

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

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

Avaliação comparativa do reconhecimento imune de proteínas  
recombinantes derivadas de antígenos de superfície de  
merozoítas de *Plasmodium vivax*

Maria Helena Cruz Rodrigues

Dissertação para obtenção do grau  
de MESTRE

Orientadora:  
Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo  
2004

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005854

**Ficha Catalográfica**

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

R696a Rodrigues, Maria Helena Cruz  
Avaliação comparativa do reconhecimento imune de proteínas recombinantes derivadas de antígenos de superfície de merozoítas de *Plasmodium vivax* / Maria Helena Cruz Rodrigues. -- São Paulo, 2004.  
Iv. Paginação irregular.

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

Orientador: Soares, Irene da Silva

I. Parasitologia clínica 2. Imunologia I. T. II. Soares, Irene da Silva, orientador.

616.96 CDD

Maria Helena Cruz Rodrigues

Avaliação comparativa do reconhecimento imune de proteínas  
recombinantes derivadas de antígenos de superfície de  
merozoítas de *Plasmodium vivax*.

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Irene da Silva Soares  
Orientadora/presidente

Profa. Dra. Adelaide José Vaz  
1º. examinador

Profa. Dra. Maria Carmen Araújo Sanchez  
2º. examinador

São Paulo, 06 de maio de 2004.

“A esperança é algo que traz o sol às sombras das nossas vidas. É nosso vínculo com um amanhã melhor. Quando a esperança se vai, também se vai nossa força vital. Enquanto a esperança permanece viva, também permanece nossa determinação de prosseguir”.

Yitta Halberstam

## **Dedicatória**

A minha mãe pelo apoio de todas as horas, pelo seu amor incondicional, pelo incentivo ao estudo, caracterizando-o como oportunidade valiosa e única para o enriquecimento de minha vida. Aos meus sobrinhos: Amanda, Victória, Laura, Gustavo, Lucas e Gabriel que são fonte do meu entusiasmo e persistência em busca dos meus objetivos, cuja alegria preenche de amor a minha vida.

## **Dedicatória**

Ao Dener, meu amado noivo, cujo amor, lealdade e presença constante constitui o sustentáculo de minha vida, sendo essencial durante a trajetória deste trabalho. Sua força motivadora me fez acreditar que todo o sonho é possível de se realizar, basta nunca desistir de lutar.

---

### **Agradecimentos especiais**

Aos meus irmãos (Rosivaldo Jr., Rosane, Rosiane, Rosilena e Márcia) e primos amados (Cláudio e Claudete) que muito contribuíram na realização deste sonho.

Ao meu Tio Claudomir, que com sabedoria ajudou-me a voar com minhas próprias asas, o maior e melhor presente da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Irene da Silva Soares, pela orientação com presteza e profissionalismo, pela oportunidade do enriquecimento intelectual essencial no processo do meu crescimento.

Meu agradecimento especial para Karen, pela amizade, companheirismo, apoio nos momentos difíceis, e especialmente pelo entusiasmo que foi essencial para superar os obstáculos desta caminhada.

As minhas colegas de bancada, Tatiane, Karina, Maria Carolina, Andréia, pelo convívio diário, solidariedade nas horas difíceis e jubilo nos momentos de glória.

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

A Profa. Dra. Adelaide Vaz e Profa. Dra. Ana Campa, por ter permitido a utilização de alguns equipamentos em seus laboratórios.

A Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes pela amizade e força nas horas de dificuldades.

A Profa. Dra. Adelaide Vaz e Profa. Dra. Sandra Ávila, pelos comentários e sugestões no exame de qualificação.

A Karina Martineli Rodrigues, pela amplificação e clonagem do gene *ama-1*.

A técnica Sonia pela ajuda, compreensão e amizade durante esta caminhada.



Ao Prof. Dr. Mauricio M. Rodrigues do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP, pela ajuda nos experimentos de sequenciamento do gene *ama-1*.

A Daniela Santoro Rosa, pela obtenção do soro policlonal anti-PV66-AMA-1 em camundongos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram com incentivos constantes e amizades verdadeiras.

Meus sinceros agradecimentos.

---

“Um dos mais elevados deveres humanos é o dever do encorajamento... É fácil rir dos ideais dos homens; é fácil despejar água fria no seu entusiasmo; é fácil desencorajar os outros. O mundo está cheio de desencorajadores. Temos o dever de encorajar-nos uns aos outros. Muitas vezes uma palavra de reconhecimento, ou de agradecimento, ou apreço, ou ânimo tem mantido um homem em pé”.

Willian Barclay

## SUMÁRIO

Lista de figuras . . . . .	xiv
Lista de tabelas. . . . .	xvi
Lista de abreviaturas. . . . .	xvii
Resumo . . . . .	xx
Abstract . . . . .	xxii
<b>I. Introdução . . . . .</b>	<b>01</b>
1. A situação atual da malária no mundo e no Brasil. . . . .	02
2. Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> e patogenia da malária . . . . .	03
3. Estratégias de controle da malária e perspectivas de desenvolvimento de vacina contra o <i>P. vivax</i> . . . . .	06
4. Diagnóstico laboratorial da malária . . . . .	15
5. Racional para o possível uso de um método de diagnóstico baseado na detecção de anticorpos anti-MSP1 <sub>19</sub> de <i>P. vivax</i> . . . . .	17
<b>II. Objetivos . . . . .</b>	<b>19</b>
1. Objetivo geral . . . . .	20
2. Objetivos específicos . . . . .	20
<b>III. Material e Métodos . . . . .</b>	<b>21</b>
1. Amostras de sangue . . . . .	22
1.1 Indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> procedentes de diferentes áreas endêmicas da Região Amazônica . . . . .	22
1.2 Indivíduos expostos ao <i>P. falciparum</i> procedentes da África . . . . .	23

1.3	Indivíduos com outras doenças não relacionadas à malária . . . . .	23
1.4	Indivíduos saudáveis . . . . .	24
2.	Composição dos reagentes, soluções e meios de cultura utilizados . . . . .	24
2.1	Reagentes e soluções . . . . .	24
2.2	Meios de cultura . . . . .	26
3.	Obtenção das proteínas recombinantes em bactérias e leveduras para uso nos ensaios imunológicos “in vitro” . . . . .	26
4.	Expressão e purificação da proteína recombinante AMA-1 em fusão com His <sub>6</sub> . . . . .	29
5.	Imunização de camundongos para obtenção de soro policlonal anti-PV66/AMA-1 . . . . .	30
6.	Deteção da proteína recombinante AMA-1 por “immunoblotting” . . . . .	31
7.	Ensaio imunoenzimático (ELISA) . . . . .	31
7.1	ELISA para deteção de anticorpos IgG . . . . .	31
7.2	ELISA para deteção de anticorpos IgG subclasses específicos . . . . .	33
7.3	ELISA para deteção de anticorpos IgM . . . . .	33
7.4	ELISA de inibição . . . . .	34
8.	Análise estatística . . . . .	34

<b>IV. Resultados</b> . . . . .	35
1. Avaliação comparativa da antigenicidade das proteínas recombinantes representando a MSP1 <sub>19</sub> de <i>P. vivax</i> expressas em diferentes vetores (bactérias e leveduras) . . . . .	36
2. Avaliação da especificidade do ensaio imunoenzimático utilizando proteínas recombinantes derivadas da MSP1 <sub>19</sub> de <i>P. vivax</i> para o diagnóstico sorológico da malária . . . . .	39
3. Obtenção do gene que codifica a proteína AMA-1 de <i>P. vivax</i> . . . . .	40
4. Expressão e purificação da proteína recombinante His <sub>6</sub> -AMA-1. . . . .	43
5. Avaliação comparativa do reconhecimento das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 e His <sub>6</sub> -MSP1 <sub>19</sub> por anticorpos IgG. . . . .	45
6. Determinação da freqüência de indivíduos respondedores para His <sub>6</sub> -AMA-1 por anticorpos IgM, IgG e subclasses de IgG . . . . .	52
7. Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos anti-His <sub>6</sub> -AMA-1 . . . . .	53
<b>V. Discussão</b> . . . . .	56
<b>VI. Conclusões</b> . . . . .	65
<b>VII. Referências bibliográficas</b> . . . . .	68
<b>VIII. Anexo</b> . . . . .	81

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Análise em SDS-PAGE 12% das proteínas recombinantes derivadas da MSP1 <sub>19</sub> de <i>P. vivax</i> . . . . .	36
<b>Figura 2.</b> Comparação da resposta de anticorpos de 200 amostras de soro de indivíduos com malária vivax contra as proteínas recombinantes derivadas da MSP1 <sub>19</sub> . . . . .	38
<b>Figura 3.</b> Análise da especificidade do ensaio imunoenzimático baseado na detecção de anticorpos contra proteínas recombinantes derivadas da MSP1 <sub>19</sub> . . . . .	41
<b>Figura 4.</b> Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos dos genes <i>pv66/ama-1</i> (acesso Y16950) e <i>ama-1</i> isolado de DNA genômico de indivíduo infectado procedente da Região Amazônica (paciente 12B, <i>clone 9</i> ) . . . . .	42
<b>Figura 5.</b> Etapas da purificação da proteína recombinante AMA-1 expressa em <i>E. coli</i> a partir do vetor pHIS. . . . .	44
<b>Figura 6.</b> Análise do reconhecimento imune da proteína recombinante His <sub>6</sub> -AMA-1 por “immunoblotting” . . . . .	44

<b>Figura 7.</b> Análise comparativa da reatividade de soros de indivíduos com malária patente por <i>P. vivax</i> contra as diferentes proteínas recombinantes . . . . .	46
<b>Figura 8.</b> Comparação da resposta de anticorpos de 200 amostras de soro de indivíduos com malária vivax contra as proteínas recombinantes derivadas de <i>P. vivax</i> . . . . .	47
<b>Figura 9.</b> Comparação do reconhecimento das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 e MSP1 <sub>19</sub> por anticorpos IgG dos soros coletados de 200 indivíduos durante infecção por <i>P. vivax</i> . . . . .	48
<b>Figura 10.</b> Ensaio de inibição por ELISA (I). . . . .	50
<b>Figura 11.</b> Ensaio de inibição por ELISA (II). . . . .	51
<b>Figura 12.</b> Análise da reatividade de soros de indivíduos com malária patente contra a proteína recombinante His <sub>6</sub> -AMA-1 . . . . .	52
<b>Figura 13.</b> Determinação das subclasses de IgG específicas capazes de reconhecer a proteína recombinante His <sub>6</sub> -AMA-1 . . . . .	53
<b>Figura 14.</b> Análise comparativa da resposta de indivíduos com infecção aguda quanto ao número de episódios prévios de malária . . . . .	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais antígenos de merozoíta de <i>P. vivax</i> identificados e caracterizados . . . . .	07
<b>Tabela 2.</b> Sumário das proteínas recombinantes derivadas da MSP1 <sub>19</sub> e AMA-1 de <i>P. vivax</i> produzidas em <i>E. coli</i> e <i>Pichia pastoris</i> . . . . .	29
<b>Tabela 3.</b> Análise da reatividade dos soros de indivíduos com malária por <i>P. vivax</i> procedentes de diferentes áreas endêmicas do Estado do Pará contra proteínas recombinantes derivadas da MSP1 <sub>19</sub> . . . . .	37



## LISTA DE ABREVIATURAS

2-ME	2-mercaptoetanol
aa	aminoácidos
ADCI	Antibody-Dependent Cellular Inhibition
AMA	Antígeno de Membrana Apical
Amp	Ampicilina
BSA	Albumina Sérica Bovina
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Ácido cítrico
CHAPS	3-(-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulfonate
DAB	3,3-diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade Ótica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilenodiamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
FAN	Fator antinuclear
FR	Fator reumatóide
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GST	Glutathiona S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HBC	Vírus da hepatite C
HBV	Vírus da hepatite B
HCl	Ácido clorídrico
His <sub>6</sub>	Cauda de seis resíduos de histidina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano
HRP2	"histidine-rich protein 2"
ICBs	"Interspecies conserved blocks"
ICT	"Immunochromatographic test"

IFN- $\gamma$	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
kb	Quilo pares de bases
kDa	Quilo Dalton
L	Litro
LB	Luria Bertani
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MSP	Proteína de Superfície do Merozoíta
N	Normal
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio bibásico
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio monobásico
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
OPD	Orto-fenilenodiamina
PADRE	“Pan-Allelic DR epitope”
Pb	Pares de bases
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia
pLDH	Lactato desidrogenase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
rpm	rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio
ssRNA	Ácido ribonucléico fita simples
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TEMED	N,N,N',N' tetrametil etilenodiamida
TNF	Fator de necrose tumoral

Tris	Hidroximetilaminometano
V	Volt
vol/vol	volume/volume
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar

## RESUMO

No presente estudo avaliamos comparativamente a antigenicidade de quatro proteínas recombinantes correspondentes à região C-terminal da Proteína 1 de Superfície do Merozoíta (MSP1<sub>19</sub>) e duas proteínas recombinantes derivadas do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *Plasmodium vivax*. Vários aspectos da resposta imune naturalmente adquirida ao *P. vivax* foram avaliados em indivíduos de áreas endêmicas de malária visando contribuir para o diagnóstico sorológico e para o desenvolvimento de uma vacina contra as formas sanguíneas de *P. vivax*.

Inicialmente, desenvolvemos um ensaio imunoenzimático (ELISA), usando como antígenos quatro proteínas recombinantes derivadas da região C-terminal da MSP1 de *P. vivax* (MSP1<sub>19</sub>) produzidas a partir de diferentes vetores de expressão. Três proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* e uma em *Pichia pastoris*. Estas proteínas foram comparadas quanto ao reconhecimento por anticorpos IgG de 200 pacientes infectados por *P. vivax*, 53 indivíduos africanos expostos ao *P. falciparum*, 128 indivíduos com outras doenças não relacionadas à malária e 49 indivíduos normais. A sensibilidade total obtida no ensaio foi de 95% e a especificidade variou de 97,7 a 100%. Os nossos resultados demonstram que um ELISA utilizando uma única proteína recombinante baseada na MSP1<sub>19</sub> pode ser utilizado como base para o desenvolvimento de um método sorológico de detecção da malária causada por *P. vivax*.

Posteriormente, expressamos em *E. coli* uma proteína recombinante correspondente a AMA-1 de *P. vivax* (His<sub>6</sub>-AMA-1) e avaliamos o reconhecimento imune desta por soros de indivíduos de área endêmica de malária. A frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM e IgG específicos contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 foi de 48,5% e 85%, respectivamente. A frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra His<sub>6</sub>-AMA-1 ou PV66/AMA-1 produzida em *Pichia pastoris* foi similar. A

subclasse de anticorpo IgG específico para His<sub>6</sub>-AMA-1 foi predominantemente IgG1.

Os ensaios de inibição utilizando as duas proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 (His<sub>6</sub>-AMA-1 e PV66/AMA-1) indicam a presença de epítomos de reatividade cruzada assim como específicos para os dois antígenos. Nossos resultados sugerem que a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 produzida em *E. coli* mantém suas propriedades antigênicas e pode ser utilizada, assim como a MSP1<sub>19</sub>, para estudos imuno-epidemiológicos em áreas endêmicas de malária.

## ABSTRACT

In the present study, we evaluated comparatively the antigenicity of four recombinant proteins corresponding the C-terminal region of the Merozoite Surface Protein-1 (MSP1<sub>19</sub>) and two recombinant proteins derived from Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) of *Plasmodium vivax*. Several aspects of the naturally acquired immune responses to the *P. vivax* were evaluated in individuals from malaria endemic areas aiming at contribute to the serological diagnosis and to the development of a vaccine against erythrocytic stages of malaria.

Initially, we developed an immune-enzymatic assay (ELISA) using as antigens four recombinant proteins derived from the C-terminal region of *P. vivax* MSP-1 (MSP1<sub>19</sub>) produced from the different expression vectors. Three recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli* and a fourth in *Pichia pastoris*. These proteins were compared with regard the recognition by IgG antibodies from 200 patients infected with *P. vivax*, 53 african individuals exposed to *Plasmodim falciparum*, 128 individuals with other diseases not related to the malaria and 49 healthy individuals. Overall, the sensitivity obtained in the assay was 95% and the specificity values varied from 97.7 to 100%. Our study demonstrated that an ELISA using a single recombinant protein of the MSP1<sub>19</sub> can be used as the basis for the development of a valuable serological assay for the detection of *P. vivax* malaria.

Subsequently, we expressed in *E. coli* a recombinant protein corresponding to the AMA-1 of *P. vivax* (His<sub>6</sub>-AMA-1) and evaluated the immune recognition of this antigen by serum from individuals from malaria endemic areas. The frequency of individuals who presented specific IgM and IgG antibodies specific for the recombinant protein His<sub>6</sub>-AMA-1 were 48.5% and 85%, respectively. The frequency of individuals who presented IgG antibodies to His<sub>6</sub>-AMA-1 or to PV66/AMA-1 produced in *Pichia pastoris* was similar. The subclass of specific IgG antibody to His<sub>6</sub>-AMA-1 was predominantly IgG1.

Inhibition assays using the two recombinant antigens derived from AMA-1 (His<sub>6</sub>-AMA-1 and PV66/AMA-1) indicated the presence of cross-reactive epitopes, as well as specific ones. Our results suggest that the recombinant protein His<sub>6</sub>-AMA-1 produced in *E. coli* maintains some of its antigenic properties and can be utilized in the same way as MSP1<sub>19</sub> to immunological studies in malaria endemic areas.

## **I. Introdução**

---



## 1. A situação atual da malária no mundo e no Brasil

A malária é uma doença parasitária potencialmente letal que, juntamente com a AIDS e a tuberculose, atinge e mata um número expressivo de pessoas, constituindo-se num dos maiores e mais graves problemas de saúde pública mundial deste século. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2002), a malária representa hoje a antroponose de maior prevalência no mundo. Atualmente, cerca de 40% da população mundial corre o risco de contrair a malária. A OMS estima que ocorra cerca de 300 a 500 milhões de casos anuais com uma mortalidade calculada em mais de 1 milhão de indivíduos. A maioria das mortes acontece na África, entre crianças menores de cinco anos de idade e mulheres grávidas. Em média, a malária mata uma criança a cada 30 segundos (OMS, 2002).

A malária é causada por protozoários intracelulares pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*, o qual apresenta várias espécies, mas apenas quatro infectam o homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, e *P. ovale*. Destas espécies *P. falciparum* e *P. vivax* são responsáveis pela maioria dos casos da doença no mundo, sendo que o *P. falciparum* é o mais patogênico, podendo levar o paciente ao óbito em poucos dias, principalmente em pessoas que estão tendo malária pela primeira vez (OMS, 2002).

No Brasil, mais de 99% dos casos de malária ocorrem na Amazônia Legal. No período de janeiro a agosto de 2003, foram registrados 208.718 casos de malária no Brasil, sendo que o *P. vivax* foi responsável por 78,5% dos casos. Comparando-se ao mesmo período do ano de 2002, observou-se uma redução de 13,7% no número de casos de malária. Os estados que registraram maior número de casos da doença foram o Amazonas, Pará e Rondônia (Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, dados parciais, 2003).

A disseminação espacial da malária na Amazônia é devida, principalmente, ao grande fluxo migratório da população do campo para os

grandes centros urbanos. Este fenômeno social tem contribuído para o aumento dos casos de malária nas periferias de algumas capitais da Amazônia Legal. A falta de infra-estrutura e saneamento básico em áreas ocupadas de forma não planejada, nos grandes centros urbanos, contribui para a formação de focos de criadouros de anofelinos (MARQUES, 1986, 1987).

A malária é uma doença que diminui a capacidade de trabalho, ocasionando prejuízos econômicos. Estudos epidemiológicos realizados no Brasil mostraram que a maior incidência da doença é em indivíduos adultos do sexo masculino (CAMARGO *et al.*, 1994). O Estado passou a tomar providências no sentido de combater a doença, adotando medidas de controle que incluem o diagnóstico precoce, tratamento imediato dos casos, controle dos insetos vetores e monitoração regular dos fatores de risco (epidemiológicos, ecológicos e sócio-econômicos). Apesar de todos os esforços, a malária continua sendo um sério problema de saúde pública no Brasil, particularmente na Amazônia Legal.

