sumarizados na Figura 11). Entretanto, quando realizamos o ensaio de inibição na presença de soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1, observamos que DI-II foi capaz de inibir apenas 49,9% dos anticorpos contra o ectodomínio de AMA-1 (Figura 10). Estes dados sugerem que alguns epítopos presentes na proteína PV66/AMA-1, a qual foi produzida em leveduras, não estão presentes na proteína baseada nos domínios I-II. Entretanto, como mostra a Figura 9, epítopos relevantes estão presentes na proteína DI-II, pois esta foi reconhecida por 59% dos soros dos indivíduos com infecção patente por *P. vivax*. Por outro lado, DII-III inibiu 73,7% dos anticorpos contra o ectodomínio de AMA-1, o que sugere a presença de um grande número de epítopos comuns entre as proteínas recombinantes baseadas nos domínios II-III e PV66/AMA-1.

Alguns autores têm sugerido que a resposta imune naturalmente adquirida é direcionada contra o domínio I, por este apresentar maior diversidade antigênica em AMA-1 (HODDER *et al*., 2001; POLLEY *et al*., 2001; KENNEDY *et al*., 2002; POLLEY *et al*., 2003; CORTES *et al*., 2005), porém, acredita-se que seja necessário estar associado com o domínio II (FENG *et al*., 2005). O domínio II de PfAMA-1 apresenta poucas mutações e é carente de sítios altamente polimórficos, o que sugere que somente uma parte dele (compreendendo os *loops I e II*) está acessível ao sistema imune (FENG *et al*., 2005). Por outro lado, recentemente surgiram evidências de que o DII de PvAMA-1 sofre fortes pressões do sistema imune (GUNASEKERA *et al*., 2007). Este estudo consistiu na análise da diversidade de nucleotídeos do gene inteiro em isolados de *P. vivax* do Sri Lanka e foram encontrados 20 sítios polimórficos no DI, 12 sítios no DII e 2 no DIII. Mais de 50%

dos sítios polimórficos detectados em PvAMA-1 foram reportados em sítios similares em PfAMA-1 (CHESNE-SECK *et al.*, 2005), sugerindo que os polimorfismos, tanto em PvAMA-1 como PfAMA-1, têm função semelhante e são provavelmente resultantes da pressão seletiva sobre os epítopos para o reconhecimento dos anticorpos. Entretanto, segundo GUNASEKERA *et al.* (2007), AMA-1 de *P. falciparum* e *P. vivax* podem estar sob diferentes pressões em termos de seleção imune e limitações estruturais e/ou funcionais como proposto para PvTRAP e PfTRAP nos estudos conduzidos por PUTAPORNTIP *et al.* (2001). Apesar das diferenças observadas com relação às intensidades de seleção entre os domínios de *P. vivax* e *P. falciparum*, a distribuição dos sítios polimórficos da estrutura tridimensional das moléculas é similar (GUNASEKERA *et al.,* 2007). Cabe considerar que a interação entre os domínios I e II é mais importante estruturalmente que a interação entre os domínios II e III (FENG *et al.*, 2005).

Mais recentemente, um outro trabalho sobre análise da diversidade de nucleotídeos do gene inteiro de *pvama-1* em isolados da Sri Lanka também mostrou uma grande diversidade no gene, especificamente nas regiões que codificam para os domínios I e II da proteína AMA-1 (RAJESH *et al.*, 2007). Os resultados apresentados por GUNASEKERA *et al.* (2007) e RAJESH *et al.* (2007) alertam para o fato de que maiores estudos de polimorfismo do gene *pvama-1* precisam ser conduzidos, não somente para se estabelecer um repertório antigênico de isolados de regiões endêmicas de malária, mas também para elucidar os mecanismos pelo qual a diversidade antigênica pode ser gerada.

Segundo HEALER *et al.* (2004), os polimorfismos, que são gerados por pressão do sistema imune do hospedeiro, estão localizados nos três domínios do ectodomínio de AMA-1, sugerindo que os epítopos protetores estão distribuídos ao

longo de toda a proteína (IGONET *et al.*, 2007). Entretanto, divergentes conclusões a respeito do domínio III na resposta imune têm emergido a partir de diferentes estudos (IGONET *et al.*, 2007). Em estudos conduzidos por NAIR *et al.* (2002) os autores demonstraram que a proteína recombinante correspondente ao domínio III de AMA-1 de *P. falciparum* foi capaz de inibir o crescimento do parasita. Ainda, a imunização de camundongos utilizando uma formulação sintética baseada em um segmento do domínio III (*loop* I) de PfAMA-1 foi capaz de induzir anticorpos que apresentaram reatividade cruzada com o parasita. Neste estudo, foram produzidos tanto anticorpos policlonais, como monoclonais. Os resultados demonstraram que o anticorpo policlonal e alguns dos monoclonais mostraram atividade de inibição de crescimento (MUELLER *et al.*, 2003). Segundo IGONET *et al.* (2007), após observarem clara competição de três dos dez anticorpos monoclonais com o anticorpo baseado no domínio III pela ligação ao antígeno, sugeriram que o domínio III representa um importante alvo na resposta imune ao antígeno recombinante, pelo menos quando se referem ao modelo murino de imunização. Outros estudos, entretanto, concluíram que os domínios I e II induziram a quantidades mais significativas de anticorpos inibitórios (HODDER *et al.,* 2001; LALITHA *et al.,* 2004) e que somente uma pequena fração da resposta imune foi direcionada contra o domínio III (HEALER et al., 2004).

No presente estudo, também avaliamos um possível efeito “boost” resultante da exposição aos antígenos de formas sanguíneas de *P. vivax*. Para tanto, analisamos as freqüências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra os diferentes domínios de AMA-1 em relação ao número de episódios prévios de malária. Foi observado que a proporção de indivíduos que apresentam anticorpos IgG contras cada uma das cinco proteínas recombinantes (exceto DI) aumenta após

o primeiro episódio de malária, mas se estabelece após o segundo ou terceiro episódio de malária *vivax,* padrão correspondente a uma resposta primária e secundária de anticorpos (Figura 12). Esse resultado sugere uma associação entre exposição ao *P. vivax* e o desenvolvimento de anticorpos. Nossos resultados foram similares aos obtidos anteriormente pelo nosso grupo utilizando uma proteína recombinante baseada no ectodomínio de PvAMA-1 (RODRIGUES *et al.*, 2005).

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 recombinantes AMA-1 revelaram que IgG1, IgG3 e IgG4 predominaram contra todos os diferentes domínios de AMA-1. Uma proporção menor de indivíduos apresentou anticorpos da subclasse IgG2 para cada uma das proteínas (Tabela 4). Este padrão de resposta de subclasses de IgG foi diferente do observado anteriormente para o ectodomínio de AMA-1, quando anticorpos citofílicos do tipo IgG1 foram as subclasses de anticorpos que apresentaram predomínio absoluto na resposta imune em indivíduos expostos ao *P. vivax* procedentes de diferentes áreas endêmicas do Brasil (RODRIGUES *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2006). A prevalência de anticorpos anti-PvAMA-1 predominantemente citofílicos do tipo IgG1 e IgG3 foi também demonstrada recentemente por WICKRAMARACHCHI *et al.* (2006) em um estudo realizado utilizando-se soro de pacientes de 3 áreas do Sri Lanka.

Os resultados obtidos com a determinação das subclasses de IgG produzidas contra as proteínas AMA-1 revelaram uma ausência de predomínio de isotipo específico. 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-1_{19}, MSP-2, AMA-1 e GPI de *P. falciparum* em indivíduos de diferentes localidades na Tanzânia.

Juntos, nossos dados fornecem as primeiras observações da resposta de anticorpos humanos a domínios individuais de AMA-1 de *P. vivax*, sugerindo que o domínio II é particularmente imunogênico durante infecções naturais. Estes dados sugerem que proteínas recombinantes contendo o DII podem ser exploradas em futuros estudos de indução de resposta imune protetora contra a malária *vivax* em primatas não-humanos. O uso de um dos domínios (I, II ou III) individualmente poderia simplificar e deixar mais estáveis os produtos vacinais baseados em AMA-1 (CHESNE-SECK *et al*., 2005). Considerando-se que em *P. falciparum*: (i) o *loop* do DII apresenta um epítopo para célula T, implicado na resposta imune humana a AMA-1 (CHESNE-SECK *et al*., 2005) e, (ii) que o epítopo reconhecido pelo anticorpo monoclonal 4G2 (inibidor da invasão) foi mapeado no domínio II de PfAMA-1, esta região seria uma promissora candidata a compor uma vacina multicomponente e multiestágio contra a malária *vivax*.