## **2. Ciclo biológico do *Plasmodium* e patogenia da malária**

A malária é transmitida por picadas de fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*. A principal espécie responsável pela transmissão da malária na Amazônia é o *Anopheles darlingi* (TADEI & THATCHER, 2000). A transmissão é mais comum em áreas rurais e semi-rurais, mas pode ocorrer em áreas urbanas, principalmente nas periferias das cidades (Fundação Nacional de Saúde - FUNASA, Ministério da Saúde, 2003).

O parasita causador da malária apresenta um ciclo de vida com uma fase sexuada que ocorre na fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* e três etapas de reprodução assexuada, sendo uma no hospedeiro invertebrado e as outras duas no hospedeiro vertebrado. A reprodução sexuada ocorre no mosquito, após o repasto sanguíneo em indivíduos infectados com gametócitos (formas infectantes para o mosquito). Os gametas masculinos e femininos dão início ao processo de fertilização,

produzindo um zigoto, que caminha para a parede intestinal transformando-se em um oocisto. Este dá início a esporogonia, que resulta em milhares de esporozoítas localizados nas glândulas salivares do inseto. Durante um novo repasto sanguíneo a fêmea inocula esporozoítas na corrente sanguínea do homem, onde permanecem por aproximadamente uma hora.

Após a invasão dos hepatócitos pelos esporozoítas, estes se transformam em esquizontes hepáticos, que amadurecem e sofrem várias divisões, produzindo milhares de merozoítas. Após o rompimento dos hepatócitos, os merozoítas deixam o fígado e invadem os eritrócitos e/ou reticulócitos, iniciando assim, a segunda etapa do ciclo assexuado do parasita (ciclo eritrocítico). Neste ciclo ocorre uma nova divisão assexuada, dando origem aos trofozoítas, que amadurecem e se dividem várias vezes formando os esquizontes. Com a ruptura da célula sanguínea os merozoítas liberados reinfectam novas hemácias. Após um período de replicação assexuada, alguns trofozoítas se diferenciam em gametócitos, que amadurecem sem divisão celular e tornam-se infectantes ao mosquito. O ciclo eritrocítico é responsável pela patogenia e manifestações clínicas da malária. O período de incubação varia, dependendo da espécie de *Plasmodium*, sendo em média de 15 dias.

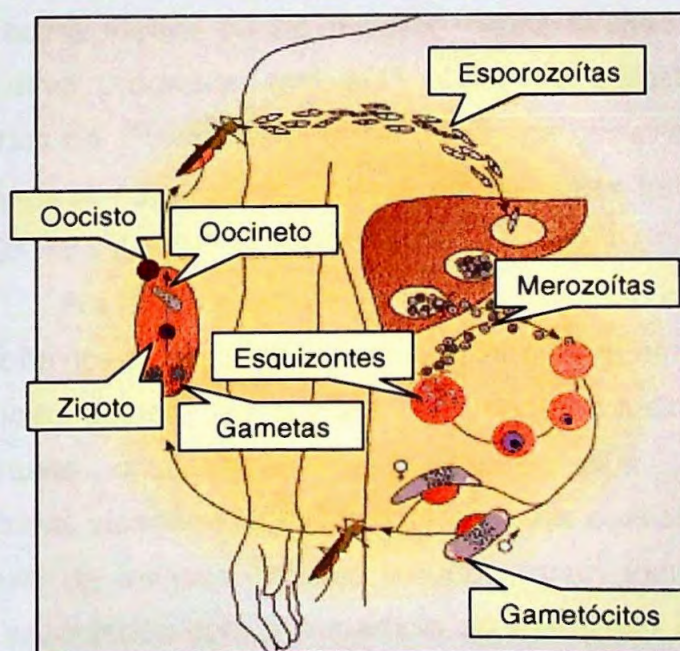
A principal característica clínica da malária em indivíduos não-imunes é o paroxismo malárico, constituído principalmente por febre, calafrios e cefaléia, como foi demonstrado primeiramente por GOLGI (1889). Este fenômeno é uma consequência da ruptura dos eritrócitos infectados com esquizontes durante o ciclo eritrocítico do parasita. Com a repetição do paroxismo malárico, o paciente vai ficando cada vez mais abatido e pálido. Aparecem náuseas e vômitos pós-alimentares, mialgias, artralgias e astenia. A anemia pode ser bastante acentuada, principalmente nos pacientes em estado mais grave (crianças e gestantes).

A gravidade da malária varia em função da espécie infectante. Na infecção por *P. falciparum* a ausência de tratamento rápido e eficiente pode levar a várias formas clínicas graves da malária, em que o seqüestramento de eritrócitos causa patologêneses severas como malária cerebral, malária

pulmonar, insuficiência renal aguda, coagulação intravascular disseminada e outras, podendo levar o paciente ao óbito.

Embora a infecção por *P. vivax* raramente leve o indivíduo à morte, já foram relatadas complicações respiratórias e anemia, principalmente em crianças. Além disso, em algumas regiões da Ásia, a infecção está associada ao risco aumentado de nascimento de bebês com baixo peso (SINA, 2002). Recentemente, foi sugerido que a resposta antiparasitária do hospedeiro também contribui para as manifestações clínicas da malária causada por *P. vivax* (KARUNAWEERA *et al.*, 2003). Como não existe um sincronismo na ruptura dos eritrócitos infectados, há liberação de grandes quantidades de antígenos do parasita que induzem uma resposta imune exacerbada caracterizada pela liberação de citocinas (IL-2, GM-CSF e TNF- $\alpha$ ) e, conseqüentemente, o paciente apresenta os sintomas do paroxismo malárico.

A seguir uma figura ilustrativa do ciclo de vida do *Plasmodium* adaptada do "site" <http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/model02.html>.



### **3. Estratégias de controle da malária e perspectivas de desenvolvimento de vacina contra o *P. vivax*.**

Atualmente, o controle da malária tem sido feito através de medidas profiláticas individuais ou ao nível de população. Entretanto, nos últimos anos o número de casos de malária registrados tem aumentado na maioria dos países. As razões para este aumento são de natureza sócio-econômica, mudanças climáticas globais e locais, e biológicas pelo aparecimento de parasitas e mosquitos resistentes a drogas. Para impedir a expansão da malária, serão necessários mais esforços para implementar novas estratégias de controle e informação sobre a doença. Neste contexto, acredita-se que é urgentemente necessário o desenvolvimento de medidas de controle adicionais, como vacinas, novas drogas e inseticidas. Os projetos genomas do mosquito, parasita e humano também podem ajudar a compreender a biologia de cada um e a buscar novas ferramentas de controle para a doença.

Uma estratégia importante no controle da morbidade ou mortalidade da doença em áreas endêmicas seria o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra malária. Neste sentido, nos últimos anos, um significativo progresso tem sido obtido na caracterização molecular, de antígenos de *Plasmodium*, assim como na compreensão dos mecanismos imunológicos capazes de eliminar as diferentes formas do parasita (revisto por SOARES & RODRIGUES, 1998).

Na fase sangüínea, durante o processo de invasão do eritrócito, o merozoíta fica exposto ao sistema imune e, portanto, antígenos presentes na superfície destes merozoítas poderiam induzir resposta imune que bloqueasse o desenvolvimento do parasita. Vários estudos foram conduzidos visando identificar e caracterizar esses antígenos relevantes no processo de invasão. Nestes estudos foram identificados antígenos que estão associados com a superfície do merozoíta ou estão localizados em organelas do polo apical (roptrias e micronemas).

---

No caso específico do *P. vivax*, as pesquisas enfocando a caracterização de antígenos-alvo para o desenvolvimento de vacinas têm sido limitadas, primeiramente pela dificuldade de se obter grandes quantidades de parasitas, uma vez que o cultivo deste ainda é restrito a poucos laboratórios (GOLENDÁ *et al.*, 1997) e, segundo, pelas baixas parasitemias obtidas diretamente de pacientes infectados. Porém, com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, foi possível o isolamento, a clonagem e seqüenciamento dos genes que codificam antígenos imunologicamente relevantes de *P. vivax*. Assim, permitindo a obtenção de proteínas recombinantes correspondentes a diferentes regiões antigênicas, as quais estão sendo utilizadas em estudos imunológico-epidemiológicos e imunizações experimentais, visando uma melhor compreensão da resposta imune humana e o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax*. A Tabela 1 apresenta os principais antígenos de merozoítas de *P. vivax* cujos genes foram clonados e sequenciados.

**Tabela 1. Principais antígenos de merozoíta de *P. vivax* identificados e caracterizados.**

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

Dentre as proteínas expressas na superfície do merozoíta de *P. vivax*, duas foram selecionadas como alvo para nossos estudos comparativos de antigenicidade de proteínas recombinantes e serão mais detalhadas a seguir.

### **Proteína 1 da Superfície de Merozoítas (MSP-1)**

Entre os antígenos de superfície de merozoítas já caracterizados, um dos principais candidatos para o desenvolvimento de uma vacina contra as formas sangüíneas de *Plasmodium*, é a Proteína 1 da Superfície de Merozoíta (MSP-1) (revisto por FERREIRA & SOARES, 2000).

A MSP-1 é uma proteína que está presente em todas as espécies de *Plasmodium* e dependendo da espécie, o peso molecular varia de 180 a 230 kDa (revisto por HOLDER & BLACKMAN, 1994). Estudos realizados com *P. falciparum* mostraram que a MSP-1 é sintetizada durante a esquizogonia (HOLDER & FREEMAN, 1982) e permanece associada à membrana do merozoíta através da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (revisto por HOLDER & RILEY, 1996). A importância biológica da MSP-1 para a sobrevivência do parasita é desconhecida. Entretanto, tentativas de deletar o gene da *mSP-1* resultaram em parasitas inviáveis, o que sugere que esta proteína é importante para a sobrevivência do parasita (O'DONNELL *et al.*, 2000).

Foi demonstrado que essa proteína é sintetizada inicialmente como um precursor de aproximadamente 200 kDa, que durante a invasão do merozoíta é processado por clivagem proteolítica, em que apenas parte da porção C-terminal permanece na superfície do merozoíta. Após a primeira etapa de clivagem quatro fragmentos são originados (83, 30, 38 e 42 kDa), então o fragmento de 42 kDa (MSP<sub>1,42</sub>) sofre uma segunda etapa de clivagem originando dois fragmentos de 33 e 19 kDa (GARMAN *et al.*, 2003) Apenas o fragmento de 19 kDa (MSP<sub>1,19</sub>) permanece ancorado à membrana e é carregado para dentro dos eritrócitos na superfície dos merozoítas (BLACKMAN *et al.*, 1990). Anticorpos que reconhecem a MSP<sub>1,19</sub> podem

inibir a invasão de merozoítas de diversas espécies de *Plasmodium*, incluindo *P. vivax* (BLACKMAN *et al.*, 1990; CHANG *et al.*, 1992; CHAPEL & HOLDER, 1993).

Nas diferentes espécies de *Plasmodium* a estrutura da MSP1<sub>19</sub> consiste de dois domínios. Estes domínios apresentam 10 a 12 resíduos de cisteínas, sendo que o domínio 1 apresenta 4-6 resíduos e forma 2 a 3 ligações dissulfídicas, o domínio 2 apresenta seis resíduos e forma 3 ligações dissulfídicas, ambos configurados de maneira semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF) (GARMAN *et al.*, 2003). Este tipo de conformação foi inicialmente sugerido pela seqüência primária de aminoácidos e, recentemente, foi confirmada pela análise cristalográfica de proteínas recombinantes representando a MSP1<sub>19</sub> de *P. cynomolgi* e *P. knowlesi* (CHITARRA *et al.*, 1999; GARMAN *et al.*, 2003). A estrutura da MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax* deve apresentar uma grande semelhança com a de *P. cynomolgi*, pois a diferença na seqüência primária da MSP1<sub>19</sub> entre as duas espécies é de apenas 11 aminoácidos.

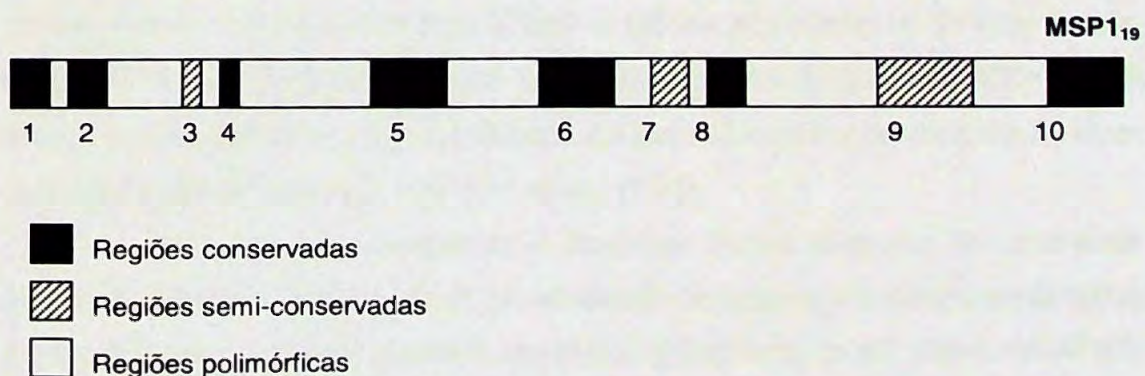
Na MSP1<sub>19</sub> de *P. falciparum* estes domínios apresentam 12 resíduos de cisteínas, com seis ligações dissulfídicas, três para cada domínio. Esta diferença foi observada por análise estrutural da molécula por Ressonância Magnética Nuclear (NMR) (MORGAN *et al.*, 1999). Através do alinhamento dos domínios EGF-like 1 e 2 foi observada uma substituição de uma cisteína por um triptofano no resíduo 28 do primeiro domínio nas outras espécies de *Plasmodium*, enquanto no *P. falciparum* este resíduo está conservado (CHITARRA *et al.*, 1999; PIZARRO *et al.*, 2003; GARMAN *et al.*, 2003).

A comparação entre as três estruturas da MSP1<sub>19</sub> revelou que estas são muito similares. A MSP1<sub>19</sub> de *P. knowlesi* compartilha uma identidade de 82% com a seqüência de *P. cynomolgi* e 51% de identidade com a seqüência de *P. falciparum*. Entretanto, a MSP1<sub>19</sub> de *P. knowlesi* apresenta um sítio de ligação para histidina no primeiro domínio EGF, o qual não está presente na estrutura das duas outras espécies de *Plasmodium* (GARMAN *et al.*, 2003).



O potencial antigênico da MSP-1 foi observado inicialmente em estudos de imunização experimental realizados em roedores ou primatas não humanos usando a proteína nativa purificada do parasita. A imunização de camundongos ou macacos com as proteínas de *P. yoelii* ou *P. falciparum*, respectivamente, foi capaz de induzir proteção significativa contra a infecção (HOLDER & FREEMAN, 1981; SIDIQI *et al.*, 1987). Recentemente, resultados semelhantes têm sido obtidos usando proteínas recombinantes representando a MSP1<sub>42</sub> ou a MSP1<sub>19</sub> de *P. yoelii* e *P. falciparum* emulsificadas em diferentes adjuvantes comerciais (revisto por WIPASA *et al.*, 2002). Sabe-se que anticorpos que reconhecem este antígeno, principalmente a MSP1<sub>19</sub>, podem inibir a invasão de merozoítas de diversas espécies de *Plasmodium* (BLACKMAN *et al.*, 1990; CHANG *et al.*, 1992; CHAPEL & HOLDER, 1993).

O gene que codifica a MSP-1 de *P. vivax* tem várias similaridades com os genes de outras espécies de *Plasmodium*. A comparação das seqüências de nucleotídeos dos genes da MSP-1 de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. yoelii* revelaram a existência de 10 blocos conservados entre as espécies (ICBs) alternando com regiões de maior diversidade (DEL PORTILLO *et al.*, 2001). Estas regiões estão esquematizadas na figura abaixo (adaptada de FERREIRA & SOARES, 2000).



Duas famílias dimórficas foram descritas inicialmente, e definidas pelas seqüências das cepas de *P. vivax* Belém e Salvador/Sal-1 (DEL

PORTILLO *et al.*, 1991; GIBSON *et al.*, 1992). Estas duas formas alélicas são relativamente conservadas com uma similaridade global de 81%. A análise da estrutura primária da MSP-1 destas duas cepas de parasita permitiu a definição de regiões conservadas, semi-conservadas e variáveis da molécula (GIBSON *et al.*, 1992).

A partir do conhecimento da estrutura primária da MSP-1 de *P. vivax* várias proteínas recombinantes baseadas nas seqüências que codificam para as regiões N - ou C-terminais da molécula foram expressas em *Escherichia coli* (LEVITUS *et al.*, 1994; SOARES *et al.*, 1997; CUNHA *et al.*, 2001), *Saccharomyces cerevisiae* (GIBSON *et al.*, 1992; KASLOW & KUMAR, 1996; SOARES *et al.*, 1999c) e baculovirus (LONGACRE *et al.*, 1994). Mais recentemente foi obtida também uma proteína recombinante secretada por *Pichia pastoris* (SOARES & RODRIGUES, 2002). Estas proteínas recombinantes têm sido utilizadas para estudos imunoepidemiológicos em diversas áreas endêmicas de malária, principalmente na região amazônica brasileira.

Os primeiros estudos utilizaram 10 proteínas recombinantes expressas em fusão com a glutathione S-transferase de *Schistosoma japonicum* (GST) e que representavam os primeiros 682 aminoácidos da região N-terminal da MSP-1 (LEVITUS *et al.*, 1994). Uma proporção alta de soros reagiu com proteínas recombinantes que expressavam blocos conservados entre as espécies (ICBs) e blocos polimórficos. Em contraste, as proteínas recombinantes que expressavam exclusivamente ICBs foram reconhecidas por uma fração reduzida de indivíduos infectados com *P. vivax* do Estado de Rondônia (LEVITUS *et al.*, 1994).

Estudos caracterizando a resposta imune humana naturalmente adquirida contra a MSP-1 de *P. vivax* foram realizados em áreas endêmicas de malária da região amazônica brasileira (LEVITUS *et al.*, 1994; SOARES *et al.*, 1997, 1999a, 1999b). Vários aspectos da resposta imune à MSP-1 foram avaliados em indivíduos recentemente expostos ao *P. vivax* que residem em Belém, Pará. Foi comparado o reconhecimento por anticorpos e células mononucleares do sangue periférico de 11 proteínas recombinantes,

que foram expressas em fusão com a glutathione S-transferase de *Schistosoma japonicum* (GST) e que representavam as regiões N - e C-terminais da MSP-1. Dez destas 11 proteínas recombinantes cobriram diferentes porções da região N-terminal da MSP-1 (aminoácidos 1-682), e uma única proteína recombinante representava a região C-terminal (MSP1<sub>19</sub>). Embora a MSP1<sub>19</sub> contenha apenas 111 aminoácidos, esta foi a proteína mais imunogênica, pois, foi reconhecida por anticorpos citofílicos do tipo IgG1 e IgG3 ou linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$  de 83,8% dos indivíduos expostos ao *P. vivax*. Não só a frequência de indivíduos respondedores foi mais alta, como os títulos de anticorpos para a MSP1<sub>19</sub> foram mais altos do que os títulos contra as demais proteínas que representavam a região N-terminal da MSP-1. Estes resultados sugeriram que a região C-terminal da MSP-1 que contém dois domínios do tipo EGF é particularmente imunogênica para anticorpos e linfócitos T durante infecções por *P. vivax* (SOARES *et al.*, 1997).

O sucesso das imunizações experimentais de roedores com a MSP1<sub>19</sub> de *P. yoelii*, estimularam tentativas de vacinações experimentais contra o *P. vivax* e o *P. cynomolgi*. A imunização com uma proteína recombinante obtida a partir de baculovírus representando a MSP1<sub>19</sub> de *P. cynomolgi* foi altamente efetiva induzindo altos títulos de anticorpos contra as formas merozoítas e reduzindo dramaticamente a parasitemia após o desafio de macacos com formas sanguíneas deste parasita (PERERA *et al.*, 1998). Proteção parcial contra a infecção por formas sanguíneas de *P. vivax* foi também obtida em macacos imunizados com uma proteína recombinante produzida em levedura representando a MSP1<sub>19</sub> (YANG *et al.*, 1999).