VI. CONCLUSÕES

1. Cinco proteínas recombinantes correspondentes aos diferentes domínios de AMA-1 de *P. vivax* (I, II, III, I-II e II-III) foram expressas em *E. coli* em fusão com cauda de histidina. Somente a proteína DII foi purificada sob forma solúvel, as demais foram obtidas a partir de corpos de inclusão e purificadas por cromatografia de afinidade após "refolding" parcial;

2. As freqüências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG para as proteínas contendo o domínio II foram significativamente maiores do que as freqüências obtidas para as proteínas baseadas nos domínios I e III, individualmente; as subclasses de anticorpos IgG1, IgG3 e IgG4 foram prevalentes para todas as proteínas analisadas. Por outro lado, as freqüências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM foram mais baixas e variaram de 4% (DIII) a 36% (DII-III);

3. A freqüência de indivíduos sorologicamente positivos contra as proteínas recombinantes contendo o domínio II aumentam de acordo com o maior número de exposições prévias ao *P. vivax*, estabilizando-se após o segundo ou terceiro episódios de malária.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

AREVALO-HERRERA, M.; SOLRTE Y.; YASNOT. M. F.; CASTELLANOS, A.; RINCON, A.; SAUL, A.; MU, J.; LONG, C.; MILLER, L.; HERRERA, S. Induction of transmission-blocking immunity in Aotus monkeys by vaccination with a *Plasmodium vivax* clinical grade PVS25 recombinant protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73(5): 32-7, 2005.

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

BARRERO, C. A.; DELGADO, G.; SIERRA, A. Y.; SILVA, Y.; PARRA-LOPEZ, C.; PATARROYO, M. A. Gamma interferon levels and antibody production induced by two PvMSP-1 recombinant polypeptides are associated with protective immunity against *P. vivax* in *Aotus* monkeys. *Vaccine.* 23: 4048–4053, 2005.

BRADFORD, M. M. 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, 1976.

BRAGA, E. M.; BARROS, R. M.; REIS, T. A.; FONTES, C. J.; MORAIS, C. G.; MARTINS, M. S.; KRETTLI, A. U. Association of the IgG response to Plasmodium falciparum merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66(5): 461-6, 2002.

BREMAN, J. G.; ALILIO, M. S.; MILLS, A. Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 71(2): 1-15, 2004.

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

CARLTON, J. The Plasmodium vivax genome sequence and comparative analysis. In: VIVAX MALARIA RESEARCH, 2005, The Institute for Genomic Research Shady Grove Road Campus, Rockville, MD, USA.

CAVASINI, C. E.; MATTOS, L. C.; COUTO, A. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; VALENCIA, S. H.; NEIRAS, W. C.; ALVES, R. T.; ROSSIT, A. R.; CASTILHO, L.; MACHADO, R. L. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative

individuals from the Brazilian Amazon region: an exception?. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 101(10):1042-4, 2007

CERAVOLO, I. P.; BRUNA-ROMERO, O.; BRAGA, E. M.; FONTES, C. J.; BRITO, C. F.; SOUZA, J. M.; KRETTLI, A. U.; ADAMS, J. H.; CARVALHO, L. H. Anti-Plasmodium vivax duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72(6): 675-81, 2005.

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

CHESNE-SECK, M. L.; PIZARRO, J. C.; VULLIEZ-LE, N. B.; COLLINS, C. R.; BLACKMAN, M. J.; FABER, B. W.; REMARQUE, E. J.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BENTLEY, G. A. Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 144(1): 55-67, 2005.

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

COLLINS, W. E.; BARNWELL, J. W.; SULLIVAN, J. S.; NACE, D.; WILLIAMS, T.; BOUNNGASENG, A.; ROBERTS, J.; STROBERT, E.; MCCLURE, H.; SAUL. A.; LONG, C. A. Assessment of transmission-blocking activity of candidate Pvs25 vaccine using gametocytes from chimpanzees. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74(2): 215-221, 2006.

COLLINS, C. R.; WITHERS-MARTINEZ, C.; BENTLEY, G. A.; BATCHELOR, A. H.; THOMAS, A. W.; BLACKMAN, M. J. Fine mapping of an epitope recognized by aninvasion-inhibitory monoclonal antibody on the malaria vaccine candidate apicalmembrane antigen 1. *J. Biol. Chem*. 282(10):7431-41, 2007.