### **Antígeno 1 de membrana apical (AMA-1)**

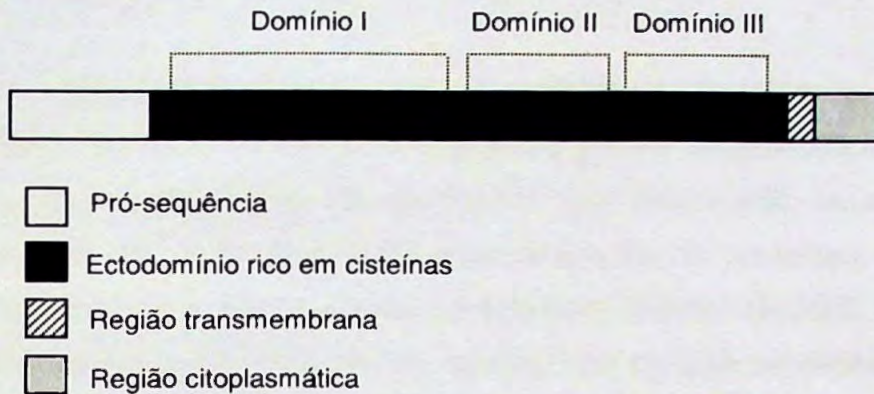
Embora muitas proteínas que estão localizadas nas roptrias dos merozoítas já tenham sido caracterizadas e estudadas em *P. falciparum* apenas uma foi descrita em *P. vivax* e, denominada de antígeno 1 da membrana apical (AMA-1) (CHENG & SAUL, 1994). O gene que codifica a

proteína AMA-1 é altamente conservado entre as espécies de *Plasmodium* de roedores, macacos e humanos (FIGTREE *et al.*, 2000). 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 estas é de 86%, 83%, 57% e 52%, respectivamente. A baixa identidade entre a seqüência nucleotídeos de AMA-1 de *P. falciparum* e das demais espécies é devido a uma inserção de 42 aminoácidos na região N-terminal da proteína AMA-1 de *P. falciparum* (CHENG & SAUL, 1994).

A proteína AMA-1 de *P. falciparum* é sintetizada durante a esquizogonia, inicialmente associada com as roptrias e, posteriormente, na superfície apical dos merozoítas. Sua forma precursora apresenta massa molecular aparente de 83 kDa, a qual é processada por clivagem proteolítica resultando na remoção de parte da região N-terminal (pró-sequência), dando origem a uma proteína de aproximadamente 66 kDa (NARUM & THOMAS, 1994). Uma vez que a proteína AMA-1 é expressa na superfície do merozoíta, esta passa por duas novas clivagens proteolíticas na região C-terminal da proteína, originando fragmentos de 48 kDa e 44 kDa, respectivamente (HOWELL *et al.*, 2003).

Esta proteína apresenta um grande ectodomínio na região N-terminal, rico em cisteínas, subdividido em três domínios distintos (I, II e III), seguido por um domínio transmembrana e por uma cauda citoplasmática curta C-terminal. O ectodomínio de *P. falciparum* apresenta 16 resíduos de cisteínas, sendo que a atividade de ligação da proteína ao eritrócito está associada aos domínios I e II, que apresenta 5 ligações dissulfídicas (HODDER *et al.*, 1996; FRASER *et al.*, 2001). No *P. vivax* a proteína AMA-1 apresenta 19 resíduos de cisteínas ao longo de seus 562 aminoácidos, estes resíduos de cisteínas estão conservados no *P. fragile* e *P. knowlesi* (CHENG & SAUL, 1994). A habilidade da proteína AMA-1 em induzir uma resposta imune protetora pode ser dependente da conformação que a proteína apresenta devido às pontes dissulfídicas (HODDER *et al.*, 1996).

A seguir uma representação esquemática da proteína AMA-1 de *P. falciparum* (adaptado de HOWELL *et al.*, 2003).



A importância funcional desta proteína não é conhecida. Entretanto, foi demonstrado que anticorpos monoclonais contra AMA-1 de *P. knowlesi* são capazes de inibir a invasão de merozoítas “in vitro” (THOMAS *et al.*, 1994). Foi proposto que esta poderia facilitar a reorientação do merozoíta após adesão inicial, de modo que as roptrias e os complexos de micronemas sejam expostos na superfície dos eritrócitos durante a invasão do parasita (CHITNIS & BLACKMAN, 2000). Por outro lado, a tentativa de remover o gene (“knockout”) que codifica a proteína AMA-1 em *P. falciparum*, resultou em um severo efeito deletério no crescimento do parasita, o que sugere que esta proteína é essencial para a biologia do parasita (TRIGLIA *et al.*, 2000).

A propriedade imunogênica da proteína AMA-1 foi demonstrada inicialmente a partir da 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 proteína AMA-1 de *P. vivax* foi expressa em *Pichia pastoris* e a imunização de primatas foi capaz de induzir forte resposta de anticorpos (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). Juntos, estes dados sugerem que AMA-1 pode ser um importante alvo para compor, junto com outras proteínas, uma vacina contra a malária.

#### 4. Diagnóstico laboratorial da malária

Os métodos laboratoriais são importantes ferramentas no controle do avanço da malária. Podem ser aplicados para o diagnóstico individual ou para o acompanhamento de pacientes em tratamento específico com antimalárico. O "gold standard" para detecção de parasitas no sangue periférico ainda é a gota espessa corada com Giemsa (ROSS, 1903). Este método permite a identificação da espécie e o estágio de desenvolvimento do plasmódio, e é quantificável. Sua sensibilidade é 10 a 30 vezes maior que um esfregaço sanguíneo e sua especificidade é satisfatória para a identificação das espécies. Contudo, é preciso levar em consideração que o exame de uma amostra de sangue para procurar plasmódios torna-se pouco sensível se os parasitas estão presentes em número muito reduzido. Novos métodos mais sensíveis e práticos têm sido desenvolvidos.

Um método alternativo foi desenvolvido para a pesquisa de plasmódios no sangue – o QBC<sup>®</sup> ("Quantitative Butty Coat"), baseado na concentração de parasitas através da centrifugação do sangue em capilar contendo laranja de acridina e anticoagulante, com subsequente exame da amostra ao microscópio de fluorescência. As hemácias parasitadas, por serem menos densas, ficam entre a camada de leucócitos e a das hemácias, tornando-se um método muito sensível, de fácil execução e leitura, para a triagem da malária em populações endêmicas. Este método detecta 10% mais infecções que a gota espessa. Entretanto, a principal desvantagem é que exige equipamento de alto custo para leitura, não disponível nas áreas endêmicas, portanto, está praticamente em desuso.

Recentemente, testes rápidos imunocromatográficos foram desenvolvidos com a finalidade de detectar infecções por *P. falciparum* e/ou *P. vivax*/*P. malariae*/*P. ovale* (ParaSight<sup>™</sup>-F, ICT Malaria Pf, Malar-Check<sup>™</sup> Pf, ICT Malaria Pf/Pv, OptiMAL<sup>®</sup>). Estes testes detectam proteínas específicas (Pf-HRP2 ou pLDH) presentes no sangue total de pacientes com malária. Em geral, estes testes utilizam tiras ou cartelas de nitrocelulose que servem de suporte para anticorpos monoclonais ou policlonais. Os métodos

imunocromatográficos apresentam algumas vantagens em relação à gota espessa, pois dispensam o uso de microscópios e podem ser usados em áreas remotas, sem infra-estrutura laboratorial e sem eletricidade. Além disso, os resultados são obtidos em aproximadamente 15 minutos. Entretanto, apresentam desvantagens como: não são quantitativos e a sensibilidade é inferior para diagnóstico de malária em indivíduos com baixas parasitemias. É importante ressaltar que estes testes não são capazes de diferenciar entre infecções causadas por *P. vivax*/*P. malariae*/*P. ovale*.

O diagnóstico da malária por PCR é o método mais sensível e específico para detecção de plasmódios. Esta técnica possibilita o diagnóstico de indivíduos com baixas parasitemias e de infecções mistas, não detectáveis pelo exame de gota espessa, em virtude da semelhança morfológica entre algumas espécies de parasitas ao exame microscópico. O método baseia-se na amplificação de genes ssRNA de *Plasmodium* utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos (SNOUNOU *et al.*, 1993; KIMURA *et al.*, 1997; RUBIO *et al.*, 1999). A desvantagem desta metodologia é que ela é de alto custo e necessita de pessoal especializado para executá-la.

O diagnóstico sorológico da malária pode ser utilizado em áreas endêmicas, para estudos imuno-epidemiológicos, verificação de presença ou ausência de infecções maláricas, detectar mudanças estacionais de transmissão e medir o grau de endemicidade da doença. Nas zonas onde a malária não é endêmica, os métodos sorológicos são úteis para selecionar doadores de sangue, elucidar casos clínicos indefinidos e detectar malária em pessoas que regressam de zonas endêmicas (revisto por AVILA & FERREIRA, 2000).

Os testes de detecção de anticorpos por imunofluorescência indireta ou ELISA indireto utilizando antígenos totais do parasita também têm sido utilizados, mas a dificuldade de cultivo do *P. vivax* tem se tornado uma barreira para essas metodologias. A possibilidade de geração de proteínas

recombinantes através das técnicas da engenharia genética pode contribuir para o aumento da sensibilidade e especificidade desses ensaios.

### **5. Racional para o possível uso de um método de diagnóstico baseado na detecção de anticorpos anti-MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax***

Como mencionado acima, mais de 80% dos indivíduos das áreas endêmicas, expostos ao *P. vivax*, foram capazes de reconhecer, por ELISA, uma proteína recombinante derivada da MSP1<sub>19</sub> expressa em fusão com a GST (GST-MSP1<sub>19</sub>). Esta frequência foi semelhante à frequência de respondedores contra as formas sanguíneas por imunofluorescência (CUNHA *et al.*, 2001). Estes resultados sugerem que o ensaio imunoenzimático utilizando a MSP1<sub>19</sub> recombinante pode constituir-se em um marcador de exposição ao *P. vivax*. É provável que uma frequência mais alta de respondedores possa ser obtida utilizando-se proteínas recombinantes geradas em diferentes sistemas de expressão. Recentemente, foi observado que cerca de 50% dos indivíduos que não respondem a GST-MSP1<sub>19</sub> foram capazes de reconhecer uma proteína recombinante (His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>) produzida em um outro vetor de expressão, o qual contém uma cauda de histidina (CUNHA, 2001).

Recentemente, a MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax* foi produzida em diferentes vetores para expressão em *E. coli* (pGEX, pET-14b e pMALc2x ou pMALp2x) (CUNHA *et al.*, 2001). O reconhecimento imune das diferentes proteínas recombinantes foi avaliado por um painel de soros de indivíduos naturalmente expostos à malária. Os resultados mostraram que as proteínas recombinantes produzidas a partir do vetor pET-14b em fusão com uma cauda histidina e contendo, ou não, uma seqüência adicional de 13 aminoácidos (Pan Allelic DR epitope ou PADRE) são similares, ou seja, compartilham a maioria dos epítomos. Entretanto, as proteínas recombinantes produzidas a partir dos vetores de expressão pGEX e pMALc2x (ou pMALp2x) apresentam epítomos distintos quando comparadas às proteínas expressas no vetor pET-14b. Estes resultados sugerem que



proteínas recombinantes produzidas a partir de vetores bacterianos diferentes não apresentam as mesmas características imunológicas (CUNHA *et al.*, 2001).

Em paralelo, a MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax* foi também expressa em *Pichia pastoris* com adição do epítipo PADRE e obtida em sua forma não glicosilada (SOARES & RODRIGUES, 2002). Foi observado que a MSP1<sub>19</sub> expressa em *P. pastoris* mantém sua antigenicidade, pois foi reconhecida por uma alta percentagem (85,6%) de indivíduos naturalmente expostos ao *P. vivax* (SOARES & RODRIGUES, 2002).

Permanece como área de investigação o estudo da imunogenicidade e antigenicidade de proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub>, assim como de outras proteínas derivadas de antígenos de superfície de merozoítas de *P. vivax*, bem como a implementação de testes sorológicos utilizando as referidas proteínas e estudos para o desenvolvimento de vacinas efetivas contra as formas sangüíneas do *P. vivax*.

## **II. Objetivos**

---

## 1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo é analisar comparativamente a resposta imune de anticorpos em indivíduos infectados por *Plasmodium vivax* contra diferentes proteínas recombinantes derivadas da Proteína 1 de Superfície do Merozoíta (MSP1<sub>19</sub>) e do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *P. vivax* produzidas a partir de vetores de expressão distintos.

## 2. Objetivos específicos

- 2.1 Avaliar comparativamente o reconhecimento imune de quatro proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax* expressas em diferentes vetores (bactérias e leveduras) por anticorpos IgG de indivíduos infectados por *P. vivax*, visando o desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático para o diagnóstico sorológico da malária;
- 2.2 Avaliar a especificidade do ensaio imunoenzimático baseado na detecção de anticorpos IgG anti-MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax*;
- 2.3 Expressar em *E. coli* uma proteína recombinante correspondente a AMA-1 de *P. vivax*, visando estudos comparativos de antigenicidade com a MSP1<sub>19</sub>;
- 2.4 Avaliar comparativamente o reconhecimento imune de duas proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 expressas em bactérias ou leveduras por soros de indivíduos infectados por *P. vivax*;
- 2.5 Comparar a antigenicidade das proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub> e AMA-1.

### **III. Material e Métodos**

---

## 1. Amostras de sangue.

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

### 1.1. Indivíduos infectados por *P. vivax* procedentes de diferentes áreas endêmicas da Região Amazônica.

#### a) Belém, PA.

Amostras de sangue foram obtidas de 103 indivíduos com malária causada por *P. vivax* admitidos no Ambulatório de Malária do Instituto Evandro Chagas/Fundação Nacional de Saúde (Belém, Pa). Todas as coletas de sangue foram realizadas sob a responsabilidade do Dr. José Maria de Souza, no período compreendido entre julho de 1995 a dezembro de 1999, após o consentimento verbal dos doadores. Dados como sexo, idade e número de episódios anteriores de malária foram solicitados. Estas amostras foram utilizadas em estudos anteriores sobre a resposta imune humana a MSP-1 (SOARES *et al.*, 1997, 1999a, 1999b).

Cinco mililitros de sangue foram coletados de cada paciente em tubos "Vacutainer" (Labnew, Campinas, Brasil) sem anticoagulante após o diagnóstico para o *P. vivax* pela gota espessa e antes do início do tratamento quimioterápico. O sangue permaneceu a temperatura ambiente até a separação do soro. O sangue foi centrifugado e alíquotas de soro foram mantidas a  $-20^{\circ}$  C até o momento da realização dos ensaios. Este grupo de indivíduos é constituído por 69,9% de homens e a idade variou de 01 a 66 anos (média  $24,9 \pm 11,6$ ).

#### b) Outras localidades endêmicas de malária do estado do Pará.

Trinta e seis amostras de sangue foram coletadas de indivíduos com parasitemia patente durante o ano de 1997, no município de Igarapé-Açu, Estado do Pará, pela Dra. Maristela Gomes da Cunha, da Universidade Federal do Pará. Este grupo de pacientes é formado por 63,9% de indivíduos do sexo masculino com idade entre 01 e 70 anos (média  $20 \pm 17,5$ ).

Um total de 61 amostras foi coletado em 3 municípios do Estado do Pará (Marabá, Itaituba e Tailândia), durante o ano de 1999, pelo Dr. Ricardo Machado do Instituto Evandro Chagas/FNS. Este grupo é composto de 75,4% de homens com idade entre 11 e 67 anos (média de  $29,2 \pm 13,7$ ).

### **1.2. Indivíduos expostos ao *P. falciparum* procedentes da África.**

Dezenove amostras de soros de indivíduos africanos expostos ao *P. falciparum* foram gentilmente cedidas pelo Dr. Marcelo Urbano Ferreira, ICB/USP e outras 34 amostras foram cedidas pela Dra. Silvia Di Santi, pesquisadora da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN). Os dados destes indivíduos foram informados em trabalhos anteriores publicados pelos respectivos grupos (FERREIRA *et al.*, 1996; MARSH *et al.*, 1986; MARSH & HOWARD, 1986). Estas amostras foram testadas com o objetivo de verificar se anticorpos de indivíduos que tiveram somente malária por *P. falciparum* reconhecem a MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax*. O motivo da utilização de amostras de soro de africanos é que estes indivíduos nunca tiveram malária causada pelo *P. vivax*.

### **1.3. Indivíduos com outras doenças não relacionadas à malária.**

Amostras de indivíduos com sorologia positiva para Doença de Chagas (n=21), Sífilis (n=21), Hepatites B (n=19) e C (n=21), AIDS (n=12), e HTLV (n=14), foram cedidas pelo Dr. Orlando C. Ferreira Jr. do Departamento de Hemoterapia do Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo. Estas amostras foram utilizadas para verificar a existência de reatividade cruzada do ensaio utilizando antígenos de *P. vivax* com outros agentes etiológicos de doenças infecciosas e parasitárias.

Soros de indivíduos positivos para fator reumatóide (n=10) e anticorpo anti-nuclear (n=10) foram gentilmente cedidos pela Dra. Elaine C. Antonacci Russo do Laboratório SAE (Serviço de Análises Especializadas Ltda), São Paulo.

#### 1.4. Indivíduos sadios.

Vinte e oito indivíduos adultos sadios que nunca estiveram em área endêmica de malária foram selecionados entre os doadores de sangue do Hemocentro do Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP. Além destes, outras 21 amostras de soro foram cedidas pelo Dr. Orlando C. Ferreira Jr.

## 2. Composição dos reagentes, soluções e meios de cultura utilizados.

### 2.1. Reagentes e soluções.

- Gel de agarose: agarose 1% (Invitrogen, Auckland, Nova Zelândia), TAE (1X), brometo de etídio 1µg/mL (Invitrogen).
- Gel de poliacrilamida para eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) – Para 2 géis (mini-gel):  
Gel de corrida: acrilamida 30%/bis-acrilamida 0,8% (Fluka Chemie, Steinheim, Alemanha) - 3,5 mL, Trizma base 0,75 M (Invitrogen)/SDS 0,2% pH 8,8 (Invitrogen) - 4,5 mL, persulfato de amônio 10% - 100 µL, TEMED (Invitrogen) - 15 µL.  
Gel de separação: acrilamida 12%/Bis-acrilamida 1,2% - 1,25 mL, Trizma base 0,25 M/SDS 0,2% pH 6,8 – 2,5 mL, persulfato de amônio 10% - 100 µL, TEMED - 12µL.
- PBS: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,3 mM, NaCl 130 mM, pH 7,4.
- PBS/Tween: PBS, Tween 20 0,05% (Fluka Chemie).
- Ponceau-S: Ponceau red 0,1%, ácido acético 10%.
- Soluções de bloqueio:  
ELISA (soro humano): PBS, leite desnatado 5% (Molico)  
“Immunoblotting” (soro de camundongo): PBS, leite desnatado 5%, BSA 2,5% (Sigma, Saint Louis, EUA).
- Solução corante: coomassie blue R250 1% (Sigma), metanol 45%, ácido acético 10%.

- 
- Solução descorante: etanol 45%, ácido acético 10%.
  - Solução de revelação (ELISA): OPD 1 mg/mL (Sigma), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%, diluídos em tampão fosfato-citrato.
  - Solução de revelação ("immunoblotting"): DAB 5 mg (Sigma), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 µL, diluídos em PBS.
  - TAE (1X): Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (Invitrogen), pH 8,0.
  - Tampão carbonato 0,05 M: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,015 M, 0,035 M, pH 9,6.
  - Tampão de amostra para SDS-PAGE (4X): glicerol 10%, SDS 4%, 2-mercaptoetanol (2-ME) 100 mM (Bio-Rad, Hercules, EUA), Tris-HCl 50 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,1% (Bio-Rad).
  - Tampão de amostra para eletroforese de DNA (5X): azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25% (Sigma), glicerol 30%.
  - Tampão de corrida: SDS 35 mM, glicina 160 mM, Trizma base 25 mM, pH 8,3.
  - Tampão de equilíbrio: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, uréia 8 M (Invitrogen), glicerol 10%, imidazol 5 mM (USB, Cleveland, EUA).
  - Tampão de eluição: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, glicerol 10%, Triton X-100 0,1% (Bio-Rad), imidazol 250 mM, GSSG 0,5 mM (ICN, Aurora, EUA), GSH 5 mM (Sigma).
  - Tampão de diálise: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, glicerol 50%, DTT 0,1 mM (Invitrogen).
  - Tampão fosfato-citrato: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 0,2 M, pH 5,0.
  - Tampão de lavagem dos corpos de inclusão: Tris-HCl 10 mM pH 8,0, CHAPS 0,5% (Pierce, Milwaukee, EUA).
  - Tampão de lavagem da resina (Níquel ou Cobalto): Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, uréia 8 M, glicerol 10%, imidazol 20 mM.
  - Tampão de lise: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, EDTA 10 mM, PMSF 2 mM (Pierce), lisozima 200 µg/mL (Sigma).
  - Tampão de "refolding": Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, glicerol 10%, Triton X-100 0,1%, Imidazol 20 mM, GSSG 0,5 mM, GSH 5 mM, uréia (6 M, 4 M, 2 M, 1 M, 0,5 M ou sem uréia).
-



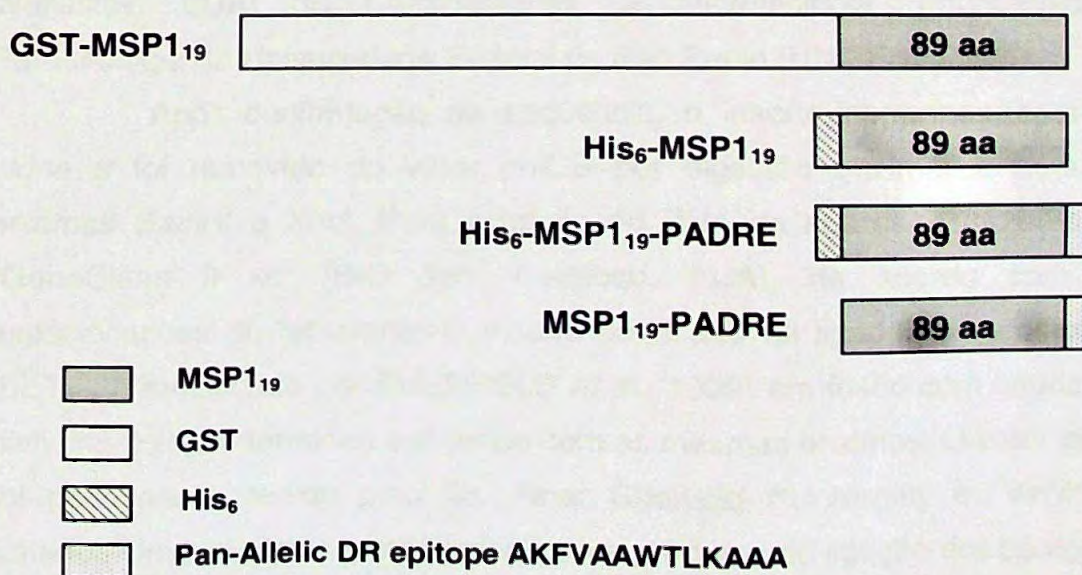
- Tampão de solubilização: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, uréia 8 M, glicerol 10%.
- Tampão de transferência ("immunoblotting"): glicina 192 mM, Trizma base 25 mM, metanol 20%.

## 2.2. Meios de cultura.

- LB (Luria Bertani): LB broth base 2% (USB), NaCl 0,5%, pH 7,0.
- LB ágar: LB, agar 1,5%.
- LB-Amp: LB, 100 µg/mL ampicilina (Sigma).
- SOB: triptona 2% (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), extrato de levedura 0,5% (Difco, Detroit, EUA), NaCl 0,05%, pH 7,0.
- SOC: SOB, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glicose 20 mM (Invitrogen).

## 3. Obtenção das proteínas recombinantes em bactérias e leveduras para uso nos ensaios imunológicos "in vitro".

As proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax* (cepa Belém, aminoácidos 1616-1704) foram produzidas previamente em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* (CUNHA *et al.*, 2001; SOARES & RODRIGUES, 2002). A seguir uma figura ilustrativa das quatro proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub> utilizadas neste estudo.



A proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 foi produzida em nosso laboratório recentemente (RODRIGUES *et al.*, 2003a). Resumidamente, a seqüência de nucleotídeos correspondente aos aminoácidos 43 a 487 de AMA-1 foi obtida através da amplificação por PCR a partir do DNA genômico de um paciente infectado por *P. vivax* procedente de Belém, Pará (código 12B). A reação de PCR foi realizada com os seguintes oligonucleotídeos: 5'-ATG GAT CCG CCT ACC GTT GAG AGA AGC -3' (senso) e 5'- GCT CGA GTG TAG TAG CAT CTG CTT GTT -3' (antisenso)(Invitrogen, São Paulo, Brasil). As porções sublinhadas dos oligonucleotídeos senso e anti-senso indicam sítios para as enzimas *Bam*HI ou *Xho*I, respectivamente. O produto de PCR foi purificado utilizando-se o "QIAquick PCR Purification kit", (Valencia, EUA) e ligado, inicialmente, no vetor comercial "pMOS Blue blunt ended cloning kit" (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra) de acordo com as instruções do fabricante.

Após transformação das bactérias competentes com os produtos de ligação, os clones recombinantes (correspondentes às colônias brancas) foram selecionados por análise de restrição das preparações de plasmídios obtidos em pequena escala. A seqüência de nucleotídeos dos clones que apresentavam insertos do tamanho esperado (1.3 kb) foi confirmada através de seqüenciamento automático utilizando o "BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit" no seqüenciador ABI PRISM 377 (ambos da Perkin-Elmer, Wellesley, EUA) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

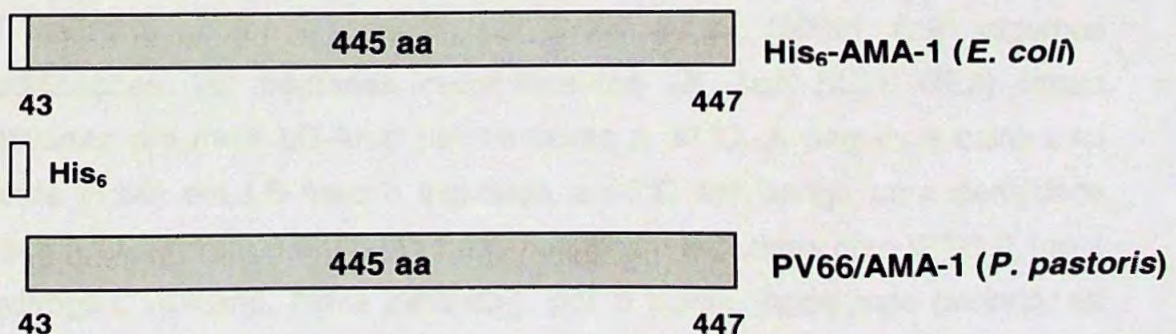
Após confirmação da seqüência, o inserto correspondente ao *clone 9* foi removido do vetor pMOS por digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I. Para extração do DNA da agarose, utilizou-se o "GeneClean II kit" (BIO 101, Carlsbad, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. O inserto purificado foi ligado no vetor pHIS (pET-22b modificado por SHEFFIELD *et al.*, 1999) em fusão com cauda de histidina (His<sub>6</sub>, N-terminal) e digerido com as mesmas enzimas. O vetor pHIS foi gentilmente cedido pelo Dr. Peter Sheffield ("University of Virginia", Estados Unidos). Após transformação dos produtos de ligação em bactérias

DH5 $\alpha$ , as colônias que continham insertos na orientação correta foram selecionadas através de análises de restrição enzimática das preparações de plasmídios obtidos em pequena escala.

Para a expressão da proteína recombinante a partir do vetor pHIS-*ama-1*, bactérias *E. coli* da cepa BL21 DE3 (Novagen, Madison, EUA) foram utilizadas. O protocolo de expressão e purificação da proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 será descrito detalhadamente no item 4.

A etapa de amplificação e clonagem do gene *ama-1*, assim como o estabelecimento das condições de expressão em pequena escala da proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 foram estabelecidas previamente pela estudante de nosso laboratório Karina Martineli Rodrigues. As reações de sequenciamento foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Mauricio M. Rodrigues do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP.

A proteína recombinante PV66/AMA-1 expressa em *Pichia pastoris* (KOCKEN *et al.*, 1999) foi gentilmente cedida pelo Dr. Clemens Kocken (Department of Parasitology, Biomedical Primate Research Centre, Holanda). A seguir uma figura ilustrativa das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 que foram utilizadas neste estudo.



As informações sobre as proteínas recombinantes (seqüência de aminoácidos, vetores e sistemas de expressão) utilizadas neste estudo estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2. Sumário das proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub> e AMA-1 de *P. vivax* produzidas em *E. coli* e *Pichia pastoris*.**

Proteína recombinante	Aminoácidos	Vetor de expressão	Sistema de expressão
GST-MSP1 <sub>19</sub>	1616-1704	pGEX-3X	<i>E. coli</i>
His <sub>6</sub> -MSP1 <sub>19</sub>	1616-1704	pET-14b	<i>E. coli</i>
His <sub>6</sub> -MSP1 <sub>19</sub> -PADRE*	1616-1704	pET-14b	<i>E. coli</i>
MSP1 <sub>19</sub> -PADRE*	1616-1704	pPIC9K	<i>P. pastoris</i>
His <sub>6</sub> -AMA-1	43-487	pHIS (pET-22b)	<i>E. coli</i>
PV66/AMA - 1	43-487	pHIL-S1	<i>P. pastoris</i>

Nos genes que codificam as proteínas recombinantes expressas nos vetores pET-14b e pPIC9K foi adicionado a sequência de nucleotídeos que codifica os aminoácidos AKFVAAWTLKAAA ou epítipo PADRE (ALEXANDER *et al.*, 1994). Este epítipo foi adicionado visando aumentar a antigenicidade e reduzir a eventual restrição genética que possa ser encontrada na resposta imune (CUNHA *et al.*, 2001).

#### 4. Expressão e purificação da proteína recombinante AMA-1 em fusão com His<sub>6</sub>.

A expressão e purificação da proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 foi realizada conforme descrito por SAINI *et al.* (2002), com algumas modificações. As bactérias recombinantes (*E. coli* BL21 DE3) foram cultivadas em meio LB-Amp por 16 horas a 37°C. A seguir, a cultura foi diluída (1:50) em LB-Amp e incubada a 37°C até atingir uma densidade óptica (DO<sub>600</sub>) entre 0.5-0.6. As bactérias foram induzidas com IPTG 0,1 mM (Invitrogen, Aukland, Nova Zelândia), por 3 horas. Após este período, as células foram precipitadas por centrifugação (8.000 rpm/15 minutos/4°C) e ressuspensas em tampão de lise, seguido de 3 ciclos de sonicação de 30 segundos. O extrato bacteriano foi centrifugado (10.000 rpm/30 minutos/4°C) e ambos as frações (precipitado e sobrenadante) foram analisadas por separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE 12%)

utilizando equipamento "Mini PROTEAN® 3 cell" (Bio-Rad, Hercules, EUA), em condições redutoras, na presença de 2-ME. O precipitado contendo a proteína (corpos de inclusão) foi lavado por 2 vezes em tampão de lavagem e ressuspenso em tampão de solubilização seguido de incubação por 2 horas, a 37°C. Em seguida o material foi centrifugado como anteriormente e a eficiência da solubilização foi analisada em SDS-PAGE 12%.

O sobrenadante contendo a proteína solubilizada foi aplicado lentamente por 2 vezes em resina de Níquel (Ni-NTA Superflow, Qiagen, Valencia, EUA) ou Cobalto (BD TALON™, Palo Alto, EUA) previamente equilibrada com tampão de equilíbrio. Em seguida a resina foi lavada com o mesmo tampão acrescido de imidazol 20 mM. Posteriormente, a resina foi lavada com o tampão de "refolding" constituído de concentrações decrescentes de uréia. Para a eluição da proteína, a resina foi incubada com o tampão de "refolding" sem a presença do agente desnaturante, porém com imidazol 250 mM. O material eluído foi analisado em SDS-PAGE 12% e, posteriormente, dialisado contra o tampão de diálise durante a noite, sob agitação, a 4°C. A concentração da proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (1976).

##### **5. Imunização de camundongos para obtenção de soro policlonal anti-PV66-AMA-1.**

Dois camundongos, fêmeas, da linhagem BALB/c foram imunizados com 5 µg da proteína recombinante PV66-AMA-1 emulsificada em adjuvante completo de Freund nas patas traseiras, por via subcutânea (s.c). Após 3 semanas, os animais receberam um reforço com 5 µg da mesma proteína emulsificada em adjuvante incompleto de Freund, injetado s.c. na base da cauda. Quinze dias após a primeira e segunda doses, os animais foram sangrados pela veia caudal. O sangue foi centrifugado, o soro separado e estocado a -20°C até o momento do uso.

## 6. Detecção da proteína recombinante AMA-1 por “immunoblotting”.

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (NC)(Hybond N, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra) a uma voltagem constante de 100 V por 1 hora 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 durante a noite, a 4°C, em solução de bloqueio. Após este período, a membrana foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente, com soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1 na diluição de 1:500 ou soro de paciente infectado por *P. vivax* diluído 1:100, ambos em solução de bloqueio. Após 3 lavagens de 10 minutos com PBS/Tween, foi realizada uma outra incubação por 1 hora, a temperatura ambiente, com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (específico para a porção Fab da IgG, Sigma, Saint Louis, EUA) ou IgG de cabra anti-IgG humano conjugado à peroxidase (específico para a porção Fc da IgG, Sigma) diluídos 1:1.000 e 1:2.000, respectivamente, em solução de bloqueio. A membrana foi lavada como anteriormente e a revelação feita com DAB e peróxido de hidrogênio, em PBS.

## 7. Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

### 7.1. ELISA para detecção de anticorpos IgG.

A detecção de anticorpos IgG anti-MSP1<sub>19</sub> e anti-AMA-1 foi feita por ELISA conforme descrito por SOARES *et al.* (1997). A concentração das proteínas recombinantes ou GST foi ajustada para 4 µg/mL em tampão carbonato 0,05 M. Em seguida, foram adicionados 50 µL por cavidade a microplacas de ELISA (High binding, Costar, New York, EUA). Após incubação durante a noite à temperatura ambiente, as placas foram lavadas e incubadas em solução de bloqueio, por 2 horas a 37°C. Inicialmente as amostras (soro ou plasma) foram diluídas 1:100 na solução de bloqueio e 50 µL de cada amostra foram adicionados por poço em duplicata. Nos ensaios

com as proteínas recombinantes produzidas em *P. pastoris* (MSP1<sub>19</sub>-PADRE e PV66/AMA-1) foi feita uma incubação prévia por 1 hora dos soros com extrato de leveduras (*P. pastoris*, cepa GS115) para adsorção dos anticorpos inespecíficos. As placas foram novamente incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. 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 diluído 1:16.000 em solução de bloqueio. A reação enzimática foi revelada pela adição de 1 mg/mL de OPD diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 0,03% (vol/vol) de peróxido de hidrogênio. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de uma solução contendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. A DO foi determinada em um leitor de microplacas (SLT SPECTRA, SLT Labinstruments, Salzburg, Austria) usando comprimento de onda de 492 nm (DO<sub>492</sub>).

Os valores individuais de DO<sub>492</sub> obtidos contra as proteínas recombinantes de *P. vivax* foram subtraídos dos valores individuais de DO<sub>492</sub> obtidos contra GST. A absorbância discriminante entre os resultados positivos e negativos ("cutoff") foi estabelecida pela média das absorbâncias produzidas por amostras de 49 indivíduos sem história clínica de malária, acrescida de cinco desvios padrão para os ensaios com as proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub> e três desvios padrão para os ensaios com as proteínas recombinantes derivadas de AMA-1. As amostras com DO<sub>492</sub> acima do "cutoff" para a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 foram posteriormente testadas em diluições seriadas até a diluição de 1:102.400 com finalidade de determinar o título de anticorpos IgG. O título foi estabelecido como sendo a última diluição que apresentava a DO<sub>492</sub> acima de 0.1. Todos os ensaios foram realizados com soros controles positivos e negativos.

## **7.2. ELISA para a detecção de anticorpos IgG subclasses específicos.**

O ELISA foi realizado como descrito no item 7.1, exceto que os anticorpos secundários foram anticorpos monoclonais de camundongo específicos para as diferentes subclasses de IgG humana (todos obtidos da Sigma, Saint Louis, EUA). Estes monoclonais anti-IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 foram diluídos respectivamente 1:8.000, 1:3.000, 1:3.000 e 1:3.000 em solução de bloqueio conforme determinado previamente. Após 1 hora de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes e incubadas com anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase, na diluição de 1:5.000, conforme determinado anteriormente. Após incubação por mais uma hora e um novo ciclo de lavagens, a revelação foi feita como descrita no item anterior. A absorbância discriminante entre os resultados positivos e negativos ("cutoff") foi estabelecida pela média das absorbâncias produzidas por amostras de soros 21 indivíduos sem história clínica de malária, acrescidos de três desvios padrão.

## **7.3. ELISA para detecção de anticorpos IgM.**

O ELISA foi realizado como descrito acima no item 7.1, exceto que o anticorpo secundário foi um anticorpo monoclonal de camundongo específico para IgM humano (específico para cadeia  $\mu$ , Sigma, Saint Louis, EUA) diluído 1:16.000 em solução de bloqueio, conforme determinado previamente. Após 1 hora de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes e incubadas novamente com anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase na diluição de 1:5.000. Após incubação por mais uma hora e um novo ciclo de lavagens, a revelação foi feita como descrita no item 7.1. A absorbância discriminante entre os resultados positivos e negativos ("cutoff") foi estabelecida pela média das absorbâncias produzidas por amostras de soros 21 indivíduos sem história clínica de malária, acrescidos de cinco desvios padrão para o ensaio com a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> e três desvios padrão para os ensaios com a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1.



#### 7.4. ELISA de inibição.

Os ensaios de inibição com as duas proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 foram realizados como descrito no item 7.1, exceto que a PV66/AMA-1 foi adsorvida à placa e as proteínas recombinantes solúveis (His<sub>6</sub>-AMA-1 e PV66/AMA-1) em diferentes concentrações a partir de 10 µg/mL foram incubadas previamente por 1 hora com os soros humanos (diluições entre 1:200 e 1:600) ou soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1 diluído 1:1.000. Após 1 hora de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes e um anticorpo anti-IgG humano ou anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase foi adicionado e as placas novamente incubadas por mais 1 hora. Um novo ciclo de lavagens foi realizado e a revelação foi feita com OPD como anteriormente. As percentagens de inibição foram calculadas como descrito por SOARES *et al.* (1999b).

#### 8. Análise estatística.

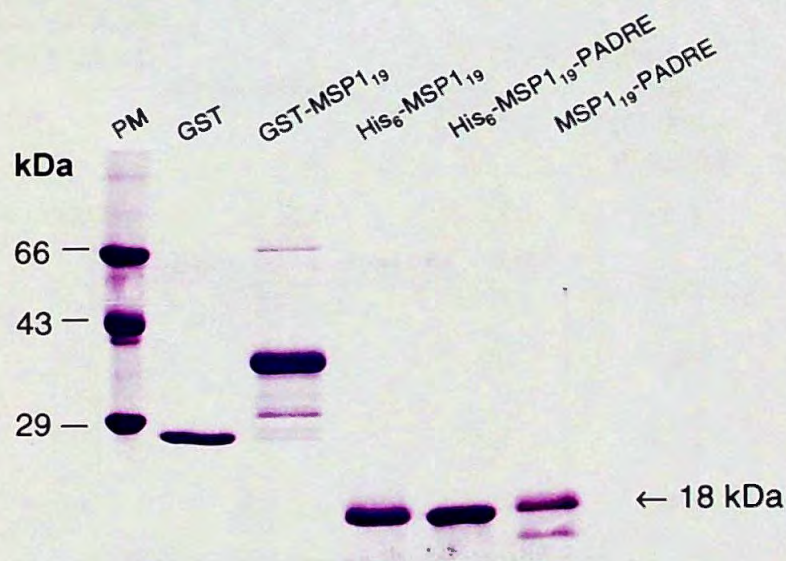
Os valores de sensibilidade e especificidade foram calculados como descrito por GALEN & GAMBINO, 1999. Os valores de DO<sub>492</sub> obtidos contra as diferentes proteínas recombinantes foram comparados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis utilizando-se o programa de computador GraphPad Prism versão 3.0. As proporções de soros positivos foram comparadas pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) em tabelas de contingência (2x2), com correção de Yates (GraphPad Prism 3.0). As correlações entre os valores de DO<sub>492</sub> obtidos com as diferentes proteínas recombinantes foram realizadas utilizando-se o programa SigmaPlot 2001. Os resultados estão apresentados como coeficientes de determinação ( $r^2$ ).