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

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

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

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

DEANS, J. A.; ALDERSON, T.; THOMAS, A. W.; MITCHELL, G. H.; LENNOX, E. S.; COHEN, S. Rat monoclonal antibodies which inhibit the in vitro multiplication of *Plasmodium knowlesi*. *Clin. Exp. Immunol.* 49(2):297-309, 1982.

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

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

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

DUTTA, S.; HAYNES, J. D.; MOCH, J. K.; BARBOSA, A.; LANAR, D. E. Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of Plasmodium falciparum merozoites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(21):12295-300, 2003.

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

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

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

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

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA, Ministério da Saúde. 2003. http://www.funasa.gov.br

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

GIERSING, B.; MIURA, K.; SHIMP, R.; WANG, J.; ZHOU, H.; ORCUTT, A.; STOWERS, A.; SAUL, A.; MILLER, L.; LONG, C.; SINGH, S. Posttranslational modification of recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1: impact on functional immune responses to a malaria vaccine candidate. *Infect Immun.* 3963-3970, 2005.

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

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

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

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

HEALER, J.; TRIGLIA, T.; HODDER, A. N.; GEMMILL, A. W.; COWMAN, A. F. Functional analysis of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 utilizing interspecies domains. *Infect. Immun.* 73(4):2444-51, 2005.

HEHL, A. B.; LEKUTIS, C.; GRIGG, M. E.; BRADLEY, P. J.; DUBREMETZ, J. F.; ORTEGA-BARRIA, E.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii* homologue of *plasmodium* apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. *Infect. Immun*. 68(12): 7078-86, 2000.

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

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

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

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

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

IGONET, S.; VULLIEZ-LE NORMAND, B.; FAURE, G.; RIOTTOT, M. M.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BENTLEY, G. A. Cross-reactivity studies of an anti-Plasmodium vivax apical membrane antigen 1 monoclonal antibody: binding and structural characterization. *J. Mol. Biol.* 366(5): 1523-37, 2007.

KINYANJUI, S. M.; CONWAY, D. J.; LANAR, D. E.; MARSH, K. IgG antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. *Malaria Journal*. 6: 82, 2007.

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

KOCKEN, C. H.; VAN DER WEL, A. M.; DUBBELD, M. A.; NARUM, D. L.; VAN DE RIJKE, F. M.; VAN GEMERT, G. J.; VAN DER LINDE, X.; BANNISTER, L. H.; JANSE, C.; WATERS, A. P.; THOMAS, A. W. Precise timing of expression of a Plasmodium falciparum-derived transgene in Plasmodium berghei is a critical determinant of subsequent subcellular localization. *J Biol Chem.* 12;273(24): 15119-24, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MILLER, L. H.; GOOD, M. F.; KASLOW, D. C. Vaccines against the blood stages of *falciparum* malaria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 452: 193-205, 1998a.

MILLER, L. H.; HOFFMAN, S. L. Research toward vaccines against malaria. *Nat. Med.* 4: 520-524, 1998b.

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

MUELLER, M. S.; RENARD, A.; BOATO, F.; VOGEL, D.; NAEGELI, M.; ZURBRIGGEN, R.; ROBINSON, J. A.; PLUSCHKE, G. Induction of parasite growth-inhibitory antibodies by a virosomal formulation of a peptidomimetic of loop I from domain III of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1. *Infect Immun*. 71(8): 4749-58, 2003.

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

NAIR, M.; HINDS, M. G.; COLEY, A. M.; HODDER, A. N.; FOLEY, M.; ANDERS, R. F.; NORTON, R. S. Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate, *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA-1). *J. Mol. Biol*. 322: 741-753, 2002.

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

NARUM, D. L.; OGUN, S. A.; THOMAS, A. W.; HOLDER, A. A. Immunization with Parasite-Derived Apical Membrane Antigen 1 or Passive Immunization with a Specific Monoclonal Antibody Protects BALB/c Mice against Lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM Blood-Stage Infection. *Infect. Immun*. 2899–2906, 2000.

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

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

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

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

POLLEY, S. D.; CHOKEJINDACHAI, W.; CONWAY, D. J. Allele frequency-based analyses robustly map sequence sites under balancing selection in a malaria vaccine candidate antigen. *Genetics*. 165: 555–561, 2003.

POLLEY, S. D.; MWANGI, T.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; DUTTA, S.; LANAR, D. E.; REMARQUE, E.; ROSS, A.; WILLIAMS, T. N.; MWAMBINGU, G.; LOWE, B.; CONWAY, D. J.; MARSH, K. Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine.* 16;23(5): 718-28, 2004.