## **IV. Resultados**

---

### 1. Avaliação comparativa da antigenicidade das proteínas recombinantes representando a MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax* expressas em diferentes vetores (bactérias e leveduras)

No presente estudo, avaliamos o reconhecimento de quatro proteínas recombinantes derivadas da região C-terminal da MSP1 de *P. vivax* (MSP1<sub>19</sub>) produzidas a partir de diferentes vetores de expressão, com o intuito de desenvolvermos um ensaio imunoenzimático (ELISA) para estudos epidemiológicos. Três proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* (GST-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> e His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>-PADRE) e uma em *P. pastoris* (MSP1<sub>19</sub>-PADRE). Como pode ser observado na figura 1, em geral estas proteínas migram com banda única de peso molecular esperado. Estas proteínas foram comparadas quanto ao reconhecimento por anticorpos IgG de 200 pacientes infectados pelo *P. vivax* procedentes de diferentes áreas endêmicas do Estado do Pará.



**Figura 1: Análise em SDS-PAGE 12% das proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax*.**

A frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra pelo menos uma das proteínas recombinantes foi de 95%. Quando

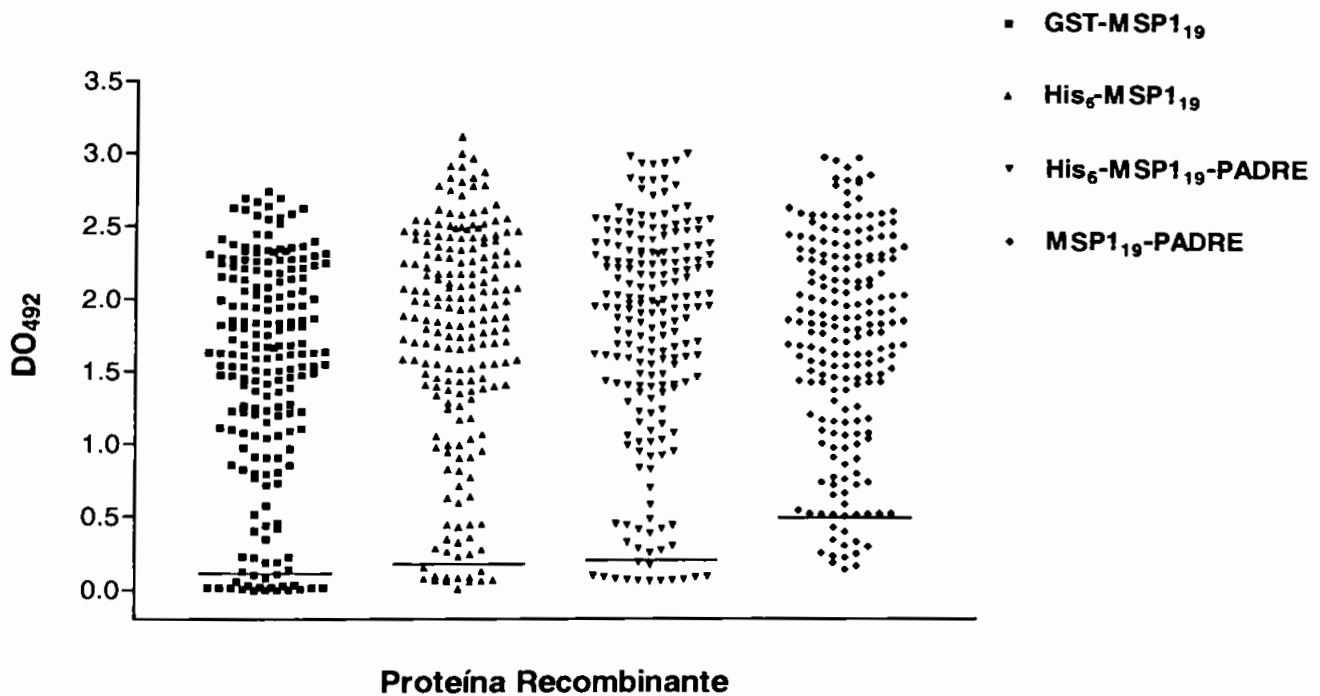
comparamos cada proteína recombinante individualmente, observamos que a proteína GST-MSP1<sub>19</sub> foi reconhecida por 90% dos indivíduos testados, enquanto que as demais proteínas recombinantes (His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>-PADRE e MSP1<sub>19</sub>-PADRE) foram reconhecidas por 93,5% dos indivíduos (tabela 3). Como podemos observar, 100% dos indivíduos da região de Itaituba foram positivos para as quatro proteínas recombinantes testadas. Por outro lado, uma menor frequência de respondedores foi observada no grupo de indivíduos procedentes de Belém, cuja positividade variou de 83,5% (GST-MSP1<sub>19</sub>) a 90,3% (His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>-PADRE e MSP1<sub>19</sub>-PADRE).

**Tabela 3. Análise da reatividade dos soros de indivíduos com malária por *P. vivax* procedentes de diferentes áreas endêmicas do Estado do Pará contra proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub>**

Área de estudo	Número de indivíduos	Positividade (%)			
		GST-MSP1 <sub>19</sub>	His <sub>6</sub> -MSP1 <sub>19</sub>	His <sub>6</sub> -MSP1 <sub>19</sub> -PADRE	MSP1 <sub>19</sub> -PADRE
Belém	103	83,5	90,3	90,3	90,3
Marabá	21	95,2	95,2	95,2	90,5
Itaituba	20	100	100	100	100
Tailândia	20	95,0	95,0	95,0	100
São Jorge	36	97,2	97,2	97,2	97,2
<b>TOTAL</b>	<b>200</b>	<b>90,0</b>	<b>93,5</b>	<b>93,5</b>	<b>93,5</b>

A figura 2 apresenta a comparação das respostas de IgG estimadas pela DO<sub>492</sub>. A média de DO<sub>492</sub> (DO ± desvio padrão) obtida para cada uma das proteínas recombinantes foi de: 1,508 ± 0,777, 1,735 ± 0,783, 1,757 ± 0,771 e 1,711 ± 0,723 para GST-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-

MSP1<sub>19</sub>-PADRE e MSP1<sub>19</sub>-PADRE, respectivamente. Observamos que os valores de DO obtidos para as proteínas recombinantes His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> e His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>-PADRE foram significativamente maiores do que os obtidos para GST-MSP1<sub>19</sub> (teste Kruskal-Wallis,  $P < 0,01$ ). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre as DOs obtidas para as proteínas recombinantes His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>-PADRE e MSP1<sub>19</sub>-PADRE, assim como entre GST-MSP1<sub>19</sub> e MSP1<sub>19</sub>-PADRE (teste Kruskal-Wallis,  $P > 0,05$ ).



**Figura 2. Comparação da resposta de anticorpos de 200 amostras de soro de indivíduos com malária vivax contra as proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub>.** Os símbolos representam a média das DOs<sub>492</sub> de cada soro testado em duplicata. As barras horizontais representam o "cutoff" obtido para cada proteína recombinante, cujos valores foram de 0,127, 0,170, 0,198 e 0,500 para GST-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>-PADRE e MSP1<sub>19</sub>-PADRE, respectivamente.

Dos 200 pacientes infectados por *P. vivax* testados, dez não responderam para nenhuma das quatro proteínas recombinantes

correspondentes a MSP1<sub>19</sub>. Os soros destes dez indivíduos foram testados também quanto à presença de IgG contra proteínas recombinantes derivadas da região N-terminal da MSP1 (ICB1-2, ICB2-3, ICB3-4, P4-ICB5) e duas outras proteínas recombinantes derivadas da Proteína 3 de Superfície do Merozoíta (MSP3 $\alpha$  e  $\beta$ ), os quais deram resultados negativos. Em seguida, realizamos ensaios de ELISA para detecção de anticorpos IgM nos soros destes indivíduos utilizando na placa somente a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>. Observamos que 90% (9/10) destes indivíduos apresentaram anticorpos IgM anti-His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> (dados não mostrados).

Com o objetivo de verificar se a ausência de resposta de anticorpos IgG nos soros destes dez indivíduos seria devido à baixa sensibilidade do ensaio, resolvemos testar os mesmos em uma diluição menor (1:50) somente contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>. Nestas condições, 100% (10/10) dos pacientes foram respondedores (dados não mostrados).

## **2. Avaliação da especificidade do ensaio imunoenzimático utilizando proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax* para o diagnóstico sorológico da malária.**

A especificidade do ensaio foi avaliada em 177 soros, sendo 108 de pacientes com doenças não relacionadas à malária, 10 soros de pacientes positivos para fator anti-nuclear, 10 soros positivos para fator reumatóide e 49 soros de pacientes normais. Além destes, soros de 53 indivíduos africanos expostos ao *P. falciparum* foram testados apenas contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, devido à limitação de quantidade destas amostras.

A Figura 3 apresenta os valores de DO<sub>492</sub> obtidos após análise das amostras de soros dos 430 indivíduos envolvidos neste estudo. Dois pacientes sorologicamente positivos para Doença de Chagas foram respondedores, sendo que um deles foi positivo para três proteínas recombinantes (GST-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> e His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>-PADRE) e o outro, para apenas uma delas (His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>-PADRE). Resultados

semelhantes foram obtidos entre os indivíduos sorologicamente positivos para Hepatite B (HBV). Um paciente positivo para Hepatite C (HCV) foi respondedor para duas proteínas recombinantes (His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> e His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>-PADRE) e um outro positivo para HTLV respondeu apenas para His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>. Dos soros de 53 indivíduos africanos testados contra a proteína His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, somente três (5,7%) foram respondedores. Para efeito de controle positivo dos ensaios com as amostras de soros dos indivíduos africanos, 39 destas foram testadas contra uma proteína recombinante derivada da proteína 2 de superfície do merozoíta (MSP-2) de *P. falciparum* e a percentagem de respondedores foi de 69,2% (dados não mostrados).

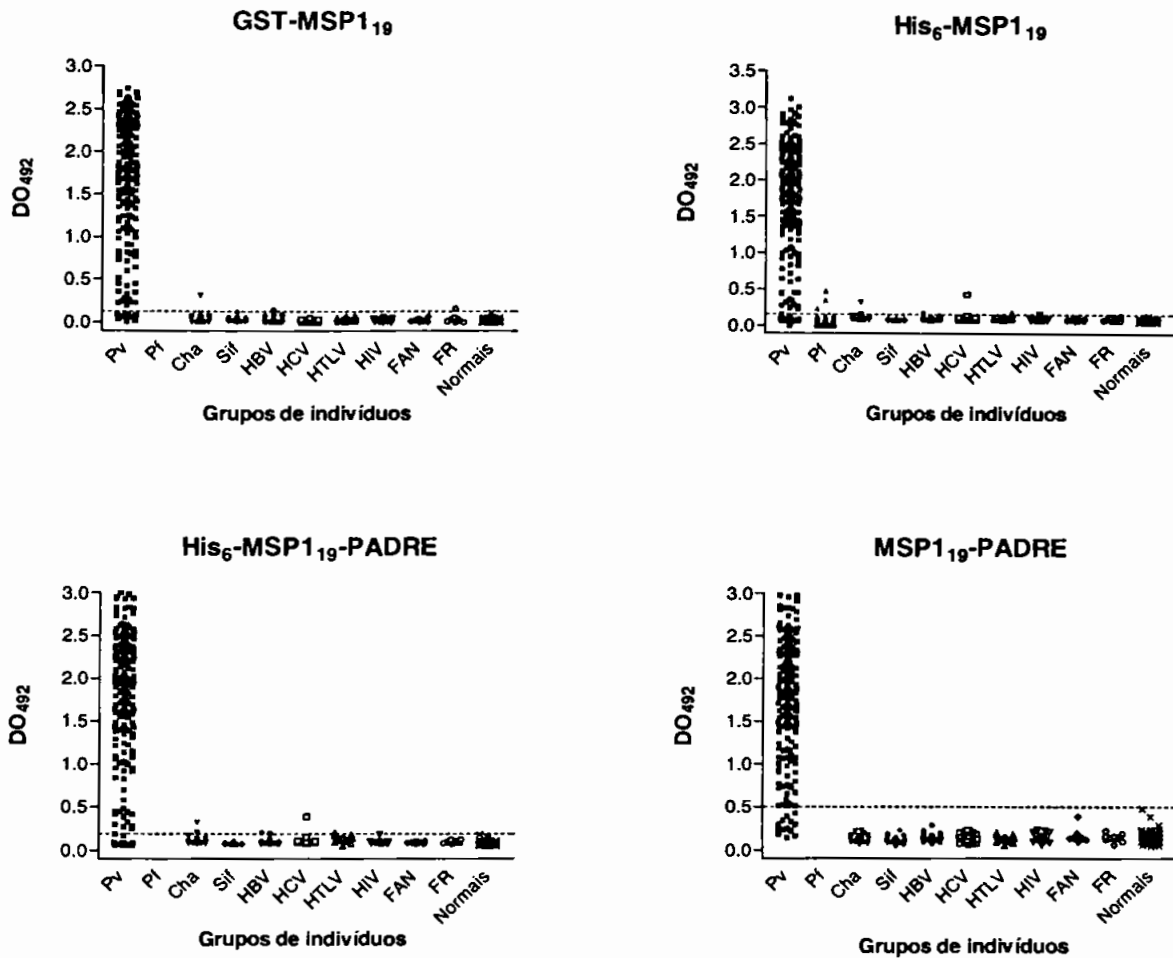
A especificidade do ensaio para cada uma das proteínas recombinantes foi de 98,3%, 97,7%, 97,7% e 100% (GST-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>-PADRE e MSP1<sub>19</sub>-PADRE, respectivamente).

### 3. Obtenção do gene que codifica a proteína AMA-1 de *P. vivax*.

A seqüência de nucleotídeos correspondente aos aminoácidos 43 a 487 de AMA-1 foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico de um paciente infectado por *P. vivax* (Código 12B) procedente de Belém, Pará. O produto de PCR foi inserido no vetor comercial pMOS e a seqüência que codifica a proteína AMA-1 foi confirmada através de seqüenciamento do DNA. A seqüência de DNA foi obtida a partir do *clone 9*, o qual liberou uma banda de 1.3 kb após digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I.

A comparação entre as seqüências de nucleotídeos do *clone 9* e do gene que codifica a proteína PV66/AMA-1 (acesso Y16950) mostrou que estas apresentam pequenas diferenças entre si, confirmando que o produto de PCR amplificado corresponde à *ama-1*. A percentagem de identidade entre as duas seqüências de aminoácidos (PV66/AMA-1 e AMA-1 (isolado 12B, *clone 9*) foi de 97,3% (figura 4).

Posteriormente, os insertos correspondentes foram removidos do vetor pMOS e inseridos no vetor pHIS (pET-22b) para expressão das proteínas recombinantes em fusão com His<sub>6</sub>.



**Figura 3. Análise da especificidade do ensaio imunoenzimático baseado na detecção de anticorpos contra proteínas recombinantes derivadas da MSP<sub>19</sub>.** Os símbolos representam as médias de DO<sub>492</sub> de cada amostra de soro testada em duplicata contra cada as quatro proteínas recombinantes indicadas. Todas os soros foram testados na diluição de 1:100. As abreviaturas são as seguintes: a) Pv = indivíduos infectados por *P. vivax* (n = 200), b) Pf = indivíduos expostos ao *P. falciparum* (n = 53); c) Cha = indivíduos com sorologia positiva para Doença de Chagas (n = 21), d) Sif = indivíduos com sorologia positiva para sífilis (n = 21), e) HBV = indivíduos com sorologia positiva para hepatite B (n = 19), f) HCV = indivíduos com sorologia positiva para hepatite C (n = 21), g) HTLV = indivíduos HTLV positivos (n = 14), h) HIV = indivíduos HIV positivos (n = 12), i) FAN = indivíduos com fator anti-nuclear positivo (n = 10), j) FR = indivíduos fator reumatóide positivo (n = 10), l) Normais = indivíduos saudáveis. Os soros dos indivíduos expostos ao *P. falciparum* foram testados apenas contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>. As barras horizontais pontilhadas representam o "cutoff" obtido para cada proteína recombinante cujos valores foram de: 0,127, 0,170, 0,198 e 0,500 para GST-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>-PADRE e MSP1<sub>19</sub>-PADRE, respectivamente.



```

PV66/AMA-1 : PTVERSTRMGNPWKAFMEKYDIERTHSSGVRVDLGEDAEVENAKYRIFAGRCVPVFGKGIIVIENSIVSFLRPVATGDQKLLK : 80
AMA-1/12B : PTVERSTRMGNPWKAFMEKYDIEKTHSSGVRVDLGEDAEVENAKYRIFAGRCVPVFGKGIIVIENSAVSFLTPVATGDQRLK : 80

PV66/AMA-1 : DGGFAPPNANDHISPMTLANLKERKRYKDNVEMMKLNDIALCRTHAASFVMAGDQNSSYRHPAVYDEKEKTCCHMLYLSAQEN : 160
AMA-1/12B : DGGFAPPNANDHISPMTIANLKARYKDNVEMMKLNDIALCRTHAASFVMAGDQNSSYRHPAVYDEKEKTCCHMLYLSAQEN : 160

PV66/AMA-1 : MGPRYCSFDAQNRDAVFCFKPKDNESFENLVYLSKNVRNDWDKCKPRKNLGNAKFGLWVDGNCEEIPYVKEVEAEADLREC : 240
AMA-1/12B : MGPRYCSFDAQNRDAVFCFKPKDNESFENLVYLSKNVRNDWDKCKPRKNLGNAKFGLWVDGNCEEIPYVKEVEAKDLREC : 240

PV66/AMA-1 : NRIVFGASASDQPTQYEEEMTDYQIQGGFRQNNREMIKSAFLPVGAFNSDNFVGFNWFANFDSVKKKCYIFNTKPT : 320
AMA-1/12B : NRIVFEASASDQPTQYEEEMTDYQIQGGFRQNNREMIKSAFLPVGAFNSDNFVGFNWFANFDSVKKKCYIFNTKPT : 320

PV66/AMA-1 : CLINDKNFIATTALSHPQEVDFEPPCSIYKDEIEREIKKQSRNMNLYSVDGERIVLPRIFISNDKESIKCPCPEPERISNS : 400
AMA-1/12B : CLINDKNFIATTALSHPQEVGPEPPCSIYKDEIEREIKKQSRNMNLYSVDGERIVLPRIFISNDKESIKCPCPEPERISNS : 400

PV66/AMA-1 : TCNFYVCNCVEKRAEIKENNQVWIKEEFRNYEENGEEKSNKQMLL : 445
AMA-1/12B : TCNFYVCNCVEKRAEIKENNQVWIKEEFRDYEENGEEKSNKQMLL : 445

```

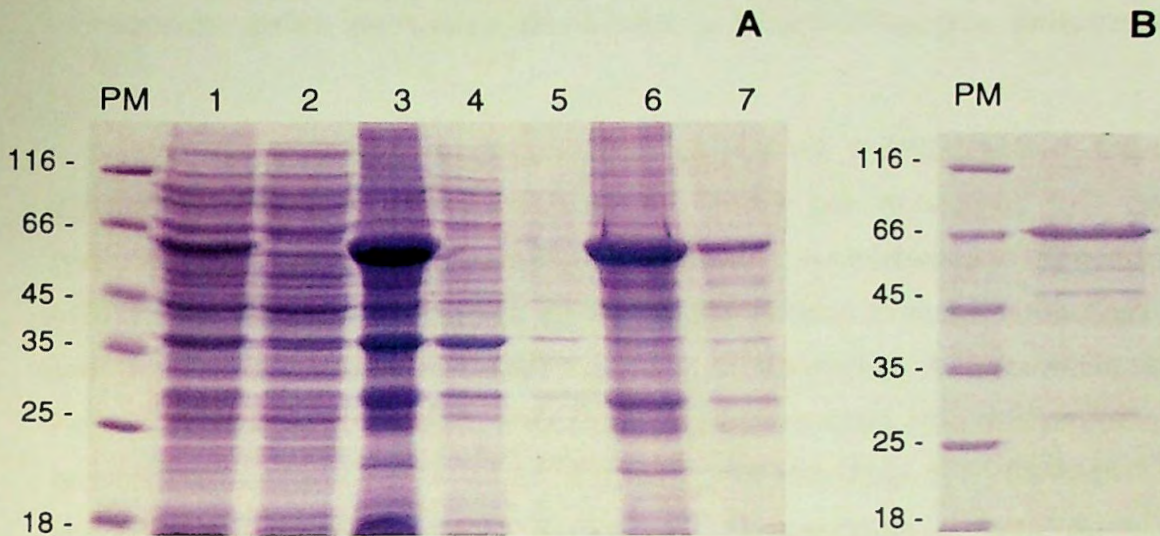
**Figura 4. Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos dos genes *pv66/ama-1* (acesso Y16950) e *ama-1* isolado de DNA genômico de indivíduo infectado procedente da Região Amazônica (paciente 12B, clone 9).** As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos foram analisadas utilizando-se o pacote DNASTAR versão 5.0 (DNASTAR Inc.) e alinhadas utilizando-se o alinhamento Clustal W. As caixas cinza representam as regiões de identidade entre as seqüências de aminoácidos das duas proteínas derivadas de *ama-1*. Para a montagem da figura foi utilizado o programa GENEDOC versão 2.5.

#### 4. Expressão e purificação da proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1.

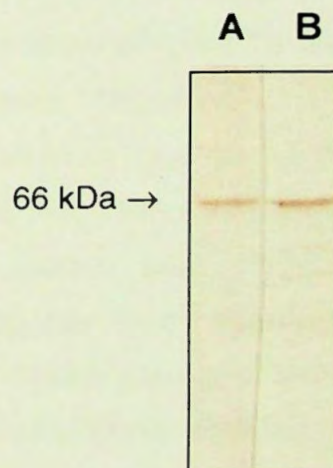
Após a transformação da construção pHIS/AMA-1 em *E. coli* cepa BL21(DE3), um clone foi expandido e induzido com IPTG. A análise em SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie das frações obtidas (precipitado e sobrenadante) após lise da cultura bacteriana, revelou a presença majoritária de uma proteína de aproximadamente 66 kDa no precipitado do extrato bacteriano caracterizando a formação de corpos de inclusão. A solubilização e purificação da proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 foram realizadas como descrito no item Metodologia.

A figura 5A apresenta as diferentes etapas do processamento do precipitado bacteriano até a solubilização da proteína recombinante a partir dos corpos de inclusão. Durante a etapa de purificação na resina foi feito “refolding” parcial, caracterizado pela retirada decrescente de uréia da amostra, seguindo ao final do processo, por diálise contra uma solução contendo 50% glicerol, para que fosse evitada à agregação da proteína purificada. Mesmo utilizando esta estratégia, uma parte da proteína fica agregada, e esta foi removida por centrifugação. O perfil de migração da proteína recombinante purificada em SDS-PAGE 12%, sob condições redutoras, pode ser visualizado na figura 5B.

Apesar de não termos nenhum ensaio biológico que nos possibilitasse avaliar se o recombinante obtido é funcional, demonstramos por análise em SDS-PAGE, que amostras submetidas à eletroforese em condições redutoras e não redutoras apresentam padrão de migração diferentes, sugerindo que a proteína recombinante obtida retém parte de sua conformação (dados não mostrados). Além disso, a proteína AMA-1 foi reconhecida em “immunoblotting” por soro policlonal de camundongo anti PV66/AMA-1 e por soro de um paciente infectado pelo *P. vivax* (figura 6), o que sugere que ambos os recombinantes (obtidos em bactéria e levedura) têm uma conformação semelhante.



**Figura 5. Etapas da purificação da proteína recombinante AMA-1 expressa em *E. coli* a partir do vetor pHIS. A)** diferentes etapas do processamento do precipitado bacteriano até a solubilização da proteína: 1. extrato total, 2. sobrenadante após sonicação, 3. precipitado pós-sonicação, 4. sobrenadante da 1ª lavagem, 5. sobrenadante da 2ª lavagem, 6. sobrenadante do precipitado solubilizado, 7. precipitado pós-solubilização. **B)** padrão de migração da proteína recombinante após purificação utilizando resina de níquel. SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie.

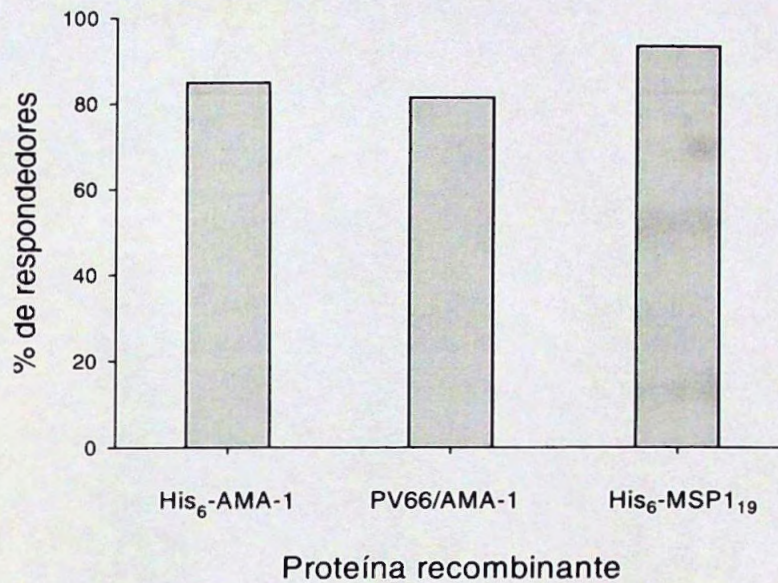


**Figura 6. Análise do reconhecimento imune da proteína recombinante His<sub>6</sub>- AMA-1 por "Immunoblotting".** Reconhecimento imune da proteína purificada AMA-1 por um soro de paciente com infecção patente por *P. vivax* (A) e por um "pool" de soros policlonais de camundongo anti-PV66/AMA-1 (B).

## 5. Avaliação comparativa do reconhecimento das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 e His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> por anticorpos IgG.

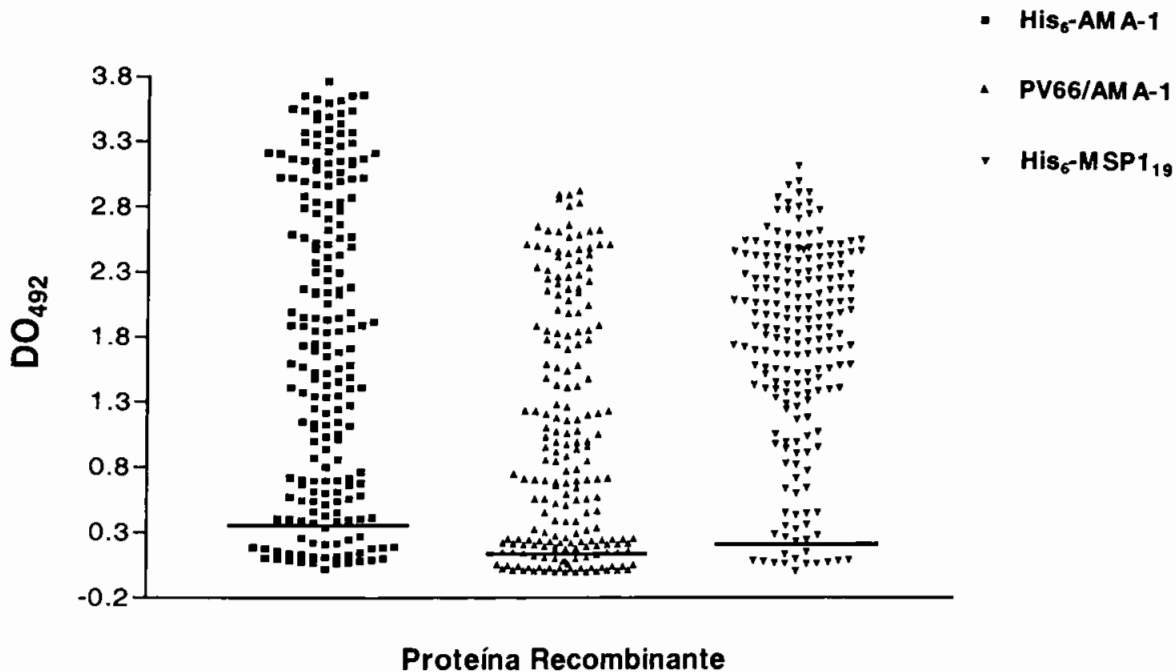
As proteínas recombinantes His<sub>6</sub>-AMA-1 e PV66/AMA-1 foram comparadas quanto ao reconhecimento imune por anticorpos IgG dos mesmos indivíduos testados com as proteínas recombinantes derivadas MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax*. Utilizamos os resultados obtidos anteriormente com a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> para comparação. A frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra cada uma das proteínas recombinantes foi de 85%, 81,5% e 93,5% para His<sub>6</sub>-AMA-1, PV66/AMA-1 e His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, respectivamente (figura 7). Utilizando-se o teste do qui-quadrado, verificamos que a proporção de indivíduos respondedores para a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> foi significativamente maior do que as proporções obtidas para as duas proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre as proporções de respondedores obtidas para His<sub>6</sub>-AMA-1 e PV66/AMA-1 ( $P > 0,05$ ).

A figura 8 apresenta a comparação das respostas de IgG estimadas pela DO<sub>492</sub>. A média de DO<sub>492</sub> (DO  $\pm$  desvio padrão) obtida para cada uma das proteínas recombinantes foi de:  $1,741 \pm 1,170$ ,  $1,027 \pm 0,922$  e  $1,735 \pm 0,783$  para His<sub>6</sub>-AMA-1, PV66/AMA-1 e His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, respectivamente. Observamos que os valores de DO obtidos para as proteínas recombinantes His<sub>6</sub>-AMA-1 e His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> foram significativamente maiores do que os obtidos para PV66/AMA-1 (teste Kruskal-Wallis,  $P < 0,001$ ). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de DO obtidos para as proteínas recombinantes His<sub>6</sub>-AMA-1 e His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> (teste Kruskal-Wallis,  $P > 0,05$ ).



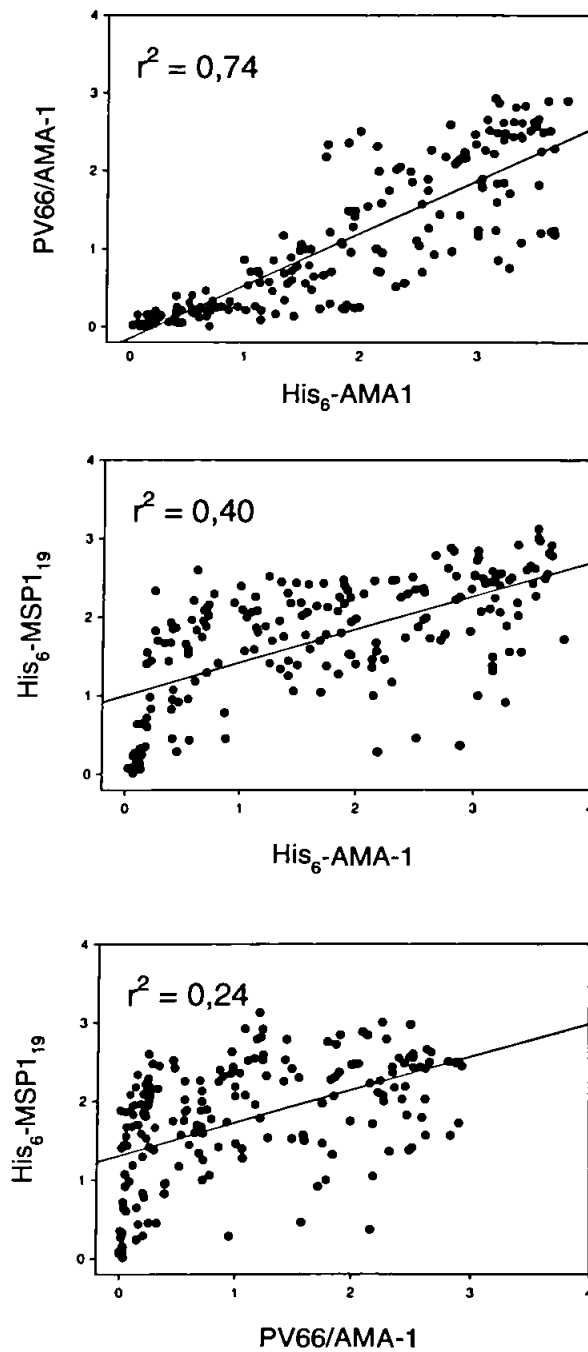
**Figura 7. Análise comparativa da reatividade de soros de indivíduos com malária patente por *P. vivax* contra as diferentes proteínas recombinantes.** Soros de 200 indivíduos foram analisados quanto à presença de anticorpos IgG específicos por ELISA. Os soros foram testados na diluição 1:100, em duplicata.

His <sub>6</sub> -AMA-1 x PV66-AMA-1	$\chi^2 = 0,65$	$P = 0,4201$
His <sub>6</sub> -AMA-1 x His <sub>6</sub> -MSP1 <sub>19</sub>	$\chi^2 = 6,67$	$P = 0,0098$
PV66-AMA-1 x His <sub>6</sub> -MSP1 <sub>19</sub>	$\chi^2 = 12,09$	$P = 0,0005$



**Figura 8. Comparação da resposta de anticorpos de 200 amostras de soro de indivíduos com malária vivax contra as proteínas recombinantes derivadas de *P. vivax*. Os símbolos representam a média das DO<sub>492</sub> de cada soro testado em duplicata. As barras horizontais representam o "cutoff" obtido para cada proteína recombinante, cujos valores foram de 0,332, 0,114 e 0,170 pra His<sub>6</sub>-AMA-1, PV66/AMA-1 e His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, respectivamente.**

A figura 9 apresenta os gráficos de correlações entre valores de DO<sub>492</sub> obtidos com as três proteínas recombinantes. Nestes gráficos podemos observar que o mais alto coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi obtido quando foram comparadas as reatividades de anticorpos entre as duas proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 (His<sub>6</sub>-AMA-1 e PV66/AMA-1,  $r^2 = 0,74$ ), indicando que os epítopos reconhecidos nestas proteínas são similares. Por outro lado, coeficientes de determinação bem mais baixos foram observados quando comparamos o reconhecimento das proteínas His<sub>6</sub>-AMA-1 e His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> ( $r^2 = 0,40$ ) ou PV66/AMA-1 e His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> ( $r^2 = 0,24$ ).



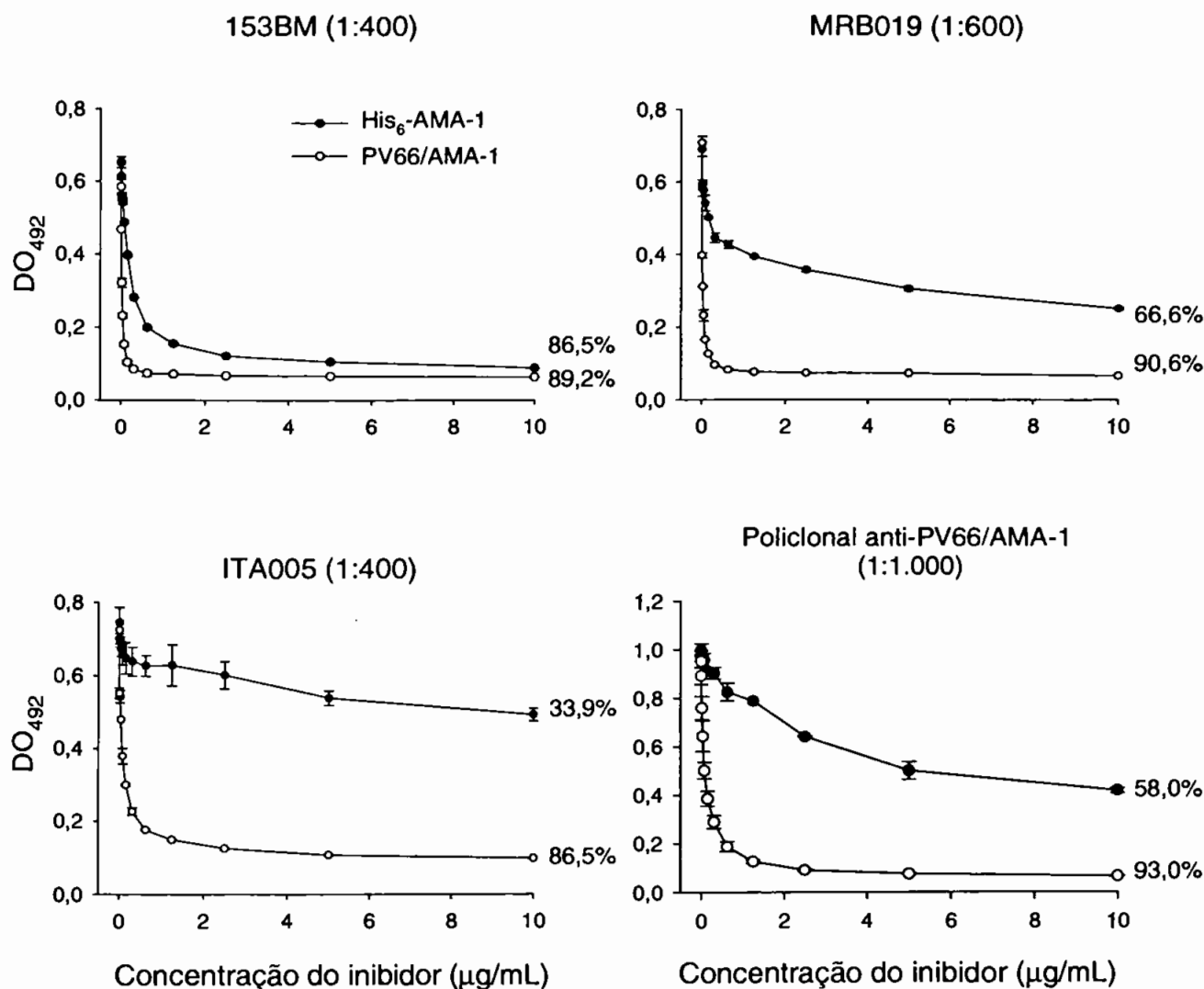
**Figura 9. Comparação do reconhecimento das proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 e MSP1<sub>19</sub> por anticorpos IgG dos soros coletados de 200 indivíduos durante infecção por *P. vivax*. Cada painel representa a reatividade destes soros contra duas proteínas recombinantes. Os soros foram testados na diluição final de 1:100, em duplicata, e cada símbolo representa a média da DO<sub>492</sub>. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) está indicado em cada painel.**

Com o intuito de avaliar se os epítomos reconhecidos nas duas proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 são similares, realizamos ensaios de inibição, por ELISA, utilizando na placa a proteína recombinante PV66/AMA-1. Os soros humanos (153BM, MRB019 ou ITA005 nas diluições de 1:400, 1:600 e 1:400, respectivamente) e o soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1 (diluído 1:1.000) foram incubados previamente com as proteínas recombinantes His<sub>6</sub>-AMA-1 ou PV66/AMA-1 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 percentagens de inibição nos ensaios com os três soros humanos variaram de 86,5 a 90,6% ou 33,9 a 86,5% quando utilizado PV66/AMA-1 ou His<sub>6</sub>-AMA-1, respectivamente. Na presença do soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1, as percentagens de inibição máxima foram de 93% e 58%, quando utilizamos os inibidores PV66/AMA-1 ou His<sub>6</sub>-AMA-1, respectivamente.