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

PUTAPORNTIP, C.; JONGWUTIWES, S.; TIA, T.; FERREIRA, M. U.; KANBARA, H.; TANABE, K. Diversity in the thrombospondin-related adhesive protein gene (TRAP) of *Plasmodium vivax*. *Gene*. 268(1-2): 97-104, 2001.

RAJESH, V.; ELAMARAN, M.; VIDYA, S.; GOWRISHANKAR, M.; KOCHAR, D.; DAS, A. *Plasmodium vivax*: Genetic diversity of the apical membrane antigen-1 (AMA-1) in isolates from India. *Exp. Parasitol*. 116: 252–256, 2007.

RICH, S. M.; AYALA, F. J. Progress in malaria research: the case for phylogenetics. *Adv. Parasitol*. 54: 255-80, 2003.

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

ROGERS, W. O.; GOWDA, K.; HOFFMAN, S. L. Construction and immunogenicity of DNA vaccine plasmids encoding four *Plasmodium vivax* candidate vaccine antigens. *Vaccine.* 17: 3136-3144, 1999.

RYAN, J. R.; STOUTE, J. A.; AMON, J.; DUNTON, R. F.; MTALIB, R.; KOROS, J.; OWOUR, B.; LUCKHART, S.; WIRTZ, R. A.; BARNWELL, J. W.; ROSENBERG, R. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75(4): 575-81, 2006.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. *Nature.* 7;415(6872): 680-5, 2002.

SAUL, A.; LAWRENCE, G.; ALLWORTH, A.; ELLIOTT, S.; ANDERSON, K.; RZEPCZYK, C.; MARTIN, L. B.; TAYLOR, D.; EISEN, D. P.; IRVING, D. O.; PYE, D.; CREWTHER, P. E.; HODDER, A. N.; MURPHY, V. J.; ANDERS, R. F. A human phase 1 vaccine clinical trial of the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1 in Montanide ISA720 adjuvant. *Vaccine*. 27;23(23): 3076-83, 2005.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2005. Disponível em <http://dtr2001.saude.gov.br/svs>. Acesso em 15 dez. 2005.

SILVIE, O.; FRANETICH, J. F.; CHARRIN, S.; MUELLER, M. S.; SIAU, A.; BODESCOT, M.; RUBINSTEIN, E.; HANNOUN, L.; CHAROENVIT, Y.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; GEMERT, G. J. V.; SAUERWEIN, R. W.; BLACKMAN, M. J.; ANDERS, R. F.; PLUSCHKE, G.; MAZIER, D. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J. Biol. Chem.* 5;279(10): 9490-6, 2004.

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

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

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J. M.; MENARD, R.; HEUSSLER, V.

T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 313(5791):1287-90, 2006.

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

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

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

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

URQUIZA, M.; SUAREZ, J. E.; CARDENAS, C.; LOPEZ, R.; PUENTES, A.; CHAVEZ, F.; CALVO, J. C.; PATARROYO, M. E. *Plasmodium falciparum* AMA-1 erytrocyte binding peptides implicate AMA-1 as erytrocyte binding protein. *Vaccine*. 19: 508-513, 2000.

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

WATERS, A. P.; THOMAS, A. W.; DEANS, J. A.; MITCHELL, G. H.; HUDSON, D. E.; MILLER, L. H.; MCCUTCHAN, T. F.; COHEN, S. A merozoite receptor protein from *Plasmodium knowlesi* is highly conserved and distributed throughout *Plasmodium*. *J. Biol. Chem.* 265: 17974–17979, 1990.

WHITE, N. J. Malaria. In: COOK, G. C. ed. Manson´s Tropical Diseases. London: WB Saunder, 1087-1164, 1996.

WICKRAMARACHCHI, T.; PREMARATNE, P. H.; PERERA, K. L. R. L.; BANDARA, S.; KOCKEN, C. H. M.; THOMAS, A. W.; HANDUNNETTI, S. M.; UDAGAMA-RANDENIYA, P. V. Natural Human Antibody Responses to *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 under Low Transmission and Unstable Malaria Conditions in Sri Lanka. *Infect. Immun.* 74 (1): 798–801, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. 2005. Disponível em <http://www.who.int/tdr/diseases/malaria/>. Acesso em 18 maio 2005.