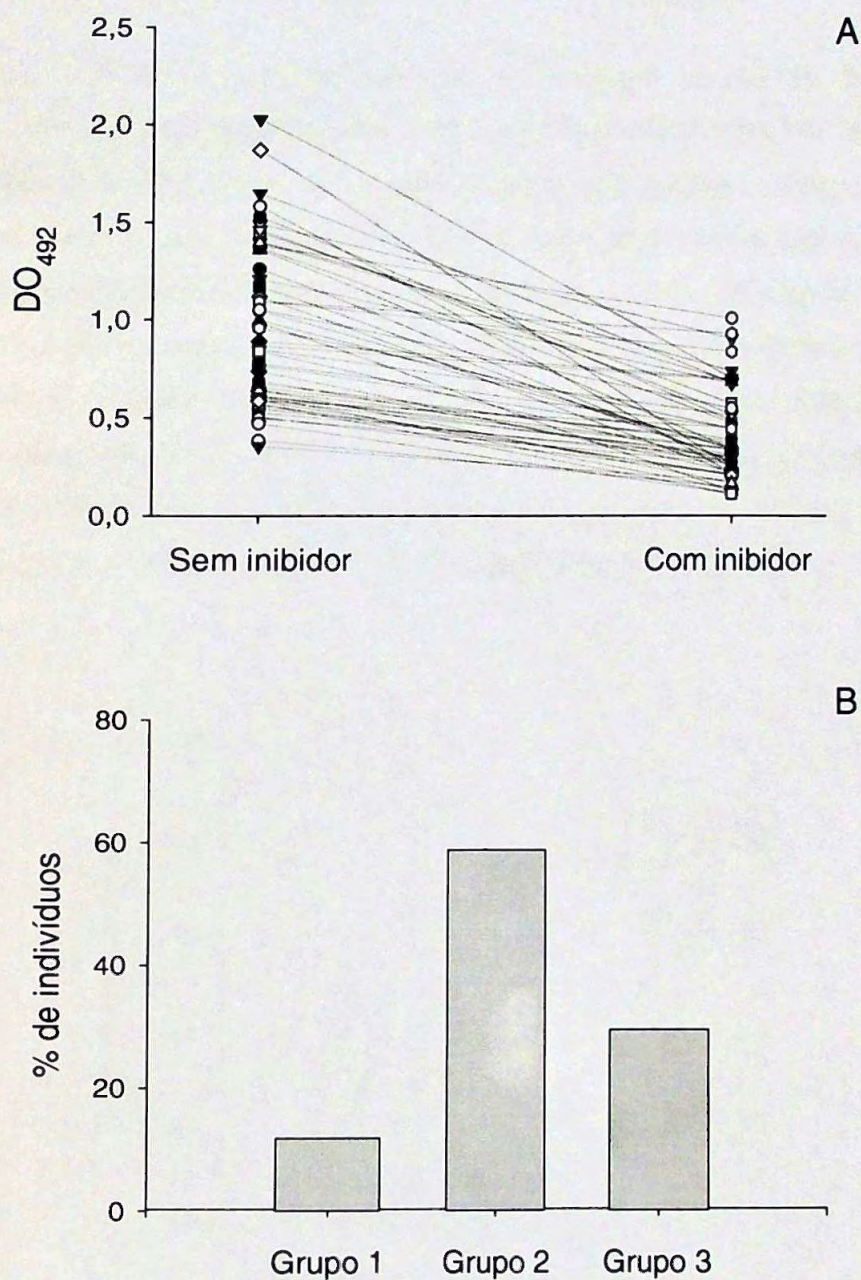
A partir destes resultados, estendemos estes estudos para outras 48 amostras de soros utilizando como inibidor apenas a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 na concentração de 10 µg/mL mantendo a proteína PV66/AMA-1 na placa. A figura 11A mostra as DO<sub>s492</sub> obtidas para cada um dos soros dos 51 pacientes na presença ou ausência do inibidor. Os soros foram testados em diluições que variaram de 1:200 a 1:600. A percentagem de inibição para as 51 amostras testadas foi de  $56 \pm 18,4\%$ , em que a maior percentagem de inibição foi de 87,5% e a menor de 15,1%.

A figura 11B mostra a percentagem de indivíduos que apresentaram valores médios de inibição <33,3% (Grupo 1), entre 33,3% e 66,6% (Grupo 2) e >66,6% (Grupo 3). Os resultados demonstram a presença de epítomos de reatividade cruzada assim como específicos para os dois antígenos recombinantes derivados de AMA-1.





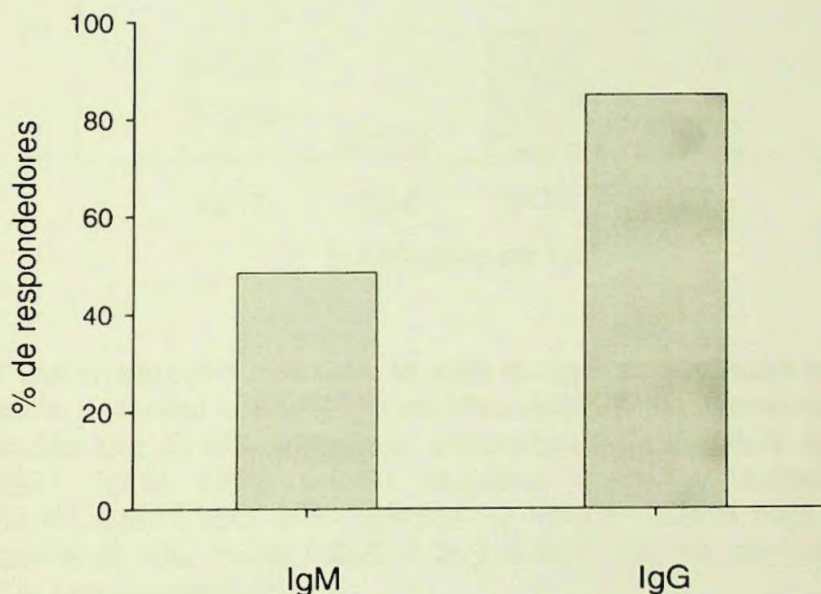
**Figura 10. Ensaio de inibição por ELISA (I).** As placas foram cobertas com a proteína recombinante PV66/AMA-1. As proteínas recombinantes His<sub>6</sub>-AMA-1 ou PV66/AMA-1 foram adicionadas em diferentes concentrações a partir de 10 µg/mL após incubação prévia com soros humanos (153BM, MRB019 ou ITA005) ou soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1 nas diluições indicadas em cada painel. As percentagens representam a inibição na presença de 10 µg/mL do inibidor (His<sub>6</sub>-AMA-1 ou PV66/AMA-1).



**Figura 11. Ensaio de inibição por ELISA (II).** As placas foram cobertas com a proteína recombinante PV66/AMA-1. A proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 foi adicionada na concentração final de 10 µg/mL após incubação prévia com cada um dos soros de 51 indivíduos, em diluições que variaram de 1:200 a 1:600. **A.** DO<sub>492</sub> obtidas com as 51 amostras testadas com ou sem inibidor. **B.** Percentagens de indivíduos que apresentam valores médios de inibição <33,3% (Grupo 1), entre 33,3% e 66,6% (Grupo 2) e >66,6% (Grupo 3).

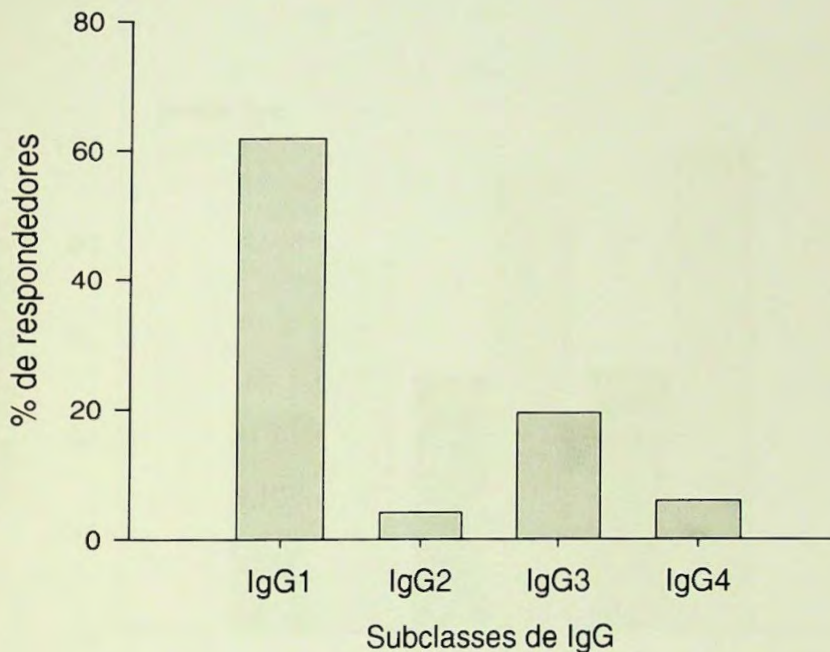
### 6. Determinação da freqüência de indivíduos respondedores para His<sub>6</sub>-AMA-1 por anticorpos IgM, IgG e subclasses de IgG.

Com a finalidade de dar continuidade ao estudo da resposta imune adquirida naturalmente contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1, avaliamos a freqüência de indivíduos que apresentavam anticorpos IgM, IgG e subclasses específicos anti-AMA-1. Como pode ser observado na figura 12 a percentagem de indivíduos que apresentaram anticorpos IgM e IgG foi de 48,5% e 85%, respectivamente. A percentagem total de respondedores para His<sub>6</sub>-AMA-1 (IgG ou IgM) foi de 90%. O que sugere que esta proteína é altamente imunogênica em infecções naturais. Os títulos de anticorpos foram determinados para todas as amostras que apresentaram IgG anti-His<sub>6</sub>-AMA-1. Os títulos variaram de 200 até 102,400 (dados não mostrados).



**Figura 12. Análise da reatividade de soros de indivíduos com malária patente contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1.** Os soros de 200 indivíduos com infecção patente por *P. vivax* foram analisados quanto a presença de IgM e IgG específicos, por ELISA, utilizando como antígeno a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1. Todas as amostras de soro foram testadas na diluição 1:100, em duplicata. O "cutoff" obtido para IgM e IgG foi de 0,104 e 0,332, respectivamente.

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 para His<sub>6</sub>-AMA-1. Os resultados obtidos mostram, que durante a infecção patente por *P. vivax*, a subclasse de IgG que predomina no reconhecimento do antígeno recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 é IgG1 (figura 13).

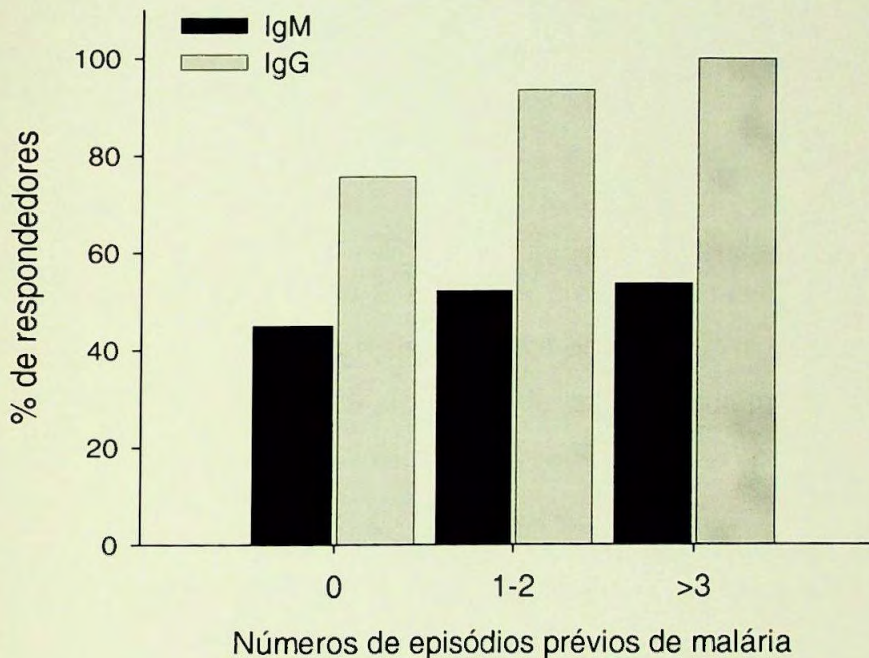


**Figura 13. Determinação das subclasses de IgG específicas capazes de reconhecer a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1.** As amostras de soros foram testadas por ELISA utilizando anticorpos monoclonais capazes de detectar IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humana. Todas as amostras foram testadas na diluição 1:100, em duplicata. O "cutoff" obtido para cada uma das subclasses de IgG foi de 0,062, 0,203, 0,064 e 0,062 para IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, respectivamente.

#### **7. Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos anti-His<sub>6</sub>-AMA-1.**

Com o intuito de avaliar se a frequência de respondedores para His<sub>6</sub>-AMA-1 aumenta de acordo com o número de episódios prévios de malária, 198 indivíduos que informaram o número de episódios prévios de

malária foram subdivididos em 3 grupos: i) primoinfectados (n=111), ii) indivíduos que tiveram 1 ou 2 episódios prévios de malária (n=46) e iii) indivíduos que tiveram 3 ou mais episódios de malária (n=41). Como pode ser observado na figura 14, a proporção de IgM se mantém, enquanto a de IgG aumenta com a maior exposição prévia à malária, padrão esse que corresponde ao esperado na vigência de um "switch" normal de isotipos de imunoglobulinas (respostas primária e secundária de anticorpos).



**Figura 14. Análise comparativa da resposta de indivíduos com infecção aguda quanto ao número de episódios prévios de malária.** Foram analisadas 198 amostras de soro quanto à presença de IgM e IgG por ELISA.

	IgG			IgM		
0 x 1-2	$\chi^2 = 5,56$	$P = 0,0183$		0 x 1-2	$\chi^2 = 0,014$	$P = 0,9027$
0 x >3	$\chi^2 = 10,5$	$P = 0,0012$		0 x >3	$\chi^2 = 0,069$	$P = 0,7922$
1-2 x >3	$\chi^2 = 1,15$	$P = 0,2821$		1-2 x >3	$\chi^2 = 0,005$	$P = 0,9389$

A análise estatística mostrou significância quando comparados os grupos de indivíduos respondedores com IgG primo infectados com o grupo de indivíduos que apresentavam de 1 a 2 episódios de malária e indivíduos com mais de 3 episódios da doença (teste do qui-quadrado,  $P < 0,05$ ). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de indivíduos que tinham de 1 a 2 ou mais de 3 episódios de malária ( $P > 0,05$ ). Para IgM, não houve diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos.

## **V. Discussão**

---

Nos últimos anos, diversos aspectos da resposta imune humana naturalmente adquirida contra proteínas recombinantes derivadas de proteínas de superfície de merozoítas de *P. vivax* (MSP-1 MSP3 $\alpha$  e  $\beta$ ) têm sido estudados (LEVITUS *et al.*, 1994; SOARES *et al.*, 1997, 1999a, 1999b, 1999c; CUNHA, 2002). Estes estudos mostraram que: i) a proteína recombinante correspondente a região C-terminal da MSP-1 (MSP1<sub>19</sub>) de *P. vivax* foi a proteína mais imunogênica; ii) os títulos de anticorpos contra a MSP1<sub>19</sub> foram mais altos do que os títulos contra todas as demais proteínas recombinantes, iii) anticorpos citofílicos do tipo IgG1 e IgG3 foram as subclasses de anticorpos que predominaram na resposta imune anti-MSP-1, iv) a resposta imune de anticorpos contra a MSP-1 é de curta duração, v) a seqüência de nucleotídeos que codifica a MSP1<sub>19</sub> foi inteiramente conservada em 28 isolados da Região Amazônica.

Com base nestes resultados, vários plasmídios (pGEX, pET e pMAL) recombinantes contendo o gene que codifica a MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax* foram construídos para expressão em bactérias e na levedura *Pichia pastoris* (pPIC9K). Estas proteínas recombinantes obtidas foram utilizadas para imunização de camundongos em diferentes adjuvantes comerciais visando estabelecer qual a melhor combinação de antígeno/adjuvante a ser utilizada em futuros ensaios em primatas não humanos (CUNHA *et al.*, 2001; SOARES & RODRIGUES, 2002; ROSA *et al.*, *in press*).

No presente estudo, analisamos comparativamente o reconhecimento de quatro proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub> expressas em diferentes vetores (CUNHA *et al.*, 2001; SOARES & RODRIGUES, 2002) por soros de 200 indivíduos expostos ao *P. vivax*. O reconhecimento imune das diferentes proteínas recombinantes foi realizado com o intuito de: (i) avaliar qual das proteínas recombinantes apresentaria uma melhor conformação reconhecida por soros humanos de indivíduos expostos ao *P. vivax*; (ii) aumentar a sensibilidade do ensaio sorológico para auxiliar o diagnóstico da malária.

Observamos que a freqüência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra pelo menos uma das proteínas recombinantes



derivadas da MSP1<sub>19</sub> foi de 95%. A frequência de indivíduos respondedores para cada proteína recombinante foi de 90% para GST-MSP1<sub>19</sub> e 93,5% para as demais proteínas recombinantes (His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>-PADRE e MSP1<sub>19</sub>-PADRE).

Dez amostras dos 200 soros de indivíduos com infecção por *P. vivax*, não responderam para nenhuma das quatro proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub>. Estas amostras foram também testadas contra proteínas recombinantes derivadas da região N-terminal da MSP-1 (ICB1-2, ICB2-3, ICB3-4, P4-ICB5) e contra proteínas derivadas da MSP3 $\alpha$  e  $\beta$ , sendo que nenhum deles apresentou anticorpos IgG contra as proteínas testadas. Esta ausência de reatividade de anticorpos IgG contra as proteínas testadas, em particular a MSP1<sub>19</sub>, poderia ser explicada por um possível atraso no "switch" de classe de IgM para IgG, uma vez que estes dez indivíduos são primoinfectados. Para testar esta hipótese, os soros destes 10 indivíduos foram avaliados por ELISA quanto à presença de IgM apenas contra a proteína His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>. Observamos que 90% (9/10) destes pacientes foram respondedores para anticorpos IgM anti-His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, o que daria uma sensibilidade de 99,5% ao ensaio de ELISA se considerássemos os resultados da detecção de anticorpos IgM e IgG para a MSP1<sub>19</sub>.

A princípio, estes dados poderiam comprometer o uso deste ensaio para detecção de indivíduos primoinfectados. Entretanto, dos 200 indivíduos avaliados, 111 são primoinfectados e o nosso ensaio foi capaz de detectar anticorpos IgG anti-MSP1<sub>19</sub> em 101 destes (90,9%), o que é uma proporção bastante significativa em se tratando de um teste sorológico. Esta informação é importante e sugere que a detecção de anticorpos IgG anti-MSP1<sub>19</sub> seja apropriada para triagem de indivíduos não imunes que estão retornando de áreas endêmicas ou viajantes que estejam em áreas endêmicas de malária pela primeira vez.

Uma questão que deve ser mais investigada é a persistência da resposta de anticorpos contra as diferentes proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub>. Anteriormente, demonstramos que há uma diminuição significativa na concentração dos anticorpos IgG contra uma proteína

recombinante derivada da MSP<sub>19</sub> em fusão com a GST (ICB10) em indivíduos expostos ao *P. vivax* após somente 2 meses de tratamento quimioterápico (SOARES *et al.*, 1999b). Em contraste a estes resultados, foi descrito que a resposta de anticorpos contra uma proteína recombinante correspondente a região C-terminal da MSP-1 (Pv200) produzida em leveduras persistiu por 7 anos após breve exposição dos indivíduos ao *P. vivax* (BRAGA *et al.*, 1998). Mais recentemente foi observada a persistência de anticorpos anti-MSP<sub>19</sub> por mais de 30 anos em indivíduos que vivem em áreas onde a malária foi erradicada (LIM *et al.*, *in press*). Entretanto, a longevidade da resposta de anticorpos aos antígenos utilizados neste estudo ainda precisa se avaliada.

A especificidade do ensaio foi avaliada pela análise de 128 amostras de soros de indivíduos com outras doenças não relacionadas à malária e 49 amostras de soros de indivíduos normais. Além destas amostras, 53 soros de indivíduos africanos expostos ao *P. falciparum* foram testados apenas a contra proteína His<sub>6</sub>-MSP<sub>19</sub>. Os valores de especificidade obtidos foram de 98,3% para GST-MSP<sub>19</sub>, 97,7% para His<sub>6</sub>-MSP<sub>19</sub> e His<sub>6</sub>-MSP<sub>19</sub>-PADRE ou 100% para MSP<sub>19</sub>-PADRE.

É importante ressaltar, que no grupo de indivíduos africanos apenas 5,7% foram respondedores (figura 3). Como controle, 39 dos soros de indivíduos africanos, foram testados contra uma proteína recombinante derivada da MSP-2 de *P. falciparum*. A percentagem de respondedores obtida foi de 69,2% (dados não mostrados). Para estudos imuno-epidemiológicos, seleção de doadores de sangue e diagnóstico sorológico da malária por *P. vivax*, a falta de reatividade cruzada entre a MSP<sub>19</sub> de *P. vivax* e *P. falciparum* pode ser a principal vantagem. Entretanto, esta ausência de reatividade cruzada por anticorpos de indivíduos expostos ao *P. falciparum* contra a proteína MSP<sub>19</sub> de *P. vivax*, pode ter algumas conseqüências imunológicas, tais como, no desenvolvimento da imunidade adquirida e na composição de uma vacina para as áreas em que ambas as espécies são prevalentes.

Recentemente, um ensaio de ELISA sandwiche direto, para detectar anticorpos IgG e IgM contra a região C-terminal da MSP1 de *P. vivax* foi proposto como um método de diagnóstico para indivíduos expostos ao *P. vivax* na Coreia (LIM *et al.*, 2002). Este ensaio apresentou uma sensibilidade elevada (99,5%), mostrando que as proteínas recombinantes derivadas da região C-terminal da MSP1 de *P. vivax* podem ser usadas em diferentes partes do mundo para detecção de indivíduos infectados por *P. vivax*.

É importante mencionar que a detecção sorológica da malária por *P. vivax* pode ser otimizada utilizando-se estratégias alternativas. Uma delas é a possibilidade do uso combinado de outras proteínas recombinantes derivadas de antígenos de formas sanguíneas de *P. vivax*, tais como MSP3 $\alpha$  e  $\beta$ , AMA-1 e DBP, as quais estão sendo atualmente produzidas em nosso laboratório. No presente estudo, se considerarmos os resultados obtidos com as proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 para efeito de diagnóstico sorológico a sensibilidade do ensaio não aumenta, pois os mesmos dez indivíduos que não responderam para a MSP1<sub>19</sub> foram também não respondedores para AMA-1.

Uma outra estratégia interessante seria o desenvolvimento de um ensaio de quimioluminescência baseado na MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax*. Este ensaio foi proposto para o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas e mostrou-se ser altamente sensível e específico (ALMEIDA *et al.*, 1994, 1997). Desta forma, possivelmente seríamos capazes de eliminar as amostras falso-positivas e falso-negativas que obtivemos.

Alternativamente, foi descrito um ensaio imunocromatográfico baseado também na detecção de anticorpos anti-MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax*. Utilizando-se esta metodologia, foram obtidos valores de 100% de sensibilidade e 98,3% de especificidade. Entretanto não foram incluídas neste estudo amostras de soros de indivíduos com *P. falciparum* (PARK *et al.*, 2003). As vantagens deste método são a rapidez, simplicidade e possibilidade de uso em trabalhos de campo. De modo semelhante, o nosso

ensaio poderia servir como base para o desenvolvimento de um teste imunocromatográfico.

Em conjunto, nossos resultados demonstraram que para a população brasileira, um ensaio imunoenzimático baseado em apenas uma proteína recombinante derivada da MSP1<sub>19</sub> de *P. vivax* pode constituir-se em um marcador de exposição ao *P. vivax*, e, portanto ser útil para testes sorológicos de detecção de anticorpos específicos para o *P. vivax*. (RODRIGUES *et al.*, 2003b – em anexo). Entre as proteínas recombinantes testadas, a His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> pode ser considerada a mais indicada por ser produzida em *E. coli*, que é um sistema mais simples de obtenção de proteínas recombinantes em relação ao sistema de expressão em leveduras, e por não conter nenhum epítipo adicional (GST ou PADRE).

Na segunda parte deste estudo, expressamos em *E. coli* uma proteína recombinante correspondente a AMA-1 (His<sub>6</sub>-AMA-1) de *P. vivax*, com o objetivo de realizar estudos comparativos de antigenicidade com a MSP1<sub>19</sub>. (RODRIGUES *et al.*, 2003a). Uma outra proteína recombinante correspondente a AMA-1 de *P. vivax* e produzida em *Pichia pastoris* (PV66/AMA-1) também foi incluída neste estudo (KOCKEN *et al.*, 1999).

O reconhecimento imune de ambas as proteínas derivadas de AMA-1 por anticorpos IgG foi avaliado, por ELISA, em 200 soros dos mesmos indivíduos testados contra a MSP1<sub>19</sub> na primeira etapa deste trabalho. As proteínas recombinantes, His<sub>6</sub>-AMA-1 e PV66/AMA-1, foram reconhecidas por anticorpos IgG de 85% e 81,5% dos indivíduos, respectivamente. Estes resultados mostram que a proteína AMA-1 é altamente antigênica em infecções naturais por *P. vivax* e sugerem que a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 produzida em *E. coli* mantém suas propriedades antigênicas, uma vez que a diferença entre as proporções de respondedores obtidas para as duas proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 não foi estatisticamente significativa.

Após demonstrarmos que durante a infecção patente por *P. vivax* a frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra as proteínas derivadas de AMA-1 foi alta, realizamos análises comparativas

entre estes resultados e os já obtidos com a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>. Como o reconhecimento imune das proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub> expressas em fusão com His<sub>6</sub> foi semelhante, selecionamos o recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> para análise comparativa, por esta proteína não conter o epítipo adicional PADRE. Nossos resultados mostram que a proporção de indivíduos respondedores para a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> foi significativamente maior do que as proporções obtidas para as duas proteínas recombinantes derivadas de AMA-1.

Através de análises de correlação linear, calculamos o coeficiente de determinação entre os valores de DO<sub>492</sub> obtidos com cada par de antígenos recombinantes. Para esta análise foram utilizados os resultados obtidos com as 200 amostras de soro testadas contra as três proteínas recombinantes. Os resultados desta análise revelaram que as proteínas derivadas de AMA-1 compartilham epítipos similares, o mesmo não acontece entre a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> e as proteínas His<sub>6</sub>-AMA-1 e PV66/AMA-1.

A fim de confirmar a hipótese de que as duas proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 apresentam epítipos comuns, realizamos ensaios de ELISA por inibição utilizando na placa a proteína PV66/AMA-1. Os resultados obtidos com 51 amostras de soros indicam a presença de epítipos de reatividade cruzada assim como específicos para os dois antígenos derivados de AMA-1. Quando realizamos o ensaio de inibição na presença de soro policlonal de camundongo anti-PV66/AMA-1 os resultados obtidos sugerem que alguns epítipos presentes na proteína PV66/AMA-1 não estão presentes na proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1. Entretanto, epítipos relevantes estão presentes na proteína His<sub>6</sub>-AMA-1, pois esta foi reconhecida por 85% dos soros dos indivíduos com infecção patente por *P. vivax*.

O fato de que, proteínas recombinantes produzidas a partir de diferentes vetores ou sistemas de expressão (procarioto e eucarioto) não apresentam os mesmos epítipos não é uma grande surpresa, pois tem sido observado com outras proteínas como por exemplo, a MSP1<sub>19</sub> (CUNHA et

*al.*, 2001). Estas observações mostram que estas comparações devem continuar sendo feitas e podem ter implicações para seleção de antígenos para imunizações experimentais.

No presente estudo também caracterizamos a resposta de anticorpos IgM e subclasses de IgG contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 produzida em *E. coli*. Demonstramos que durante a infecção patente por *P. vivax* a frequência de indivíduos que apresentam anticorpos IgM contra a proteína recombinante foi de 48,5%. A frequência total de respondedores obtida foi de 90%, se considerarmos a presença de IgG ou IgM AMA-1-específicos nos soros. A determinação das subclasses de IgG produzidas contra a proteína His<sub>6</sub>-AMA-1, revelou que anticorpos citofílicos da subclasse IgG1 foram predominantes na resposta imune naturalmente adquirida. Na malária causada por *P. falciparum*, esta subclasse de IgG, assim como IgG3, estão associados à resposta imune protetora em indivíduos de áreas de alta endemicidade (GARRAUD *et al.*, 2003). Estes anticorpos promovem a inibição da multiplicação do parasita através de um mecanismo que envolve a participação de monócitos denominado ADCI (BOUHAROUN-TAYOUN *et al.*, 1990).

Finalmente, avaliamos o efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgG e IgM contra a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1. Foi observado que a proporção de IgM se mantém, enquanto a de IgG aumenta de acordo com o maior número de exposições prévias ao *P. vivax*, padrão correspondente a uma resposta primária e secundária de anticorpos. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente pelo nosso grupo utilizando uma proteína recombinante derivada da MSP1<sub>19</sub> (ICB10) em fusão com GST (SOARES *et al.*, 1997). Este resultado sugere uma associação entre a exposição e o desenvolvimento da imunidade, mas para que esta informação seja válida serão necessários estudos mais amplos e detalhados sobre a imunidade adquirida na malária por *P. vivax*.

Que seja de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de resposta imune naturalmente adquirida contra proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 de *P. vivax*. Vários aspectos da resposta imune

humana naturalmente adquirida contra esta proteína ainda necessitam ser investigados como a persistência da resposta de anticorpos e a caracterização de regiões particularmente antigênicas para anticorpos e células T. Nossos resultados sugerem que a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 produzida em *E. coli* mantém suas propriedades antigênicas e pode ser utilizada, assim como a MSP1<sub>19</sub>, para estudos imunoepidemiológicos em áreas endêmicas de malária.

É nosso intuito investir na obtenção de novas proteínas recombinantes baseadas em AMA-1 de *P. vivax*, utilizando, se necessário, sistemas alternativos de expressão com o objetivo de obter recombinantes solúveis que possam ser usados futuramente em imunizações pré-clínicas.

## **VI. Conclusões**

---



1. A frequência de indivíduos com infecção patente por *P. vivax* que apresentaram anticorpos IgG, por ELISA, contra pelo menos uma das proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub> foi de 95%. A proteína recombinante GST-MSP1<sub>19</sub> foi reconhecida por 90% dos indivíduos testados, enquanto que as demais proteínas recombinantes (His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>, His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub>-PADRE e MSP1<sub>19</sub>-PADRE) foram reconhecidas por 93,5% dos indivíduos.
2. O ensaio imunoenzimático baseado nas proteínas recombinantes derivadas da MSP1<sub>19</sub> apresentou valores de especificidade que variaram de 97,7% a 100% .

Os resultados obtidos nesta primeira etapa do trabalho demonstram que um ELISA utilizando uma única proteína recombinante baseada na MSP1<sub>19</sub> pode ser utilizado como base para o desenvolvimento de um método sorológico de detecção da malária causada por *P. vivax*.

3. Uma proteína recombinante correspondente ao antígeno de superfície de merozoíta de *P. vivax* AMA-1 foi expressa em *E. coli* em fusão com His<sub>6</sub> (His<sub>6</sub>-AMA-1). A proteína recombinante foi obtida a partir de corpos de inclusão e purificada por cromatografia de afinidade após "refolding" parcial.
4. A frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG por ELISA contra as proteínas recombinantes His<sub>6</sub>-AMA-1 e PV66/AMA-1 (produzida em *Pichia pastoris*) foi de 85% e 81,5 %, respectivamente.
5. A frequência de indivíduos respondedores para a proteína recombinante His<sub>6</sub>-MSP1<sub>19</sub> foi significativamente maior do que as frequências obtidas para as duas proteínas recombinantes derivadas de AMA-1.

Os resultados obtidos na segunda etapa deste trabalho sugerem que a proteína recombinante His<sub>6</sub>-AMA-1 produzida em *E. coli* mantém suas propriedades antigênicas e pode ser utilizada, assim como a MSP1<sub>19</sub>, para estudos imunoepidemiológicos em áreas endêmicas de malária.

## **VII. Referências bibliográficas**

---

ALMEIDA, I. C. ; RODRIGUES, E. G. ; TRAVASSOS, L. R. 1994. Chemiluminescent immunoassays: discrimination between the reactivities of natural and human patient antibodies with antigens from eukaryotic pathogens, *Trypanosoma cruzi* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Lab. Anal.** **8**: 424-431.

ALMEIDA, I. C. ; COVAS, D. T. ; SOUSSUMI, L. M. ; TRAVASSOS, L. R. 1997. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. **Transfusion** **37**: 850-857.

ALEXANDER, J. ; SIDNEY, J. ; SOUTHWOOD, S. ; RUPPERT, J. ; OSEROFF, C. ; MAEWAL, A. ; SNOKE, K. ; SERRA, H. M. ; KUBO, R. T. ; SETTE, A. 1994. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. **Immunity** **1**: 751-761.

ÁVILA, S. L. M. & FERREIRA, A. W. 2000. An appraisal of laboratory methods addressing roll back malaria. **Ciência e Cultura** **52**: 220-229.

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

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

BLACKMAN, M. J. ; HEIDRICH, H. ; DONACHIE, S. ; McBRIDE, J. S. ; HOLDER, A. A. 1990. A single fragment of a malaria merozoite surface

protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **J. Exp. Med.** **172**: 379-382.

BORHAROUN-TAYOUN, H. ; ATTANATH, P. ; SABCHAREON, A. ; CHONGSUPHAJASIDDHI, H. ; DRUILHE, P. 1990. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. **J. Exp. Med.** **172**: 1633- 1641.

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

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

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

CHANG, S. P. ; GIBSON, H. L. ; LEE-NG, C. T. ; BARR, P. J. ; HUI, G. S. N. 1992. A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth. **J. Immunol.** **149**: 548-555.

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

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

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

CHITNIS, C. E. & BLACKMAN, M. J. 2000. Host cell invasion by malaria parasites. **Parasitol. Today** **16**: 411-415.

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

CUNHA, M. G. ; RODRIGUES, M. M. ; SOARES I. S. 2001. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP<sub>1,9</sub> expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine** **20**: 385-396.

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

DEL PORTILLO, H. A. ; LONGACRE, S. ; KHOURI, E. ; DAVID, P. H. 1991. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax*

reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**: 4030-4034.

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

FERREIRA, M. U. ; KIMURA, E. A. S. ; SOUZA, J. M. ; KATZIN, A. M. 1996. The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **55**: 315-323.

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

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

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FUNASA, MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2003. <http://www.funasa.gov.br>

GALEN, R. S. & GAMBINO, S. R. 1999. Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis. New York, John Willey & Sons.

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

---

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

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

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

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

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

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

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



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

HOLDER, A. A. & FREEMAN, R. R. 1981. Immunization against blood stage rodent malaria using purified parasite antigens. **Nature** **294**: 361-364.

HOLDER, A. A. & FREEMAN, R. R. 1982. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. **J. Exp. Med.** **156**: 1528-1538.

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

HOLDER, A. A. & RILEY, E. M. 1996. Human Immune Response to MSP1. **Parasitol. Today** **12**: 173-174.

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

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

KASLOW, D. C. & KUMAR, S. 1996. Expression and immunogenicity of the C-terminus of a major blood-stage surface protein of *Plasmodium vivax*, Pv200<sub>19</sub>, secreted from *Saccharomyces cerevisiae*. **Immunol. Letters** **51**: 187-189.

---

KIMURA, M. ; KANEKO, O. ; QING, L. ; MIAN, Z. ; KAWAMOTO, F. ; WATAYA, Y.; OTANI, S. ; YAMAGUCHI, Y. ; TANABE, K. 1997. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitol. Int.** **46**: 91-95.

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

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

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

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

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

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

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

MARSH, K. ; SHERWOOD, J. A. ; HOWARD, R. J. 1986. Parasite-infected-cell-aggutination and indirect immunofluorescence assays for detection of human serum antibodies bound to antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **J. Immunol. Methods** 91: 107-115.

MARSH, K. & HOWARD, R. J. 1986. Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: expression of diverse and conserved determinants. **Science** 231: 150-153.

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

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

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. 2002. Roll Back Malaria. <http://www.rbm.who.int>

PARK, S. K. ; LEE, K. W. ; HONG, S. H. ; KIM, D. S. ; LEE, J. H. ; JEON, B. H. ; KIM, W. S. ; SHIN, H. J. ; NA, S. H. ; PARK, H. 2003. Development and evaluation of an immunochromatographic kit for the detection of antibody to *Plasmodium vivax* infection in South Korea. **Yonsei Med. J.** **44**: 747-50.

PERERA, K. L. R. L. ; HANDUNNETTI, S. M. ; HOLM, I. ; LONGACRE, S. ; MENDIS, K. 1998. Baculovirus merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant antigens are highly protective in natural primate model of human *Plasmodium vivax* malaria. **Infect. Immun.** **66**: 1500-1516.

PIZARRO, J. C. ; CHITARRA, V. ; VERGER, D. ; HOLM, I. ; PÊTRES, S. ; DARTEVELLE, S. ; NATO, F. ; LONGACRE, S. ; BENTLEY, G. A. 2003. Crystal structure of a Fab complex formed with PfMSP1-19, the C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*: a malaria vaccine candidate. **J. Mol. Biol.** **328**: 1091-1103.

RODRIGUES, M. H. C. ; RODRIGUES, K. M. ; JIMENEZ, M. C. S. ; OLIVEIRA, T. R. ; SOARES, I. S. 2003a. Expressão e antigenicidade de uma proteína recombinante derivada do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *Plasmodium vivax*. XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA. Livro de resumos, p. 218.

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

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

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

ROSS, R. 1903. An improvement method for microscopical diagnosis of intermittent fevers. **Lancet** **1**: 86-87.

RUBIO, J. M. ; BENITO, A. ; ROCHE, J. ; BERZOSA, P. J. ; GARCIA, M. L. ; MICO, M. ; EDU, M. ; ALVAR, J. 1999. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **60**: 183-187.

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

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2003. Boletim epidemiológico da malária nº 01/2003. **www.saude.gov.br**

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

SIDDIQUI, W. A. ; TAM, L. Q. ; KRAMER, K. J. ; HUI, G. S. N. ; CASE, S. E. ; YAMAGA, K. M. ; CHANG, S. P. ; CHAN, E. B. T. ; KAN, S-C. 1987. Merozoite surface coat precursor protein completely protects *Aotus* monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**: 3014-3018.

---

SINA, B. 2002. Focus on *Plasmodium vivax*. **Trends Parasitol.** **18**: 287-289.

SNOUNOU, G. ; VIRIYAKOSOL, S. ZHU, X. P. ; JARRA, W. ; PINHEIRO, L. ; DO ROSÁRIO, V. E. ; THAITHONG, S. BROWN, K. N. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Mol. Biochem. Parasitol.** **61**: 315-320.

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

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

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

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

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

SOARES, I. S. & RODRIGUES, M. M. 2002. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1<sub>19</sub> expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*. **Parasitology** **124**: 237-246.

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

THOMAS, A. W. ; DEANS, J. A. ; MITCHELL, G. H. ; ALDERSON, T. ; COHEN, S. 1994. The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol.** **13**: 187-199.

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

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

WIPASA, J. ; ELLIOTT, S. ; XU, H. ; GOOD, M. F. 2002. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. **Immunol. Cell Biol.** **80**: 401-414.

YANG, C. ; COLLINS, W. E. ; SULLIVAN, J. S. ; KASLOW, D. C. ; XIAO, L. ; LAL, A. A. 1999. Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in *Saimiri* monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. **Infect. Immun.** **67**: 342-349.

## **VIII. Anexo**

---



## OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)  
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO