



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE
REGIÕES POLIMÓRFICAS E CONSERVADA DA
“PROTEÍNA 1” DE SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTO DE
PLASMODIUM VIVAX E CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA
IMUNE HUMORAL EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A MALÁRIA
NO AMAZONAS**

MARIA EDILENE MARTINS DE ALMEIDA

MANAUS - AMAZONAS
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA

MARIA EDILENE MARTINS DE ALMEIDA

PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE
REGIÕES POLIMÓRFICAS E CONSERVADA DA
“PROTEÍNA 1” DE SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTO DE
***PLASMODIUM VIVAX* E CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA**
IMUNE HUMORAL EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A MALÁRIA
NO AMAZONAS

Plano de Dissertação apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
Básica e Aplicada da Universidade Federal do
Amazonas como requisito para obtenção do
título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís André Morais Mariúba

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira

MANAUS - AMAZONAS
2013

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A447p Almeida, Maria Edilene Martins de
Produção de antígenos recombinantes de regiões polimórficas e conservada da "Proteína 1" de Superfície de Merozoíto de Plasmodium vivax e Caracterização da Resposta Imune Humoral em indivíduos expostos a Malária no Amazonas / Maria Edilene Martins de Almeida. 2013
147 f.: il. color; 29 cm.

Orientador: Luís André Morais Mariúba
Coorientador: Paulo Afonso Nogueira
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Malária. 2. Plasmodium vivax. 3. Resposta imune. 4. MSP-1. I. Mariúba, Luís André Morais II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

MARIA EDILENE MARTINS DE ALMEIDA

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE REGIÕES
POLIMÓRFICAS E CONSERVADA DA “PROTEÍNA 1” DE
SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTO DE *PLASMODIUM VIVAX* E
CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM
INDIVÍDUOS EXPOSTOS A MALÁRIA NO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada da
Universidade Federal do Amazonas como
parte do pré-requisito para obtenção do
título de Mestre em Imunologia na área de
concentração “*Imunologia Básica e
Aplicada*”.

APROVADA EM: / /

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Luís André Moraes Mariúba, Presidente
Instituto Leônidas Maria Deane - FIOCRUZ Amazônia**

**Prof. Dr. Antônio Luiz Boechat Lopes, Membro Interno
Universidade Federal do Amazonas, UFAM**

**Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa, Membro Externo
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP**

*Aos meus pais **Julia e Felipe**,
meus mestres e exemplo de vida...*

*Ao **Edemilson**, meu companheiro de todas as horas,
pela paciência, amor e compreensão...*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela grandeza, amor incondicional, carinho e força nos momentos difíceis...

Aos meus pais **Felipe Ferreira de Almeida** e **Maria Júlia Martins de Almeida**, pelo eterno orgulho de nossa caminhada, pelo apoio, compreensão, e, em especial, por todo carinho ao longo da minha vida.

À Minha **Família**, que nos momentos de minha ausência, entenderam que o futuro é construído a partir da constante dedicação no presente.

E em especial, ao meu esposo **Edmilson Silva** pelo amparo, compreensão, e por todo o carinho prestado a mim.

Ao **Dr. André Mariúba**, pela orientação, incentivo nos momentos difíceis e disponibilidade durante toda a execução deste trabalho. Muito obrigada.

Ao **Dr. Paulo Afonso**, pela oportunidade e confiança de trabalhar neste e em outros trabalhos.

Aos amigos do Mestrado em Imunologia - Turma 2010/2: **Andréa Tarragô, Helaine Virgolino, Allyson Guimarães, Luciana Sousa, Paula Taquita e Juliana Lameiras** pelo apoio incondicional. Obrigada pela cumplicidade, ajuda e amizade.

Aos colegas de Laboratório, **Leidiane, Yury, Maria Carolina, Karen, Andréia, Vani, Davi, Joyce, Jeniffer e Lorrane**, por compartilharem trabalhos, alegrias e aflições.

À professora **Dra. Aya Sadahiro** que com muita dedicação me orientou no estágio a docência.

À **Universidade Federal do Amazonas**, por proporcionar minha formação acadêmica.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada** e a todos os seus integrantes pela oportunidade de concretização deste trabalho.

Ao **Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/FIOCRUZ-AM** por propiciar a realização deste projeto de pesquisa.

À **Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)**, pelo apoio para realização de experimentos.

À **Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)**, por fornecer os soros.

À **Fundação de Apoio a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM)** e pelo apoio financeiro ao projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho.

Nem sempre são os corredores mais velozes que ganham as corridas; nem sempre são os soldados mais valentes que ganham as batalhas. Notei ainda que as pessoas mais sábias nem sempre têm o que comer e que as mais inteligentes nem sempre ficam ricas. Notei também que as pessoas mais capazes nem sempre alcançam altas posições. Tudo depende da sorte e da ocasião. (Eclesiastes: 9.11).

RESUMO

Introdução: A malária é um problema de saúde pública amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais no mundo. No Brasil, a doença ainda apresenta elevados números de casos, no qual o *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) é responsável pela maior parte de diagnóstico. Nos últimos anos, esses casos vêm se apresentando de forma complicada, tornando-se este um motivo de preocupação, pois esta espécie apresenta ampla distribuição geográfica, dessa maneira torna-se necessário o controle da infecção. Uma das alternativas para controle da infecção seria o desenvolvimento de uma vacina. No entanto, um dos grandes problemas para seu desenvolvimento é a incompreensão das respostas imunológicas contra os antígenos candidatos. Dentre os antígenos candidatos, a “proteína 1” de superfície do merozoíto (MSP-1) de *Plasmodium* tem se destacado, pois estudos demonstram que anticorpos contra as diferentes regiões de MSP-1 conferem proteção clínica em indivíduos que residem em áreas endêmicas. O objetivo desta trabalho foi caracterizar a resposta imune humoral contra antígenos recombinantes de regiões variáveis e conservada da PvMSP-1 em indivíduos que residem em áreas endêmicas no estado do Amazonas. **Material e métodos:** Para tanto, foram produzidas três proteínas recombinantes, duas correspondente a região variável (bloco 2) e uma da conservada (bloco do ICB1) da PvMSP-1 (utilizando sequencias identificadas em trabalhadores anteriores, e selecionadas por bioinformática como os epítomos de células B). Tais proteínas foram expressas e purificadas utilizando genes sintéticos otimizados para expressão em *Escherichia coli*. A reatividade de soros de pacientes sintomáticos e assintomáticos contra estas proteínas, juntamente com a proteína ICB2-5 de PvMSP-1 (obtida em trabalhos anteriores), foi avaliada por ELISA indireto. **Resultados e Conclusão:** A expressão e purificação das proteínas recombinantes foram realizadas com êxito. A análise sorológica contra os antígenos recombinantes demonstrou maior nível de anticorpos contra a proteína ICB2-5 para ambas as aéreas (Rio Pardo e Manaus). Em relação à resposta de anticorpos IgG contra às três proteínas (P1, P2 e P3), foi observado que a proteína P2 foi a mais reconhecida nos soros de pacientes sintomáticos de Manaus e Rio Pardo, enquanto que a P3 foi a mais reconhecida nos assintomáticos. Em análise a resposta de subclasses observou-se que o IgG3 foi o mais prevalente contra ICB2-5. Em relação às três proteínas o nível de reatividade foi baixo para as subclasses, porém quando as frequências de soros respondedores IgG3 e IgG2 foram reunidas *in silico*(ICB2-5+P1+P2+P3). Estas superaram os resultados nos níveis de reconhecimento da ICB2-5 sozinha, sugerindo que o desenvolvimento de um repertório de proteínas recombinantes correspondentes ao Bloco 2 é capaz de expandir o espectro de soros reagentes.

Palavras-chave: Malária; *Plasmodium vivax*; Resposta imune; MSP-1.

ABSTRACT

Introduction: Malaria is a public health issue distributed in tropical and subtropical regions worldwide. In Brazil, the disease still has a high number of cases in which *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) is responsible for most of diagnosis. Lately, these cases have been performing so complicated that becomes a matter of concern because the species has a wide geographic distribution, and there is a need to control the infection. One alternative for infection control would be the development of a vaccine. However, a major problem for its development is the lack of understanding of the immune response against the antigen candidates. Among the candidate antigens, the Protein 1 Merozoite Surface (MSP-1) of *Plasmodium* has excelled, because studies show that antibodies against different regions of MSP-1 confer clinical protection in individuals living in endemic areas. The aim of this study was to characterize the humoral immune response against the recombinant antigen of conserved and variable regions of PvMSP-1 in individuals living in endemic areas in the state of Amazonas. **Methods:** For this purpose, we produced three recombinant proteins, two corresponding to the variable region (block 2) and the conserved (block ICB1) of PvMSP-1 (using sequences identified by previous workers, and selected by bioinformatics as epitopes B cell). The proteins were expressed and purified using synthetic genes optimized for expression in *Escherichia coli*. The serum reactivity from symptomatic and asymptomatic patients against the proteins was evaluated by ELISA, along with protein ICB2 PvMSP-5-1 (obtained in previous work. **Results and Conclusion:** The expression and purification of recombinant proteins were performed successfully. The serological analysis against recombinant antigens showed a higher level of antibodies against the protein ICB2-5 for both groups (Rio Pardo and Manaus). Regarding IgG antibody response against the three proteins (P1, P2 and P3), it was observed that the P2 protein was recognized in the serum of most patients symptomatic of Manaus and Rio Pardo, whereas P3 has been the most recognized in asymptomatic. The subclasses analysis showed that the IgG3 was the most prevalent against ICB2-5. The level of reactivity was low to subclasses for all proteins, but when the frequencies of serum IgG2 and IgG3 responders were assembled in silico (ICB2-5 + P1 + P2 + P3). These results recognition level overcame ICB2-5 alone, suggesting that the development of the repertoire of recombinant proteins corresponding to block 2 is capable to expand the spectrum of reactive serum.

Keywords: malaria, *Plasmodium vivax*, immune response; MSP-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Distribuição das áreas de risco para a malária de acordo com IPA	17
Figura 02: Distribuição para a malária segundo IPA, por o município do Amazonas	18
Figura 03: Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	21
Figura 04: Resposta imune ao <i>Plasmodium</i> no fígado.....	24
Figura 05: Resposta imune ao <i>Plasmodium</i> no estágio sanguíneo.....	27
Figura 06: Etapas do processamento de clivagem da MSP1	29
Figura 07: Esquema mostrando a divisão da PvMSP-1 em blocos conservados.....	31
Figura 08: Esquema mostrando a divisão da PvMSP-1 em 13 blocos.....	31
Figura 09: Regiões variáveis do bloco 2 de PvMSP-1 identificadas no Amazonas..	33
Figura 10: Esquema da construção do gene sintético.....	40
Figura 11: Esquema mostrando a construção do gene sintético pela IDT no plasmídeo.....	41
Figura 12: Mapa do plasmídeo de expressão pRSET	44
Figura 13: Digestão do plasmídeo de clonagem pSMART	51
Figura 14: Confirmação da correta inserção dos fragmentos da sequencia gênica codificantes	52
Figura 15: Resultado do sequenciamento das proteínas no vetor de expressão	54
Figura 16: SDS-PAGE demonstrando a purificação das proteínas recombinantes..	55
Figura 17: Frequência dos anticorpos IgG contra os antígenos recombinantes do bloco 2.....	57
Figura 18: Soro de indivíduos assintomáticos e porcentagem de respondedores ...	58
Figura 19: Porcentagem de respondedores assintomáticos as subclasses	60
Figura 20: Reatividade individual das proteínas.....	62
Figura 21: Comparação dos soros que reagiram individualmente para cada subclasse	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Características das proteínas (P1, P2, e P3).....	42
Quadro 2: Cepas bacterianas e plasmídeos utilizados	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Correlação do soro dos sintomáticos de Rio Pardo	57
Tabela 02: Análise de correlação de <i>Spearman</i> entre soros assintomáticos.....	59
Tabela 03: Análise de correlação de <i>Spearman</i> entre soros sintomáticos semi- imunes.....	60
Tabela 04: Análise da correlação de <i>Spearman</i> entre os soros sintomáticos em ambas as áreas que reagiram para as subclasses contra as proteínas.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

C-terminal	Carboxi-terminal
D.O.	Densidade Ótica
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
GPI	Glicosil-fosfatidil inositol
GST	Glutathione S Transferase
IPTG	Isopropílico β -D-1-thiogalactopyranoside
MS	Ministério da Saúde
MSP	Proteína de Superfície de Merozoíto
N-terminal	Amino terminal
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPS	Organização Pan-americana da Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PvMSP-1	Proteína 1 de Superfície de Merozoíto de <i>Plasmodium vivax</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TBE	Tampão Tris Acido Bórico-EDTA
WHO	<i>World Health Organization</i>
IUPs	<i>Intrinsically Unstructured Proteins</i>

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1 Aspectos epidemiológicos da malária no mundo	15
1.2 <i>Plasmodium sp.</i>.....	18
1.3 Ciclo de vida do parasita no hospedeiro vertebrado	18
1.4 Infecções causadas por <i>Plasmodium vivax</i>	21
1.5 Resposta imune contra <i>Plasmodium</i>	23
1.6 Resposta imune no estágio pré-eritrocítico	23
1.7 Resposta imune no estágio eritrocítico	25
1.8 Proteína 1 de Superfície do Merozoíto (MSP-1)	29
1.9 Retrospectiva de trabalhos anteriores	32
2. OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo Geral.....	36
2.2 Objetivos Específicos	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Modelo de estudo.....	37
3.2 População de estudo	37
3.3 Conservação das amostras.....	38
3.4 Aspectos éticos.....	38
3.5 Produção das proteínas recombinantes	38
3.5.1 Desenho do gene sintético para produção das proteínas recombinantes do bloco 2 de PvMSP-1	40
3.6 Digestão do vetor de clonagem com enzimas de restrição	43
3.7 Subclonagem em vetor de expressão pRSET	43
3.7.1 Preparação de célula competente para inserção do plasmídeo recombinante	44
3.7.2 Crescimento e seleção das colônias.....	45
3.7.3 Extração plasmidial e digestão para confirmação da orientação do inserto	45
3.7.4 Sequenciamento	46
3.7.5 Transformação de células eletrocompetentes	46

3.8 Cultivo e indução das proteínas do bloco 2 de MSP-1 recombinante.....	46
3.9 Análise da expressão das proteínas	47
3.10 Purificação das proteínas recombinantes	47
3.11 Liofilização das proteínas	48
3.12 Imunoblotting	48
3.13 Ensaio por ELISA indireto	49
3.14 Análise dos dados.....	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1 Expressão das proteínas recombinantes	51
4.2 Análise do sequenciamento	53
4.3 Produção dos antígenos recombinantes His-PvMSP-1	55
4.4 Resposta humoral aos antígenos recombinantes.....	56
4.5 Resposta humoral aos soros de indivíduos assintomáticos aos antígenos recombinantes.....	58
4.6 Resposta humoral contra domínios variáveis e conservados do bloco 2.....	59
5. DISCUSSÃO	63
CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	88
Anexo 01 - Aprovação do Comitê de Ética UFAM	88
Anexo 02 - Alinhamento	89
Anexo 03 – Análise IUPrep	90
Anexo 04 – Artigo de Revisão.....	94
Anexo 05 – Artigo Original	112

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Aspectos epidemiológicos da Malária no Mundo

Malária é uma doença infecciosa, febril, aguda, sistêmica e não contagiosa, cujos agentes etiológicos são protozoários do gênero *Plasmodium sp.* (OPAS, 2009). A doença representa um sério problema de saúde pública, por apresentar altas taxas de incidência de morbidade e mortalidade nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (GREENWOOD *et al.*, 2008; OMS, 2009).

Embora a interação entre parasitos do gênero *Plasmodium sp* e o homem seja conhecida há muito tempo, as estratégias de controle desenvolvidas para minimizar os efeitos da infecção por esses parasitos ainda não foram capazes de eliminar a malária por completo (MILLER *et al.*, 2002).

E ainda que se tenha observado nos últimos anos um declínio dos números de casos de malária, a mortalidade continua elevada para uma doença que pode ser evitada e tratada. Mundialmente cerca de 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco para malária, sendo 106 países considerados endêmicos (OMS, 2011).

No geral, observa-se que os países subdesenvolvidos são os que apresentam maior incidência para malária, pois são regiões com condições socioeconômicas e ambientais, que favorecem a proliferação do parasita no mosquito transmissor e dificultam para controle da doença (OMS, 2010).

Em 2010, foi notificado 216 milhões de casos da doença, ocasionando a morte de quase um milhão de pessoas, principalmente de crianças menores de 5 anos de idade na região Africana, sendo a grande maioria dos casos registrados nesta área (81%), seguido pelo Sudeste da Ásia (13%) e Leste do Mediterrâneo (5%) (OMS, 2011).

Nas Américas a transmissão da malária ocorre em 21 países, do qual foram confirmados cerca de 675 mil casos em 19 países no ano de 2010, sendo que a maioria desses casos foram reportados no Brasil e na Colômbia (OMS, 2011).

No Brasil, a transmissão da malária é causada por três espécies de *Plasmodium sp*: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae*, no qual o primeiro é responsável pelo maior número de casos registrados, com uma estimativa de 90% (BRASIL, 2011a).

Em 2011, foram registrados aproximadamente 265.919 mil casos, havendo uma diminuição em relação ao ano anterior. No entanto, o quadro epidemiológico

desta patologia ainda é preocupante, principalmente na região da Amazônia Legal (considerada uma área endêmica a qual compreende os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão), onde 263.23 mil casos foram notificados.

Os estados do Amazonas, Pará e Rondônia foram os estados que registraram o maior número de diagnósticos com aproximadamente 203.111 mil (BRASIL, 2012). Isto, geralmente, se deve ao fato dessas regiões apresentarem características geográficas e ecológicas altamente favoráveis à interação do parasito (plasmódio) e do mosquito vetor (anofelino) (BRASIL, 2006), além de condições ambientais e socioculturais que favorecem a transmissão da patologia e prejudicam a utilização de procedimentos de controle padrão (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

A ocorrência da malária em determinada área de acordo com o perfil epidemiológico de transmissão, pode ser classificada em área hiperendêmica, mesoendêmica ou hipoendêmica. Também existem as áreas holoendêmicas, em que a transmissão é perene e o grau de imunidade da população é alto, dessa forma permitindo a existência de portadores assintomáticos (BRASIL, 2009). Embora o Brasil seja considerado uma área de risco para transmissão da malária, a distribuição geográfica da doença não apresenta igual intensidade para todas as áreas endêmicas, ou seja, não é uniforme, estando intrinsecamente vinculada à dispersão dos vetores e a mobilidade humana (SARAIVA *et al.*, 2009).

As áreas de risco de transmissão para malária no Brasil nas regiões são determinadas pelo número anual de casos por 1.000 habitantes (IPA – Índice Parasitário Anual). As áreas podem ser classificadas: sendo de alto risco (IPA maior que 49.9 casos/ 1.000 Hab), médio risco (entre 10 e 49.9 casos /1.000 Hab) e baixa (de 0,1 a 9,9 casos/ 1000 Hab.) (BRASIL, 2006). Na Figura 01, é possível observar a distribuição das áreas de risco no Brasil e sua transmissão no ano de 2010.

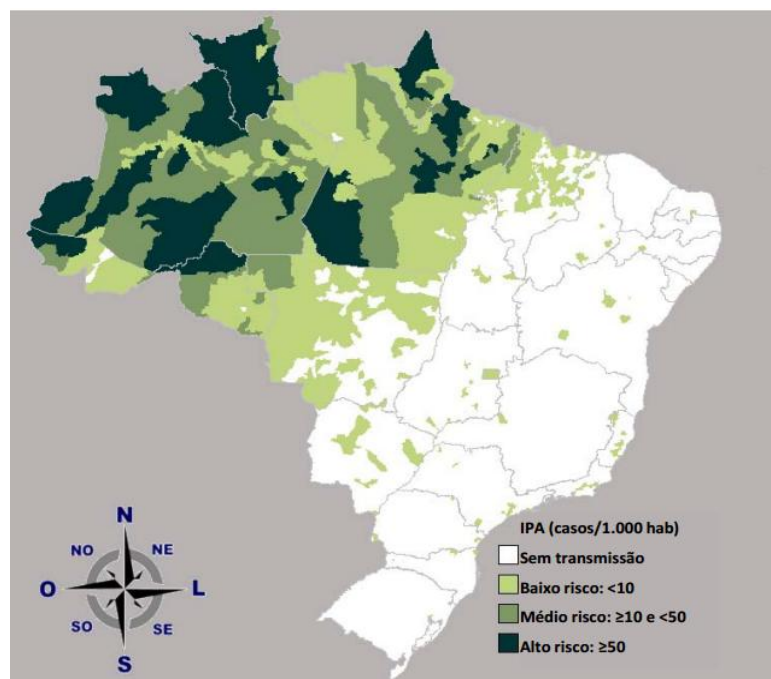


Figura 01: Distribuição das áreas de risco para malária de acordo com IPA.

Fonte: BRASIL, 2011a.

O estado do Amazonas é o segundo maior com concentração de casos de malária do país. Uma estimativa realizada pelo Ministério da Saúde em 2011 foi notificada 59.279 mil casos, ainda que se tenha observado um declínio de 20% do número de casos comparado com o ano de 2010 (BRASIL, 2012).

Em 2010, 15 municípios do Estado do Amazonas registraram o maior número de casos, dentre eles; Manaus, São Gabriel da Cachoeira, Eirunepé, Atalaia do Norte, Coari, Barcelos, Tabatinga, Manicoré, Tefé, Lábrea, Borba, Tapauá, Rio Preto da Eva, Itacoatiara e Guajará (Figura 2). Estes contribuíram com quase 80% dos casos de Malária na área da Amazônia Legal (BRASIL, 2011b).

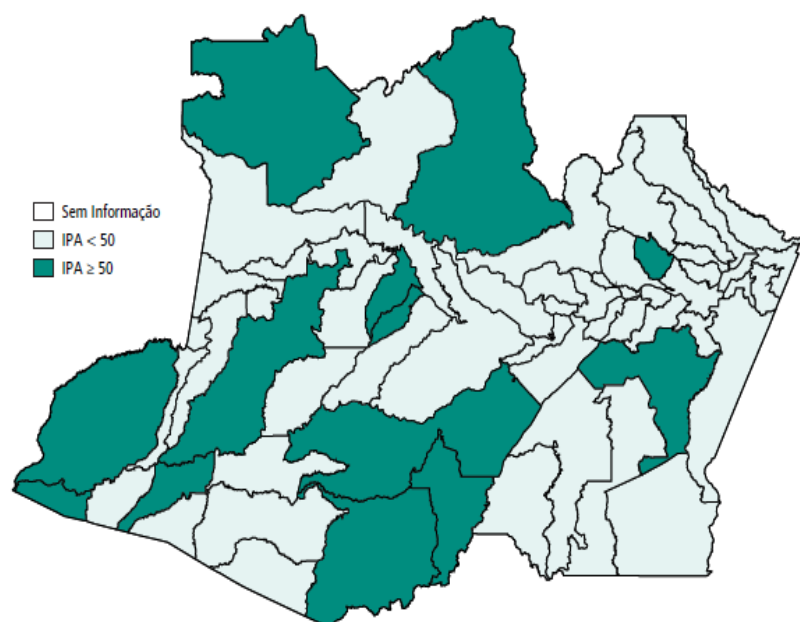


Figura 2: Distribuição da malária segundo IPA, por município do Amazonas.

Fonte: BRASIL, 2011b.

1.2. *Plasmodium* sp.

Os parasitos da malária são classificados como protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexo, classe Sporozoe, subclasse Coccidia, ordem Eucocidiida, subordem Haemosporina, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*. Este é transmitido ao homem através da picada da fêmea dos mosquitos pertencente ao gênero *Anopheles*, durante a realização do repasto sanguíneo (OMS, 2010).

Cinco espécies de *Plasmodium* podem causar a doença no homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* (encontrado principalmente no continente africano) (MACHADO *et al.*, 2010), e *Plasmodium knowlesi*. Este último considerado a algum tempo de caráter zoonótico, vem apresentando relatos de casos nos últimos anos de infecção em humanos dessa espécie no continente asiático (COX-SINGH, 2008; LEE *et al.*, 2009).

1.3. Ciclo de Vida do Parasito no Hospedeiro Vertebrado

A fase de desenvolvimento e transmissão dos plasmódios que transmitem a malária se dá por um complexo ciclo de vida, envolvendo um hospedeiro vertebrado (humano ou outro animal), e um vetor invertebrado (mosquito do gênero *Anopheles*). Na etapa em que envolve um hospedeiro vertebrado ocorrem em duas fases

assexuadas do ciclo, a esquizogonia hepatocítica e eritrocítica, enquanto que no vetor acontece a fase sexuada ou esporogônica é exógena e caracterizada pela multiplicação dos protozoários no hospedeiro invertebrado (SOUZA *et al.*, 2002) (Figura 3).

O ciclo parasitário no hospedeiro humano dar-se início, quando a fêmea do mosquito inocula na corrente sanguínea a forma infectante do parasita denominado esporozoítos, dando início ao estágio pré-eritrocítico. Durante os minutos seguintes, alguns dos esporozoítos deixam o local no qual foram injetados e entre os vasos sanguíneos são carregados rapidamente para o fígado, enquanto que outros permanecer na pele ou migram para os gânglios linfáticos regionais ou o baço (MOTA *et al.*, 2001).

Ao chegar ao fígado os esporozoítos atravessam o endotélio e invadem os hepatócitos. Nestes, o desenvolvimento do parasito nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para as espécies, *Plasmodium falciparum* ou *Plasmodium vivax* e cerca de duas semanas para o *Plasmodium malariae*. Logo, os parasitas se multiplicam por reprodução assexuada (esquizogonia), originando milhares de merozoítos.

Nas infecções por *P. vivax* ou *P. ovale*, alguns parasitas se desenvolvem lentamente, no qual ficam em estado de latência no fígado, e são por isso, denominados hipnozoítos (do grego *hipnos*, sono). Estes podem ser ativados meses após a infecção e retornar ao ciclo hepático, ocasionando as recaídas da doença (BRASIL, 2010).

Após o período de incubação na célula hepática estes merozoítos são liberados na circulação para invadirem os eritrócitos. Neste momento dar-se o início a segunda fase de reprodução assexuada dos plasmódios, denominada de ciclo sanguíneo ou eritrocítico (REY *et al.*, 2002).

Após a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea, alguns são fagocitados pelas células de Kupffer e os outros vão invadir os eritrócitos (hemácias) (BRASIL, 2006). O que não se sabe ainda, é como as moléculas de superfície de merozoítos reconhecem a superfície dos eritrócitos e em seguida, sinalizam para o início do processo de invasão. Os eventos de invasão incluem a liberação de moléculas essenciais para organelas apicais, que irão iniciar a junção de actina e miosina em movimento que leva o parasita para interior do vacúolo que se forma na hemácia (MILLER *et al.*, 2002).

O merozoíto então se liga ao eritrócito através de moléculas de adesão da membrana de superfície e do complexo apical. Algumas proteínas estão envolvidas neste processo, como a proteína 1 de superfície de merozoíto (MSP1), que se liga de forma específica à superfície do eritrócito. Ao entrar neste, o merozoíto libera na membrana de superfície no meio extracelular seus complexos de membranas internas e microtúbulos subpeliculares são degradados, tornando-se trofozoítos (CIMERMAN *et al.*, 1999).

Estes trofozoítos sofrem processo de desenvolvimento e multiplicação originando anel, trofozoítos jovens, maduros e esquizontes, que irão romper a membrana do eritrócito liberando outros milhares de merozoítos na circulação. Assim, o ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes, sendo responsável pelos sintomas da doença.

Os ciclos eritrocitários repetem-se a cada 48 horas nas infecções por *Plasmodium vivax* ou *Plasmodium falciparum* e a cada 72 horas nas infecções por *Plasmodium malariae*. Dependendo da espécie de *Plasmodium*, os sintomas podem se manifestar de maneira não complicada podendo evoluir para uma forma complicada. Segundo o Ministério da Saúde os sintomas usuais se caracterizam por febre, calafrio e dor de cabeça, mal-estar, dor muscular, sudorese, náusea e tontura – podendo se manifestar isoladamente ou em conjunto (BRASIL, 2010).

Nas infecções por *P. malariae* e *P. ovale* e *P. vivax* predomina a forma não complicada (apesar de relatos recentes indicarem que infecções por *Plasmodium vivax* também podem se manifestar de forma complicada como casos de anemia grave dentre outros sintomas (DOUGLAS *et al.*, 2012). Infecções por *Plasmodium falciparum*, entretanto, podem apresentar manifestações graves, tais como malária cerebral, anemia grave, acidose metabólica dentre outros (MILLER *et al.*, 2002).

Depois de algumas gerações de merozoítos nas hemácias, alguns se diferenciam em formas sexuadas do parasito, denominados de gametócitos. Na realização do repasto sanguíneo o mosquito fêmea do *Anopheles*, pode ingerir hemácias contendo gametócitos que se diferenciaram em gametas masculinos (microgametas) e feminino (macrogametas), assim ocorrendo a fertilização no lúmen do estômago do mosquito com a formação do zigoto e posteriormente do oocineto.

Os oocinetos sofrem o processo de esporogonia e formam os oocistos, que passam por um processo complexo de desenvolvimento para a produção de milhares de esporozoítos que migraram para as glândulas salivares dos mosquitos.

Ao realizar os próximos repastos sanguíneos, a fêmea irá infectar outro hospedeiro vertebrado e desta maneira iniciará um novo ciclo (BRASIL, 2009).

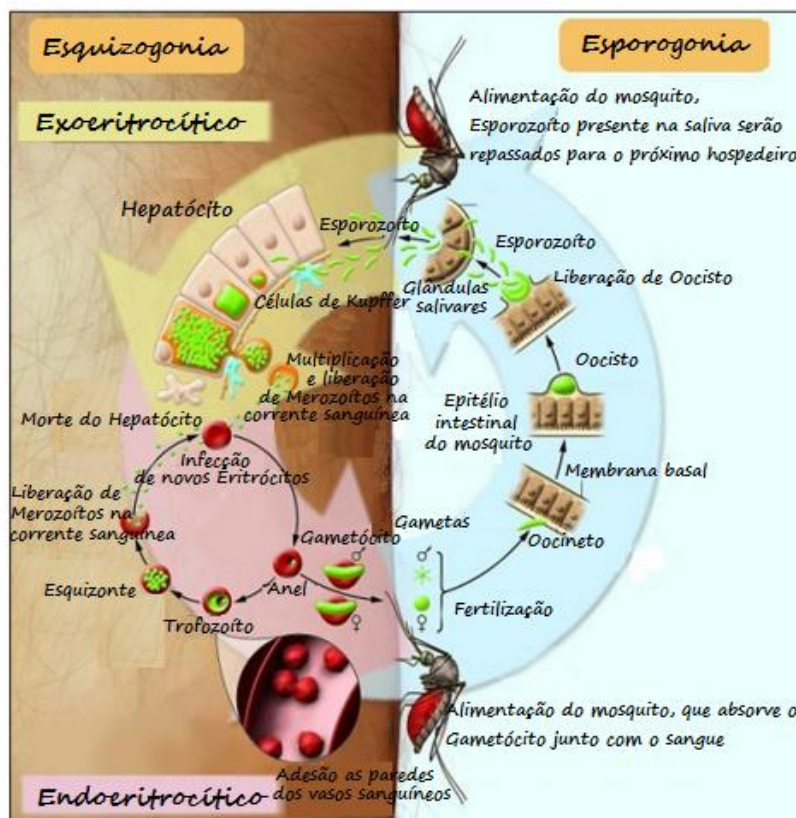


Figura 3: Ciclo de vida do *Plasmodium*

Fonte: adaptada de JA KIEWICZ et al., 2010

1.4. Infecções causadas por *Plasmodium vivax*

Entre as cinco espécies de plasmódios que infecta o homem, o *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* são as espécies mais comuns de infecções, sendo que o maior impacto sobre a saúde humana em termos de mortalidade é do *P. falciparum*, devido este parasita apresentar um processo de infecção potencialmente fatal e um perfil de resistência aos agentes quimioterápicos (MENDIS et al., 2001).

No entanto, *Plasmodium vivax* também constitui um importante problema sobre a saúde pública, pois apresenta uma ampla distribuição geográfica, decorrente de sua diversidade fenotípica, ocorrendo na maior parte das latitudes tropicais e subtropicais (BOUTIN et al., 2005). Embora menos fatal, essa infecção provoca uma doença altamente debilitante com múltiplos episódios e recaídas (DOOLAN et al., 2009; GUERRA et al., 2010).

Nos últimos anos no Brasil, tem se observado um padrão incomum de complicações clínicas associadas a infecção por *Plasmodium vivax*, com um crescente aumento do número de pacientes que necessitaram de internação hospitalar (SANTOS-CIMINERA *et al.*, 2007; ALEXANDRE *et al.*, 2010).

Tais manifestações graves causadas por *P. vivax*, foram relatadas em estudos de diferentes lugares do mundo e incluem: malária cerebral, síndrome respiratória aguda, lesão pulmonar, insuficiência renal, disfunção hepática, icterícia e anemia grave, dentre outras, podendo levar a morte desses pacientes. Tais complicações clínicas são semelhantes as que são causadas por *Plasmodium falciparum*, sugerindo desta maneira que o *P. vivax* seja capaz de provocar malária grave (BARCUS *et al.*, 2007; KOCHAR *et al.*, 2009; DOUGLAS *et al.*, 2012).

Outro agravante se deve ao fato do *Plasmodium vivax* apresentar algumas particularidades em seu ciclo de vida que o diferenciam do *Plasmodium falciparum* e que dificultam a interrupção de sua transmissão, como: este poder permanecer no fígado na forma de hipnozoíto, podendo iniciar a infecção no estágio sanguíneo, após meses da infecção inicial pelo esporozoíto; *P. vivax* inicia o seu desenvolvimento em gametócitos nas primeiras fases do ciclo eritrocítico logo após a liberação do merozoíto pelo fígado, enquanto o *P. falciparum* apresenta o desenvolvimento mais tardio. Assim, a transmissão do *P. vivax* ocorre mais cedo, iniciando antes do estado sintomático da doença (SINNIS & KIM LEE SIM, 1997).

Fica claro, então, que infecções causadas por *P. vivax* são um motivo de preocupação para saúde pública nacional, visto sua prevalência no Brasil. Nesse sentido, se faz necessário o desenvolvimento de novos métodos e estratégias de intervenção para bloquear a sua transmissão. Por isso nos últimos anos têm sido observados avanços significativos em relação a uma melhor compreensão da espécie de *P. vivax*. Por meio dos estudos imunoepidemiológicos, uma série de genes que codificam antígenos imunologicamente importantes no estágio sanguíneo, foram isolados, clonados e sequenciados permitindo a geração de diferentes proteínas recombinantes.

Dentre os principais antígenos do estágio sanguíneo avaliados, a proteína 1 de superfície do merozoíto tem sido extensivamente estudada por diferentes grupos (SOARES *et al.*, 1999; O'DONNELL *et al.*, 2001; NOGUEIRA *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2007; FERNANDEZ-BECERRA *et al.*, 2010; STORTI-MELO *et al.*, 2011), com a finalidade de fornecer informações para compreensão dos mecanismos envolvidos

na aquisição imunidade, capaz de conferir algum grau de proteção e, consequentemente, subsídios para o desenvolvimento de uma vacina eficaz.

1.5. Resposta imune contra *Plasmodium*

As dificuldades em desvendar os mecanismos imunes relacionados ao desenvolvimento e aquisição da imunidade adquirida contra a malária se deve ao fato dos parasitos apresentarem um ciclo de vida complexo (DAVID *et al.*, 1988) com diferentes formas, diversidade genética e variação antigênica do parasita (COELHO-CASTELO *et al.*, 2009). Esses mecanismos permitem que o parasita se mantenha vivo dentro do hospedeiro sem que uma resposta imune eficaz seja estabelecida (FERREIRA *et al.*, 2004).

Por convenção, as respostas imunes a malária foram divididas em resposta na fase pré-eritrocítica, a qual envolve esporozoítos e esquizontes teciduais, e resposta imune no estágio sanguíneo (dirigido contra merozoítos e parasitas intraeritrocíticos).

1.6. Resposta imune no estágio pré-eritrocítico

A imunidade pré-eritrocítica é principalmente composta da resposta celular direcionada aos hepatócitos infectados que impedem o desenvolvimento dos parasitas intracelulares, através da indução de intermediários de reativos de nitrogênio (NOS) (McCALL, 2010).

No início da infecção da malária, os esporozoítos são reconhecidos pelas células dendríticas imaturas (iDC) e são drenados para os linfonodos. (GOOD & DOOLAN, 2010). As células dendríticas maduras reconhecem os antígenos dos esporozoítos, tal como a da proteína circunsporozoíto CS. (BONGFEN *et al.*, 2007). O antígeno é processado dentro do endossoma e transportado para a superfície da célula (SCHWENK & RICHIE, 2011). Logo depois esse antígeno pode ser apresentado a linfócitos T helper *naive*, através da ligação do antígeno leucocitário de classe II (HLA II) e moléculas co-estimulatórias.

Simultaneamente, as células dendríticas mielóides produzem IL-12, modulando uma resposta imune celular para T_H1. Estas, por sua vez secretam IL-2 e IFN- γ , os quais induzem a ativação e proliferação de linfócitos T citotóxicos (CTLs) específicos ao parasita (RILEY *et al.*, 2006).

Os esporozoítos que migraram através das células de Kupffer (KC) para o fígado, irão invadir vários hepatócitos. Os CTLs ativados entram na circulação e migram para o fígado. Neste, os CTLs reconhecem o antígeno do parasita na superfície do hepatócito infectado, através do HLA de classe I e induzem a produção de perforinas, granzimas e IFN- γ para destruir as células infectadas (GOOD & DOOLAN, 2010).

Os linfócitos TCD8⁺ são considerados importantes efetores na infecção a malária na fase pré-eritrocítica. Uma vez que essas células ativadas exibem ação citotóxica agindo na destruição de células hepáticas infectadas (GOOD *et al.*, 2005).

A destruição de hepatócitos infectados também pode ser efetuada pelas células natural killer (NK), (NKT), células T $\gamma\delta$ e células de Kupffer que irão produzir TNF- α , e, por conseguinte, induzirão a síntese de NOS (SCHWENK & RICHIE, 2011). As citocinas presentes no fígado também podem promover a ativação de células T reguladoras (T_{reg}), e estas podem secretar IL-10 para suprimir a ativação de células T efectoras (SCHWENK & RICHIE, 2011). O mecanismo da resposta imune no fígado pode ser observado na figura 4.

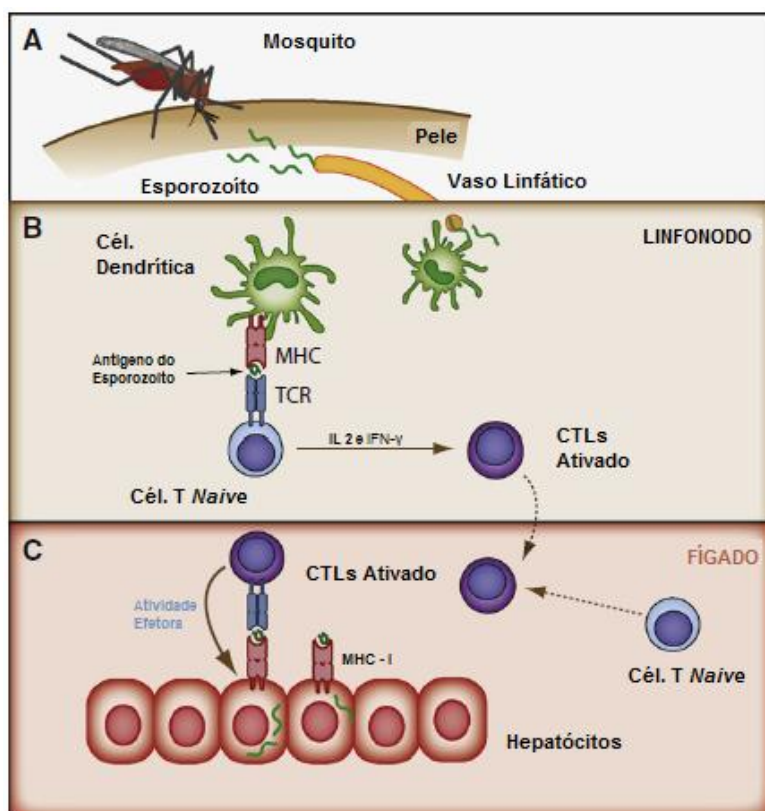


Figura 04: Resposta imune ao *Plasmodium* no fígado

Fonte: Adaptada de GOOD & DOOLAN, 2010.

1.7. Resposta imune no estagio eritrocítico

O estágio eritrocítico da infecção por malária inicia após a ruptura dos hepatócitos infectados, liberando milhares de merozoítos na circulação. Os potenciais alvos para uma resposta imune são os parasitas intra-eritrocítico e merozoítos livres (LANGHORNE *et al.*, 2008).

De um modo geral o que se observa é que a imunidade à infecção do *Plasmodium sp.* no estágio sanguíneo é dependente de IFN- γ e requer um gerenciamento do sistema imune inato e adaptativo, envolvendo células dendríticas, células NK, linfócitos T helper CD4⁺ e linfócitos B (McCALL, 2010).

O eritrócito infectado ou produtos do parasita podem interagir com vários receptores de superfície celular, como por exemplo o CD36 e receptores *Toll-like* (TLRs). O receptor CD36 está presente em Células Dendríticas (DCs) e macrófagos, podendo ser reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro através da proteína (PfEMP1) que é expressa na superfície de eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* (COBAN *et al.*, 2007). Alguns dos bioprodutos resultantes do metabolismo do parasita, como o pigmento malárico denominado hemozoína, e outras presentes na superfície de células infectadas como a âncora Glicosilfosfatidilinositol (GPI) (PERKINS *et al.*, 2011), podem ativar a expressão de citocinas, através dos receptores TLRs, tais como (TLR9), (TLR2) e (TLR4) (AUGUSTINE *et al.*, 2009).

A hemozoína é caracterizada como um cristal insolúvel formado no vacúolo alimentar de parasitas da malária, como resultado da polimerização da porção heme da hemoglobina. Um estudo realizado por Parroche e colaboradores (2007) mostrou que a hemozoína pode contribuir com a resposta imune inata nas infecções por malária, visto que se liga ao DNA do parasita e ativa as DCs por meio de TLR9 para produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a hemozoína pode induzir a liberação de TNF- α pelos macrófagos (COBAN *et al.*, 2005).

A âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) do *Plasmodium sp.* é uma molécula que está ligada na membrana do parasita e em algumas estruturas, tais como merozoíto e vacúolo alimentar. A GPI de *Plasmodium falciparum* parece ser um fator importante na indução das respostas pró-inflamatória, por meio da interação específica com receptor TLR-2, sendo responsável pela produção de NO em células endoteliais, que conduz a apoptose. Além disso, a ligação de GPI com TLR-2 é estimulada pela via MyD88 que é essencial para a produção de IL-12, uma vez que

essa citocina está associada com a gravidade da doença (RAZAKANDRAINIBE *et al.*, 2012).

Foram observados em estudos experimentais em ratos e humanos que a GPI presente em muitas proteínas de superfície de plasmódios pode ativar as (DCs), macrófagos e células B através do complexo TLR2-TLR-1 e, em menor grau, por meio de TLR-4 (KRISHNEGOWDA *et al.*, 2005; LANGHORNE *et al.*, 2008).

A febre na malária é uma das características, que ocorrem quando os eritrócitos infectados se rompem e liberam moléculas derivadas do parasita que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias pelo hospedeiro (Ferreira, 2004). As citocinas envolvidas no estagio eritrocítico da doença são originadas principalmente da ativação de células $CD4^+$ e tem por finalidade controlar a infecção ou reprimir seus efeitos patológicos. Por isso, o hospedeiro produz níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como $TNF-\alpha$, IL-1, IL-6, IL-12 e $IFN-\gamma$ e antiinflamatórias tais como IL-10 e $TGF-\beta$ (RILEY *et al.*, 2006).

Segundo McCALL (2010), o $IFN-\gamma$ exerce várias funções na malária, funcionando igualmente como um indutor e um efetor nas respostas inata e adaptativa durante todo o ciclo de vida do parasita. Em conjunto com $TNF-\alpha$, atuam na ativação de macrófagos a fagocitarem eritrócitos parasitados e merozoítos livres, além de induzir a liberação de óxido nítrico, que pode estar envolvido na regulação da resposta imune à malária e não diretamente na eliminação do parasita. (OMER *et al.*, 2003; STEVENSON & RILEY, 2004).

Um dos principais produtores de $IFN-\gamma$ no sangue periférico são as células NK quando expostas a eritrócitos infectados na presença de IL-12. Outro papel importante das células NK na infecção da malária é sustentado pela descoberta de que estas células destroem eritrócitos infectados por *P. falciparum* por meio de contato direto (ARTAVANIS-TSAKONAS & RILEY, 2002).

O $IFN-\gamma$ produzido por NK induz a diferenciação de linfócitos T_H1 , além de induzir a maturação de células dendríticas e facilitando a expansão clonal de células T $CD4^+$ naive frente ao antígeno específico que foi reconhecido. Por sua vez, a célula T $CD4^+$ perfil T_H1 produz IL-2, que ativa mais células NK a secretarem $IFN-\gamma$, o qual induz a maturação das células dendríticas e ativação de macrófagos, consequentemente potencializando a resposta imune adaptativa (GOOD & DOOLAN, 2010; STEVENSON & RILEY, 2004). Todo esse mecanismo do sistema

imune (Figura 05), diante da infecção parece ser essencial para frear a multiplicação do parasita (STEVENSON *et al.*, 2011).

Enquanto que estas citocinas relacionadas desempenham um papel importante para a proteção contra a malária, algumas citocinas pró-inflamatórias quando produzidas em excesso dificultam a eliminação dos parasitas, podendo causar uma patologia grave que leva a morte do indivíduo. Por isso, a regulação da resposta imune na malária é tão importante como a sua indução para determinação do resultado final da infecção (RILEY, 2006). Citocinas como TGF- β e a IL-10 podem atuar como inibidores dos efeitos patológicos da infecção associados a quadros graves da doença, como a malaria cerebral e anemia grave (OMER *et al.*, 2003; YAZDANI *et al.*, 2006).

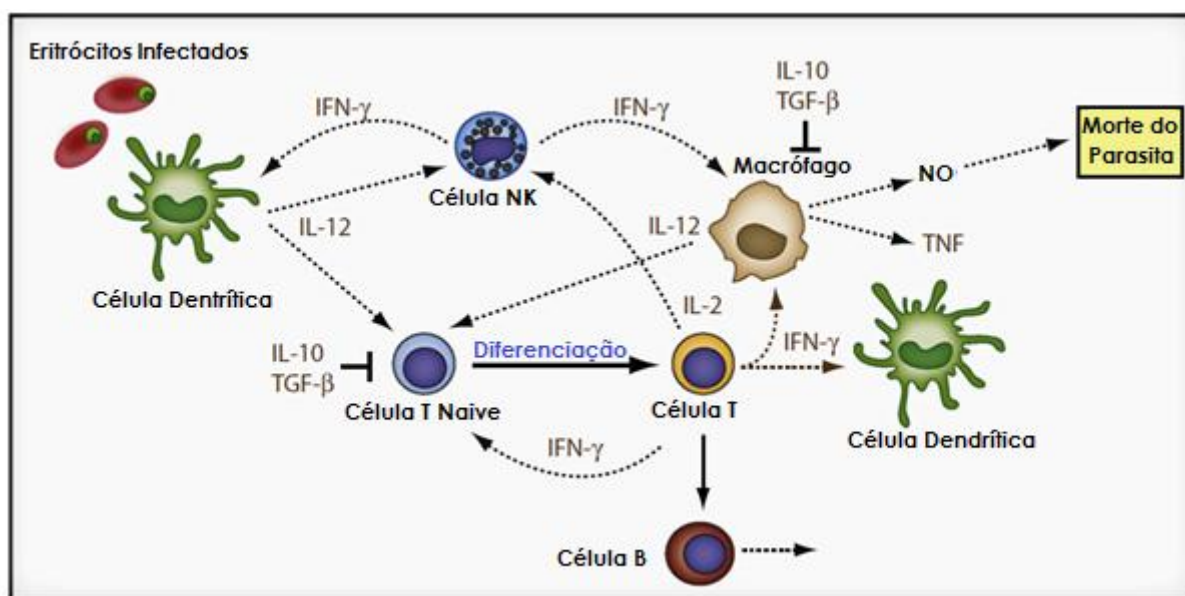


Figura 05: Resposta imune ao *Plasmodium* no estágio sanguíneo.

Fonte: Adaptada de GOOD & DOOLAN, 2010.

A imunidade celular é limitada em razão das hemácias não expressarem moléculas do HLA de classe I e II. Desta forma, a resposta imune humoral é essencial contra o estágio eritrocítico (LANGHORNE *et al.*, 2008). Neste âmbito, evidências apontam a importância da interação de células $CD4^+$ T_H1 com as células B para produção de anticorpos específicos na eliminação eficiente do parasita durante a infecção na fase tardia (LANGHORNE *et al.*, 2002).

As células $TCD4^+$ também são consideradas essenciais para a completa eliminação do parasita durante a fase tardia da doença (MENDING *et al.*, 1991),

uma vez que estas células são necessárias para ativar as células B a produzirem imunoglobulinas G (anticorpos IgG) de alta afinidade especificidade ao *Plasmodium sp.*

Embora outros mecanismos protetores, como estes mediados pelos linfócitos TCD4+, também possam participar da resposta imune humoral, tal processo é dependente de mecanismos efetores de neutralização dos merozoítos, lise mediada pelo sistema complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (MOORE *et al.*, 2002). Anticorpos protetores, então, podem agir em união com outras células efetoras como os monócitos e outros leucócitos (ação citofílica) e, provavelmente, são ativados pelas células T (LANGHORNE *et al.*, 1998).

Durante a infecção natural da malária são gerados anticorpos que reconhecem tanto os antígenos de superfície de merozoítos como os associados à membrana dos eritrócitos, os quais apresentam atividade aglutinante ou propriedades que controlam crescimento *in vitro* do parasita de forma eficaz (HIRUNPETCHARAT *et al.*, 1998).

O controle da infecção no paciente está ligado também a subclasse de anticorpos produzida. Os anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 podem se ligar aos antígenos de superfície dos eritrócitos (opsonização) e auxiliar na fagocitose ou participar da inibição celular dependente de anticorpos (ADCI) (BOUHAROUN-TAYOUN *et al.*, 1992), ou ainda participar da citotoxicidade dependente de anticorpos (ACCD). O efeito neutralizante da ADCI é mediado principalmente produção por óxido nítrico liberado por monócitos.

Essas subclasses são associadas a menor parasitemia e redução do risco de patologia grave (STEVENSON *et al.*, 2011). Já os anticorpos não citofílicos IgG2 e IgG4 podem inibir as respostas efetoras dos anticorpos citofílicos pela competição dos mesmos domínios desencadeando um desequilíbrio na resposta imune a malária.

Informações importantes sobre a função da resposta imune humoral em humanos referente ao estágio sanguíneo do parasita foram fornecidas por meio de estudos longitudinais em populações endêmicas (SABCHAREON *et al.*, 1991; PIERCE, 2009; CROMPTON *et al.*, 2010). Tais estudos analisaram a resposta dos pacientes a várias proteínas do ciclo eritrocítico do parasita, dentre elas as de superfície do parasita, como a proteína 1 de Superfície do merozoíto (MSP1), a qual é alvo deste estudo.

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

Dentre as proteínas presentes na superfície do merozoíto, a MSP-1 é a mais abundante, no qual é expressa em outras espécies de *Plasmodium sp*, sendo primeiramente descrita para *Plasmodium falciparum* por Holder e colaboradores, em 1982. Esta proteína é sintetizada na fase de esquizogonia do parasita e apresenta alto peso molecular variando de 190-230 kDa de acordo com a espécie (HOLDER *et al.*, 1982).

A MSP-1 faz parte de um complexo no qual estão associadas às proteínas MSP-6 e MSP-7, que se ligam a superfície do merozoíto pela âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estudos utilizando *P. falciparum* indicam que o complexo sofre dois processos de clivagens, sendo que no primeiro processamento realizado pela protease subtilisina-like (SUB1) (KOUSSIS *et al.*, 2009), são gerados 4 fragmentos de aproximadamente 83, 30, 38 e 42 kDa, conhecidos como: MSP1₈₃, MSP1₃₀, MSP1₃₈ e MSP1₄₂ (HOLDER *et al.*, 1982).

No segundo processo de clivagem, que acontece antes do merozoíto invadir o eritrócito, o fragmento de (42kDa) que permanece associado à superfície do merozoíto é clivado por outra protease a subtilisina (SUB2), gerando os fragmentos de 33 e 19 kDa (MSP-1₃₃ e MSP-1₁₉) (HARRIS *et al.*, 2005). O fragmento maior de 33 kDa é então liberado na corrente sanguínea juntamente com o restante do complexo, ao passo que o fragmento menor de 19 kDa permanece ancorado à membrana do merozoíto pela (GPI), (BLACKMAN *et al.*, 1990). A figura 6 ilustra as etapas do processamento da MSP1.

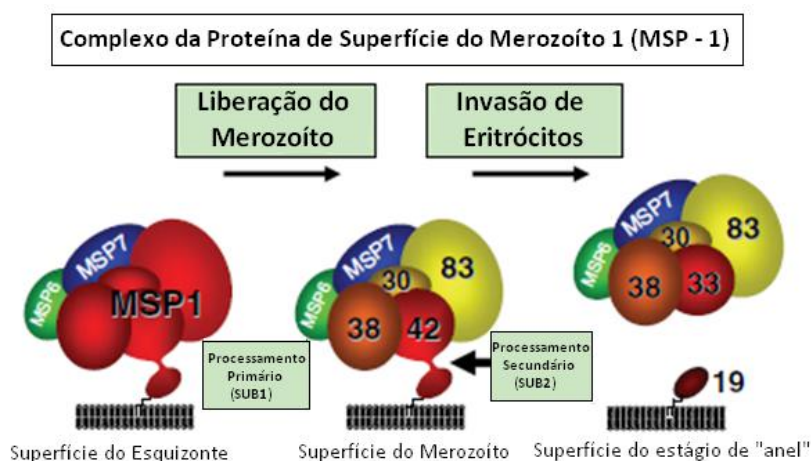


Figura 06: Etapas do processamento de clivagem da MSP-1.

Fonte: Adaptada de HOLDER, 2009.

O segundo processamento é essencial para que ocorra o processo de invasão, dado a observação de que a utilização de anticorpos monoclonais inibe a segunda clivagem, e, desta maneira, impedem a entrada do parasito na célula hospedeira ou posterior desenvolvimento, mostrando assim a importância de anticorpos direcionados contra esta região do antígeno (BLACKMAN *et al.*, 1994; O'DONNELL *et al.*, 2001).

Além de constatações *in vitro*, foi observado que anticorpos que inibem o processamento secundário de MSP1 também podem ser encontrados em soro de indivíduos naturalmente expostos à malária (NWUBA *et al.*, 2002), o que pode ser uma evidência de que estes anticorpos podem interferir na ação da protease SUB2 fazendo com que não alcance seu sítio de clivagem (HOLDER, 2009).

As análises realizadas no gene MSP-1 subdividiu-os em blocos com base no nível de diversidade genética sem o uso de outros critérios biológicos. A análise da estrutura gênica da MSP-1 foi descrita pela primeira vez em *Plasmodium falciparum* por Tanabe e colaboradores (1987). O gene que codifica a proteína PfMSP-1 foi dividido em 17 blocos, classificados como, conservados, semiconservados e variáveis. Nos blocos variáveis, os padrões alélicos são bem caracterizados, seguindo dois grupos distintos, compondo um modelo dimórfico conhecidos como alelo K1 e MAD20. Porém, um único domínio, conhecido como bloco 2, é altamente polimórfico com pequenas sequencias com alto número de repetições (TANABE *et al.*, 1987; COOPER, 1993).

Em *Plasmodium vivax*, o gene MSP1 codifica um polipeptídeo de 1726 aminoácidos, sendo identificada a presença de dois alelos: Belém (DEL PORTILLO *et al.*, 1991) e Salvador (GIBSON *et al.*, 1992). Através da comparação da sequência protéica da PvMSP-1, do isolado Belém, com sequências de MSP-1 de *P. falciparum* e *P. yoelli*, foi possível observar semelhanças existente entre as sequências de aminoácidos nas três espécies, desde modo permitindo identificar na proteína: sete regiões conservadas presentes nas três espécies, denominadas de blocos conservados interespecies (ICBs) (ICB1, ICB2, ICB4, ICB5, ICB6, ICB8 e ICB10); e três regiões conservadas apenas em *P. vivax* e *P. falciparum*, chamados de blocos conservados CBs (CB3, CB7 e CB9) (DEL PORTILLO *et al.*, 1991).

Os blocos denominados de ICBs foram os que apresentaram similaridade de aminoácidos maior que 48% entre MSP1 de *P.falciparum*, *P. vivax* e *P.yoellii*, os CBs com similaridade de aminoácidos maior que 50% entre *P.falciparum* e *P. vivax* e os

blocos com similaridade de aminoácidos menor que 45% foram denominados blocos polimórficos (figura 7) (DEL PORTILLO *et al.*, 1991).

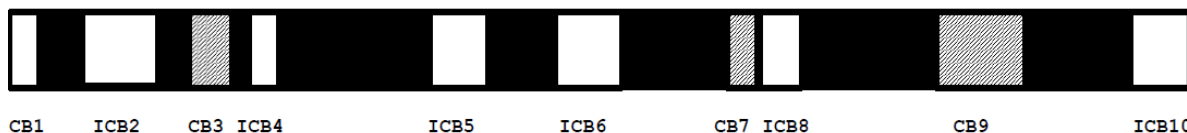


Figura 7: Esquema mostrando a divisão da PvMSP-1 em blocos conservados interespecíes entre *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. yoelii* (em branco) e blocos conservados entre *P. falciparum* e *P. vivax* (em cinza) e blocos polimórficos (em preto).

Fonte: Del Portillo *et al.*, 1991.

Uma segunda classificação referente à PvMSP-1, foi realizada com isolados de *Plasmodium vivax* de diversas partes do mundo, incluído o Brasil. Após análise do sequenciamento dos isolados de *P. vivax* para o gene MSP1, foi observado que a mesma era composta de 13 blocos, sendo sete blocos conservados (blocos 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13) flanqueados por seis blocos altamente polimórficos, no qual 4 deles repetitivos (2, 4, 6, 8, 10 e 12) (PUTAPORNTIP *et al.*, 2002). Como pode ser visualizado na figura abaixo (Figura 8).



Figura 8: Esquema mostrando a divisão da PvMSP-1 em 13 blocos, em 7 blocos conservados representado na cor branca e seis polimórficos na cor preta.

Fonte: BASTOS *et al.*, 2007.

A MSP-1 tem sido amplamente estudada, com o objetivo de compreender os mecanismos envolvidos na invasão dos eritrócitos pelos parasitas, além de ser observada como um antígeno capaz de ativar a resposta imune do hospedeiro, o qual se torna um alvo potencial para a produção de vacina contra a malária (BABON *et al.*, 2007). Os estudos realizados em áreas endêmicas no Brasil a cerca do perfil da imunogenicidade das regiões de PvMSP-1, estão melhores descritos no artigo de Revisão (Anexo 01).

1.9. Retrospectiva de Trabalhos Anteriores

Em estudos anteriores realizados por nossa equipe, coordenados pelo pesquisador Paulo Afonso Nogueira no Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane - Fundação Oswaldo Cruz (ILMD/FIOCRUZ), buscou-se compreender o processo de aquisição de anticorpos contra a porção N-terminal de PvMSP1 em indivíduos que vivem em áreas endêmicas.

Em 2006, Nogueira e colaboradores realizaram um estudo em Porto Velho (Rondônia/Brasil) com moradores de uma comunidade ribeirinha chamada Portuchuello. Neste foi avaliada a aquisição natural de anticorpos contra a proteína PvMSP-1 em indivíduos com malária causada por *Plasmodium vivax* ao longo de um ano, no qual as proteínas correspondiam a região C- terminal representado pela proteína ICB-10 (região conservada) e N-terminal por ICB2-5. A avaliação foi realizada através de ensaios ELISA, com soros de pacientes que tinham sido previamente identificados como assintomáticos e sintomáticos. Os resultados obtidos demonstraram que cerca de 33% da população tinha anticorpo anti-PvMSP1 contra a N terminal e 40% apresentava anticorpo para C terminal. Além disso, a aquisição de anticorpos para região N-terminal, e não para C- terminal, de PvMSP-1, na maioria dos indivíduos do estudo, estava associada com a idade e o tempo que residiam na área endêmica para a malária.

Neste mesmo estudo, também foi observado que os indivíduos respondedores a região N-terminal de PvMSP1, apresentavam redução do risco de se infectarem por *P.vivax*, porém quando eram infectados, tornavam-se susceptíveis a serem assintomáticos ou seja, conferia-lhes proteção clínica. Na maioria dos indivíduos assintomáticos o estudo demonstrou que os anticorpos presente para a porção N-terminal de PvMSP1 era do tipo IgG3.

Vale resaltar que os indivíduos sintomáticos não apresentaram níveis elevados de anticorpos para porção N-terminal de PvMSP1, somente a grande maioria dos assintomáticos. Segundo os autores uma possível explicação do porquê de alguns dos soros dos indivíduos assintomáticos não reconheceram a proteína recombinante da região N-terminal de PvMSP1, poderia está relacionado com a variabilidade das regiões polimórficas de PvMSP1, uma vez que a proteína ICB2-5 apresenta blocos altamente variáveis como o bloco 2.

Em virtude da suposição da variabilidade da região polimórfica da PvMSP1, um segundo estudo conduzido por Soares em 2010, teve por finalidade analisar a

estrutura gênica da diversidade alélica de isolados de *Plasmodium vivax* circulantes em áreas de transmissão no entorno de Manaus com base nas três sequências gênicas (bloco 2,6 e 10) do gene MSP1 de *Plasmodium vivax* (PvMSP-1).

Os resultados obtidos, após análise do alinhamento entre sequências dos isolados do bloco 2, revelaram que estes blocos apresentam alta número de recombinações, com características de variações alélicas entre os seguimentos de aminoácidos, indicando desta maneira que há uma variedade de haplótipos do gene PvMSP-1 na região do Amazonas. Ao fim, foram identificados no estudo sete regiões variáveis do bloco 2 da proteína MSP1 de *P. vivax* circulantes no Amazonas (Figura 9). Além disso, foram encontrados genótipos semelhantes a isolados de outras partes do Brasil, bem como de outras regiões geográficas como, por exemplo, genótipos oriundos da Ásia (dados ainda não publicados).

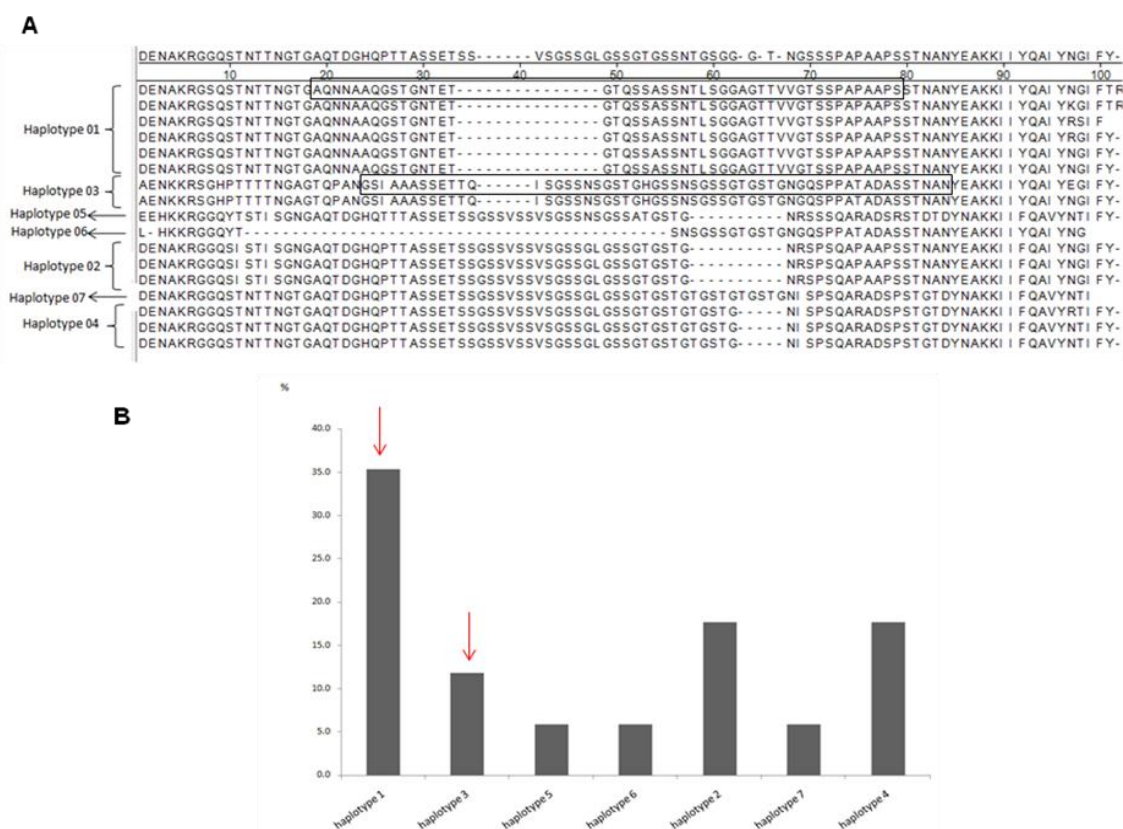


Figura 9. Regiões variáveis do bloco 2 de PvMSP-1 identificadas no Amazonas. **A:** A figura exibe o resultado do alinhamento dos isolados referentes aos sete haplótipos encontrados no Amazonas, as regiões em destaque representam as sequências que codificaram as proteínas produzidos neste trabalho, P2 dentro do haplótipo 1 e P3 no haplótipo 3. **B:** Os sete haplótipos do bloco 2 identificados no Amazonas e a frequência alélica dos haplótipos, a seta indica o percentual do haplótipo mais prevalente (Hap 1) e dos menos prevalente (Hap 3).

Em paralelo ao estudo de Soares (2010), Versiane (2011) avaliou, em estudo clínico epidemiológico semelhante ao realizado por Nogueira (2006), a resposta imune humoral contra as porções N e C terminais da *PvMSP-1* (ICB2-5 e ICB-10, respectivamente) em soros de indivíduos identificados como sintomáticos e assintomáticos de uma comunidade rural localizada na região de Rio Pardo, no município de Presidente Figueiredo, estado do Amazonas.

Os resultados demonstraram que 51,0% apresentaram IgG total contra a porção C-terminal e 29,5% contra a porção N-terminal da proteína. Conforme observado no estudo de Nogueira e colaboradores (2006), o estudo também confirmou que os anticorpos contra a porção N-terminal foram correlacionados com a idade, o número de infecções anteriores e tempo de residência na área endêmica. Além de haver predominância de anticorpos (IgG) de subclasse 3 contra a porção N-terminal da proteína. Vale resaltar que os anticorpos do tipo IgG3 que reagiram contra a porção N-terminal de *PvMSP-1* só foram detectados em indivíduos assintomáticos, ao passo que, na maioria dos pacientes sintomáticos não apresentaram esses anticorpos. Os dados apresentados sugerem que a presença de IgG3 contra a porção N-terminal da proteína em pacientes assintomáticos constitui-se como marcador soro-epidemiológico de proteção clínica.

Logo, a partir das indagações remanescentes do estudo de Nogueira (2006) e utilizando as informações obtidas com o estudo de Soares (2010) e Versiani (2011), levantou-se a hipótese de que seria relevante a construção de proteínas recombinantes baseadas nas sequências variáveis que foram encontradas para o bloco 2 de *PvMSP-1*. Assim, seria possível avaliar a resposta humoral específicas contra esses diferentes epítomos identificados e, desta maneira, contribuir para uma melhor compreensão do envolvimento destas regiões variantes na aquisição de proteção a doença, colaborando assim com o desenvolvimento de uma futura vacina para malária.

No presente estudo, foi avaliada a resposta humoral contra quatro proteínas recombinantes referente ao bloco 2 da porção N-terminal de *MSP-1* (três construídas neste estudo e a proteína ICB2-5 de trabalhos anteriores). O desenho das proteínas aqui produzidas foi específico para as regiões variáveis do bloco 2 (haplótipos 1 e 3) e conservada do ICB1 da *PvMSP-1* que foram identificadas no trabalho de Soares e colaboradores (2010). Este estudo faz parte de um projeto

maior que visa produzir um grande número destes epítomos variáveis identificados e avalia-los quanto a sua capacidade para desenvolvimento de vacina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Produção de antígenos recombinantes de regiões polimórficas e conservada da “Proteína 1” de superfície de merozoito de *Plasmodium vivax* e caracterização da resposta imune humoral em indivíduos expostos a malária em áreas do Estado do Amazonas.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenhar genes sintéticos de regiões do “bloco 2” e ICB1 da PvMSP-1 baseados em sequências identificadas em trabalhos anteriores;
- Expressar e purificar as proteínas recombinantes em hospedeiro bacteriano;
- Testar e analisar a reatividade destes antígenos recombinantes e ICB 2-5 frente a soros de diferentes grupos de indivíduos infectados por *P. vivax*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Modelo de Estudo

O trabalho realizado foi um estudo longitudinal, no qual deu seguimento a estudos anteriores (SOARES et al., 2010; VERSIANI. et al., 2011), da linha de pesquisa sobre malária causada por *Plasmodium vivax* do Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/FIOCRUZ. Neste estudo, visou-se a análise do nível de anticorpos em soros de pacientes infectados por *Plasmodium vivax* frente a sequências específicas da porção N- terminal de MSP1. Para isso, foram construídas três proteínas recombinantes (nomeadas como P1, P2 e P3) representando regiões que foram identificadas em isolados de Manaus, e uma proteína produzida em trabalhos anteriores (ICB2-5).

3.2. População de Estudo

Fizeram parte desta pesquisa amostras de soros de indivíduos que foram consideradas positivas para malária causada por *Plasmodium vivax*, pelo método da gota espessa e PCR. Os soros testados neste estudo foram coletados de indivíduos de duas aéreas de transmissão para malária localizada no Estado do Amazonas (Rio Pardo e Manaus).

Parte das amostras sorológicas utilizadas neste estudo foi proveniente do estudo de Versiani (2011). Foram testadas aqui somente as amostras de soro que apresentaram reatividade para a proteína ICB2-5 neste estudo. Tais amostras foram coletadas no período de setembro de 2008 á fevereiro 2010 na comunidade de Rio Pardo localizada no município de Presidente Figueiredo-AM. Esses participantes também foram avaliados quanto à proteção clínica da doença, no qual foram identificados indivíduos assintomáticos no local.

Para complementar o estudo, foram utilizadas amostras provenientes de Manaus. Os soros foram coletos, por um período de 8 meses, de um estudo transversal, no qual, os participantes foram selecionados por demanda espontânea no atendimento de rotina do Ambulatório da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD, confirmados com infecção por *Plasmodium vivax* e as imunofenotipagens e análises por citometria de fluxo foram realizadas no laboratório do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ/AM em colaboração com o pesquisador Dr. Marcus Vinícius Guimarães Lacerda.

Sendo assim, neste estudo foram analisadas por ELISA 96 amostras, no qual 24 foram de indivíduos assintomáticos e 30 amostras de indivíduos que apresentaram sintomas durante o período do estudo. Além destas, foram avaliadas 42 amostras oriundas da Fundação de Medicina Tropical em Manaus-AM. Como controles negativos, foram usados 20 amostras de soros de indivíduos que nunca se infectaram com o *Plasmodium*.

3.3. Conservação das Amostras

As amostras de soros usadas neste estudo foram estocadas na Soroteca do Instituto Leônidas e Maria Deane- FIOCRUZ-AM e mantidas a -20 °C para a manutenção do material biológico.

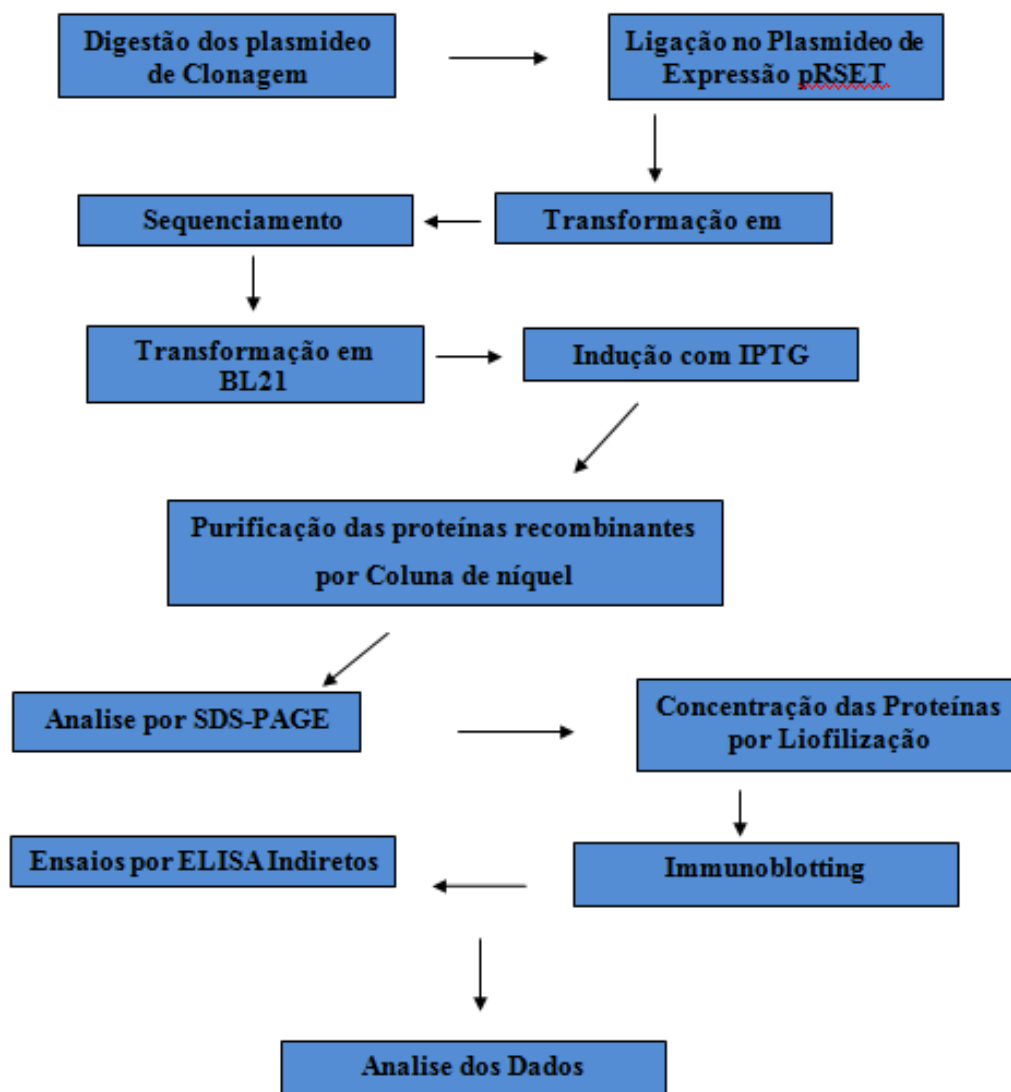
3.4. Aspectos Éticos

As amostras sanguíneas utilizados no presente estudo estão vinculadas aos projetos: 1. Intitulado: **“Dinâmica das infecções maláricas em comunidades do Amazonas sob aspecto de marcadores moleculares de parasitas e do polimorfismo de proteínas candidatas a vacinas”**, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Amazonas sob CAAE: 3640.0.000.115-07. Enquanto que as amostras de soros provenientes de Manaus foram coletas, de um estudo transversal intitulado: 2. **“Avaliação da resposta inume celular de linfócitos em pacientes infectados por *Plasmodium vivax*”** seguindo os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética, Conselho da FMT-HVD (Processo CAEE: 0044.0.114.000-11-FMT-HVD).

3.5. Produção das Proteínas Recombinantes

Para realização do estudo sorológico, foram empregados três antígenos recombinantes derivados da região polimórfica do bloco 2 da PvMSP1, expressos durante o desenvolvimento deste trabalho. A proteína ICB2-5 também utilizada nas análises sorológicas foi oriunda de trabalhos anteriores, essa proteína foi expressa em fusão com o gene da glutathione S-transferase (GST), por isso foi necessário a utilização da GST como controle dos ELISAS. O fluxograma abaixo indica as etapas do trabalho realizado.

Fluxograma com Etapas do trabalho



3.5.1. Desenho do Gene Sintético para Produção das Proteínas Recombinantes do Bloco 2 de PvMSP-1

Para o desenho do gene sintético, foram utilizadas sequências de isolados identificadas no estudo de Soares LA e colaboradores (2010) realizado em Manaus, referente ao bloco 2 de MSP1. A seleção da sequência foi baseada na identificação da região polimórfica e conservada através de alinhamento das amostras utilizando o programa “Clustal W” (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e pela identificação de epítipo de célula “B” através do programa BepiPrep (www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/), que prediz a localização do epítipo linear de células B que serão reconhecidos por anticorpos do sistema imune, utilizando um *threshold* de 0.35 para a região conservada e 1.3 para as regiões variáveis (Anexo 2). Logo, partindo destes critérios, três proteínas recombinantes foram desenhadas, duas de regiões variáveis do bloco 2 e uma da região conservada do bloco ICB1 de PvMSP (Figura 10). A sequência gênica que originou a “proteína 1” (P1) tem origem na região conservada (semelhante ao haplótipo Belem) e apresenta 117 pares de base (pb), a “proteína 2” apresenta 153 pb (representando a porção polimórfica semelhante ao haplótipo Belém) e a “proteína 3”, 144 pb (representando a porção polimórfica do haplótipo 3).

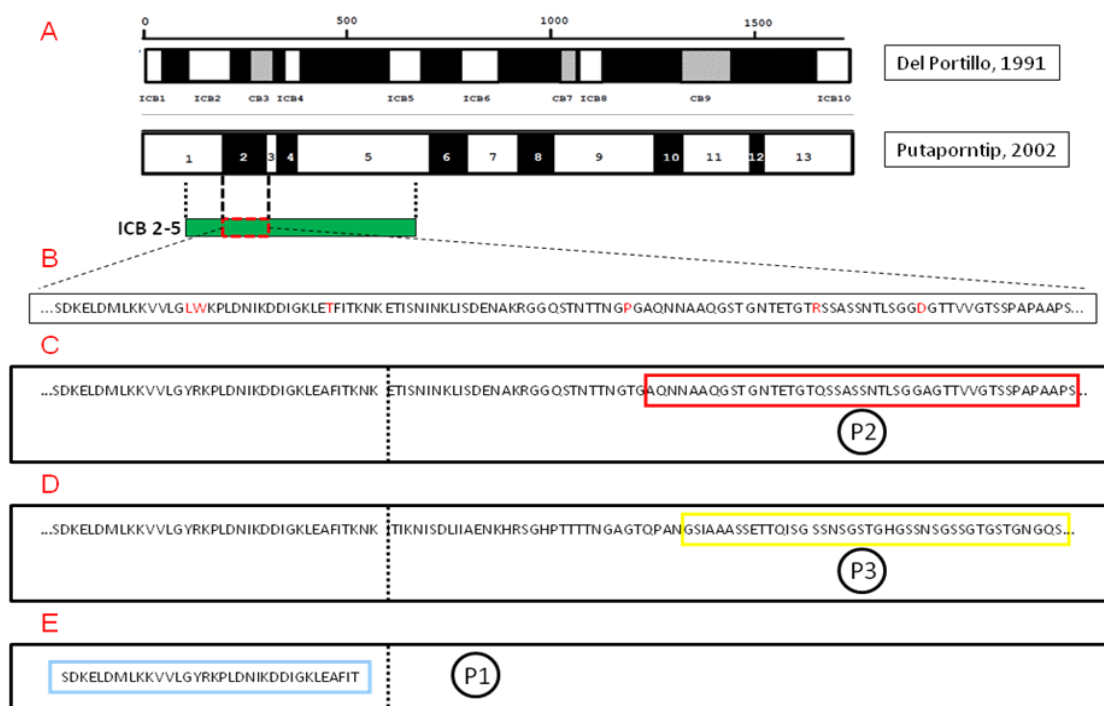


Figura 10: Esquema da construção do gene sintético. **A:** Esquemas em

sobreposição das separações gênicas de PvMSP-1 feitas por Del Portillo (1991) e Putaporntip (2002). **B:** Proteína ICB 2-5, sequência localizada no bloco 2. **C:** Região em destaque representa sequência da proteína 2 presente no “bloco 2” de um Isolado identificado no Amazonas semelhante ao isolado *Belém* (Soares, 2010) **D:** Região em destaque representa a sequência da proteína 3 presente no “bloco 2” de um isolado do identificado no Amazonas (Soares, 2010) **E:** Região conservada do bloco ICB1 intercalado o bloco 2 (Soares, 2010)

Cada sequência desenhada possuía sítios para enzimas de restrição entre início e termino de cada sequência gênica e *stop codon* (figura 11). Estas informações foram enviadas ao fabricante de genes sintéticos (*IDT - Integrated DNA Technologies*) para síntese, sendo solicitado deste a correção do viés de códon para *Escherichia coli*, buscando assim otimizar a expressão das proteínas neste hospedeiro. Análise de bioinformática para identificar a massa molecular esperada de cada proteína foi realizada no programa Protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Para identificação de IUPs (*Intrinsically unstructured proteins*) foi utilizado o programa IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>).

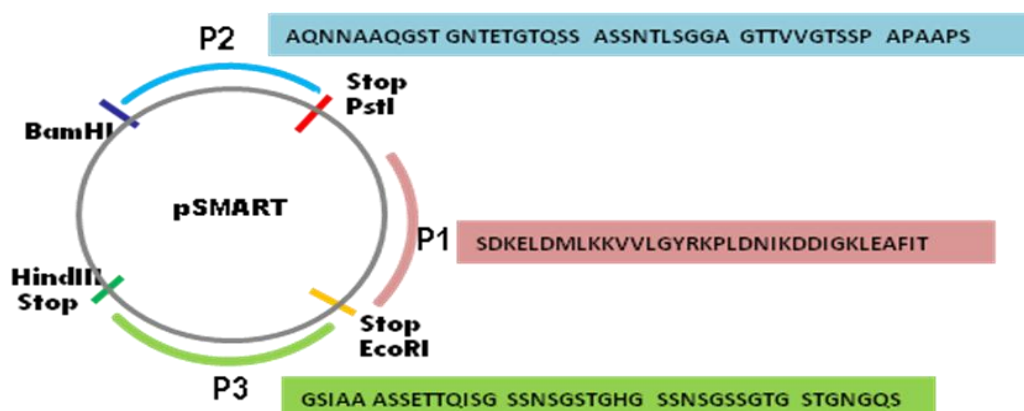


Figura 11: Esquema mostrando a construção do gene sintético pela *IDT* no plasmídeo. No plasmídeo pSMART, a região em azul representa sequência gênica da proteína 2 (P2), no qual foi digerida com as enzimas de restrição *BamHI* e *PstI*. Em rosa claro, proteína 1 (P1), flaqueadas pelos sítios para as enzimas *PstI* e *EcoRI*. Em verde claro, proteína 3 (P3), flaqueadas pelos sítios das enzimas *EcoRI* e *HindIII*. Ao lado de cada proteína está presente sua sequência de aa codificada. Vale resaltar que o plasmídeo pSMART apresenta outras regiões, incluindo a região que confere resistência ao antibiótico ampicilina.

Quadro I: Características das proteínas (P1; P2; P3). E dados que foram utilizados para construção, sequências de nucleotídeos e de aminoácidos. Dados da expressão das proteínas: plasmídeos de expressão (pRSET) e as respectivas enzimas de restrição utilizadas para digeri-los, seguida da massa molecular de cada uma das proteínas que foram expressadas.

PROTEÍNAS	SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS	SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS	ENZIMAS DE RESTRINÇÃO	PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO	MASSA MOLECULAR APÓS EXPRESSÃO
P1 Conservada	TTG CAG TCA GAT AAA GAG TTG GAC ATG CTT AAA AAA GTT TTA GGT TAC CGT AAA CCG TTG GAT AAT ATT AAG GAC GAT ATT GGT AAA CTG GAG GCC TTC ATC ACC TAGGAATTC	SDKELDMLKKVVLGYRKKPL DNKKDDIGKLEAFIT	<i>Pst</i> I e <i>Eco</i> RI	pRSETC	8,7709 kDa
P2 Variável	GGG CAA AAC AAC AAC GCC GCC CAG GGA TCA ACC GGC AAC ACG GAA ACT GGC ACA CAA TCG AGC GCT AGC TCT AAT ACC CTC AGC GGC GGA GCC GGT ACC ACA GTG GTA GGT ACC AGC TCA CCG GCA CCG GCG GCA CCC AGCTAGCTG CAG	AQNNAAQGST GNTEGTGTQSS ASSNTLSGGA GTTVVGTSSP APAAPS	<i>Bam</i> HI e <i>Pst</i> II	pRSETA	8,2806 kDa
P3 Variável	GAA TTC GGT TCT ATC GCC GCG TCC AGT GAG ACC ACA CAA ATT AGT GGG AGC AGC AAT TCT GGT AGT ACT GGG CAC GGC TCG TCA AAT AGC GGT TCA AGC GGT ACC GGT TCC ACG GGC AAC GGC CAG AGC TGATAGCTT	GSIAA ASSETTQISG SSNSGSTGHG SSNSGSSGTG STGNQGQS	<i>Eco</i> RI e <i>Hind</i> III	pRSETB	8,52698 kDa

3.6. Digestão do Vetor de Clonagem com Enzimas de Restrição

O gene sintético produzida pelo fornecedor *IDT Integrated DNA Technologies* em plasmídeo de clonagem pSMART, foi digerido de acordo a produção de cada proteína recombinante (figura 11).

Utilizou-se 1 µl de cada enzima de restrição (*Invitrogen*TM), 1 µl do vetor de clonagem pSMART, 2 µl tampão das respectivas enzimas e completou-se com H₂O para um volume final de 20 µl, seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, o produto foi submetido à eletroforese em tampão TBE 1X a 100 V, utilizando agarose na concentração 1.5%, para a verificação das respectivas bandas em gel.

Em seguidas as bandas obtidas da digestão foram purificadas, através do kit Gel Extraction Kit (250) Qiaquick[®] (*QIAGEN*[®]), conforme as instruções do fabricante.

3.7. Subclonagem em Vetor de Expressão pRSET

Os fragmentos, depois de digeridos e purificados foram ligados ao vetor de expressão pRSET (*Invitrogen*TM) (figura 10). As cepas bacterianas da linhagem *Escherichia coli* e os plasmídeos de clonagem e expressão utilizados neste estudo, para a produção de proteínas recombinantes, encontram-se caracterizados no quadro I e II.

Utilizou-se a proporção 3:1 (fragmento: vetor) para ligação em plasmídeo de expressão utilizando a enzima T4-Ligase (*Invitrogen*TM). O volume final de 50 µl foi dividido entre os outros reagentes que compõem a reação, foi então incubadas no termociclador a uma temperatura de 16 °C por 16 horas.

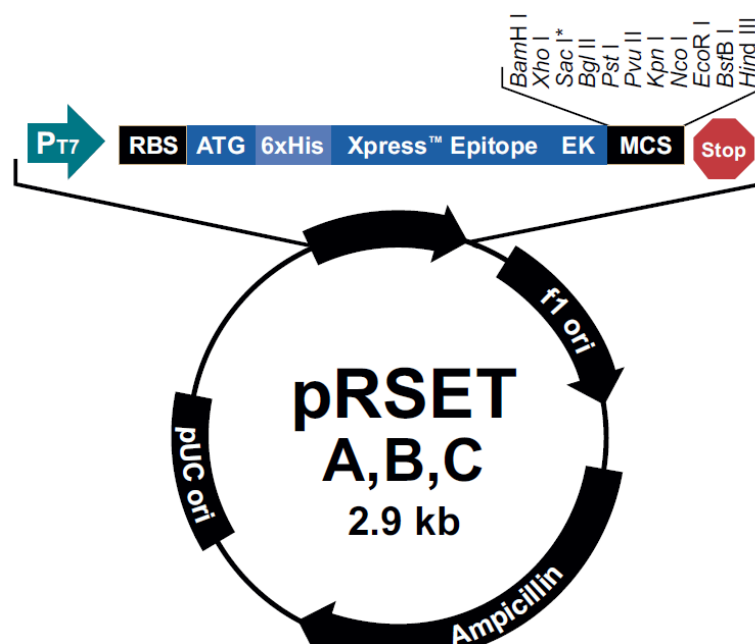


Figura 12: Mapa do plasmídeo de expressão pRSET com várias regiões presentes nele. Fonte: Manual Técnico Invitrogen (Catálogo V 351-20).

Quadro II: Cepas bacterianas e plasmídeos utilizados para a clonagem e expressão das proteínas.

CEPAS	CARACTERÍSTICAS	FABRICANTE
BACTERIANAS		
TOP 10	<i>E. coli</i> utilizada para ensaios de clonagem	<i>Invitrogen</i>
BL 21 (DE3) pLysS	<i>E. coli</i> utilizada para expressão proteica	<i>Invitrogen</i>
PLASMÍDEOS		
pSMART	vetor de clonagem	<i>IDT</i>
pRSET	vetor de expressão	<i>Invitrogen</i>

3.7.1. Preparação de Célula Competente para a Inserção do Plasmídeo Recombinante - Transformação em Top 10

Antes da realização da transformação, foi preparada a célula quimicamente competente de *E. coli* TOP 10, sendo esta utilizada na primeira transformação, a outra foi realizada na *E. coli*, cepa BL21(DE3) pLysS.

Para o preparo de *E. coli*, cepa TOP 10 e BL21(DE3) pLysS, quimicamente competente, utilizou-se o protocolo fornecido pelo grupo de Pesquisa em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas. Resumidamente, as bactérias foram incubadas em 300 ml de LB líquido até atingir D.O 0.5 e, posteriormente, centrifugadas a 4.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C e o “pellet” foi ressuspendido sucessivas vezes em tampão glicerol 10%.

Do produto resultante da ligação (fragmento da PvMSP1+ pRSET) foi retirado 1µl e colocado em criotubo contendo 50µl de bactérias competentes da espécie *Escherichia coli*, linhagem TOP 10, em seguida incubada por cinco minutos em gelo. Posteriormente, colocou-se o conteúdo em cubeta de eletroporação para o choque térmico a 1.900 V no eletroporador. Em seguida adicionou-se ao conteúdo 950 µl de LB⁺ (glicose 0,4% e MgCl₂ 20 mM final) e foram submetidas a crescimento por 1 hora a 37°C sob agitação constante.

3.7.2. Crescimento e Seleção das Colônias

Após o crescimento, as bactérias transformadas foram semeadas em placas de Petri com meio LB-ágar contendo 100µg/mL de ampicilina. Logo, as placas foram incubadas a 37°C por um período de 12 horas.

As colônias transformantes, que apresentaram resistência a ampicilina, foram escolhidas aleatoriamente, repicadas organizadamente em uma segunda placa de LB Agar com ampicilina e mantidas a 37 °C por 16 h.

3.7.3. Extração Plasmidial e Digestão para Confirmação da Orientação do Inserto

No dia seguinte, as colônias foram cultivadas em 3 ml de meio LB líquido contendo ampicilina, a 37 ° C, por 16 horas. Posteriormente realizou-se um Miniprep das colônias, utilizando o kit Qiaprep spin (*QIAGEN*), conforme as recomendações do fabricante.

A orientação do inserto foi verificada por digestão, conforme a condição descrita no tópico 3.6, utilizando as enzimas de restrição conforme descrito no quadro 1. Em seguida, o produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1.5% para a verificação do fragmento devidamente digerido.

3.7.4. Sequenciamento

Para o conhecimento da sequência de bases nitrogenadas correspondente ao gene em questão, realizou-se o sequenciamento das amostras (plasmídeo com o inserto das respectivas proteínas) em parceria com a Plataforma de Sequenciamento da Fundação Oswald Cruz / BA. Para esta reação, utilizou-se o oligo universal T7 e um analisador genético Abi 3100 (*Applied Biosystems*). Posteriormente, realizou-se a análise do sequenciamento por Bioinformática utilizando as ferramentas disponíveis *online* BLASTp (NCBI) e PROTPARAM (Expasy).

3.7.5. Transformação de Células Eletrocompetentes (*E. coli* BL21(DE3) pLysS)

Após a confirmação do inserto no plasmídeo de expressão, através da digestão com as respectivas enzimas de restrição e sequenciamento, realizou-se a inserção do plasmídeo em célula competente BL21.

Para a inserção do plasmídeo de expressão recombinante, em célula bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) pLysS quimicamente competente, utilizou-se o mesmo método descrito no tópico 3.7.1, porém desta vez e os respectivos antibióticos para o crescimento bacteriano em placas foram ampicilina (100µg/mL) e clorofenicol (34µg/mL).

Por conseguinte, as colônias que apresentaram resistência a ampicilina e clorofenicol foram selecionadas por possuírem o plasmídeo com inserto e transformadas.

3.8. Cultivo e Indução das Proteínas do Bloco 2 de PvMSP-1 Recombinante

As colônias transformadas foram cultivadas em 3 ml de LB contendo os seguintes antibióticos, ampicilina (100µl/mL) e clorofenicol (34µl/mL) por 16 horas a 37 °C sob agitação constante.

Após o crescimento das colônias, foi adicionado 1,5mL deste pré-inóculo em 500 mL de meio LB contendo os respectivos antibióticos. Posteriormente, o conteúdo foi incubado a 37 °C sob agitação constante até atingir uma absorbância de $A_{600} = 0.6$ D.O. A esse crescido foi adicionado reagente indutor IPTG na concentração final de 1mM. O conteúdo foi incubado a 37 °C sob agitação constante, por três horas e centrifugado a 4.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C.

3.9. Análise da Expressão das Proteínas

Para a análise da expressão das proteínas recombinantes (P1; P2; P3), utilizou-se a técnica de eletroforese em gel poliacrilamida-SDS-PAGE 15% SDS- (running gel) e 5% (stacking gel), na presença da solução acrilamida/bisacrilamida 30%, Tris 1M pH 8.8, persulfato de amônia a 10% (APS); dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 6µl de Temed e água miliQ para um volume final de aproximadamente 15ml seguindo Maniatis e colaboradores (1989).

As proteínas foram aplicadas no gel com tampão de corrida (Tris 0,01M, pH 6,8; SDS 10%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,06% e DTT a 4%) e em seguida denaturadas por aquecimento á 95°C por 10 minutos. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 100 V até a coloração do azul de bromofenol alcance a extremidade inferior do gel.

Após corrida em gel de poliacrilamida, fixou-se a proteína em solução corante contendo azul de *Coomassie* (*coomassie blue* 0,2%), ácido acético glacial 7%, etanol 40%, diluídos em H₂O destilada, que além de fixá-las, mantém as proteínas desnaturadas. Uma vez coradas, foram submetidas à descoloração, utilizando os mesmos reagentes citados acima, exceto o *Coomassie*, para visualização e análise de proteínas.

3.10. Purificação das Proteínas Recombinantes

A proteína foi purificada pela técnica denominada Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado (IMAC), desenvolvida por Porath em 1975. Neste estudo, utilizou-se a coluna de purificação contendo íons Ni²⁺ (*Qiagen*®) em afinidade a cauda de Histidina inserida na proteína. A retenção da proteína PvMSP-1, foi testada em várias concentrações de imidazol, em duplicata.

Para a realização da purificação das proteínas recombinantes, a cultura do induzido, foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em tampão de lise contendo, 20mM Tris pH8.0, 500mM NaCl, 1mM de PMSF e glicerol a 10%.

Em seguida, foram submetidas ao processo de lise celular por sonicação. O produto da sonicação foi centrifugado por 15 min a 14000 rpm e o sobrenadante recuperado.

A coluna de purificação contendo íons Ni^{2+} foi previamente lavada com H_2O e tampão de lise. Posteriormente, foi adicionado o sobrenadante lisado, contendo a proteína (de 1 em 1 ml).

Em seguida foram realizadas lavagem para verificar a retenção da proteína PvMSP1 na coluna, seguindo as seguintes concentrações de Imidazol 20Mm; 40Mm; 60Mm; 80Mm. O tampão de eluição com imidazol foi adicionada sempre de duas vezes de 500 μl , nas seguintes concentrações: 200Mm, 300Mm, 400Mm e 500Mm de Imidazol sendo separadas em alíquota E1 e E2. Todas as alíquotas foram armazenadas a -20°C . O monitoramento deste processo foi realizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 15%, como descrito no tópico 3.9.

As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Bradford (*Bio-Rad*®) (1976) e densidade óptica por espectrofotômetro.

E seguida, todas as eleições das proteínas que foram visualizadas no gel SDS-PAGE e quantificadas, foram submetidas à diálise em membranas de 0,2mm, para retirada do excesso do imidazol e dos outros reagentes.

3.11. Liofilização das Proteínas

Após a Diálise, foi realizado o processo de concentração das proteínas por Liofilização. Para isso as proteínas foram colocadas em um frasco de vidro previamente autoclavados e levados ao -80°C , por 16 horas.

No dia seguinte, as amostras congeladas foram colocadas no liofilizador, previamente resfriado, por um período de 16 horas. Posteriormente as amostras que foram liofilizadas foram ressuspensas em H_2O para ficar em uma concentração 10 vezes maior que a inicial, em uma seguida foram armazenadas a -20°C .

3.12. Immunoblot

A detecção da presença da cauda de polihistidina nos antígenos recombinantes foi realizada pela técnica de “*immunoblot*” (Towbin et al.,1979). Para isso, as proteínas foram separadas por eletroforese SDS-PAGE 15% e transferidas por eletroforese para membrana de nitrocelulose, ambos embebidos em tampão 0,025 M Tris, 0,192 M glicina, pH 8.5, e metanol 20%.

O sistema foi colocado em uma cuba específica para eletrotransferência (Semi-dry system, Bio-rad, Hercules, USA) sendo submetido à uma voltagem constante de

12 V durante 50 minutos. Após ser retirada do sistema, a membrana foi mantida no mesmo tampão de transferência descrito, até o momento da revelação.

Posteriormente, realizou-se a revelação utilizando kit comercial *Western breeze* (*Invitrogen*®), seguindo as recomendações do fabricante.

3.13. Ensaios por Elisa Indireto

As reações por *Enzyme Linked Immuno Sobent Assay* (ELISA), segundo Harlow & Lane (1988), foram realizadas para avaliar a presença de anticorpos e suas suclases contra His-PvMSP1 (P1, P2 e P3) e GST-ICB2-5 em soros de pacientes infectados por *Plasmodium vivax*. Todas as amostras de soros foram testadas em duplicatas e todos os ensaios foram repetidos.

Resumidamente, poços de placas de 96 poços foram sensibilizados com as proteínas recombinantes His-PvMSP1, diluída em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.6 e deixado overnight a 4° C. Dia seguinte, os poços foram lavados 3 vezes com PBS Tween 0,05%, e bloqueados com PBS/leite desnatado a 5%, adicionando-se 300µl/poço e incubados a 37°C por 2 horas. Soros diluídos a 1/100 foram colocados nos poços e incubados em câmara úmida em estufa a 37°C, por 1 h e em seguida lavados 3 vezes em PBS Tween 0,05%. Conjugado anti-IgG humano peroxidase KPL diluídos a 1/1000 foram adicionados nos poços e incubados a 37°C por 1 h e, em seguida, lavados 3 vezes em PBS Tween 0,05 %. Em seguida o Substrato cromogênico Tetrametilbenzidina 1M (TMB - Sigma) e H₂O₂ (água oxigenada) foram adicionados em cada cavidade da placa (50µl) por 10 minutos para revelação da reação que, em seguida, foi interrompida com 50µl H₂SO₄ a 2M. A densidade óptica (D.O) foi determinada por uma leitora de ELISA (*Thermo*®) utilizando filtro de 450nm em leitor de ELISA.

Para determinação das subclasses de IgG, foram utilizados anticorpos monoclonais de camundongo direcionados a cada subclasse de IgG humana (Sigma, St. Louis, MO) diluído de acordo com as instruções do fabricante, utilizando um painel de soros que foram positivos no ELISA anterior. Todos os soros foram testados em diluições de 1:100, e a ligação do anticorpo monoclonal foi detectado com imunoglobulina conjugado com peroxidase anti-mouse (*Sigma*®).

O “*cut-off*” foi calculado pela média das D.O. de 20 amostras de soros negativos mais duas vezes o desvio padrão. Para determinar se as amostras eram

positivas para as três proteínas (P1, P2, P3) e para ICB2-5, foi calculada média de cada amostra menos o “*cut-off*” dos soros negativos para cada proteína.

O segundo “*cut-off*”, foi realizado apenas para ICB2-5. Este foi calculado pela média da D.O das duplicatas de cada amostra para o antígeno controle (GST). Este resultado foi utilizado para subtrair o valor da média das amostras para ICB2-5.

3.14. Análises dos Dados

Os resultados obtidos no presente estudo foram analisados utilizando os programas estatísticos PRISMA versão 5.0 (*Graph Pad Software*®) e PASW versão 8.0. Para comparar a média dos níveis de anticorpos entre os diferentes grupos, foi utilizado as correlações entre diferentes variáveis foram feitas pelo teste não paramétrico de *Spearman*.

4. RESULTADOS

4.1. Expressão das Proteínas Recombinantes

O plasmídeo de clonagem pSMART foi devidamente digerido com as enzimas de restrição, com o objetivo de obter os fragmentos correspondente a cada proteína (P1;P2;P3) do bloco 2 de *PvMSP-1*. Após a digestão do vetor de clonagem os fragmento foram purificados e inseridos no plasmídeo de expressão pRSET para a transformação em célula hospedeira da linhagem *E. coli* TOP 10 (figura 13). As sequências gênica que codificaram as proteínas (P1; P2; P3) foram ligadas no vetor de expressão pRSETC, pRSETA, e pRSETB respectivamente.

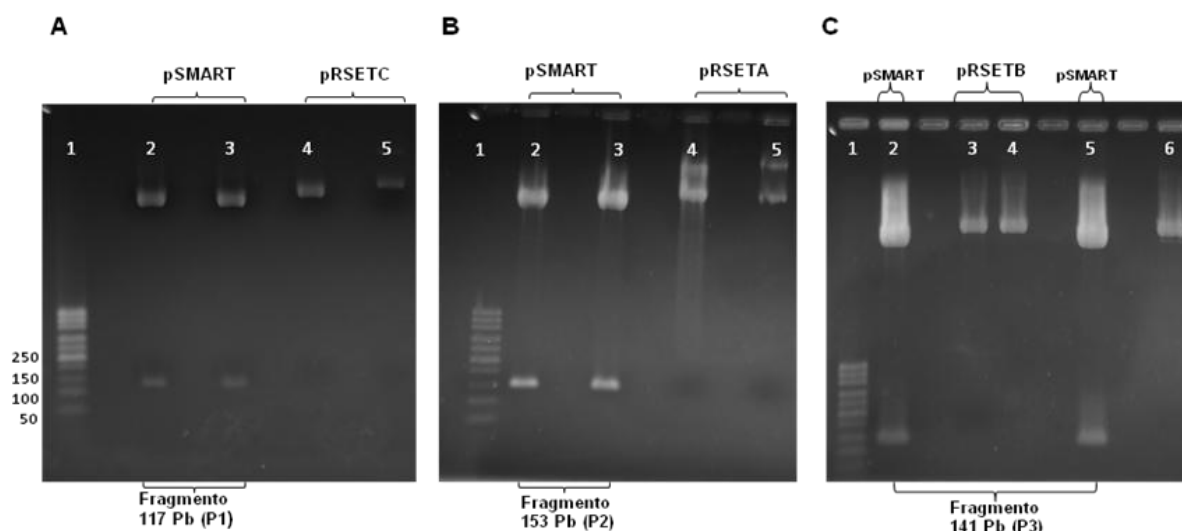


Figura 13: Digestão do plasmídeo de clonagem pSMART e a presença dos fragmentos na altura esperada e digestão dos plasmídeos de expressão pRSET A, B e C. **A:** As canaletas de número 2 e 3 representam o pSMART com a presença do fragmento abaixo de 117 pares de base (pb) de *PvMSP1* (Proteína 1), a canaleta 4 representa o plasmídeo de subclonagem pRSETC, todos devidamente digeridos com as enzimas de restrição PstI e EcoRI e a canaleta de número 5 representa controle negativo do plasmídeo pRSETC (sem enzima de restrição); **B:** As canaletas de número 2 e 3 representam o pSMART com a presença do fragmento abaixo de 153 pb (Proteína 2), a canaleta 4 representa o pRSETA, digeridos com as enzimas de restrição BamHI e PstI e a canaleta de número 5 controle negativo do plasmídeo pRSETA; **C:** As canaletas de número 2 e 5 representam o pSMART com a presença do fragmento abaixo de 141 pb (Proteína 3), a canaleta 3 e 4 representa o pRSETB, digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII, e a canaleta de número 6 representa o controle negativo do plasmídeo pRSETB. Para visualização da digestão foi realizada a eletroforese, no qual utilizou-se gel de agarose na concentração de 1.5%. Todas as canaletas de número 1 representam o marcador molecular de 50pb (*ladder*).

Após a subclonagem, realizou-se extração plasmidial das colônias transformantes e em seguida digestão do vetor de expressão (pRSET), visando verificar a presença dos fragmentos de *PvMSP-1*. Considerando que cada plasmídeo de expressão usados nestes experimentos (pRSETA, pRSETB e pRSETC) possuem sítios de restrição únicos para as enzimas utilizadas, foi observada que os fragmentos de *PvMSP-1* só eram detectados quando uma digestão dupla dos vetores era realizada. Em reações onde essas enzimas foram utilizadas separadamente, não se observou a presença dos fragmentos. Desta maneira, constatou-se que os fragmentos estavam inseridos corretamente no vetor de expressão (figura 14).

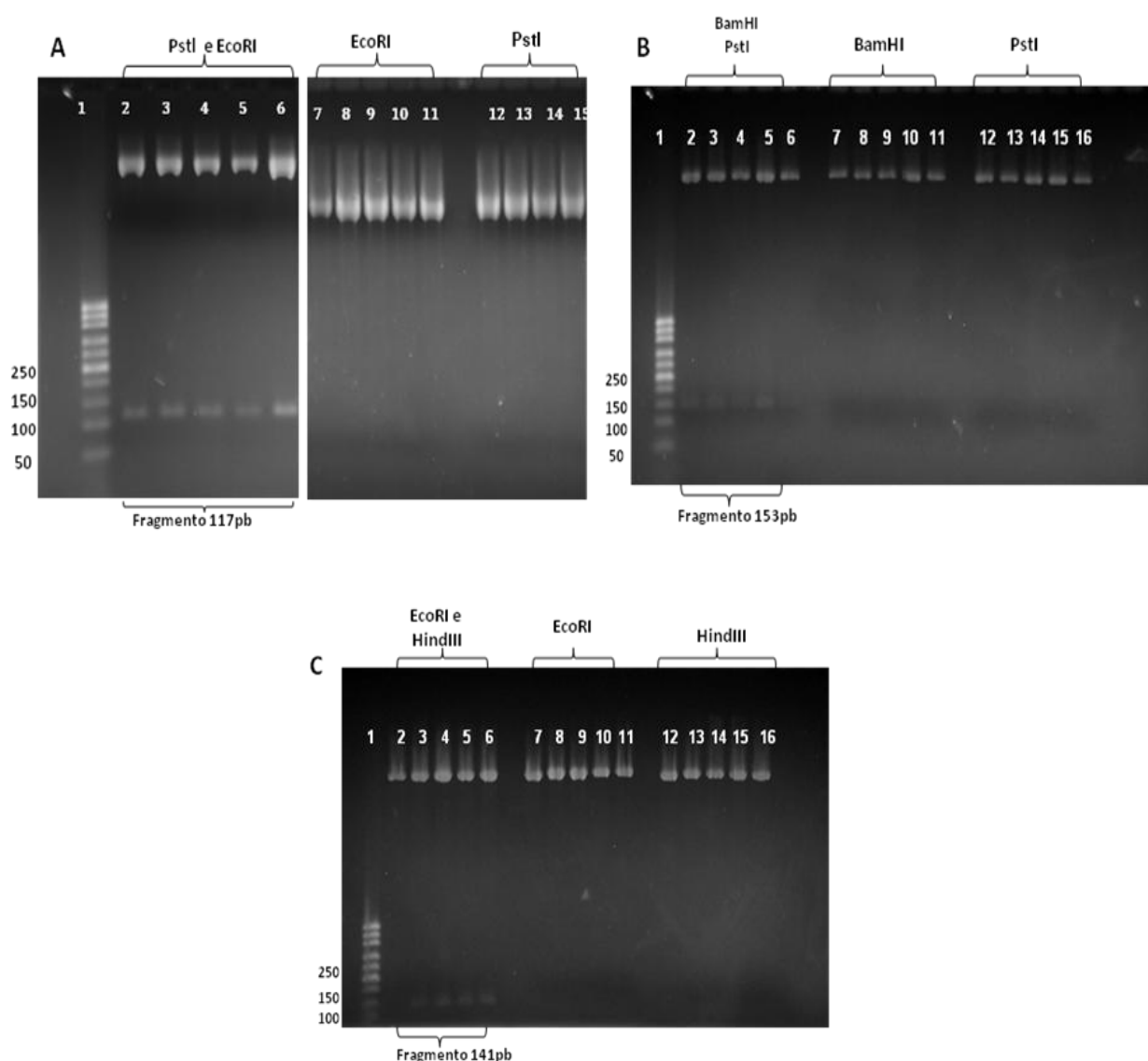


Figura 14: Confirmação da correta inserção dos fragmentos das sequências gênicas codificantes para as três proteínas no vetor de expressão. As canaletas de número 1

das figuras representa o marcador molecular de 50pb. **A:** As canaletas de número 2 a 6 representam o pRSETC-P1 digerido com ambas as enzimas de restrição e a presença do fragmento para *PvMSP-1* (P1). Enquanto que as canaletas de 7 à 15 representam o pRSETC-P1 digerido com as enzimas separadamente e não se observa a presença dos fragmentos. **B:** As canaletas de número 2 a 6 representam o pRSETA-P2 digerido com ambas as enzimas de restrição e a presença do fragmento para *PvMSP-1* (P2). Enquanto que as canaletas de 7 à 16 representam o pRSETA-P2 digerido com as enzimas separadamente e não se observa a presença dos fragmentos. **C:** As canaletas de número 2 a 6 representam o pRSETB-P3 digerido com ambas as enzimas de restrição e a presença do fragmento para *PvMSP-1* (P3). Enquanto que as canaletas de 7 à 16 representam o pRSETB-P3 digerido com as enzimas separadamente e não se observa a presença dos fragmentos.

4.2. Análise do Sequenciamento

Além de verificar através de restrição enzimática a correta inserção dos fragmentos no vetor de expressão, foi realizada uma avaliação da qualidade dos plasmídeos obtidos através do sequenciamento das amostras (pRSET+fragmento) (Figura 15). O sequenciamento do DNA comprovou que os insertos correspondiam às sequências identificadas no trabalho de Soares *et al* (2010) (como garantido pelo fornecedor IDT) que foram selecionadas neste trabalho para a construção do gene sintético, e que estes estavam no sentido e fase de leitura para a correta expressão proteica.

Proteína 1

Sequenciamento DNA

```

C A T C A T C A T C A T C A T G G T A T G G C T A G C
A T G A C T G G T G G A C A G C A A A T G G T C G G G A T
C T G T A C G A C G A T G A C G A T A A G G A T C G A T G G
A T C C G A C C T C G A G A T C T G C A G T C A G A T A A A
G A G T T G G A C A T G C T T A A A A A A G T T G T T T T A
G G T T A C C G T A A A C C G T T G G A T A A T A T T A A G
G A C G A T A T T G G T A A A C T G G A G G C C T T C A T C
A C C T A A G A A T T C G A A G C T T G A T C C G G C T G C
T A A C A A A G C C C G A A A G G A A G C T G A G T T G G C
T G C T G C C A C C G C T G A G C A A T A A C T A G C A T A
A C C C T T G G G C C T C T A A A C G G T C T T G A G
G G G T T T T T G C T G A A A G G A G G A A C T A T A T C
C G G A T C T G G C G T A A C T C C C T

```

Tradução

HHHHHHGMASMTGGQGMGRDLYDDDDKDRWIRPRDLQSDKELDMLKKVVLGYRKPLDNIKDDIGKLEAFIT-

Proteína 2

Sequenciamento DNA

```

C A T C A T C A T C A T C A T G G T A T G G C T A G C
A T G A C T G G T G G A C A G C A A A T G G T C G G G A T
C T G T A C G A C G A T G A C G A T A A G G A T C G A T G G
G G A T C C G C G C G C A A A A C A A C G C C G C C A G G A
T C A A C C G G C A A C A C G G A A A C T G G C A C A C A A
T C G A G C G C T A G C T C T A A T A C C C T C A G C G G C
G G A G C C G G T A C C A C A G T G G T A G G T A C C A G C
T C A C C G G C A C C G G C A C C C A G C C T A A C T A G
C A G C T G G T A C C A T G G A A T T C G A A G C T T G A T
C C G G C T G C T A C A C A G C C C G A A A G G A A G C T
G A G T T G G C T G C C A C C G C T G A G C A A T A A A
C T A G C A T A A C C C C T T G G G G C C T C T A A A C G G
G T C T T G A G G G T T T T T T G

```

Tradução

HHHHHHGMASMTGGQGMGRDLYDDDDKDRWGSQAQNAAQGSTGNTETGTQSSASSNTLSGGAGTTVVGITSSPAPAAPS-

Proteína 3

Sequenciamento DNA

```

C A T C A T C A T C A T C A T G G T A T G G C T A G C
A T G A C T G G T G G A C A G C A A A T G G G T C G G G A T
C T G T A C G A C G A T G A C G A T A A G G A T C C G A A G C
T C G A G A T C T G C A G C A T G G T A C C A T G C G A T G C
G G T T C T A T C G C C G C G G C G T C C A G T G A G A C C
A C A C A A T T A G T G G G A G C A G C A A T T C T G G T
A G T A C T G G C A C G G C T C G T C A A T A G C G G T
T C A A G C G G T A C C G G T T C C A C G G G C A A C G G C
C A G A G C T A A A A G C T T G A T C C G G C T G C T A A C
A A A G C C G A A A G G A A G C T G A G T T G G C T G C T
G C C A C C G C T G A G C A A T A A C T A G C A T A A C C
C T T G G G C C T C T A A A C G G G T C T T G A G G G T
T T T T G C T G A A A G G A G G A A C T A T A T C C G G A
T C T G G C T A A T A G C G A A G A G C C C G C A C C G
A T C G C C T T C C C A A C A G T T G

```

Tradução

HHHHHHGMASMTGGQGMGRDLYDDDDKDPSSRSAAGTMEFGSIAAASSETTQISGSSNSGSGTGHGSSNSGSSGTGSTGNGQS-

Figura 15: Resultado do sequenciamento das proteínas no vetor de expressão. Os três quadros representam as sequências do DNA que codificou cada proteína, a região em amarelo exhibe as sequências dos insertos e abaixo o resultado da tradução das sequências referente às mesmas. Destacado em vermelho a cauda de polihistidina (6xHis) presente no vetor de expressão.

4.3. Produção dos antígenos recombinantes His-PvMSP-1

Logo, foram expressas e purificadas com êxito 3 proteínas recombinantes (P1; P2; P3) do bloco 2 de PvMSP-1 juntamente a uma cauda de polihistidina. Todas estavam presentes na porção solúvel do lisado bacteriano. A proteína 1 (P1) apresentou um tamanho esperado de aproximadamente 8.6 KDa, enquanto que as proteínas 2 (P2) e 3 (P3), apresentaram uma tamanho acima do que se esperava em torno de 16 KDa. A concentração das proteínas fusionadas a cauda de histidina ficaram em torno de 2.0 µg/µL a 2,8 µg/µL. A revelação de um *imunoblot* utilizando os anticorpos monoclonais anti-HisG (Invitrogen) confirmou a presença da cauda polihistidina nas proteínas obtidas (figura 16).

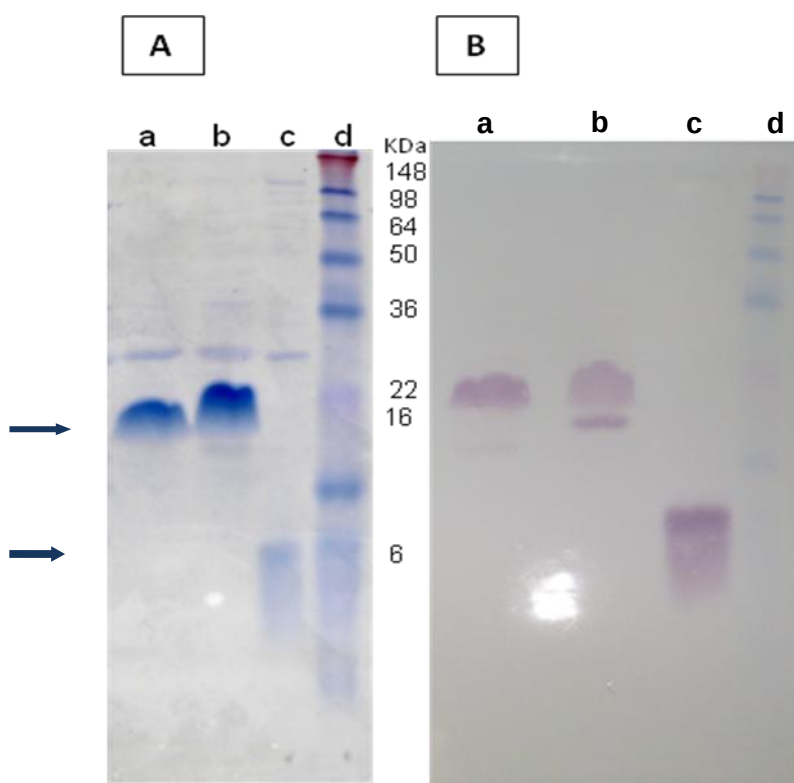


Figura 16: SDS-PAGE demonstrando a purificação das proteínas recombinantes e ao lado o resultado da revelação de um *imunoblot*. **A:** O poço **a**, **b** e **c** representam as proteínas (P3), (P2) (P1), respectivamente, do bloco 2 e ICB1 da PvMSP-1, as setas indicam a altura de cada proteína. **B:** *Imunoblot*, realizado para o reconhecimento da cauda da histidina, confirmando a correta expressão das proteínas recombinantes. O poço **a**, **b** e **c** representam as proteínas (P3), (P2) (P1) respectivamente. O poço **d** representa o marcador molecular de proteínas e as respectivas massas moleculares ao lado.

4.4. Resposta Humoral aos Antígenos Recombinantes (Regiões Variáveis e Conservadas) em pacientes sintomáticos

Após a expressão e purificação dos antígenos recombinantes, foi quantificada a resposta imune a imunoglobulina da classe IgG contras as duas proteínas recombinantes do bloco 2, P2; P3 (região variável), uma proteína do ICB1 P1 (conservada) e a proteína ICB2-5 (obtida em trabalhos anteriores) de *PvMSP-1* em soros de indivíduos naturalmente expostos a malária, provenientes de Rio Pardo e Manaus.

Na figura 17-A, pode-se observar a frequência de soros de indivíduos sintomáticos que apresentaram anticorpos IgG capazes de reconhecer as proteínas recombinantes ICB2-5, P1 P2 e P3. A proteína ICB2-5 foi a mais reconhecida nos soros sintomáticos nas duas áreas (Rio Pardo e Manaus) em relação às proteínas P1, P2 e P3, porém quando comparadas as duas áreas observou-se que os indivíduos oriundos de Manaus apresentaram maior nível de anticorpos para a ICB2-5 (83%) em relação aos de Rio Pardo (61%).

Em relação a porcentagem de respondedores IgG contra a proteína conservada (bloco ICB1) e as duas variáveis do bloco 2 de *PvMSP-1* nos sintomáticos de Rio Pardo, foi observado que as duas últimas foram mais reconhecida que a primeira, onde houve uma maior prevalência para a P2 sobre a P3. O antígeno P2 (semelhante ao Belém) apresentou o nível de anticorpo com porcentagem de 29%, contra 19% da proteína P3. No entanto o antígeno P3 foi mais reconhecido nesta aérea em relação ao P1 que foi de 6,4%.

Quando comparando a reatividade das proteínas pelos indivíduos sintomáticos de Manaus, verificou-se que os maiores níveis de anticorpos foram contra o antígeno P2 e os menores níveis contra o antígeno P3. A proteína P2 foi a mais reconhecida com 38%, enquanto que a proteína P3 originária do haplótipo 3, foi menos reconhecida com 2%, inclusive com a reatividade inferior à proteína conservada (P1) que foi de 16,6%, e quando avaliado por área (Manaus e Rio Pardo) o antígeno P2 apresentou o mesmo perfil de reconhecimento que a ICB2-5, no qual os indivíduos provenientes de Manaus apresentaram maior nível de anticorpo em relação os de Rio Pardo.

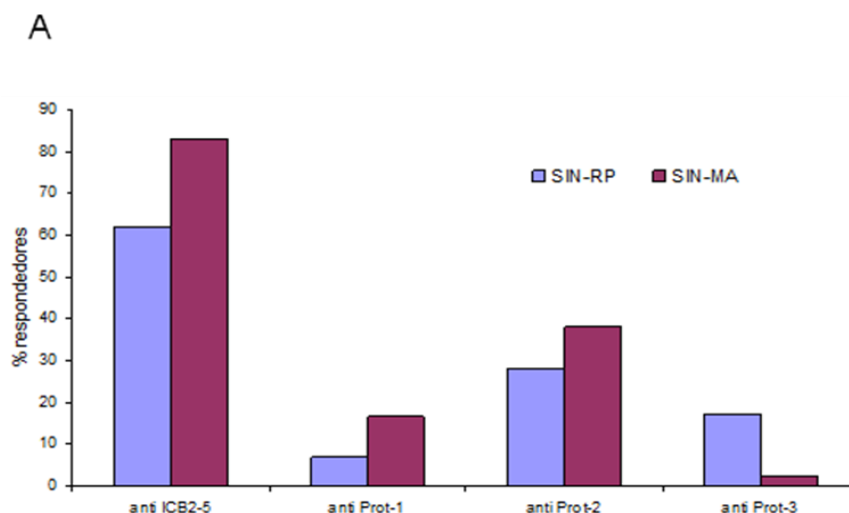


Figura 17: Frequência de respondedores para anticorpos IgG contra os antígenos recombinantes P1, P2, P3 e ICB2-5 de PvMSP1 em Manaus e Rio Pardo **A:** A frequências de respondedores sintomáticos em ambas as áreas foi maior para ICB2-5, seguida pela P2.

A análise bivariável de *Spearman* revelou a correlação entre os soros de sintomáticos da comunidade de Rio Pardo que reagiram para ICB2-5, P1 e P3, em relação às proteínas P1 com P2 e P3. Em contraste, não houve correlação entre os soros que reagiram com P2 e P3 (Tabela 1).

Tabela 1: Correlação entre os soros de sintomáticos de Rio Pardo contra as proteínas ICB2-5, P1, P2 e P3.

Sintomático/RP	ICB2-5	P1	Prot2
ICB2-5			
P1	0.403*		
Prot2	0.499*	0.396*	
P3	0.286*	0.570*	0.357

* Correlação de *Spearman* apresenta diferenças estatísticas significativas ($P < 0.01$)

4.5. Resposta Humoral dos Soros de Indivíduos Assintomáticos aos Antígenos Recombinantes do Bloco 2 e a ICB2-5.

Nas amostras de soros de indivíduos assintomáticos de Rio Pardo, os maiores níveis de anticorpos foram para a proteína ICB2-5 (70,8%), seguidos pela proteína (P3) de 45,8%, proteína (P2) aproximadamente 31% e (P1) com 29%. No entanto, quando comparados o nível de anticorpos contra as proteínas construídas das regiões variáveis (P2; P3) e região conservada (P1) do bloco 2 de *PvMSP-1*, observou-se que a proteína (P3) foi a mais reconhecida pelos indivíduos assintomáticos. Na figura 18 observa-se a frequência de respondedores aos antígenos recombinantes em relação aos soros de indivíduos assintomáticos.

A análise bivariável de *Spearman* revelou a correlação entre os soros de assintomáticos da comunidade de Rio Pardo para todas as proteínas testadas (tabela 2).

A

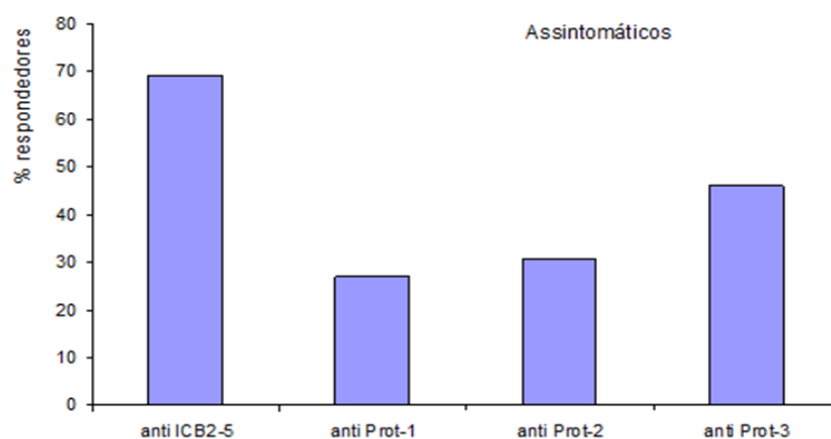


Figura 18: Prevalência dos respondedores assintomáticos contra os antígenos. Nos soros de indivíduos assintomáticos provenientes de Rio Pardo (Ass-RP), maior porcentagem de respondedores foi para ICB2-5, seguida pela P3, P2 e P1.

Tabela 2: Correlação entre os soros de assintomáticos de Rio Pardo contra as proteínas ICB2-5, P1, P2 e P3.

	ICB2-5	P1	Prot2
Assintomático			
ICB2-5			
P1	0.501*		
Prot2	0.516*	0.595*	
P3	0.579*	0.770**	0.646**

* Correlação de *Spearman* apresenta diferenças estatísticas significativas ($P < 0.01$)

** Correlação de *Spearman* apresenta diferenças estatísticas significativas ($P < 0.001$)

4.6. Resposta Humoral contra Domínios Variáveis e Conservados do Bloco 2 de PvMSP1

Para determinar o perfil de resposta dos isotípos de imunoglobulinas G quanto a subclasse de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) dirigidos aos antígenos recombinantes P1 da ICB1; P2 e P3 do bloco 2 da PvMSP-1, foram avaliados por ELISA indireto somente as amostras consideradas positivas para IgG total dos indivíduos sintomáticos assintomáticos. Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados com os três grupos de soros separadamente (Ass-RP, Sint-RP e Sint-MA), em que a proteína recombinante ICB2-5 foi utilizada como comparativo.

Os soros dos assintomáticos responderam para a ICB2-5 apenas para as duas subclasses com predominância para IgG3 (76.5%) seguida de IgG2 (41.17%) (figura 18). Para P3 a frequência de respondedores foi de IgG3 (29.4%) e IgG2 (11.7%); para P1 (conservada) a frequência de respondedores para IgG3 (17.6%) e IgG2 (11.7%). A resposta contra P2 foi diferente, com a presença de alguns respondedores para IgG1 (5.88%) e sem a predominância para IgG3 (11.7%) sobre IgG2 (11.7%). Os níveis de IgG3 anti ICB2-5 foram bem acentuados em relação a IgG2 nos assintomáticos (Figura 19). O mesmo predomínio de IgG3 foi observado em relação a P1 e P3.

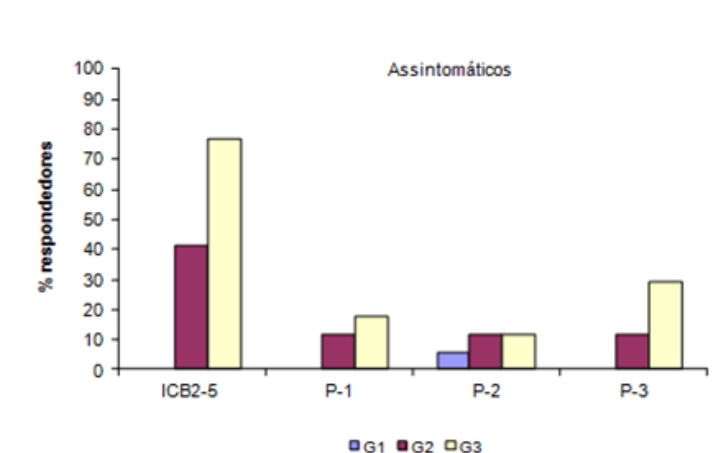


Figura 19: Porcentagem de respondedores assintomáticos as subclasses contra os antígenos recombinantes. O perfil de resposta de anticorpos as subclasses (IgG1, IgG2 e IgG3).

Entre os soros dos assintomáticos, a análise bivariável de Spearman indicou a correlação que reagiram com subclasses IgG3 e IgG2 para ICB2-5. Estes soros foram correlacionados apenas com os que apresentaram IgG3 e IgG2 para P3. Foram encontradas maiores correlações entre os soros reagentes com IgG2 anti P2 e anti P1; entre IgG1 anti P2 e IgG2 anti P3, e finalmente entre os IgG3 e IgG2 anti P3 (Tabela 3).

Tabela 3: Análise de correlação de *Spearman* entre os soros assintomáticos que reagiram para as subclasses de IgG contra as proteínas estudadas.

		ICB2-5			P1			P2			P3	
		G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2
ICB2-5	G1											
	G2											
	G3		0.487*									
P1	G1											
	G2		0.147	0.088								
	G3		0.321	-0.043		0.176						
P2	G1		0.387	0.411		0.729**	-0.137			**		
	G2		0.147	0.088		1.000	0.176		0.729			
	G3		-0.019	-0.022		-0.133	0.223		-0.091	-0.133		
P3	G1											
	G2		0.529*	0.539*		0.395	-0.253		0.614**	0.395	-0.168	
	G3		0.272	0.519*		0.233	-0.347		0.443	0.233	0.136	0.812**

* Correlação de *Spearman* apresenta diferenças estatísticas significativas ($P < 0.01$)

** Correlação de *Spearman* apresenta diferenças estatísticas significativas ($P < 0.001$)

Comparando os soros dos sintomáticos de ambas às áreas contra a proteína ICB2-5, a análise bivariável de *Spearman* indicou a correlação entre IgG1 com IgG2 ou IgG3. Não houve correlação entre os soros que tiveram IgG2 e IgG3 anti ICB2-5. Os soros contendo IgG3 anti ICB2-5 apresentaram correlação com os que reagiram com IgG1 ou IgG3 para P2. E finalmente, houve correlação apenas com os soros que responderam para P2 com IgG1 e IgG3 (Tabela 4).

Tabela 4: Análise da correlação de *Spearman* entre os soros sintomáticos em ambas as áreas que reagiram para as subclasses contra as proteínas.

		ICB2-5			P.2			P.3	
		G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2
ICB2-5	G1								
	G2	0.431*							
	G3	0.419*	0.013						
P2	G1	-0.044	-0.062	0.342*					
	G2	-0.063	0.187	-0.084	-0.025				
	G3	0.228	0.247	0.428*	0.384*	0.196			
P3	G1	-0.124	-0.154	0.287	-0.050	-0.072	0.220		
	G2								
	G3	-0.225	0.114	-0.077	-0.091	-0.132	0.232	0.485	

* Correlação de *Spearman* apresenta diferenças estatísticas significativas ($P < 0.01$)

** Correlação de *Spearman* apresenta diferenças estatísticas significativas ($P < 0.001$)

Boa parte dos soros não tiveram correlação, indicando a existência de alguns soros reagentes dirigidos exclusivamente para as proteínas dos Blocos 2 de PMSP1 (P2 e P3) e ICB1 (P1).

Reunindo os soros dos dois grupos, a porcentagem de respondedores indicou a predominância de IgG3 somente para as proteínas variáveis P2 (23.7%) e P3 (10.5%). A IgG2 foi a segunda subclasse mais frequente, P2 (7.8%) e P3 (2.6%) e 7.8% para (P1) (Figura 20). Os soros apresentaram níveis baixos para IgG1 para as três proteínas (1.3 a 2.6%), enquanto que para IgG4 não houve respondedor (dado não mostrado).

Quando a reatividade das subclasses foi combinada em P2+P3, houve aumento na frequência de respondedores IgG3 (30.2%) e IgG2 (9.2%). As frequências de respondedores aumentaram quando P1+P2+P3 foram combinadas, IgG3 (35.5%) e IgG2 (13.1%). Estas frequências de respondedores para IgG3 foram próximas às frequências de IgG3 (43.4%) e IgG2 (35.5%) para a proteína ICB2-5. (Figura 20)

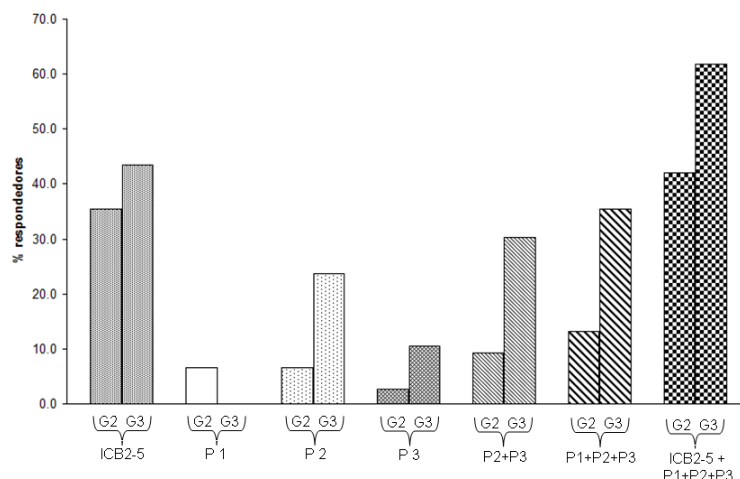


Figura 20: Reatividade individual das proteínas, seguida da união da reatividade das subclasses contra as proteínas (variáveis) e conservada.

A distribuição dos soros confirma a exclusividade de alguns soros contra a combinação P1+P2+P3 em comparação à resposta contra ICB2-5 (estrelas na Figura 21). As frequências de soros respondedores IgG3 e IgG2 reunindo todas as proteínas testadas (ICB2-5+P1+P2+P3) superaram os resultados da ICB2-5 sozinha (Figura 21) sugerindo que o desenvolvimento de um repertório de proteínas recombinantes correspondentes ao bloco 2 é capaz de expandir o espectro de soros reagentes.

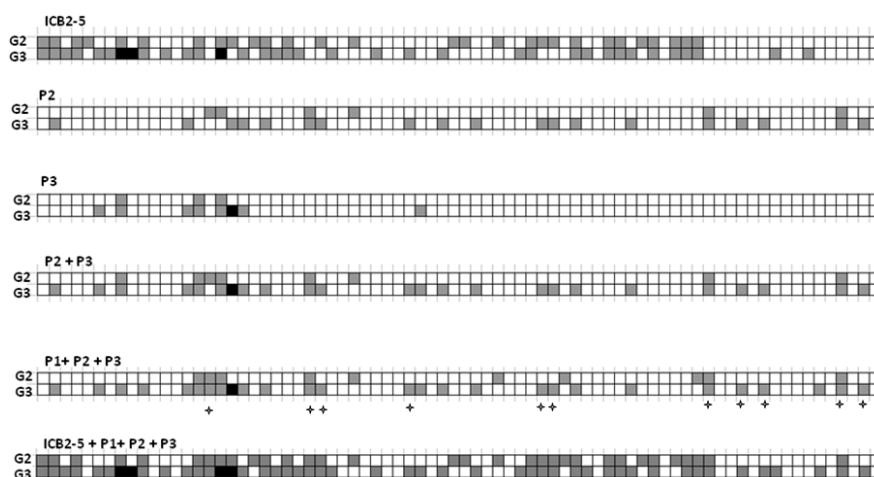


Figura 21: Comparação dos soros que regiram individualmente para cada subclasse contra as proteínas. Os quadros brancos indicam os soros que não reagiram, em cinza os soros que reagiram fracamente e os pretos os que reagiram forte.

5. DISCUSSÃO

A malária causada por *Plasmodium vivax* apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo considerado um grande problema de saúde pública. Isto se deve principalmente ao fato de nas últimas décadas essa espécie apresentado resistências às drogas antimaláricas convencionais em diversas partes mundo (BAIRD, 2004; PRICE *et al.*, 2007), além de um aumento de episódios graves, podendo levar a morte dos pacientes. No Brasil, essa espécie é responsável por aproximadamente 80% dos casos registrados no território, tornando-se um motivo de preocupação para saúde pública (GUERRA *et al.*, 2009; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

Nesse sentido, torna-se de extrema importância o desenvolvimento de novos métodos e estratégias de intervenção para bloquear a transmissão da doença causada por essa espécie, por isso diversos estudos vêm sendo conduzidos com o intuito desenvolver uma vacina eficaz (GOOD, 2005).

Os candidatos a vacina anti-malária mais importantes são delineadas em antígenos do estágio pré-eritrocítico CSP (Circumsporozoite protein) e SSP2/TRAP (Thrombospondin related anonymous protein); do ciclo eritrocítico assexual: as subunidades da MSP-1 (42kDa, 19kDa e uma molécula precursora de 200kDa), MSP-9, DBP-RII (Duffy Binding Protein recetor 2) e AMA-1 (Apical membrane antigen-1), e os antígenos do ciclo eritrocítico sexual Pvs25 e Pvs28. Outros genes de *Plasmodium vivax* do ciclo eritrocítico assexual e identificados como potenciais candidatos a vacinas são: a família da PvMSP-3 (pvmmsp3a/3b/3g); PvMSP-4, PvMSP-5 e PvRBP 1/2 (HERRERA *et al.*, 2007).

Entretanto, uma das grandes dificuldades no desenvolvimento de uma vacina contra a malária é diversidade antigênica e a fraca imunogenicidade dos antígenos candidatos (TETTEH & CONWAY, 2011), principalmente em regiões altamente polimórficas dos antígenos de superfície, identificados nos isolados de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* em diferentes áreas geográficas em todo o mundo. O problema do polimorfismo tende a ser mais importante para as vacinas baseadas nas proteínas do estágio sanguíneo do parasita, as quais são alvos de imunidade naturalmente adquirida (TAKALA *et al.*, 2009; WEEDALL & CONWAY, 2010). E desta forma uma investigação da

variação de sequência de antígenos (incluindo os haplótipos de diferentes regiões geográficas) sob forte pressão imunológica, tais como o MSP1, se faz necessário para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a malária (FERREIRA *et al.*, 2004; CHENET *et al.*, 2012).

A proteína 1 de superfície do merozoíto (MSP-1) tem se destacado como antígeno candidato, através das pesquisas soroepidemiológicas que tem demonstram seu potencial imunogênico. Embora grande parte desses estudos destaque a região C-terminal da MSP-1₁₉ (região ser altamente conservada), tanto de *P. falciparum* (EGAN *et al.*, 1996; BRANCH *et al.*, 1998; BRAGA *et al.*, 2002) como de *P. vivax* (SOARES *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2009; MEHRIZI *et al.*, 2009), como o mais importante alvo da resposta imune adquirida e protetora em humanos, evidências indicam que a região N-terminal da proteína MSP-1 de ambos patógenos, são capazes de serem reconhecidos pelo sistema imune de indivíduos que residem em áreas endêmicas (em destaque a proteína ICB2-5 [União de 5 blocos do alelo Belém de PvMSP-1] e o bloco 2 em ambas as espécies).

Além disso, foi observado que os anticorpos naturalmente adquiridos reconhecem com mais frequência antígenos que compunham esses blocos variáveis quando comparados a antígenos que representam blocos conservados (FRUH *et al.*, 1991; TOLLE *et al.*, 1993; NOGUEIRA *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2007), no qual a região que representa o bloco 2 é considerada o principal alvo da imunidade clínica contra a malária causada por *Plasmodium falciparum* (CONWAY *et al.*, 2000; POLLEY *et al.*, 2003).

Os estudos desenvolvidos para o bloco 2 da MSP-1 tem sido desenvolvidos para *P. falciparum* (SOWA *et al.*, 2001; CAVANAGH *et al.*, 2004; GALAMO *et al.*, 2009; NORANATE *et al.*, 2009; BHARTI *et al.*, 2012). Apenas um estudo no Brasil trabalhou com antígenos recombinantes oriundos do bloco 2 de *P. vivax* (BASTOS *et al.*, 2007), na qual foi analisada os padrões de diversidade de sequências em isolados presentes em uma comunidade do Acre para os blocos variáveis 2, 6 e 10 da PvMSP-1 e em seguida foi avaliada presença de anticorpos contra um painel de proteínas recombinantes correspondentes dos mesmos blocos e para MSP-1₁₉. Para o bloco 2 da PvMSP-1 foram construídas 6 proteínas recombinantes, esses antígenos recombinantes foram expressos a partir do DNA extraídos de seis isolados de

P. vivax identificados em Rondônia (PUTAPORNTIP *et al.*, 2002) no qual representam todo o repertório de sequências conhecidas, encontrado em isolados brasileiros.

Bastos e colaboradores (2007) utilizaram a metodologia de produção de proteínas recombinantes com a utilização de iniciadores que anelavam as regiões conservadas que flanqueiam o bloco 2 considerado altamente polimórfico. No presente estudo, foi realizada a construção de antígenos recombinantes específicos das regiões do bloco 2 de PvMSP-1, utilizando ferramentas de bioinformática para identificar os possíveis epítomos de células B e aplicação da tecnologia de construção através de genes sintéticos. Esses foram os primeiros antígenos do bloco 2 (polimórfico) e ICB1 (conservado) de PvMSP-1, identificados no estado do Amazonas (SOARES *et al.*, 2010) a serem construídos utilizando essa técnica. Estudo semelhante ao nosso foi realizado por Bueno e colaboradores (2011) com a proteína AMA-1 de *P. vivax*, no qual foi identificados epítomos de células B e construído peptídeo sintético (DII) de uma região da proteína, após análise em soros de indivíduos com malária, observou-se que o peptídeo foi altamente antigênico, no qual foi reconhecido por uma alta prevalência de anticorpos específicos, dessa maneira sugerindo futuramente seu possível uso em estudos pré-clínicos (BUENO *et al.*, 2011).

As regiões gênicas utilizadas neste estudo foram otimizadas para expressão proteica em *Escherichia coli*, buscando assim evitar o viés de códons existente entre a origem eucariota e o destino procarioto da informação. As proteínas construídas foram expressas na forma solúvel, onde a P1 apresentou a massa molecular esperada em SDS-PAGE. Entretanto, as duas proteínas correspondentes à porção polimórfica da MSP1 (P2 e P3) apresentaram massas moleculares acima do previsto no programa Protparam (mesmo o sequenciamento dos genes apresentando como resultado sequências identificadas as solicitadas para síntese).

A partir de uma análise no programa IUPred, observou-se que este fato estava relacionado à estrutura das proteínas, onde verificou-se que essas eram intrinsecamente não estruturadas (IUPs). Esse tipo de proteína não apresenta estrutura tridimensional bem definida, o que poderia ter levado a uma alteração na massa molecular aparente da proteína. A P1 não exibiu características de

IUPs. Observação semelhante foi relatada no trabalho de Cowan e colaboradores (2011), em que foi produzida uma proteína recombinante composta por diversas regiões do bloco 2 da MSP-1 de *Plasmodium falciparum*. Neste trabalho, a massa molecular aparente da proteína recombinante foi quase o dobro da esperada e estimada por espectrometria de massa. Os autores sugeriram que as sequências do bloco 2 possuem domínios de IUPs, o que levou a esta discrepância entre a massa molecular esperada e a observada.

Como dito anteriormente, a produção das proteínas recombinantes correspondente ao Bloco 2 e a ICB1 se deu a partir de um estudo preliminar que determinou a frequência alélica do Bloco 2 de PvMSP-1 nos isolados em Manaus (Soares *et al.*, 2010). Neste, foram identificados sete haplótipos do Bloco 2 entre os isolados circulantes no mesmo período de estudo. No presente estudo, duas proteínas produzidas correspondiam ao domínio variável identificados como *Belém* e uma ao haplótipo 3 (Figura 9).

Na investigação da influência da diversidade genética do Bloco 2, a P2 (semelhante ao *Belém*), e oriunda do haplótipo mais circulante na área endêmica de Manaus, também foi a mais reconhecida pelos respondedores sintomáticos residentes da mesma área, enquanto que um dos haplótipos menos circulantes (P3) foi pouco reconhecida. Desta maneira, sugerindo que o número de respondedores a uma variante pode estar relacionada a prevalência desta em uma dada região.

Na área endêmica de Rio Pardo, a frequência de respondedores para ambas as proteínas foi evidente. A comunidade de Rio Pardo se caracteriza por apresentar pouca influência no processo migratório e com índice parasitário anual (IPA) na ordem de 50 casos por mil habitantes, além de apresentar uma área endêmica de malária mais estável possibilitando a identificação de indivíduos portadores de infecções assintomáticas na área (VERSIANI *et al.*, 2013). Dispondo-se da reatividade dos indivíduos assintomáticos nessa área, verificou-se que a P3 foi mais reconhecida que a P2. A determinação da frequência alélica dos isolados na comunidade de Rio Pardo não foi realizada devido às dificuldades operacionais. Mas o resultado da sorologia contra estes antígenos pode ser uma evidência de uma diversidade de haplótipos circulantes na área diferente de Manaus (visto que os pacientes sintomáticos

apresentaram uma maior reatividade a P3 quando comparado ao grupo de Manaus), levando à suposição de uma resposta variante-específica as cepas da área. No entanto, no estudo realizado por Bastos e colaboradores em Acrelândia/AC, não foi encontrada nenhuma associação evidente entre a presença de uma dada sequência no período do estudo e a proporção de respondedores. Dentre as hipóteses sugeridas pelos autores, a mais plausível seria a subdetecção dos haplótipos circulantes (não foi analisada a presença de infecções multiclonais, ou seja, mais de um haplótipo em uma mesma amostra) e a existência de outras variantes ocorrentes no intervalo das coletas sanguíneas podem ser uma explicação para esta baixa correlação.

A maioria dos soros dos indivíduos avaliados neste estudo, tanto do grupo assintomático como o sintomático nas duas aéreas (Manaus e Rio Pardo) reconheceram a proteína ICB2-5. Um dos motivos para tal fato poderia estar relacionado ao tamanho do antígeno, pois a ICB2-5 é formada pela união de três blocos conservados (1,3 e 5) e dois blocos variáveis (2 e 4) do alelo Belém da *PvMSP-1* (Nogueira *et al.*, 2006). Enquanto que as demais proteínas correspondem somente ao bloco 2 e a ICB1 da *PvMSP-1*, sendo então compostas por regiões menores em relação a ICB2-5.

Além disso, observou-se uma maior prevalência de respondedores IgG contra a ICB2-5 na população de Manaus em relação a Rio Pardo. Esse mesmo perfil foi observado para a proteína P2. A prevalência no reconhecimento dos indivíduos de Manaus aos antígenos pode ser explicada pelo fato de que, como dito anteriormente, a comunidade de Rio Pardo situa-se aproximadamente a 160 km da capital, consistindo de uma área endêmica de malária mais estável e com pouca influência de processo migratório. Enquanto que em Manaus, a população com malária é atendida pela Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), a qual atende as áreas endêmicas situadas por toda a periferia da cidade, apresentando, portanto, um fluxo mais intenso de pessoas.

Outro fato observado na prevalência de respondedores aos antígenos produzidos foi com relação às proteínas referentes às regiões variáveis (P2 e P3) do bloco 2, no qual foram mais reconhecidas em comparação a P1 (ICB 1 bloco conservado). Dados similares também foram observados por Bastos e colaboradores (2007), onde os maiores níveis de anticorpos IgG foram

detectados contra o antígeno BP13-2, o qual é semelhante a P3 do nosso estudo. Além disto, foi observado uma correlações significativas encontradas entre níveis de IgG e tempo de residência na Amazônia, mostrando que a exposição cumulativa a malária prediz a presença e os maiores níveis de anticorpos contra no mínimo um domínio variável da PvMSP-1, enquanto a exposição recente malária foi um forte preditor da presença e de maiores níveis de anticorpos IgG a PvMSP19. Estes dados demonstram a influência da diversidade genética do MSP1 de *P. vivax* na aquisição natural de anticorpos contra os domínios polimórficos.

A partir deste conjunto de proteínas recombinantes correspondentes às extensões conservadas e polimórficas do PvMSP-1 ficou demonstrado que a prevalência da resposta humoral de indivíduos com infecção aguda pelo *P. vivax* é dirigida contra os blocos polimórficos deste antígeno. Além disso, fica demonstrado que a prevalência dos anticorpos IgG provavelmente reconhecem as sequências polimórficas dos antígenos e não as regiões conservadas que as flanqueiam que são distribuídas por todas as variantes do mesmo bloco (resaltando que Soares e colaboradores (1997) e Bastos (2007) utilizaram para as análises sorológicas antígenos compostos por regiões polimórficas e conservadas na mesma sequência).

Recentemente, foi mostrado que IgG3 anti-ICB2-5 seria a subclasse associada à imunidade clínica desenvolvida por indivíduos portadores de infecção pelo *P. vivax* assintomáticas. Ao mesmo tempo, a presença de níveis menores IgG2 anti-ICB2-5 representaria a transição para este estado de premunição à malária (VERSIANI *et al.*, 2013). Está bem estabelecido que os anticorpos citofílicos e opsonizadores (principalmente IgG3) são indispensáveis na imunidade protetora contra os estágios sangüíneos do parasita, através do mecanismo de inibição de invasão do merozoito no eritrócito dependente de anticorpo, ADCI - *antibody dependent cellular inhibition* (DRUILHE & PERIGNON, 1994, 1997; BOUHAROUN-TAYOUN *et al.*, 1995; JAFARSHAD *et al.*, 2007). As extensões polimórficas do MSP1, como por exemplo, o Bloco 2 de PvMSP-1, são fracamente imunogênicas e dependentes de exposição sucessiva ao parasita (Bastos *et al.*, 2007). Desta forma anticorpos protetores e dirigidos contra extensões polimórficas do Bloco 2 são adquiridos em respostas de vida curta e dependentes de exposição sucessiva ao parasita como ocorre

em infecções assintomáticas (Polley *et al.*, 2003; Cavanagh *et al.*, 2004). A predominância da subclasse IgG3 contra as proteínas ICB2-5, P3, P2 e P1 e a correlação entre os assintomáticos suporta a conclusão de que a região do bloco 2 MSP-1 é um alvo de imunidade protetora contra *P. vivax*. Antígenos polimórficos, como os que representam o bloco 2 da PfMSP-1 induz preferencialmente níveis elevados de IgG3 (CAVANAGH *et al.*, 2004).

Além do predomínio da subclasse IgG3 nos soros respondedores, a frequência de respondedores IgG3 foi ainda maior quando as respostas contra as proteínas foram combinadas *in silico* (P2-P3 ou P1-P2-P3). As proteínas desenvolvidas aqui foram correspondentes apenas a dois haplótipos circulantes nas áreas de estudo e a frequência dos respondedores IgG3 foi muito próxima à frequência observada contra ICB2-5, sugerindo que a expansão do repertório de proteínas deve diminuir o efeito do polimorfismo do Bloco 2 e aumentar a abrangência da resposta imune de anticorpos protetores IgG3 contra o antígeno MSP1. Portanto, o desenvolvimento de um repertório de proteínas correspondentes ao Bloco 2 será capaz de expandir o espectro de soros reagentes e provavelmente diminuir o efeito da diversidade genética do antígeno MSP1. Dessa maneira, os resultados aqui obtidos servem como base para novas construções gênicas e formulação de quimeras com a união desses antígenos para geração de uma futura vacina para malária causada por *Plasmodium vivax*. Entretanto, mais estudos com essas proteínas precisam ser realizados para certificar o seu potencial imunogênico.

CONCLUSÃO

As proteínas recombinantes (P1, P2 e P3) foram menos reconhecidas por anticorpos IgG de indivíduos expostos a malária que a proteína ICB2-5, porém, entre elas a frequência e os níveis anticorpos IgG contra proteínas das regiões variáveis da PvMSP-1 foram maiores que os da proteína da região conservada P1.

Foi observada uma inversão de reconhecimento entre os grupos de sintomáticos e assintomáticos, onde o primeiro apresentou maior reação para a P2 quando comparada a P3. O segundo apresentou relação inversa.

Em Manaus, foi observada uma reatividade maior a proteína P2, a qual representa o haplótipo mais prevalente na área (como observado em estudos anteriores), o que pode indicar uma ligação entre a prevalência de respondedores e dos isolados circulantes na área. Porém permanece a necessidade de análises futuras

Houve predomínio de respondedores IgG3. Isto foi maior ainda quando as respostas contra as proteínas foram combinadas *in silico* (P2-P3 ou P1-P2-P3). Isto sugere que a expansão do repertório de proteínas deve diminuir o efeito do polimorfismo do bloco 2 sobre os respondedores e aumentar a abrangência da resposta imune de anticorpos protetores IgG3 contra o antígeno MSP1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexandre, MA; Ferreira, CO; Siqueira, AM; Magalhães, BL; Mourão, MPG; Lacerda, MV; Alecrim, MGC; Alecrim, W. **Severe Plasmodium vivax Malaria, Brazilian Amazon.** *Emerging Infectious Disease* 16(10): 1611, 2010.

Artavanis-Tsakonas, K; Riley, EM. **Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.** *Journal of Immunology* 169: 2956–2963, 2002.

Augustine, AD; Hall, BF; Leitner WW; Mo, AX; Wali, TM; Fauci, AS. **NIAID workshop on immunity to malaria: addressing immunological challenges.** *Nature Immunology* 10(7): 673-678, 2009.

Babon, JJ; Morgan, WD; Kelly, G; Eccleston, JF; Feeney, J; Holder, AA. **Structural studies on Plasmodium vivax merozoite surface protein-1.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 153: 31-40, 2007.

Baird, J.K. **Chloroquine resistance in Plasmodium vivax.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 4075-83, 2004.

Barcus, MJ; Basri, H; Picarima, H; Manyakori, CS; Elyazar, I; Bangs, MJ; Maguire, BJD; Baird, JK. **Demographic risk factors for severe and fatal vivax and falciparum malaria among hospital admissions in northeastern Indonesian papua.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 984–991, 2007.

Bastos, MS; Da Silva-Nunes, M; Malafronte, Hoffmann, EHE; Wunderlich, G; Moraes, SL; Ferreira, MU. **Antigenic polymorphism and naturally acquired**

antibodies to Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 in rural Amazonians. *Clinical Vaccine Immunology* 14(10): 1249-1259, 2007.

Bharti, PK; Shukla, MM; Sharma, YD; Singh, N. **Genetic diversity in the block 2 region of the merozoite surface protein-1 of Plasmodium falciparum in central India.** *Malaria Journal* 11:78, 2012.

Blackman, MA; Gerhard-Burgert, H; Woodland, DL; Palmer, ED; Kappler, JW; Marrack, P. **A role for clonal inactivation in T cell tolerance to Mis-1^a** *Nature* 345: 540-542, 1990.

Blackman, MJ; Scott-Finnigan, TJ; Shai, S; Holder, AA. **Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein.** *Journal of Experimental Medicine* 180(1): 389-93, 1994.

Bongfen, S; Torgler, R; Romero, JF; Renia, L; Corradin, G. **Plasmodium berghei-infected primary hepatocytes process and present the circumsporozoite protein to specific CD8 T cells in vitro.** *Journal of Immunology* 178, 7054–63, 2007.

Bouharoun-Tayoun, H; Oeuvray, C; Lunel, F; Druilhe, P. **Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages.** *Journal of Experimental Medicine* 182: 409–418, 1995.

Boutin, JP; Pradines, B; Pages, F; Legros, F; Rogier, C; Migliani, R. **Epidemiology of Malaria.** *La Revue du praticien* 559(8): 833-40, 2005.

Braga, EM; Barros, RM; Reis, TA; Fontes, CJ; Morais, CG; Martins, MS; Krettli, AU. **Association of the IgG response to Plasmodium falciparum merozoite**

protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66: 461-466, 2002.

Branch, OH; Udhaykumar, V; Hightower, AW; Oloo, AJ; Hawey, WA; Nahelen, BL; Bloland, PB; Kaslow, DC; Lal, AA. **A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kilodalton domain of 52 *Plasmodium falciparum* in pregnant woman and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58:211-219, 1998.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Ações de Controle da Malária-Manual para Profissionais de Saúde na Atenção Básica.** Brasília, 2006.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Série A. Normas e Manuais Técnicos- 1 ed.-** Brasília, 2010.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos- 2 ed.-** Brasília, 2009.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação Epidemiológica da Malária na Amazônia.** Brasília, 2011b.

Brasil, Ministério da Saúde. Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica-SIVEP/ Malária. Disponível: http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp. Acessado em 14 de outubro de 2012, 2012.

Brasil, Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Relatório de Situação: Amazonas** - 5. ed.- Brasília, 2011a.

Bueno, LL; Lobo,FP; Moraes, CG; Mourão, LC; Ávila, RAM, Soares, IS, Fontes, CJ, Lacerda, MV, Olórtégui, CC; Bartholomeu, DC, Fujiwara, RT; Braga, EM. **Identification of a Highly Antigenic Linear B Cell Epitope within *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1).** *PloS One* 6(6): e21289.

Cavanagh, DR; Dodoo, D; Hviid, L; Kurtzhals, JA; Theander, TG; Akanmori, BD; Polley, S; Conway, DJ; Koram, K; McBride, JS. **Antibodies to the N-terminal block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are associated with protection against clinical malaria.** *Infection and Immunity* 72(11): 6492-502, 2004.

Chenet, SM; Tapia, LL; Escalante, AA; Durand, S; Lucas, C; Bacon, DJ. **Genetic diversity and population structure of genes encoding vaccine candidate antigens of *Plasmodium vivax*.** *Malaria Journal* 11: 68, 2012.

Cimerman, S; Cimerman, B; Lewi, DS. **Avaliação da relação entre parasitoses intestinais e fatores de risco para o HIV em pacientes com AIDS.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32(2): 181-185, 1999.

Coban, C; Ishii, KJ; Horri, T; Akira, S. **Manipulation of host innate immune responses by the malaria parasite.** *Trends in Microbiology* 15(6): 271-278, 2007.

Coban, C; Ishii, KJ; Kawai, T; Hemmi, H; Sato, S; Uematsu, S; Yamamoto, M; Takeuchi, O; Itagaki, S; Kumar, N; Horii, T; Akira, S. **Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin.** *Journal of Experimental Medicine* 201: 19–25, 2005.

Coelho-Castelo, AAM; Trombone, APF; Rocha, CD; Lorenzi, JCC. **Resposta imune a doenças infecciosas.** *Medicina (Ribeirão Preto)* 42(2): 127-42, 2009.

Conway, D; Cavanagh, DR; Tanabe, K; Roper, C; Mikes, ZS; Sakihama, N; Bojang, KA; Oduola, AMJ; Kremsner, PG; Arnot, DE; Greenwood, BM; McBride, J. **A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses.** *Nature Medicine*, v.6, p.689-692, 2000.

Cooper, JA. **Merozoite surface antigen-1 of *Plasmodium*.** *Parasitology today* 9: 50-4, 1993.

Cowan, GJM; Creasey, AM; Dhanasarnsombut, K; Thomas, AW; Remarque, EJ; Cavanagh, DR. **A malaria vaccine based on the polymorphic clock 2 region of the MSP-1 that elicits a broad serotype-spanning immune response.** *PloS, One* 6(10): e26616, 2011

Cox-Singh, J; Davis, TM; Lee, KS; Shamsul, SS; Matsop, A; Ratnam, S; Rahman, HA; Conway, DJ; Singh, B. ***Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.** *Clinical Infectious Disease* 46(2): 165–171, 2008.

Crompton, PD; Kayala, MA; Traore, B; Kayentao, K; Ongoiba, A; Weiss, GE; Molina DM; Burk CR, Waisberg M; Jasinskas, A; Tan, X; Doumbo, S; Doumbo, D; Kone, Y; Narum, DL; Liang, X; Doumbo, OK; Miller, LH; Doolan,

DL; Baldi, P; Felgner, PL; Pierce, SK; Affiliations. **A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 29: 1-6.

David, PH; Del Portillo, HA; Mendis, KN. **Plasmodium vivax malaria: parasite biology defines potential targets for vaccine development.** *Biology of the Cell* 64(2): 251-280, 1988.

Del Portillo, HA; Longacre, S; Khouri, E; David, PH. **Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(9): 4030, 1991.

Doolan, DL; Dobano, C; Baird, JK. **Acquired immunity to malaria.** *Clin Microbiol Rev* 22(1): 13-36, 2009.

Douglas, NM; Nstey, NM; Buffet, PA; Poespoprodjo, JR; Yeo, TW; White, NJ; Price, RN. **The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria.** *Malaria Journal* 11: 135, 2012.

Druilhe, P; Perignon, JL. **Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stages in humans.** *Immunology Letters* 41: 115-120, 1994.

Egan, AE; Morris, J; Barnish, G; Allen, S; Greenwood, BM; Kaslow, DC; Holder, A; Riley, EM. **Clinical immunity *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19 kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen PfMSP- 1.** *Journal of Infectious Disease* 173: 765-769, 1996.

Fernandez-Becerra, C; Sanz, S; Brucet, M; Stanisic, DI; Aalves, PF; Camargo, EP; Alonso, PL; Mueller, I; Del Portillo, HA. **Naturally-acquired humoral immune responses against the N- and C-termini of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay.** *Malaria Journal* 9: 29e, 2010.

Ferreira, MU; Da Silva Nunes, M; Wunderlich, G. **Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites.** *Clinical Vaccine Immunology* 11(6): 987, 2004.

Galamo, CD; Jafarshad, A; Blanc, C; Druilhe, P. **Anti-MSP1 block 2 antibodies are effective at parasite killing in an allele-specific manner by monocyte-mediated antibody-dependent cellular inhibition.** *Journal of Infectious Disease* 199(8): 1151-4, 2009.

Gibson, HL; Tucker, JE; Kaslow, DC; Krettli, AU; Collins, E; Kiefer, MC; Bathust, LC; Barr, PJ. **Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 50: 325-34, 1992.

Good MF. **Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies.** *Trends Parasitol* 21: 29-34. 2005

Good, MF; Doolan, DL. **Malaria vaccine design: immunological considerations.** *Immunity* 33(4):555-66, 2010

Greenwood, BM; Fidock, DA; Kyle, DE; Kappe, SH; Alonso, PL; Collins, FH; Duffy, P. **Malaria: progress, perils, and prospects for eradication.** *Journal of Clinical Investigation* 118(4):1266–1276, 2008.

Guerra, CA; Howes, RE; Patil, AP; Gething, PW; Van Boeckel, TP; Temperley, WH; Kabaria, CW; Tatem, AJ; Manh, BH; Elyazar, IRF; Baird JK; Snow, RW; Hay, SI. **The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009.** *PloS Neglected Tropical Diseases* 4:e774, 2010.

Harlow, E; Lane, D. **Antibodies: A Laboratory Manual.** *Cold Spring Harbor Laboratory*, p. 726, 1988.

Harris, PK; Yeoh, S; Dluzewski, AR; O'Donnell, RA; Withers-Martinez, C; Hackett, Fiona; Bannister, LH; Mitchell, GH; Blackman, MJ. **Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase.** *PLoS pathogens* 1(3):e29, 2005.

Herrera, S; Corradin, G; Arévalo-Herrera, M. **Focus on *Plasmodium vivax*: An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine.** *Trends in Parasitology* 23(3): 122-128, 2007.

Hirunpetcharat, C; Good, M.F. **Deletion of *Plasmodium berghei*-specific CD4⁺ T cells adoptively transferred into recipient mice after challenge with homologous parasite.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1715–1720, 1998.

Holder, A. **The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria.** *Parasitology* 136(12): 1445-1456, 2009.

Holder, A.; Freeman, R. **Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody.** *Journal of Experimental Medicine* 156(5): 1528, 1982.

Ja Kiewicz, E; Graczyk, J; Rydzak, J. **Proteins involved in invasion of human red blood cells by malaria parasites.** *Post py higieny i medycyny do wiadczalnej (Online)* 64: 617, 2010.

Jafarshad, A; Dziegiel, MH; Lundquist, R; Nielsen, LK; Singh, S; Druilhe, P. **A Novel Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Mechanism Involved in Defense against Malaria Requires Costimulation of Monocytes Fcγ-RII and Fcγ-RIII.** *Journal of Immunology* 178: 3099–3106, 2007.

Kochar, DK; Das, A; Kochar, SK; Saxena, V; Sirohi, P; Garg, S; Kochar, A; Khatri, P; Gupta, V. **Severe Plasmodium vivax malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.80, p.194-198, 2009.

Koussis, K; Withers-Martinez, C; Yeoh, S; Child, M; Hackett, F; Knuepfer, E; Juliano, L; Woehlbier, U; Bujard, H; Blackman, MJ. **A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion.** *The EMBO journal* 28(6): 725-35, 2009.

Krishnegowda G; Haijar, AM; Zhu, J; Douglass, EJ; Uematsu, S; Akira, S; Woods, AS; Gouda DC. **Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glyco-sylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity.** *Journal Biology Chem* 280(9): 8606-16. 2005.

Langhorne J; Cross C; Seixas E; Li C; von der Weid T. **A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Proc.* 95 (4):1730-4.1998.

Langhorne J; Ndungu FM; Sponaas AM, Marsh K. **Immunity to malaria: more questions than answers.** *Nature Immunology*. 9:725–732. 2008.

Langhorne J; Quin SJ; and Sanni LA. **Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cyto-kines in protection and pathology.** *Chem Immunol* 80: 204-228. 2002.

Lee, KS; Cox-Singh, J; Brooke, G; Matusop, A; Singh, B. **Plasmodium knowlesi from archival blood films: further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo.** *International Journal for Parasitology*, v.39, n.10, p.1125–1128, 2009.

Machado, P; Mendes, C; Rosário, VE; Arez AP. **A contribuição dos polimorfismos humanos do eritrócito na proteção contra a malária.** *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 1(4): 85-96, 2010.

McCall MB and Sauerwein RW. **Interferon- γ : central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria.** *Journal of Leukocyte Biology* 88: 1131-1143. 2010.

Meding, SJ; Langhorne, J. **CD4⁺ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*.** *Europe Journal of Immunology* 21: 1433–38, 1991.

Mehrizi, AA; Zakeri, S; Salmanianb, A; Zanati, MH; Djadid, ND. **IgG subclasses pattern and high-avidity antibody to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in an unstable hypoendemic region in Iran.** *Acta Tropical* 12: 1-7, 2009.

Mendis, K; Sina, BJ; Marchesini, P; Carter, R. **The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 64: 97-106, 2001.

Miller, LH; Baruch, DI; Marsh, K; Doumbo, OK. **The pathogenic basis of malaria.** *Nature* .415: 673-79, 2002.

Moore, SA; Surgey, EGE; Cardwgan, AM. **Malaria Vaccines: where are we and where are we going?.** *The Lancet Infections Diseases* 2: 737-743, 2002.

Mota, MM; Pradel, G; Vanderberg, JP; Hafalla, JCR; Frevert, U; Nussenzweig, RS; Nussenzweig, V; Rodriguez A. **Migration of *Plasmodium* through cells before infection.** *Science* 291: 141-144, 2001.

Nogueira, PA; Alves, FP; Fernandez-Becerra, C; Pein, O; Santos, NR; Pereira da Silva, LH; Camargo, EP; Del Portillo, HA. **A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1.** *Infection and immunity* 74(5): 2726, 2006.

Noranate, N; Prugnolle, F; Jouin, H; Tall, A; Marrama, L; Sokhna, C; Ekala, MT; Guillotte, M; Bischoff, E; Bouchier, C; Patarapotikul, J; Ohashi, J; Trape, J-F; Rogier, C; Mercereau-Puijalon, O. **Population diversity and antibody selective pressure to *Plasmodium falciparum* MSP1 block2 locus in an African malaria-endemic setting.** *BMC Microbiology* 9: 1471-2180, 2009.

Nwuba, RI; Sodeinde, O; Anumudu, CI; Omosun, YO; Odaibo, AB; Holder, AA; Nwagwu, M. **The human immune response to *Plasmodium falciparum* includes both antibodies that inhibit merozoite surface protein 1**

secondary processing and blocking antibodies. *Infection and immunity* 70(9): 5328, 2002.

O'donnell, RA; De Koning-Ward, TF; Burt, RA; Bockarie, M; Reeder, JC; Cowman, AF; Crabb, BS. **Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-119 are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria.** *Journal of Experimental Medicine* 193(12): 1403, 2001.

Oliveira-Ferreira, J; Lacerda, MVG; Brasil, P; Ladislau JLB; Tauil PL; Daniel-Ribeiro CT. **Malaria in Brazil: an overview** *Malaria Journal* 9:115, 2010.

Omer, FM; de Souza, JB; Corran, PH; Sultan, AA; Riley, EM. **Activation of transforming growth factor beta by malaria parasite-derived metalloproteinases and a thrombospondin-like molecule.** *Journal of Experimental Medicine* 198(12):1817-27, 2003.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Situação Epidemiológica: Malária 2009.** Disponível em: <http://www.new.paho.org/bra/index.php>. Acesso em: 21/10/2011.

Organização Mundial de Saúde (OMS). **World malaria report 2009.** World Health Organization (WHO), Library Cataloguing-in-Publication, 2009. Geneva. Disponível em: < <http://www.who.int/malaria/publications> > acessado em: 12 de julho de 2010.

Organização Mundial de Saúde (OMS). **World malaria report 2010.** World Health Organization (WHO), Library Cataloguing-in-Publication, 2010. Geneva. Disponível em: < <http://www.who.int/malaria/publications> > acessado em: 7 de março de 2011.

Parroche, P; Lauw, FN; Goutagny, N; Latz, E; Monks, BG; Visintin, A; Halmen, KA; Lamphier, M; Olivier, M; Bartholomeu, DC; Gazzinelli, RT; Golenbock, DT. **Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9.** *Proceedings of the National Academy of Science USA* 104(6): 1919–24, 2007.

Perkins DJ; Were T; Davenport GC; Kempaiah P; Hittner JB; Ong'echa JM. **Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis.** *International Journal Biology Science* (9):1427-42.

Pierce, S.K. **Understanding B cell activation: from single molecule tracking, through Tolls, to stalking memory in malaria.** *Immunology. Res.* 43: 85-97.2009.

Polley, SD; Tetteh, KK; Cavanagh, DR; Pearce, RJ; Lloyd, JM; Bojang, KA; Okenu, DM; Greenwood, BM; McBride, JS; Conway, DJ. **Repeat sequences in block 2 of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 are targets of antibodies associated with protection from malaria.** *Infectious Immunity* 71(4):1833-1842, 2003.

Price, RN; Tijitra, E; Guerra, CA; Yeung, S; White, NJ; Anstey, NM. **Vivax malaria: Neglected and not benign.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77(6):79–87, 2007.

Putaporntip, C; Jongwutiwes, S; Sakihama, Ferreira, MU; Khol, Weon-Gyu; Kaneko, A; Kanbara, H; Hattori, T; Tanabe, K. **Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 locus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(25): 16348-353, 2002.

Razakandrainibe, R; Pelleau, S; Grau, GE; Jambou, R. **Antigen presentation by endothelial cells: what role in the pathophysiology of malaria?** *Cell Press. Trends in Parasitology* 28(4):151-60, 2012.

Rey, L. **Bases da Parasitologia Medica.** 2 ed. Guanabara Koogan, p.106-136, 2002.

Riley EM; Wahl S; Perkins DJ; Schofield L. **Regulating immunity to malaria.** *Parasite Immunology* (1-2):35-49. 2006.

Sabchareon, A; Burnouf, T; Ouattara, D; Attanath, P; Bouharoun-Tayoun, H; Chantavanich, P; Foucault, C; Chongsuphajasiddhi, T; Druilhe, P. **Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45(3): 297-308, 1991.

Santos-Ciminera, PD; Roberts, DR; Alecrim, MGC; Monica R.F. Costa, MRF; Quinnan, GV. **Malaria diagnosis and hospitalization trends, Brazil.** *Emerging infectious diseases* 13(10): 1597, 2007.

Saraiva, MGG; Amorim, RDS; Moura, MAS; Martinez-Espinosa, FE; Barbosa, MGV. **Expansão urbana e distribuição espacial da malária no município de Manaus, Estado do Amazonas.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42: 515-522, 2009.

Schwenk RJ; Richie TL. **Protective immunity to pre-erythrocytic stage malaria.** *Trends Parasitology* (7):306-14 2011.

Sinnis, P; Sim, BKL; **Cell invasion by the vertebrate stages of Plasmodium.** *Trends in Microbiology* 5(2): 52-58, 1997.

Soares, A.S.G. **Análise da estrutura gênica e a diversidade alélica de isolados de *Plasmodium vivax* circulantes no entorno de Manaus baseando-se em três sequências gênicas correspondentes aos blocos polimórficos 2,6 e 10 do gene MSP1.** Dissertação Mestrado. Biologia de Agentes infecciosos e parasitários - Universidade Federal do Amazonas, Manaus- AM, 2010.

Soares, IS; Cunha, MG; Silva, MN; Souza, JM; Del Portillo, HA; Rodrigues, MM. **Longevity of natural acquired antibody responses to the Nand C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1.** *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 60: 357-363,1999.

Souza, JB; Riley, E M. **Cerebral Malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis.** *Microbes and Infection* 4: 291-300, 2002.

Sowa, KMP; Cavanagh, DR; Creasey, AM; Raats, J; McBride. JS; Sauerwein, R; Roeffen, WF; Arnot, DE. **Isolation of a monoclonal antibody from a malaria patient-derived phage display library recognising the Block 2 epitope of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1.** *Molecular & Biochemical Parasitology* 112: 143-149, 2001.

Stevenson MM and Riley EM. **Innate immunity to malaria.** *Nature immunology*; 4: 169-180. 2004.

Stevenson MM, Ing R, Berretta F, Miu J. **Regulating the adaptive immune response to blood-stage malaria: role of dendritic cells and CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells.** *International Journal Biology Science*.7 (9):1311-22. 2011

Storti-Melo, LM; Souza-Neiras, WC; Cassiano, GC; Taveira, LC; Cordeiro, AJ; Couto, VS; Povia, MM; Cunha, MG; Echeverry, DM; Rossit, AR; Arevalo-Herreira, M; Herreira, S; Machado, RL. **Evaluation of the naturally acquired**

antibody immune response to the Pv200L N-terminal fragment of Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 in four areas of the Amazon Region of Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 84: 58-63, 2011.

Takala, SL; Coulibaly, D; Thera, MA; Batchelor, AH; Cummings, MP; Escalante, AA; Ouattara, A; Traoré, K; Niangaly, A; Djimdé, AA; Doumbo, OK; Plowe, CV. **Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development.** *Science Trans Medicine* 1: 25, 2009.

Tanabe, K; Mackay, M; Goman, M; Sacife, JG. **Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Molecular and Biological Evolution* 9: 381–393, 1987.

Tetteh, KKA; Conway, DJ. **A polyvalent hybrid protein elicits antibodies against the diverse allelic types of block 2 in *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1.** *Vaccine* 29: 7811-7817, 2011.

Tolle, R; Früh, K; Doumbo, O; Koita, O; N'Diaye, M; Fischer, A; Dietz, K; Bujard, H. **A prospective study of the association between the human humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stage antigen gp190 and control of malarial infections.** *Infection and Immunity* 61(1):40–47, 1993.

Versiani, FG, Almeida, MEM; Melo, GC; Versiani, FOL; Orlandi, PP; Mariúba, LAM; Soares, LA; Souza, LP; Monteiro, WM; Costa, FTM; Del Portillo, HA; Lacerda, MVG; Nogueira, PA. **Clinical protection from malaria is associated with high levels of IgG3 against the N-terminus of *Plasmodium vivax* merozoite surface antigen-1.** Submitted. 2013.

Weedall, GD; Conway, DJ. **Detecting signatures of balancing selection to identify targets of anti-parasite immunity.** *Trends in Parasitology* 26: 363–9, 2010.

Yazdani, SS; Mukherjee, P; Chauhan, VS; Chitnis, CE. **Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites.** *Current Molecular Medicine* 6:187-2003, 2006.

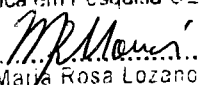


PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 3640.0.000.115-07, intitulado: **“Dinâmica das infecções maláricas em comunidades do Amazonas sob aspecto de marcadores moleculares de parasitas e do polimorfismo de proteínas candidatas a vacinas”**, tendo como Pesquisador Responsável Paulo Afonso Nogueira.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 22 de novembro de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFAM


Prof. Dr. Maria Rosa Lozano Borrás
Coordenadora

Anexo 02

38	-----LLLGYSKPPGHIKDDIGLEAFITK	KEIISNINKLISDENAKRGGSQST	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	-----GTGSI	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	113
02	-----LLLGYSKPPGHIKDDIGLEAFITK	KEIISNINKLISDENAKRGGSQST	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	-----GTGSI	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	150
58	-----SSGHKDDIGKLEAFITK	KEIISNINKLISDENAKRGGSQST	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	-----GTGSI	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	115
10a	SDKELDMLKKVVLGYR	KPLDNKDDIKLEAFITK	KEIISNINKLISDENAKRGGSQST	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	155
05	-----SSGHKDDIGKLEAFITK	KEIISNINKLISDENAKRGGSQST	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	-----GTGSI	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	135
80	DKELDMLKKVVLGYR	KPLDNKDDIKLEAFITK	KEIISNINKLISDENAKRGGSQST	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	136
19	-----NIKDDIGNLEAFITK	KEIISNINKLISDENAKRGGSQST	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	-----GTGSI	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	83
13	-----NIKDDIGNLEAFITK	KEIISNINKLISDENAKRGGSQST	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	-----GTGSI	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	119
15a	SDKELDMLKKVVLGYR	KPLDNKDDIKLEAFITK	KEIISNINKLISDENAKRGGSQST	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	137
13a	SDKELDMLKKVVLGYR	KPLDNKDDIKLEAFITK	KEIISNINKLISDENAKRGGSQST	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	173
38a	ELDMLKKVVLGYR	KPLDNKDDIKLEAFITK	KEIISNINKLISDENAKRGGSQST	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	144
15	SLTKELDMLKKVVLGYR	KPLDNKDDIKLEAFITK	KEIISNINKLISDENAKRGGSQST	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	167
06	-----LDNKKDDIGKLEAFITK	KEIISNINKLISDENAKRGGSQST	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	-----GTGSI	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	82
10	-----SLG--WRNYDGR--	NIFS	NTITNGIGAQTIDGHQPT	IASSETSSGSSVSSVSGSSGLSSSGTGSTGTG	ST	-----GTGSI	GNISPSQARAGSPSTGIDYNAKKIIFQ	PVYRTI	-----	52

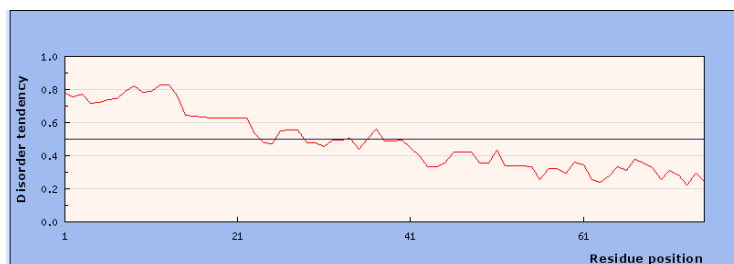
Alinhamento no programa clustal W e identificação dos epítomos de célula B no programa Bepiprep. Em amarelo está representada a região conservada da MSP1 de *P. vivax*. Em verde, azul e vermelho as regiões polimórficas. Os quadrados vermelhos representam os epítomos de células B. Neste estudo foram expressas a região correspondente à porção conservada e duas polimórficas.

UIPred

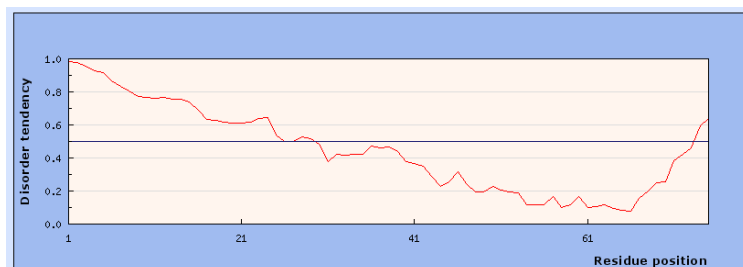
P1

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWIRPRDLQSDKELDMKKVVLGYRKPLDNIKDDI
GKLEAFIT-

Long disorder

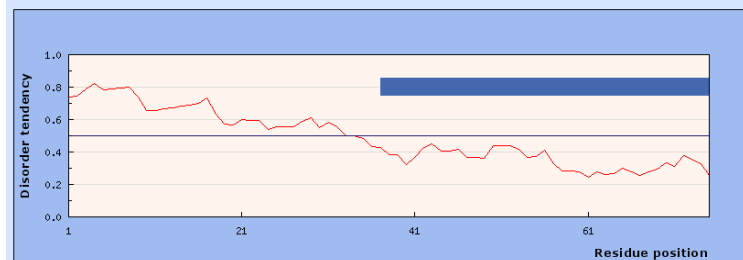


Short disorder



Structured region

```
>Unknwn  globular domains: 37-75
mrqshhhhhh gmasmtggqq mgrdlyddd kdrwirPRDL QSDKELDMKK VVLGYRKPL
DNIKDDIGKL EAFIT
```

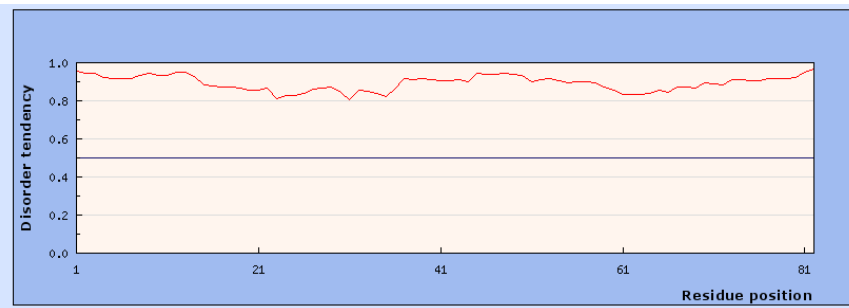


P2

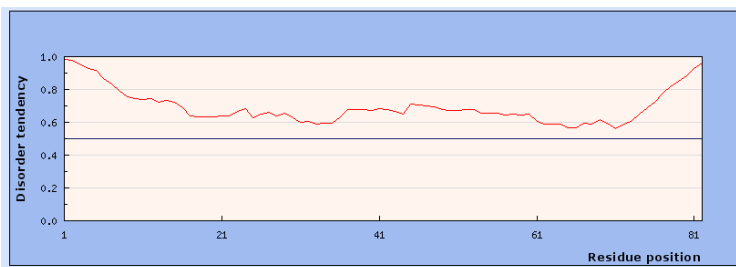
MRGS

HHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSAQNNAAQGSTGNTETGTQSSASSNTLSGGAGTTV
 VGTSSPAPAAPS-

Long disorder

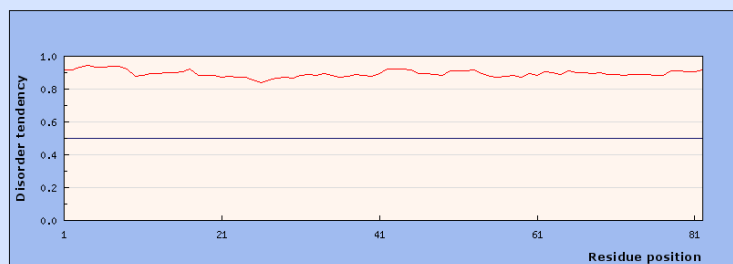


Short disorder



Structured region

```
>Unknown
mrgehhhhh gmaemtggq mrdlyddd kdrwgaqnn aagsgtnte vgtqseasn
tlsggagttv vgtssapaa ps
```

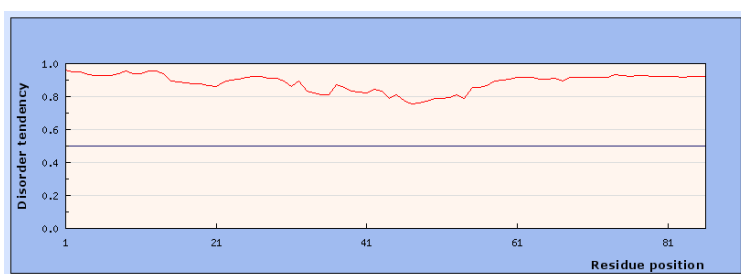


P3

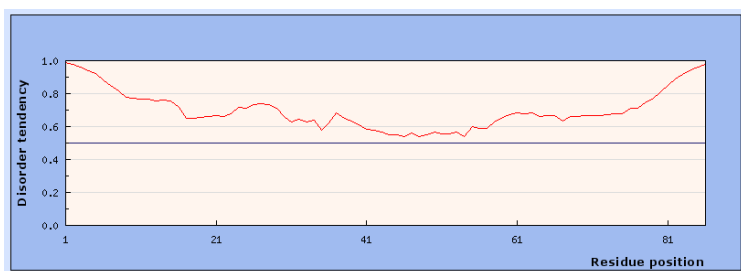
MRGS

HHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPSSRSAAGTMEFGSIAAASSETTQISGSSNSGSTGHGSSNS
GSSGTGSTGNGQS-

Long disorder

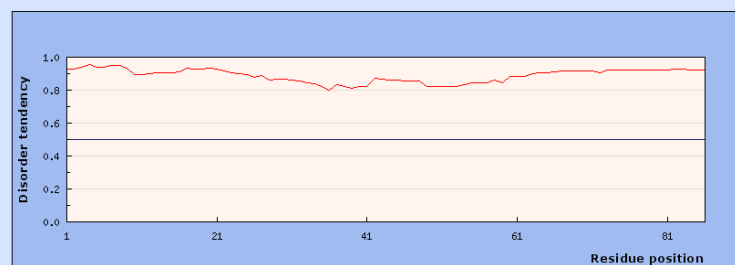


Short disorder



Structured region

```
>Unknown
mrghhhhhh gmasmtggqq mgrdlydddd kdpssrsaaq tmefgsiaaa seettqiegs
snegstghgs snegsegtgs tqngqs
```



**“PROTEÍNA 1” DE SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTO DE *Plasmodium vivax*: UMA
REVISÃO SOBRE SUA SOROEPIDEMIOLOGIA NO BRASIL**

**Maria Edilene Martins de Almeida^{1,2} Luis André Morais Mariuba³ Paulo Afonso
Nogueira³**

Resumo

A “Proteína 1” de Superfície de Merozoíto (MSP-1) tem sido intensivamente estudada com intuito de investigar seu potencial imunogênico. A estrutura da MSP-1 é constituída por blocos conservados intercalados por blocos polimórficos, apresentando padrões distintos a resposta humoral (IgG) para cada regiões proteica. A região C-terminal, representado pela proteína MSP1₁₉, foi intensamente investigada como indutora de uma resposta imune protetora. Em contraste, poucos estudos foram conduzidos utilizando a região N-terminal (representada pelo bloco 2 e ICB2-5). Neste artigo, são discutidos estudos que buscaram comparar o perfil da resposta imune frente a essas duas regiões da MSP-1 de *Plasmodium vivax* no Brasil. O aumento do conhecimento sobre a resposta imunológica que conferem proteção clínica para indivíduos que residem em áreas endêmicas para malária possibilitará avanços para o desenvolvimento de uma vacina eficaz.

Palavras-chave: *Plasmodium vivax*, MSP-1, Malária.

Abstract

Merozoite Surface Protein 1 (MSP-1) has been intensively studied in order to investigate its immunogenic potential. MSP-1 structure is constituted of conserved blocks interspersed with blocks polymorphic, having distinctive patterns humoral response (IgG) to protein regions each. The C-terminal region, represented by MSP1₁₉ protein has been intensely investigated as inducing a protective immune response. In contrast, few studies have been conducted using the N-terminal region (represented by block 2 and ICB2-5). In this article, we discuss studies that compared the profile of the immune response against MSP-1 (C-terminal and N-terminal region) of *Plasmodium vivax* in Brazil. Increased knowledge about the immune response that confer clinical protection to individuals residing in malaria endemic areas to enable advances in the development of an effective vaccine.

Key-Words: *Plasmodium vivax*, MSP1, Malaria.

¹ Parte da dissertação de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

² Bolsista FAPEAM do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

³ Pesquisador do Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ Amazônia, Rua Teresina, 476, Adrianópolis, Manaus, Amazonas, Brasil.

1. Introdução

A malária ainda representa um problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais no mundo. No Brasil, a maior parte dos casos são de infecções causadas por *Plasmodium vivax*, sendo que nos últimos anos vem sendo registrados padrões incomuns de complicações de malária causados por *P. vivax*, tornando-se este um motivo de preocupação, pois esta espécie apresenta uma ampla distribuição geográfica (GUERRA *et al.*, 2010) e por isso o controle da infecção pela intervenção no seu ciclo biológico faz-se necessário, porém, é difícil não só pelas condições socioeconômicas das populações que vivem em áreas de risco, mas por que envolve elementos como os vetores, cujo controle ou eliminação são racionalmente difícil de realizar.

Investimentos buscando uma mudança neste quadro vêm sendo realizados em diversos países tanto para a distribuição dos medicamentos utilizados para o tratamento desta doença como para o desenvolvimento de novas drogas e de vacinas. Portanto, acredita-se que uma vacina seria uma das alternativas que poderia contribuir efetivamente para esse controle. Porém, um dos grandes problemas para o desenvolvimento de uma vacina é a incompreensão dos diversos mecanismos envolvidos na resposta imune ao *Plasmodium*.

Dentre as etapas o desenvolvimento de uma vacina encontra-se a identificação da natureza precisa dos antígenos que atuam como potenciais alvos da resposta imune naturalmente adquirida. Diversos antígenos já foram investigados como possíveis candidatos, como a proteína 1 de superfície do merozoíto (MSP-1) de *Plasmodium*, a qual é uma forte candidata vacinal, visto que estudos demonstraram sua capacidade de ativar a resposta imune do hospedeiro. Este artigo busca discutir sobre tais estudos, destacando as investigações científicas realizadas no Brasil.

2. Metodologia

Os artigos foram selecionados no site de busca da PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) com as seguintes palavras chave: Malaria vivax and MSP-1 (166 artigos acesso em 13 de junho de 2012); MSP-1 and humoral immune response (63 artigos acessado em 14 junho de 2012) e

N-terminal MSP-1 and *Plasmodium vivax* (15 artigos acesso em 17 de outubro de 2012). Destes foram selecionados os artigos foram realizados no Brasil e falavam dos aspectos imunes a MSP-1 de *P. vivax*. Foram consultados também as publicações das páginas do Portal Saúde do Ministério da Saúde do Brasil (<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index>) e da organização Mundial de Saúde (<http://www.who.int/en/>).

3. Revisão de literatura

3.1 Aspectos Gerais da Malária no Brasil

Malária é uma doença infecciosa, febril, aguda, sistêmica e não contagiosa, cujos agentes etiológicos são protozoários do gênero *Plasmodium* sp. (OPAS, 2009). A doença representa um sério problema de saúde pública, por apresentar altas taxas de incidência de morbidade e mortalidade nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (GREENWOOD *et al.*, 2008; WHO, 2009).

Nas Américas a transmissão da malária ocorre em 21 países, do qual foram confirmados cerca de 675 mil casos em 19 países no ano de 2010, sendo que a maioria desses casos foram reportados no Brasil e na Colômbia (WHO, 2011).

Cinco espécies de *Plasmodium* podem causar a doença no homem: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* (encontrado principalmente no continente africano) (MACHADO *et al.*, 2010), e *Plasmodium knowlesi*. Este último considerado a algum tempo de caráter zoonótico, vem apresentando relatos de casos nos últimos anos de infecção em humanos dessa espécie no continente asiático (COX-SINGH, 2008; LEE *et al.*, 2009). No Brasil, a transmissão da malária é causada pelos três primeiros, no qual o *P. vivax* é responsável pelo maior número de casos registrados, com uma estimativa de 80% (BRASIL, 2011). Em 2011, foram registrados aproximadamente 265.919 mil casos, havendo uma diminuição em relação ao ano anterior. No entanto, o quadro epidemiológico desta patologia ainda é preocupante, principalmente na região da Amazônia Legal (considerada uma área endêmica a qual compreende os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão), onde 263.23 mil casos foram notificados.

Os Estados do Amazonas, Pará e Rondônia foram os que registraram o maior número de diagnósticos, com aproximadamente 203.111 mil (SIVEP, 2012). Isto, geralmente se deve ao fato dessas regiões apresentarem características geográficas e ecológicas altamente favoráveis à interação do parasito (plasmódio) e do mosquito vetor (anofelino) (BRASIL, 2006), além de

condições ambientais e socioculturais que favorecem a transmissão da patologia e prejudicam a utilização de procedimentos de controle padrão (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

A ocorrência da malária em determinada área de acordo com o perfil epidemiológico de transmissão, pode ser classificada em área hiperendêmica, mesoendêmica ou hipoendêmica. Também existem as áreas holoendêmicas, em que a transmissão é perene e o grau de imunidade da população é alto, dessa forma permitindo a existência de portadores assintomáticos (BRASIL, 2009). Embora o Brasil seja considerado uma área de risco para transmissão da malária, a distribuição geográfica da doença não apresenta igual intensidade para todas as áreas endêmicas, ou seja, não é uniforme, estando intrinsecamente vinculada à dispersão dos vetores e a mobilidade humana (SARAIVA *et al.*, 2009).

3.2 Infecções causadas por *Plasmodium vivax*

Dentre as cinco espécies de plasmódios, o *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* são as espécies mais comuns de infecções, sendo que o maior impacto sobre a saúde humana em termos de mortalidade é do *P. falciparum*, devido este parasita apresentar um processo de infecção potencialmente fatal e um perfil de resistência aos agentes quimioterápicos (MENDIS *et al.*, 2001).

No entanto, *Plasmodium vivax* também constitui um importante problema sobre a saúde pública, pois apresenta uma ampla distribuição geográfica, decorrente de sua diversidade fenotípica, ocorrendo na maior parte das latitudes tropicais e subtropicais (BOUTIN *et al.*, 2005). Dados recentes estimam que cerca de 2,5 bilhões de pessoas no mundo vivam em área de risco para malária causada por *P. vivax*. Embora menos fatal, essa infecção provoca uma doença altamente debilitante com múltiplos episódios e recaídas (DOOLAN *et al.*, 2009; GUERRA *et al.*, 2010).

Por muito tempo se pensou que as infecções causadas por *P. vivax* eram benignas e por isso não era considerada principais alvos de estudo, em comparação com o enorme impacto de morbidade e mortalidade apresentado por *Plasmodium falciparum* (ARNOTT *et al.*, 2012). Porém, nos últimos anos no Brasil, tem se observado um padrão incomum de complicações clínicas associadas à infecção por *Plasmodium vivax*, com um crescente aumento do número de pacientes que necessitaram de internação hospitalar (SANTOS-CIMINERA *et al.*, 2007; ALEXANDRE *et al.*, 2010). Tais manifestações graves causadas por *P. vivax*, foram relatadas em estudos de diferentes lugares do mundo e incluem: malária cerebral, síndrome respiratória aguda, lesão pulmonar, insuficiência renal, disfunção hepática, icterícia, anemia grave,

dentre outras, podendo levar a morte desses pacientes. Tais complicações clínicas são semelhantes as que são causadas por *Plasmodium falciparum*, sugerindo desta maneira que o *P. vivax* seja capaz de provocar malária grave (BARCUS *et al.*, 2007; KOCHAR *et al.*, 2009; DOUGLAS *et al.*, 2012).

Outro agravante se deve ao fato do *Plasmodium vivax* apresentar algumas particularidades em seu ciclo de vida que o diferenciam do *Plasmodium falciparum* e que dificultam a interrupção de sua transmissão, como: este poder permanecer no fígado na forma de hipnozoíto, podendo iniciar a infecção no estágio sanguíneo, após meses da infecção inicial pelo esporozoíto; *P. vivax* inicia o seu desenvolvimento em gametócitos nas primeiras fases do ciclo eritrocítico logo após a liberação do merozoíto pelo fígado, enquanto o *P. falciparum* apresenta o desenvolvimento mais tardio. Assim, a transmissão do *P. vivax* ocorre mais cedo, iniciando antes do estado sintomático da doença (SINNIS & KIM LEE SIM, 1997).

Fica claro, então, que infecções causadas por *P. vivax* são um motivo de preocupação para saúde pública nacional, visto sua prevalência no Brasil. Nesse sentido, se faz necessário o desenvolvimento de novos métodos e estratégias de intervenção para bloquear a sua transmissão. Por isso, nos últimos anos têm sido observados avanços significativos em relação a uma melhor compreensão da espécie de *P. vivax*. Por meio dos estudos imunoepidemiológicos, uma série de genes que codificam antígenos imunologicamente importantes no estágio sanguíneo, foram isolados, clonados e sequenciados permitindo a geração de diferentes proteínas recombinantes.

Dentre os principais antígenos do estágio sanguíneo avaliados, a proteína 1 de superfície do merozoíto tem sido extensivamente estudada por diferentes grupos (SOARES *et al.*, 1999; O'DONNELL *et al.*, 2001; NOGUEIRA *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2007; FERNANDEZ-BECERRA *et al.*, 2010; STORTI-MELO *et al.*, 2011), com a finalidade de fornecer informações para compreensão dos mecanismos envolvidos na aquisição imunidade, capaz de conferir algum grau de proteção e, consequentemente, subsídios para o desenvolvimento de uma vacina eficaz.

3.3 Proteína 1 de Superfície do Merozoíto (MSP1) de *Plasmodium vivax*

Dentre as proteínas presentes na superfície do merozoíto, a MSP-1 é a mais abundante, a qual é expressa em outras espécies de *Plasmodium sp.*, sendo primeiramente descrita para *Plasmodium falciparum* por Holder e colaboradores, em 1982. Esta proteína é sintetizada na fase de esquizogonia do parasita e apresenta alto peso molecular variando de 190-230 kDa, de acordo com a espécie (HOLDER, 1982).

A MSP-1 faz parte de um complexo no qual estão associadas às proteínas MSP-6 e MSP-7, que se ligam a superfície do merozoíto pela âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estudos utilizando *P. falciparum* indicam que o complexo sofre dois processos de clivagens, sendo que no primeiro processamento realizado pela protease subtilisina-like (SUB1) (KOUSSIS et al., 2009), são gerados 4 fragmentos de aproximadamente 83, 30, 38 e 42 kDa, conhecidos como: MSP1₈₃, MSP1₃₀, MSP1₃₈ e MSP1₄₂ (HOLDER, 1982).

No segundo processo de clivagem, que acontece antes do merozoíto invadir o eritrócito, o fragmento de (42kDa) que permanece associado à superfície do merozoíto é clivado por outra protease, a “subtilisina 2” (SUB2), gerando os fragmentos de 33 e 19 kDa (MSP-1₃₃ e MSP-1₁₉) (HARRIS et al., 2005). O fragmento maior de 33 kDa é então liberado na corrente sanguínea juntamente com o restante do complexo, ao passo que o fragmento menor de 19 kDa permanece ancorado à membrana do merozoíto pela GPI, (BLACKMAN et al., 1990). O segundo processamento é essencial para que ocorra o processo de invasão, dado a observação de que a utilização de anticorpos monoclonais inibe a segunda clivagem, e, desta maneira, impedem a entrada do parasito na célula hospedeira ou posterior desenvolvimento, mostrando assim a importância de anticorpos direcionados contra esta região do antígeno (BLACKMAN et al., 1994; O'DONNELL et al., 2001). Além de constatações *in vitro*, foi observado que anticorpos que inibem o processamento secundário de MSP1 também podem ser encontrados em soro de indivíduos naturalmente expostos à malária (NWUBA et al., 2002), o que pode ser uma evidência de que estes anticorpos podem interferir na ação da protease SUB2 fazendo com que não alcance seu sítio de clivagem (HOLDER, 2009).

As análises realizadas no gene MSP-1 subdividiu-o em blocos com base no nível de diversidade genética sem o uso de outros critérios biológicos. A análise da estrutura gênica da MSP-1 foi descrita pela primeira vez em *Plasmodium falciparum* por Tanabe e colaboradores (1987). O gene que codifica a proteína PfMSP-1 foi dividido em 17 blocos, classificados como, conservados, semiconservados e variáveis. Nos blocos variáveis, os padrões alélicos são bem caracterizados, seguindo dois grupos distintos, compondo um modelo dimórfico conhecidos como alelo K1 e MAD20. Porém, um único domínio, conhecido como bloco 2, é altamente polimórfico com pequenas sequências com alto número de repetições (TANABE et al., 1987; COOPER, 1993).

Em *Plasmodium vivax*, o gene MSP1 codifica um polipeptídeo de 1726 aminoácidos, sendo identificada a presença de dois alelos: Belém (DEL PORTILLO et al., 1991) e Salvador (GIBSON et al., 1992). Através da comparação da sequência protéica da PvMSP-1, do isolado Belém, com sequências de MSP-1 de *P. falciparum* e *P. yoelli*, foi possível observar

semelhanças existente entre as sequências de aminoácidos nas três espécies, desde modo permitindo identificar na proteína: sete regiões conservadas presentes nas três espécies, denominadas de blocos conservados interespécies (ICBs) (ICB1, ICB2, ICB4, ICB5, ICB6, ICB8 e ICB10); e três regiões conservadas apenas em *P. vivax* e *P. falciparum*, chamados de blocos conservados CBs (CB3, CB7 e CB9) (DEL PORTILLO *et al.*, 1991).

Os blocos denominados de ICBs foram os que apresentaram similaridade de aminoácidos maior que 48% entre MSP1 de *P.falciparum*, *P. vivax* e *P.yoelii*, os CBs com similaridade de aminoácidos maior que 50% entre *P.falciparum* e *P. vivax* e os blocos com similaridade de aminoácidos menor que 45% foram denominados blocos polimórficos (Figura 1) (DEL PORTILLO *et al.*, 1991).

Uma segunda classificação referente a PvMSP-1, foi realizada com isolados de *Plasmodium vivax* de diversas partes do mundo, incluído o Brasil. Após análise do sequenciamento dos isolados de *P. vivax* para o gene MSP1, foi observado que o mesmo era composto de 13 blocos, sendo sete blocos conservados (blocos 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13) flanqueados por seis blocos altamente polimórficos, no qual 4 deles repetitivos (2,4,6,8,10 e 12) (PUTAPORNTIP *et al.*, 2002) (Figura 1).

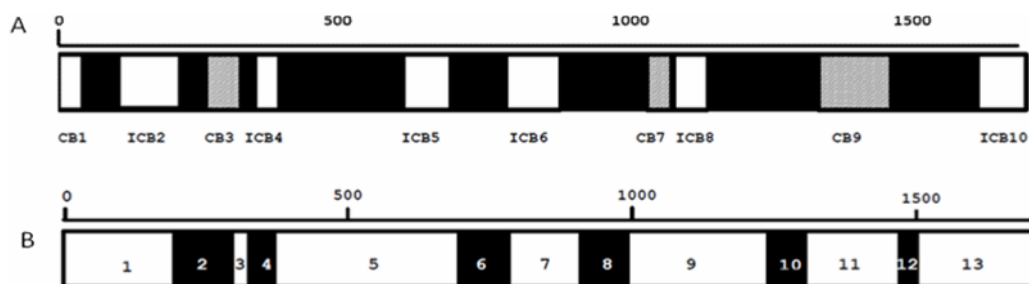


Figura 1: Esquema mostrando a divisão do gene de *Plasmodium vivax*. **A)** A primeira classificação da PvMSP-1, com sequências da MSP-1 entre *P. falciparum*, *P.vivax* e *P. yoelii*. Os blocos conservados interespécies (em branco) e blocos conservados entre *P. falciparum* e *P.vivax* (em cinza) e blocos polimórficos (em preto). **B)** A segunda classificação da MSP-1 somente com sequências de *P. vivax*. A proteína foi dividida em 13 blocos, sendo 7 blocos conservados (cor branca) e 6 blocos polimórficos (preto).

Fonte: adaptado de BASTOS *et al.*, 2007.

3.4.1 Resposta humoral a PvMSP-1

As pesquisas relacionadas à resposta imune naturalmente adquirida contra a MSP-1 de *Plasmodium vivax*, só foram possíveis após a identificação da estrutura primária do gene que codifica essa proteína (DEL PORTILLO *et al.*, 1991). Desde então, diversos estudos tem sido realizados para avaliar o potencial imunogênico da MSP-1. Vale resaltar que tais estudos são direcionados tanto para experimentos que incluem animais (roedores e primatas) (LING *et al.*, 1994; YANG *et al.*, 1999) quanto em humanos, sendo que está revisão se focará apenas na resposta em humanos contra PvMSP-1.

Pesquisas soroepidemiológicas em populações residentes em áreas endêmicas para malária de diferentes partes do mundo (ZEYREK *et al.*, 2008; DENT *et al.*, 2008), inclusive no Brasil (SOARES *et al.*, 1997, 1999; NOGUEIRA *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2007), têm avaliado a antigenicidade de proteínas recombinantes referente as regiões conservadas (C-terminal, representada pela MSP1-19) e polimórficas (N-terminal, representadas pela ICB2-5 e Bloco 2) da PvMSP-1, visto que ambas têm sido sugeridas como candidatas para o desenvolvimento de uma vacina contra o *Plasmodium sp.* Tais estudos comparam a resposta de anticorpos induzida à porção C-terminal e N-terminal da proteína MSP-1.

No Brasil, o primeiro estudo acerca da resposta imune humana contra a MSP-1 de *P. vivax* foi realizado por Soares e colaboradores (1997). Foram produzidas dez proteínas recombinantes contendo as porções C-terminal e N-terminal da PvMSP-1 e em seguida comparadas a resposta imune em soros de indivíduos residentes em Belém-PA. Os resultados demonstraram que a proteína da região C-terminal (ICB10) foi mais reconhecida por 62,2% dos soros enquanto que as proteínas do N-terminal apresentaram 51,4% de reconhecimento. Entre as proteínas recombinantes da região N-terminal, a ICB2-3, ICB3-4, ICB2-5 e P4-ICB5 foram as mais reconhecidas. Os títulos de anticorpos específicos contra a ICB10 foram significativamente mais altos, quando comparados com os títulos de anticorpos que reconheceram a proteína recombinante ICB2-5. Os níveis de anticorpos foram influenciados pela exposição repetida, uma vez que os indivíduos que relatam mais de quatro episódios de malária apresentaram níveis mais altos, quando comparados com os que tiveram apenas um episódio de malária. (SOARES *et al.*, 1997).

Em outro trabalho realizado por Soares e colaboradores, (1999) na vila de Cotijuba no Estado do Pará, foi analisada a influência da exposição natural e da idade na aquisição de anticorpos IgG contra proteínas recombinantes das regiões C (MSP1₁₉) e N-terminal (ICB2-5) de PvMSP. Observou-se uma maior frequência de anticorpos IgG para a proteína PvMSP1-19. No entanto, esses anticorpos foram significativamente maiores nos indivíduos com recente histórico de malária (a menos de seis meses). A prevalência de anticorpos para

a proteína ICB2-5 (N-terminal) dos indivíduos expostos à malária aumentou significativamente com a idade, sendo que nenhuma correlação foi encontrada para PvMSP1-19 (SOARES *et al.*, 1999c). Os autores sugerem que o maior reconhecimento da PvMSP1₁₉ durante a infecção natural, provavelmente é devido a região C-terminal ser menos polimórfica que a região N-terminal da MSP-1 (SOARES *et al.*, 1999b).

Para verificar se o perfil imunoepidemiológico da resposta contra as regiões de PvMSP-1 se diferenciavam em soros de indivíduos do Brasil e de outra região, Fernandez-Becerra e colaboradores (2010) avaliou a resposta imune humoral contra as regiões C e N-terminal de PvMSP-1 em soros de pacientes sintomáticos e assintomáticos oriundos de duas regiões endêmicas diferentes, Brasil e Papua Nova Guiné (PNG). Os resultados demonstraram diferenças entre idade e isotipo. Foi observado que os níveis de anticorpos contra C-terminal, estavam associado à idade em ambas as aéreas, mas com perfil diferente. No Brasil, a associação foi observada em pessoas mais velhas, enquanto que em PNG o nível de anticorpos foi maior em crianças menores. Os anticorpos citofílicos também apresentaram perfis diferentes entre as aéreas, os anticorpos do tipo IgG3 dos soros de indivíduos assintomáticos foram predominantes contra a N-terminal de PvMSP-1, enquanto que para C-terminal os anticorpos IgG1 foram predominantes (PNG) e IgG3 no Brasil.

A grande maioria dos estudos soroepidemiológicos com a MSP-1 de *P. vivax* são direcionados para o fragmento MSP1₁₉. Esta se destaca, em razão de apresentar uma elevada imunogenicidade quando avaliada em soros de indivíduos com malária, isto pode estar relacionado ao fato dessa região ser conservada, além de permanecer ancorada a superfície do parasita, (BLACKMAN *et al.*, 1990) o que poderia facilitar a ligação de imunoglobulinas, uma vez que os epítomos poderiam ficar mais expostos à resposta imune. Embora estudos constatem que as regiões variáveis da proteína MSP-1, são mais frequentemente reconhecidas por anticorpos naturalmente adquiridos, quando comparadas aos das regiões conservadas (NOGUEIRA *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2007).

Em 2006, Nogueira e colaboradores realizaram um estudo em Porto Velho (Rondônia/Brasil) com moradores de uma comunidade ribeirinha chamada Portuchuello. Neste foi avaliada a aquisição natural de anticorpos contra a proteína PvMSP-1 em indivíduos com malária causada por *Plasmodium vivax* ao longo de um ano, no qual as proteínas correspondiam a região C-terminal representado pela proteína ICB-10 (região conservada) e N-terminal por ICB2-5. A avaliação foi realizada através de ensaios ELISA, com soros de pacientes que tinham sido previamente identificados como assintomáticos e sintomáticos. Os resultados obtidos demonstraram que cerca de 33% da população tinha anticorpo anti-PvMSP1 contra a N-terminal e 40% apresentava anticorpo para C-terminal. Além disso, a aquisição de anticorpos para região N-terminal, e não para C-terminal, de PvMSP-1, na maioria dos

indivíduos do estudo, estava associada com a idade e o tempo que residiam na área endêmica para a malária. Neste mesmo estudo, também foi observado que os indivíduos respondedores a região N-terminal de PvMSP1, apresentavam redução do risco de se infectarem por *P. vivax*, porém quando eram infectados, tornavam-se susceptíveis a serem assintomáticos ou seja, conferia-lhes proteção clínica. Na maioria dos indivíduos assintomáticos o estudo demonstrou que os anticorpos presente para a porção N-terminal de PvMSP1 era do tipo IgG3 (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

Entre as regiões do gene MSP-1 identificadas como variáveis, a região que compreende o bloco 2 é considerada a extensão mais polimórfica da proteína de superfície do merozoíto (TANABE *et al.*, 1987; DEL PORTILLO *et al.*, 1991) e tem sido utilizada em estudos de diversidade genética dos isolados, de *P. vivax*. (BASTOS *et al.*, 2007). A resposta de anticorpos contra blocos polimórficos da região N-terminal de PvMSP-1 tem sido descrita em infecções naturais, sendo que a imunidade é variante-específica (LEVITUS *et al.*, 1994).

Entre os estudos soroepidemiológicos conduzidos no Brasil com as regiões variáveis de PvMSP-1, Bastos e colaboradores (2007) avaliaram soros de indivíduos da população de Acrelândia- Acre, contra um painel de proteínas recombinantes correspondentes aos blocos variáveis 2, 6 e 10 e a região conservada representada pela MSP-1₁₉ da PvMSP-1. Assim como os resultados dos outros trabalhos já haviam mencionados, neste foi observado que a MSP-1₁₉ foi a mais reconhecida por anticorpos IgG de 54,3% dos indivíduos residentes na aérea. Entre os blocos analisados, os antígenos referentes ao bloco 2 foram mais frequentemente reconhecidos por anticorpos IgG (32,99%). No entanto foi observado que a exposição repetida para a malária foi um forte preditor de anticorpos IgG específicos contra as regiões variáveis (bloco 2) de PvMSP-1. E que os anticorpos contra o repertório local de domínios variáveis da PvMSP-1 são induzidos depois de algumas infecções repetidas e requerem estímulos frequentes, enquanto os anticorpos contra a MSP1₁₉ são mais frequentemente detectados em indivíduos com exposição recente a malária.

Vale resaltar que os demais estudos conduzidos para verificação da presença de anticorpos IgG contra o bloco 2 da MSP-1, são direcionados para o *P. falciparum*, o qual é considerado o principal alvo da imunidade humana contra a malária (CONWAY *et al.*, 2000). Um desses estudos foi realizado Cavanagh e colaboradores (2004), em que avaliou o padrão da resposta imune adquirida as três variantes alélica do bloco 2. Foi observada associações significativas entre a presença de anticorpos IgG, principalmente IgG3, a duas variantes alélica do bloco 2, e proteção clínica a episódios subsequente de malária. Além disso, foi observado que a resposta era dependente da exposição e da idade.

4. Discussão e Conclusão

Para o desenvolvimento de uma vacina contra o *Plasmodium vivax*, o parasita da malária humana com ampla distribuição geográfica, torna-se necessário uma melhor compreensão das respostas imunológicas que conferem protecção clínica para indivíduos que residem em áreas endêmicas para a doença (FERNANDEZ-BECERRA *et al.*, 2010). O principal obstáculo bloqueando as pesquisas com o *P. vivax* é a falta de dados disponíveis para esse parasita, uma vez que o *P. vivax* não pode ser mantido em cultivo *in vitro* e indivíduos infectados normalmente apresentam baixa parasitemia.

Em função disso a maioria dos estudos imunoepidemiológicos, utiliza proteínas recombinantes expressas em vetor procarioto, para analisar os níveis dos anticorpos nesses indivíduos (GENTIL *et al.*, 2010), pois é sabido que nas áreas de transmissão para malária, a exposição contínua aos antígenos do parasita contribui para a aquisição de anticorpos específicos, sendo este um passo importante para o desenvolvimento de vacinas (RODRIGUES *et al.*, 2003), uma vez que fornece informações para uma melhor compreensão da resposta imune natural.

A MSP-1 tem sido amplamente estudada, com o objetivo de compreender os mecanismos envolvidos na invasão dos eritrócitos pelos parasitas, além de tentar esclarecer como este antígeno é capaz de ativar a resposta imune do hospedeiro (BABON *et al.*, 2007).

Como dito, anteriormente a resposta imune naturalmente adquirida contra a PvMSP-1, só foi possível após a identificação da estrutura primária do gene que codifica esse antígeno (DEL PORTILLO *et al.*, 1991). Segundo Holder (2009), uma maior compreensão da estrutura do gene de MSP-1 ajudará a projetar melhor os antígenos que serão utilizados na geração de futuras vacinas.

De modo geral foi observado nesta revisão, que a resposta imune a PvMSP-1 de indivíduos que residem em áreas endêmicas para malária, apresenta padrões distintos, para as regiões C e N-terminal da PvMSP-1. A região C-terminal é mais reconhecida em soros de pacientes com malária, porém tal reconhecimento é associado a indivíduos que foram menos expostos ao parasita, além de estudos relatarem que está pode induzir resposta imune protetora em humanos (SOARES *et al.*, 1997). Mas essa protecção pode ser contraditória, pois outro estudo demonstrou que as respostas de anticorpos não se associaram com protecção clínica, uma vez que os indivíduos mais expostos haviam apresentado episódios recentes de malária (LEITE *et al.*, 2007). Enquanto que a região N-terminal é mais reconhecida em soros de indivíduos que estão mais expostos ao parasita, estudos apontam que existe associação com a protecção clínica.

O papel das diferentes subclasses de anticorpos IgG específicos contra a PvMSP1 ainda é pouco conhecida, mais os estudos mostram que podem participar dos mecanismos efetores mediados por uma resposta específica. Para MSP1₁₉ (C-terminal) ocorre predominância da subclasse IgG1, enquanto que para N-terminal o predomínio é de IgG3.

A maioria dos estudos imunoepidemiológicos realizados no Brasil têm se concentrado na MSP1₁₉, sendo poucos os que foram conduzidos para analisar a antigenicidade da região N-terminal da PvMSP-1, principalmente para o bloco 2, que parece estar associado com proteção clínica.

Diante do exposto, ao longo dessa revisão fica claro que há uma escassez de estudos no Brasil envolvendo o Bloco 2 de PvMSP-1. Por essa razão torna-se necessário investigar a imunogenicidade dessa região em populações de diferentes áreas geográficas naturalmente expostas, bem como elucidar o padrão de resposta de anticorpos associados às manifestações clínicas, a fim de esclarecer melhor o perfil de resposta contra esta região.

Referências Bibliográficas

ALEXANDRE MA; FERREIRA CO; SIQUEIRA AM; MAGALHÃES BL; MOURÃO MPG; LARCERDA MV; ALECRIM MGC; ALECRIM W. **Severe Plasmodium vivax Malaria, Brazilian Amazon.** *Emerging Infectious Disease*, v.16, n.10, p.1611, 2010.

ARNOTT, A; BARRY, AE; REEDER, JC. **Understanding the population genetics of Plasmodium vivax is essential for malaria control and elimination.** *Malaria Journal*, v. 11, p.14, 2012.

BABON, JJ; MORGAN, WD; KELLY, G; ECCLESTON, JF; FEENEY, J; HOLDER, AA. **Structural studies on Plasmodium vivax merozoite surface protein-1.** *Molecular Biochemical Parasitology*, v.153, p.31-40, 2007.

BARCUS, MJ; BASRI, H; PICARIMA, H; MANYAKORI, CS; ELYAZAR, I; BANGS, MJ; MAGUIRE, BJD; BAIRD, JK. **Demographic risk factors for severe and fatal vivax and falciparum malaria among hospital admissions in northeastern Indonesian papua.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.77, p.984–991, 2007.

BASTOS MS, SILVA-NUNES M, MALAFRONTES RS, HOFFMAN EHE, WUNDERLICH G, MORAES SL, FERREIRA MU. **Antigenic polymorphism and naturally acquired antibodies to Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 in rural amazonians.** *Clinical and Vaccine Immunology*, v.14, p. 1249-1259, 2007.

BLACKMAN MJ, HEIDRICH H, DONACHIE S, MCBRIDE JS, HOLDER AA. **A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies.** *Journal of Experimental Medicine*, v.172, p.379-382, 1990.

BLACKMAN MJ; SCOTT-FINNIGAN TJ; SHAI S; HOLDER AA. **Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein.** *Journal of Experimental Medicine*, v.180, n.1, p.389-93, 1994.

BOUTIN, JP; PRADINES, B; PAGES, F; LEGROS, F; ROGIER, C; MIGLIANI, R. **Epidemiology of Malaria.** *La Revue du praticien*, v. 559, n.8, p.833-40, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Ações de Controle da Malária-Manual para Profissionais de Saúde na Atenção Básica.** Brasília, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos- 2 ed.-** Brasília, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação Epidemiológica da Malária na Amazônia.** Brasília, 2011.

CAVANAGH DR, DODOO D, HVIID L, KURTZHALS JA, THEANDER TG, AKANMORI BD, POLLEY S, CONWAY DJ, KORAM K, MCBRIDE JS. **Antibodies to the N-terminal Block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are associated with protection against clinical malaria.** *Infection and Immunity*, v.72, p.6492-6502, 2004.

CONWAY D, CAVANAGH DR, TANABE K, ROPER C, MIKES ZS, SAKIHAMA N, BOJANG KA, ODUOLA AMJ, KREMSNER PG, ARNOT DE, GREENWOOD BM, MCBRIDE J. **A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses.** *Nature Medicine*, v.6, p.689-692, 2000.

COOPER, JA. **Merozoite surface antigen-1 of *Plasmodium*.** *Parasitology today*, v.9, p.50-4, 1993.

COX-SINGH, J; DAVIS, TM; LEE, KS; SHAMSUL, SS; MATUSOP, A; RATNAM, S; RAHMAN, HA; CONWAY, DJ; SINGH, B. ***Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.** *Clinical Infectious Disease*, v.46, n.2, p.165–171, 2008.

DEL PORTILLO HA, LONGACRE S, KHOURI E, DAVID PH. **Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.88, p.4030-4034, 1991.

DENT, AE; BERGMANN-LEITNER, ES; WILSON, DW; TISCH, DJ; KIMMEL, R; VULULE, J; SUMBA, PO; BEESON, JG; ANGOV, E; MOORMANN, AM; KAZURA, JW. **Antibody-mediated growth inhibition of *Plasmodium falciparum*: relationship to age and protection from parasitemia in Kenyan children and adults.** *PLoS ONE*, v. 3 p.e3557, 2008.

DOOLAN DL; DOBANO C; BAIRD JK. **Acquired immunity to malaria.** *Clinical Microbiologic Reviews*, v.22, n.1, p.13-36, 2009.

DOUGLAS, NM; NSTEY, NM; BUFFET, PA; POESPOPRODJO, JR; YEO, TW; WHITE, NJ; PRICE, RN. **The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria.** *Malaria Journal*, v.11, p.135, 2012.

FERNANDEZ-BECERRA, C; SANZ, S; BRUCET, M; STANISIC, DI; ALVES, PF; CAMARGO, EP; ALONSO, PL; MUELLER, I; DEL PORTILLO, HA.

Naturally-acquired humoral immune responses against the N- and C-termini of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay. *Malaria Journal*, v.9, p.29e, 2010.

GENTIL, F; BARGIERI, DY; LEITE, JA; FRANCO, KS; PATRICIO, MB; ESPINDOLA, NM; VAZ, AJ; PALATNIK-DE-SOUSA, CB; RODRIGUES, MM; COSTA, FT; SOARES, IS. **A recombinant vaccine based on domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice.** *Vaccine*, v. 28, p.6183-6190, 2010.

GIBSON, HL; TUCKER, JE; KASLOW, DC; KRETTLI, AU; COLLINS, E; KIEFER, MC; BATHUST, LC; BARR, PJ. **Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.50, p.325-34, 1992.

GREENWOOD BM; FIDOCK DA; KYLE DE; KAPPE SH; ALONSO PL; COLLINS FH; DUFFY P. **Malaria: progress, perils, and prospects for eradication.** *Journal of Clinical Investigation*, v.118, n.4, p.1266–1276, 2008.

GUERRA CA, HOWES RE, PATIL AP, GETHING PW, VAN BOECKEL TP, TEMPERLEY WH, KABARIA CW, TATEM AJ, MANH BH, ELYAZAR IRF, BAIRD JK, SNOW RW, HAY SI. **The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009.** *PloS Neglected Tropical Diseases*, v.4, p.e774, 2010.

HOLDER A; FREEMAN R. **Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody.** *Journal of Experimental Medicine*, v.156, n.5, p.1528, 1982.

HOLDER A. **The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria.** *Parasitology*, v.136 n.12, p.1445-1456, 2009.

KOCHAR, DK; DAS, A; KOCHAR, SK; SAXENA, V; SIROHI, P; GARG, S; KOCHAR, A; KHATRI, P; GUPTA, V. **Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.80, p.194-198, 2009.

LEE, KS; COX-SINGH, J; BROOKE, G; MATUSOP, A; SINGH, B. ***Plasmodium knowlesi* from archival blood films: further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo.** *International Journal for Parasitology*, v.39, n.10, p.1125–1128, 2009.

LEITE, RMR. **Resposta de anticorpos IgG contra a região C-terminal da proteína 1 da superfície de merozoíto de *Plasmodium vivax* em indivíduos que residem em áreas de transmissão de malária no Estado do Pará.**

Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, BELÉM – PARÁ, 2007.

LEVITUS, G; MERTENS, F; SPERANÇA, MA; CAMARGO, LMA; FERREIRA, UM; DEL PORTILLO, HA. **Characterization of naturally acquired human IgG responses against the N-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax*.** *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, v.51, p.68–76, 1994.

LING, IT; OGUN, SA; HOLDER, AA. **Immunization against malaria with a recombinant protein.** *Parasite Immunology*, v. 16, n.2, p.63-67, 1994.

MACHADO P; MENDES C; ROSÁRIO VE; AREZ AP. **A contribuição dos polimorfismos humanos do eritrócito na proteção contra a malária.** *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v.1, n.4, p.85-96, 2010.

MENDIS K; SINA BJ; MARCHESI P; CARTER R. **The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.64, p.97-106, 2001.

NOGUEIRA PA, ALVES FP, FERNANDEZ-BECERRA C, PEIN O, SANTOS NR, SILVA LHP, CAMARGO EP, DEL PORTILLO HA. **A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1.** *Infection and Immunity*, v.74, p.2726-2733, 2006.

NWUBA RI; SODEINDE O; ANUMUDU CI; OMOSUN YO; ODAIBO AB; HOLDER AA; NWAGWU M. **The human immune response to *Plasmodium falciparum* includes both antibodies that inhibit merozoite surface protein 1 secondary processing and blocking antibodies.** *Infection and immunity*, v.70, n.9, p.5328, 2002.

O'DONNELL RA; DE KONING-WARD TF; BURT RA; BOCKARIEC M; REEDERC JC; COWMANB AF; CRABB BS. **Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-119 are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria.** *Journal of Experimental Medicine*, v.193, n.12, p.1403, 2001.

OLIVEIRA-FERREIRA J, LACERDA MVG, BRASIL P, LADISLAU JLB, TAUIL PL, DANIEL-RIBEIRO CT. **Malaria in Brazil: na overview.** *Malaria Journal*, v.9, 115, 2010.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Situação Epidemiológica: Malária 2009.** Disponível em: <http://www.new.paho.org/bra/index.php>. Acesso em: 21/10/2011.

PUTAPORNTIP C, JONGWUTIWES S, SAKIHAMA N, FERREIRA MU, KHO W, KANEKO A, KANBARA H, HATTORI T, TANABE K. **Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus.** *PNAS*, v.99, p.16348-16353, 2002.

RODRIGUES, MC; CUNHA, MG; MACHADO, RLD; FERREIRA, JR OC; RODRIGUES, MM; SOARES, IS. **Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDA C-terminal region of the merozoite surface protein-1.** *Malaria Journal*, v.2 p.39-46, 2003.

SANTOS-CIMINERA PD, ROBERTS DR, ALECRIM MG, COSTA MRF, QUINNAN JR GV. **Malaria diagnosis and hospitalization trends, Brazil.** *Emerging Infectious Diseases*, v.13, p.1597-1599, 2007.

SARAIVA MGG, AMORIM RDS, MOURA MAS, MARTINEZ-ESPINOSA FE, BARBOSA MG. **Expansão urbana e distribuição espacial da malária no município de Manaus, Estado do Amazonas.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42, p.515-522, 2009.

SINNIS, P; KIM LEE SIM, B. **Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*.** *Trends in Microbiology*, v. 5, n.2, p.52-58, 1997.

SOARES, IS; LEVITUS, G; SOUZA, JM; DEL PORTILLO, HA; RODRIGUES, MM. **Acquired immune responses to the N-and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria.** *Infection and Immunity*, v.65, p.1606 - 1614, 1997.

SOARES, IS; CUNHA, MG; SILVA, MN; SOUZA, JM; DEL PORTILLO, HA; RODRIGUES, MM. **Longevity of natural acquired antibody responses to the Nand C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1.** *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, v.60, p. 357-363,1999b.

SOARES, IS; OLIVEIRA, S; SOUZA, JM; RODRIGUES, MM. **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 Tropica*, n.72, p. 13 - 24, 1999c.

STORTI-MELO, LM; SOUZA-NEIRAS, WC; CASSIANO, GC; TAVEIRA, LC; CORDEIRO, AJ; COUTO, VS; POVOA, MM; CUNHA, MG; ECHEVERRY, DM; ROSSIT, AR; AREVALO-HERREIRA, M; HERREIRA, S; MACHADO, RL. **Evaluation of the naturally acquired antibody immune response to the Pv200L N-terminal fragment of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 in four areas of the Amazon Region of Brazil.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.84, p. 58-63, 2011.

TANABE, K; MACKAY, M; GOMAN, M; SACIFE, JG. **Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Molecular and Biological Evolution*, v.9, p.381–393, 1987.

WHO - World Health Organization. **World malaria report 2009.** Library Cataloguing-in-Publication, 2009. Geneva. Disponível em:< <http://www.who.int/malaria/publications> > acessado em: 12 de julho de 2010.

WHO - World Health Organization. **World malaria report 2011.** Library Cataloguing-in-Publication, 2011. Geneva. Disponível em:< http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/ > acessado em: 21 de março de 2012.

YANG, C; COLLINS, WE; SULLIVAN, JS; KASLOW, DC; XIAO, L; GALLAND, GG; LAL, AA. **Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in *Saimiri* monkeys by immunization with a recombinant C-terminus of merozoite surface protein 1 (MSP-1) in block copolymer adjuvant.** *Infection and Immunity*, v.67, p. 342–349, 1999.

ZEYREK, FY; BABAOGLU, A; DEMIREL, S; ERDOGAN, DD; AK, M; KORKMAZ, M; COBAN, C. **Analysis of naturally acquired antibody responses to the 19-kd C-terminal region of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* from individuals in Sanliurfa, Turkey.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.78, p.729-732, 2008.

Anexo 05

Title: Responses of immune and semi-immune individuals against a repertoire of proteins of Block 2 able to enlarge serotype-specific responses to Pv-MSP1.

Maria Edilene M. Almeida, Fernanda Versiani, Leidiane A Soares, Patrícia P Orlandi, Luciana P Sousa, Marcus VG Lacerda, Fabio T.M Costa Luis Andre Mariuba and Paulo A. Nogueira.

ABSTRACT

One of the major difficulties in developing a malaria vaccine is the genetic diversity of highly polymorphic surface antigens. Antibody responses to Block 2 of MSP1 are associated with clinical immunity in *P. falciparum* and *P. vivax* infections. A group of recombinant proteins of the major alleles of the Pv-MSP1 Block 2 was produced. Genetic diversity of Pv-MSP1 Block 2 modulated the prevalence of IgG response in different areas and the repertoire of proteins was able to enlarge the range of IgG3 responses found among immune and semi-immune adults in Amazonian malaria endemic areas, and probably reduce the effect of genetic diversity of MSP1.

INTRODUCTION

The human malaria parasites exhibit extensive antigenic diversity, due to the complex life cycle and, particularly, allelic forms of genetically polymorphic proteins or clonally variant expression of multi-gene families (Good et al. 1998). Molecular population genetic analyses of antigen genes have revealed patterns of diversifying selection in particular sequence regions. The most abundant protein on the surface of the invasive blood stage form of malaria parasites, Merozoite Surface Protein 1, is a leading candidate for a malaria vaccine (Tetteh et al. 2003; Polley et al. 2003).

Plasmodium vivax MSP1 (Pv-MSP1) contains six highly polymorphic domains (called polymorphic blocks) that are flanked by fairly conserved sequences (Putaporntip et al. 2002). The extensive sequence divergence in variable domains of PvMSP-1 (known as allelic diversity) has been maintained by balanced selection over five million years, most likely as the result of variant-specific immune pressure (Putaporntip et al. 2006).

Block 2 of PvMSP1 is considered the most polymorphic of these, because it contains a wide variety of minor sequences called repeats near the N terminus of MSP-1, which differ in type, number and position (Putaporntip et al. 2002). In previous studies, naturally acquired antibodies that recognise a recombinant protein ICB2-5 (encompassing variable Blocks 2 and 4 of PvMSP-1) were associated with protection against clinical disease in Brazil (Versiani et al. 2013; Nogueira et al. 2006). However, the adaptive significance of natural antibodies to variant specific domains of Block 2 Pv-MSP1

remains unknown, since only a single version of these highly polymorphic domains was used to date.

We describe the first group of recombinant proteins for some of the major alleles of the MSP1 Block 2 of *P. vivax*, which are shown to be able to enlarge the range of responses found among immune and semi-immune adults in two malaria endemic areas of the Amazon, and broadening the immune responses in individuals who already produce limited, serotype-specific responses to Block 2.

Material and Methods

Sample collection: Parasite sample collection was performed in 2009 from patients with microscopically confirmed *P. vivax* infection who were resident in Manaus. Samples were collected at a tertiary care centre (Tropical Medicine Foundation of Amazonas).

Serological samples, selected area and population: From September 2008 to February 2009 at the Rio Pardo rural settlement, we conducted a prospective study in an endemic area, which began with an interview and population monitoring for malaria microscopy using Giemsa stained thick smears from the SIVEP-malaria/2012 blood database throughout the study period [Sivep 2012]. In November 2008, a cross-sectional study was performed on the collected blood samples to determine malarial infection by both real-time PCR (PCR) and Giemsa-stained thick blood smears. The prospective study was done to classify patients into asymptomatic and symptomatic using both real-time PCR and Giemsa-staining following a diagnosis of malaria. Sera of twenty-six asymptomatic

individuals (three with mixed infections) were used, and twenty-eight patients were diagnosed as symptomatic (Versiani *et al.* 2013).

From 2011 to 2012, blood samples were collected from residents of malaria-endemic areas of Manaus, the capital of Amazonas State (northern of Brazil; Latitude 03°09' S Long 60°01'W), which is encircled by rainforest. However, malaria transmission is known to occur in the outskirts of the city, where the Annual Parasitary Index in 2011 was 11.3/1,000 inhabitants, with 93.6% of *P. vivax*. Patients were selected based on a number of inclusion factors, such as willing to participate in this study, age above 18 years, no chronic diseases, and no gravid women. They answered a questionnaire about previous malarial history and 5 ml of blood collected was after the consent form was signed. Venous blood was collected into tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). This study was approved by the Research Ethical Committee of the Federal University of Amazonas (Ethical Approval No. 3640.0.000.115-07).

Genotyping of isolates MSP1 Block 2 of *P. vivax*: The parasite DNA was purified by the Charge Switch gDNA 50-100 µl Blood kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was purified from isolates collected from patients with microscopically confirmed *P. vivax* infection. We used three pairs of oligonucleotide primers designed by Bastos and collaborators (2007) (see below), who had amplified Blocks 2, 6 and 10 of isolates from the western Brazilian Amazon. Sense Block 2: (5'CTCTGACAAAGAGCTGGAC3'); Antisense Block 2: (5'GCTCCTTCAGCACTTTCACGCG 3'). The amplification reactions for each block were performed in a total reaction volume of 50 µl, supplemented with 1 pM primers,

100 μ M dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1 U of Taq polymerase and 100 ng of DNA template. The cycling was as follows: one cycle of 95°C for 5 min, followed by 36 cycles of 94°C for 1 min, 63°C for 1 min and 72°C for 1 min and a last cycle of 72°C for 10 min. The amplicons were visualised in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide, purified by QIAquick Gel Extraction (Qiagen) according to instructions and frozen at -80°C. For sequencing, the amplicons were shipped on dry ice for sequencing in the facilities of the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ, located in Salvador, BA, Brazil. The sequencing reactions were performed in automatic DNA MegaBace 1000 by the dideoxy method. Only the Pvmsp-1 variable blocks of Blocks 2, 6 and 10 were sequenced. The high-quality sequences were chosen by the Phred program. The eletropherograms were visualised and edited in EditSeq of Lasergene packet, version 4.05 (DNASar). Nucleotide and amino acid sequences were compared with the corresponding accessible sequences of GenBank by Blast-P from the National Centre for Biotechnology Information to select some sequences of Blocks 2, 6 and 10 found to have similarities of 50% to 100%. The sequences were deposited in GenBank under submission number HQ200196-HQ200270.

Construction of recombinant proteins: Three synthetic DNA sequences of Pv-MSP1 Block 2 (117bp, 153bp and 144bp), a conserved region (P1) and two (P2 and P3) corresponding to the repeats of haplotypes (*belem* and haplotype 3) and circulating in the area studied were cloned as a single chimera pSMART (IDT Integrated DNA Technologies). *Bam*HI, *Pst*I, *Eco*RI and *Hind*III sites and *stop-codon* nucleotides were inserted between the beginning and end of each gene sequence (Figure 2B).

Digestion was performed following the combination of *Bam*HI-*Pst*I (P2); *Pst*I-*Eco*RI (P1); *Eco*RI-*Hind*III (P3) according to traditional protocols; fragments were viewed in 1.5% agarose in Tris-Boric acid-EDTA buffer; purified using the Qiaquick® second Extraction Kit (Qiagen) inserted into pRSET vector (Invitrogen™) by the T4 ligase protocol and introduced into competent *E. coli* TOP 10 for electroporation at 1,900 V. The recombinant plasmids were introduced into competent *E. coli* strain BL21 (DE3-pLysS) by electroporation competent to 1,900 V. Sequencing was performed using universal T7 oligos and ABI Genetic Analyser 3100 (Applied Biosystems); the analyses were performed by online BLASTp (NCBI) and PROTPARAM (Expasy) to select the correct colonies containing the insert with high similarity between sequences deposited in NCBI (Figure 2A).

Expression of proteins: *His-PvMSP1 proteins:* After expanding colonies of pre-inoculum (16 hours at 37°C, under constant stirring) were grown in LB containing ampicillin (100µg/mL) and chloramphenicol (34µg/mL) in 500 ml of LB medium and antibiotics, IPTG (1mM) was added and incubation was performed for three hours (37°C, under constant stirring). The expression of proteins (P1, P2 and P3) was monitored by 15% polyacrylamide gel SDS-PAGE (Maniatis et al. 1989). The pellet of each bacterium containing the His-tagged protein was subjected to cell lysis by sonication; the supernatant was flowed in Ni²⁺ columns (Invitrogen). After washing with concentrations of Imidazole (20-80mM), the eluents were obtained to a concentration of 200-400mM and stored at -20°C in Tris-salt buffer (pH8.0, 500mM-Tris-NaCl plus 1mM PMSF and

10% glycerol) and monitored by SDS-PAGE and "immunoblotting" using anti-His-tag (Towbin et al. 1979).

GST-ICB2-5: The recombinant protein ICB2-5 from the MSP1 protein of *Belem* strain was glutathione S-transferase (GST) fusion proteins [Nogueira et al. 2006; Soares et al. 1997]. As a control, GST alone was also produced. GST and *Pv* recombinant protein were purified using Glutathione-Sepharose 4B columns (Amersham Pharmacia), and protein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad) [20; 29; 37].

ELISA: The immunoenzymatic assays were performed to evaluate the presence of antibodies against *His-PvMSP1* proteins (P1, P2 and P3) and *GST-ICB2-5* (ICB2-5) in the sera of patients infected by *Plasmodium vivax* according to Harlow and Lane (1988). The recombinant proteins diluted in 0.1M carbonate/bicarbonate buffer (pH9.6) were sensitised in 96-wells plates (overnight at 4°C). After washing with 0.05% Tween-0.1M PBS and blocking with 5% skim milk 0.05% Tween-0.1M PBS (2 hours, 37°C), sera diluted 1/100 were added and incubated for 1 h at 37°C in moist chamber (37°C in MC) and washed three times in 0.05% Tween-0.1M PBS. For total IgG anti-human IgG peroxidase conjugate (KPL) diluted 1/1000 were added to the wells and incubated for 1 h (37°C in MC) and washed three times with 0.05% Tween-0.1M PBS. For IgG subclasses, mouse monoclonal antibodies for each subclass of IgG (Sigma, St. Louis, MO) were diluted 1/1000 and used as above. The tetramethylbenzidine (TMB, Sigma) in and H₂O₂ phosphate buffer was added after 10 minutes, and then stopped with 2M H₂SO₄. The OD was measured at 450nm in an ELISA reader.

To evaluate the sera positivity for GST-ICB2-5, two cut-offs were determined. In the first, the cut-off was made from samples of individuals who never had malaria (Nogueira et al. 2006). The second cut-off was calculated by subtracting the average of the OD against GST plus 2 times the standard deviation (Nogueira et al. 2006; Soares et al. 1997). The positivity of the serum was determined when OD was superior to the two cut-offs.

Statistical analysis: The means of antibody levels were calculated by nonparametric T-test (Kruskal Wallis) and bivariate correlations by nonparametric Spearman using the programs PRISM version 5.0 (Graph Pad Software) and PASW Statistic version 8.

RESULTS

Genetic diversity of Pv-MSP1 Block 2 in Manaus and modulation in the prevalence of IgG

Block 2 is the most polymorphic extension of MSP1 and has been used in studies of genetic diversity of isolates of *P. vivax*. PCR amplification was performed in 56% (73/130) of gDNA from blood samples of patients with febrile infection with *P. vivax* using these primers. Sequencing of Pv-MSP1 Block 2 was performed in 28 *P. vivax* isolates.

Initially, the diversity of our sequences was evaluated to understand the polymorphic regions. There were sequences of repeats in the form of two trimers and a

dimer. The first was a degenerating SSX (X represents E, G, T, A, N, P, S or Q residue), the second was a conserved 3-mer (GST), and the third was a conserved dimer repeat (GT). There were several synonymous sequences coding for SSG, SSV, SSN, GST and GT repeats (Table 1).

Seven different alleles of Block 2 were categorised into three families according to the upstream sequence (DENARKR, AENKKR and EEHKRR), synonymous substitutions and arrangement of repeats with frequencies of these haplotypes circulating in endemic area from Manaus (Figure 1).

To assess the influence of allelic diversity of Pv-MSP1 Block 2 on the prevalence of IgG antibodies, three recombinant proteins were produced corresponding to haplotypes circulating in an endemic area of Manaus. P2 corresponded to the extension of repeats of haplotype 1 (corresponding to *belem*) and P3 were produced from one of the least circulating haplotypes in Manaus (*haplotype 3*). A third protein (P1) originated from the interface between an extension ICB1 and Block 2 (Figure 2A). The his-tagged proteins (P1, P2 and P3) were soluble after bacterial lysate and were confirmed by immunoblot using monoclonal anti-hisG (Invitrogen). P1 presented an expected size of approximately 8.6 kDa, while P2 and P3 had a larger size than expected of 16 kDa (Figure 2B-C).

The frequency of IgG responders of symptomatic patients from Manaus were compared with a recombinant proteins comprising *ICB2-Bloco2-ICB3-Bloco4-ICB5* (ICB2-5). Comparing the IgG responders were ICB2-5 (83.3%), P1 (16.6%), P2 (38.0%) and P3 (2.3%), the levels of IgG antibodies to proteins P2 and P3 were different ($p < 0.0001$). P2 was the most recognised, whereas P3 (one less circulating haplotype) was less recognised, with a lower reactivity than P1 (Figure 3).

Comparison of humoral response to variants of the Pv-MSP1 Block 2

The allelic frequency of isolates circulating in the rural settlement of Rio Pardo was not performed due to operational difficulties, however the classification of asymptomatic and symptomatic individuals in the prospective study might provide allele frequency in this endemic area. P2 and P3 were more recognised than P1 by symptomatic IgG responders, the prevalences were 62.0% (18/29) against ICB2-5, 6.8% (2/29) to P1, 27.9% (8/29) to P2 (27.9%) and 17.2% (5/29) to P3.

All proteins were well recognized by IgG of asymptomatic individuals, the prevalences were 69.2% (16/26) to ICB2-5, 26.9% (7/26) to P1, 30.7% (8/26) to P2 and 46.1% (12/26) to P3. P3 was more recognised than P2, indicating the circulation of both haplotypes in the area.

Assessing sera from asymptomatic individuals by the Spearman's bivariate analyses revealed correlations between them against all proteins tested (Table 2). The same analysis performed with IgG symptomatic responders showed correlations between the response against ICB2-5, P1 and P2. In contrast, sera against P3 were correlated only with those reagents P1, indicating that they were not the same sera that reacted against two different Pv-MSP1 Block 2 proteins.

Cytophilic antibodies (mainly IgG3) are indispensable in protective immunity against asexual blood stage parasites. The IgG subclasses of asymptomatic were compared against all proteins. Sera reacted predominantly to ICB2-5 with IgG3 (76.5%) followed by IgG2 (41.1%). The frequency of responders to P3 was 29.4% (IgG3) and

11.7% (IgG2), and against P1 was 17.6% (IgG3) and 11.7% (IgG2), respectively. The response against P2 was different, with the presence of some responders for IgG1 (5.88%) and no predominance of IgG3 (11.7%) over IgG2 (11.7%).

As subclasses response in asymptomatic individuals to P1 and P3 was similar to ICB2-5, with well pronounced predominance of IgG3 in relation to IgG2, bivariate comparison by Spearman indicated correlation between sera that reacted with IgG3 and IgG2 to ICB2-5 and P3. In relation to P2, correlations were found only P1 (Table 3).

Classifying symptomatic individuals from two areas in a group (N=59), the responses of the three subclasses against ICB2-5 were similar 27.1% (IgG1) and 33.9% for IgG2 and IgG3. IgG3 against P2 (28.8%) was only subclass that responded similarly to ICB2-5. In contrast, the subclasses against the other proteins had low prevalence below 7%.

Broadening the serotype-specific humoral responses to variants of Pv-MSP1 Block 2

Assessing of subclasses of all subjects (N = 76), IgG3 was the most frequent antibody against variables proteins P2 (23.7%) and P3 (10.5%), followed by IgG2 P2 (7.8%), P3 (2.6%) and 7.8% (P1) (Figure 4A). There were very few IgG1 responders for all three proteins (1.3 to 2.6%) and there were no IgG4 responders (data not shown). These frequencies increased when the reactivity was combined into P2+P3, IgG3 (30.2%) and IgG2 (9.2%). The frequency of IgG3 responders was even higher when P1+P2+P3 were combined 35.5%. These frequencies of IgG3 responders were close to the frequencies of IgG3 (43.4%) and IgG2 (35.5%) for ICB2-5.

The distribution of serum confirms the exclusivity of some sera against the combination P1+P2+P3 compared to the response against ICB2-5 (stars in Figure 4B). The frequencies of sera responders IgG3 and IgG2 when grouping together all of the proteins tested (ICB2-5+P1+P2+P3) exceeded the results of ICB2-5 alone (Figure 4A), confirming that the development of a repertoire of proteins corresponding to Block 2 can expand the spectrum of reactive sera.

DISCUSSION

The most important malaria vaccine candidates are outlined in the pre-erythrocytic stage: CSP (*Circumsporozoite protein*) and SSP2/TRAP (*Thrombospondin related anonymous protein*); asexual erythrocytic cycle: the subunits of MSP-1 (42kDa, 19 kDa and a precursor molecule of 200kDa), MSP-9, DBP-RII (*Duffy Binding Protein receptor-2*) and AMA-1 (*apical membrane antigen-1*), and the antigens of the sexual erythrocytic cycle, Pvs25 Pvs28. Other genes of *Plasmodium vivax* asexual erythrocytic cycle that have been identified as potential vaccine candidates are the PvMSP-3 family (*pvmmsp3a/3b/3g*); PvMSP-4, PvMSP-5 and PvRBP-5 1/2 (Herrera et al. 2007).

However, one of the major difficulties in developing a malaria vaccine is the genetic diversity of highly polymorphic surface antigens of *P. falciparum* and *P. vivax* in different geographic areas around the world. The problem of polymorphism tends to be more important for vaccines based on blood stage targets of naturally-acquired immunity (Weedall and Conway, 2010; Takala et al. 2009). Therefore, investigation of the sequence variation antigen (including regions of different haplotypes) under immune

pressure such as MSP1 is necessary for the development of an effective vaccine against malaria (Chenet *et al.* 2012).

When *msp1* in *P. vivax* was isolated from haplotype *belém* and compared with genes from other species (*P. falciparum* and *P. yoelli*), results indicated similarities above 48% between the amino acid sequences in seven extensions called "interspecies conserved blocks" (ICB1, ICB2, ICB4, ICB5, ICB6, ICB8 and ICB10). Still, three conserved extensions in *P. vivax* and *P. falciparum* were called conserved blocks (CB3, CB7 and CB9). Finally, blocks (2, 4, 6 and 10) with similarities lower than 45% were designated polymorphic blocks (Del Portillo *et al.* 1991).

The notion that the targets of protective immunity are predominantly highly polymorphic domains of MSP-1 has been supported by elegant experiments with rodent *Plasmodium* species with which we have seen that a specific variant form of variable domains is selected in mice previously immunised with parasites carrying heterologous MSP-1 variant (Martinelli *et al.* 2005). From blood samples of febrile *P. vivax* infected persons, seven Block-2 haplotypes were identified among the isolates circulating on the periphery of Manaus, indicating movement of various Block 2 haplotypes (Figure 1). Block 2 alleles showed a wide variation in repeats and several one-copy sequences. The repeat GSXXX (X stands for any residue) identified by Putaporntip and Cols (2002) did not help in our analysis because many alleles had the same number of repeats. However, we were able to classify other types of repeats using non-synonymous mutations to group them (Table 1). Haplotype 1 represented by the haplotype of the *belém* strain was predominant in our isolates and they were also found in different localities in Southeast Asia and the Brazilian Amazon (data not shown). Both haplotypes 2 and 4 were frequent

in the studied area, and, along with haplotype 7, differences were seen in the number of repeats. These haplotypes were also detected in South Korea, Thailand, Bangladesh and other areas of Brazil (Cui *et al.* 2003; Kim *et al.* 2006; Putaporntip *et al.* 2006; 2002). Haplotypes 3, 5 and 6 were less common among our isolates, although they were found in other endemic areas (Putaporntip *et al.* 2006, Bastos *et al.* 2007)

Two proteins were produced from sequences of haplotypes circulating in an endemic area of Manaus: P2 corresponded to the extension of repeats of haplotype 1 (corresponding to *belém*) and P3 was produced from one of the least commonly circulating haplotypes in Manaus (*haplotype 3*). A third protein (P1), which originated from the interface between an extension ICB1 and Block 2, was produced. Sera of another febrile *P. vivax* infected person assisted by the Hospital Tropical Medicine Foundation were assessed against three recombinant proteins corresponding to Pv-MSP1 Block 2 from 2 haplotypes.

All proteins were soluble, but P2 and P3 had the molecular masses predicted above (Figure 2C-D). The IUPred algorithm determined that these proteins were intrinsically unstructured proteins (IUPs) (data not shown). In contrast, P1 showed expected molecular and well defined three-dimensional structure. However, the functional properties of the three proteins were confirmed by enzyme immunoassays with sera from individuals who were naturally exposed to *P. vivax*. The IUPs were observed with Block 2 proteins of MSP-1 of *Plasmodium falciparum* (Cowan *et al.* 2011), confirming that the sequences of the MSP1 block 2 of both species domains are IUPs and therefore have an apparent molecular mass that is larger than expected.

Investigating the influence of genetic diversity, the P2 (similar to the most frequent haplotype circulating in the endemic area of Manaus) was more frequently seen in symptomatic residents of this area, while P3 (one of less circulating haplotypes) was poorly recognised (Figure 3).

In the endemic area of Rio Pardo, the frequency of response for both was evident, and P3 was more recognised. With little influence of the human migration and annual rates of parasitaemia in the order of 50 cases per thousand inhabitants, the community of Rio Pardo located 140 km from the capital is a more stable malaria endemic area, enabling the identification of individuals with asymptomatic infections (Versiani *et al.* 2013). ICB2-5 was more commonly seen in symptomatic sera in both areas (Manaus and Rio Pardo), but, when comparing the two areas, the individuals from Manaus had higher antibody levels (83%) compared to those from Rio Pardo (62%). Although there are differences in size between ICB2-5 and proteins, P2 showed a similar recognition profile of ICB2-5 in individuals from Manaus and a higher frequency of responders from Manaus (38%) in comparison to Rio Pardo (29%), while P3 was more commonly seen in individuals of Rio Pardo (19%) than Manaus (2%). Comparing the level and frequency of IgG against ICB2-5 in asymptomatic patients, IgG anti-P2 and anti-P3 indicated the presence of two haplotypes in Rio Pardo, as can be seen in symptomatic responses.

In a study conducted in Acrelândia/AC (western Amazon region), both haplotypes (haplotypes *belem* and 3) were identified as circulating in the area, among others, and the prevalence of IgG response to haplotype 3 was similar to our data (Bastos *et al.*, 2007). These data confirm the influence of genetic diversity of MSP1 *P. vivax* in acquiring natural antibodies against polymorphic domains.

From a set of recombinant proteins corresponding to conserved and polymorphic extensions of Pv-MSP1, it was shown that the prevalence of humoral responses of individuals with acute infection by *P. vivax* was directed against polymorphic blocks preferentially against the polymorphic blocks 2 and 4 (Bastos *et al.* 2007; Soares *et al.* 1997). In a preliminary study, survival analyses showed that high levels of IgG anti-ICB2-5 (known as N-terminal MSP1) were associated with premunition and protection to new malaria infections, representing an important factor for immunity clinics (Nogueira *et al.* 2006). Similar to previous data, IgG against the N-terminal *P. falciparum*-MSP1 maintained by asymptomatic individuals conferred a protective effect for prolonged periods (Cavanagh *et al.*, 2004, Polley *et al.* 2003).

It is well established that cytophilic antibodies (mainly IgG3) are indispensable for protective immunity against the blood stages of the parasite through the mechanism of inhibition at the merozoite invasion antibody-dependent level (Jafarshad *et al.* 2007; Druilhe and Perignon 1997, 1994; Bouharoun-Tayoun *et al.* 1995). Recently, it was shown that IgG3 anti-ICB2-5 were associated with clinical immunity developed in asymptomatic infections by *P. vivax*, while IgG2 anti-ICB2-5 represent a transition to this state (Versiani *et al.* 2013).

The predominance of the IgG3 subclass in all responders against the sequences of repeats complies with several studies have shown polymorphic antigens, including variants of the PfMSP1 Block-2 and PvMSP5 frequently recognized by short-lived, species-specific IgG3 (Woodberry *et al.*, 2008; Scopel *et al.* 2007; Cavanagh *et al.*, 2001). Tandem repeated epitope sequences would influence the ability to stimulate effective memory B-cell responses (Woodberry *et al.*, 2008). Regarding the proteins were

developed with only two haplotypes circulating in the study areas the frequency of responders was greater when IgG3 responses against proteins were combined (ICB2-5+P1+P2+P3) was higher than that observed against ICB2-5 alone, the expansion of this repertoire should decrease the effect of the polymorphism of Block 2 and therefore increase the spectrum of protective IgG3 and potentially could decrease the effect of genetic diversity of MSP1.

Acknowledgements

We thank Ms Silvana Sousa da Paz from the facilities of the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ - Salvador, BA, Brazil, for performing the sequencing reactions.

References

Bastos MS, da Silva-Nunes M, Malafronte RS, Hoffmann EH, Wunderlich G, Moraes SL, Ferreira MU: **Antigenic polymorphism and naturally acquired antibodies to Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 in rural Amazonians**. Clinical Vaccine Immunology 2007, **14**: 1249-1259.

Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, and Druilhe P: **Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages**. Journal Experimental Medecine 1995, **182**: 409–418.

Cavanagh DR, Dodoo D, Hviid L, Kurtzhals JA, Theander TG, Akanmori BD, Polley S, Conway DJ, Koram K, McBride JS: **Antibodies to the N-terminal block 2 of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 are associated with protection against clinical malaria**. Infect Immunity 2004, **72 (11)**:6492-502.

Cavanagh DR, Dobaño C, Elhassan IM, Marsh K, Elhassan A, Hviid L, Khalil EA, Theander TG, Arnot DE, McBride JS: **Differential patterns of human immunoglobulin G subclass responses to distinct regions of a single protein, the merozoite surface protein 1 of Plasmodium falciparum**. Infection and Immunity 2001, **69(2)**:1207-11.

Chenet SM, Tapia LL, Escalante AA, Durand S, Lucas C, Bacon DJ: **Genetic diversity and population structure of genes encoding vaccine candidate antigens of *Plasmodium vivax***. *Malar Journal* 2012, **14**:11-68.

Cui L, Mascorro CN, Fan Q, Rzomp KA, Khuntirat B, Zhou G., Chen H, Yan G, Sattabongkot J: **Genetic diversity and multiple infections of *Plasmodium vivax* malaria in Western Thailand**. *Am J Trop Med Hyg* 2003, **68**:613-619.

Del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH: **Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, **88**: 4030-4034.

Druilhe P and Perignon JL: **Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stages in humans**. *Immunology Letters* 1994, **41**: 115-120.

Druilhe P. and Peignon JL: **A Hypothesis about the Chronicity of Malaria Infection**. *Parasitology Today* 1997, **13 (9)**: 353-357.

Kim JR, Imwong M, Nandy A, Chotivanich K, Nontprasert A, Tonomsing N, Maji A, Addy M, Day NPJ, White NJ and Pukrittayakamee S: **Genetic diversity of *Plasmodium vivax* in Kolkata India**. *Malaria Journal* 2006, **5**:71.

Good MF, Kaslow, DC and Miller LH: **Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine.** Annual Review Immunology 1998, **16**:57–87.

Herrera S, Corradin G and Arévalo-Herrera M: **Focus on Plasmodium vivax: An update on the search for a Plasmodium vivax vaccine.** Trends in Parasitology, 2007, **23 (3)** 122-128.

Jafarshad A, Dziegiel MH, Lundquist R, Nielsen LK, Singh S, and Druilhe P: **A Novel Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Mechanism Involved in Defense against Malaria Requires Costimulation of Monocytes Fcγ-RII and Fcγ-RIII.** The Journal of Immunology 2007, **178**: 3099–3106.

Martinelli A, Cheesman S, Hunt P, Culleton R, Raza A, Mackinnon M, Carter R. **A genetic approach to the de novo identification of targets of strain-specific immunity in malaria parasites.** Proc Natl Acad Sci USA 2005, **102 (3)**:814-9.

Nogueira PA, Alves FP, Fernandez-Becerra C, Pein O, Santos NR, . **A reduced risk of infection with Plasmodium vivax and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1.** Infect Immunity 2006 **74**: 2726-2733.

Polley SD, Tetteh KK, Cavanagh DR, Pearce RJ, Lloyd JM, Bojang KA, Okenu DM,

Greenwood BM, McBride JS, Conway DJ: **Repeat sequences in block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are targets of antibodies associated with protection from malaria.** Infection and Immunity 2003, 71(4):1833-42.

Putapornpit C, Jongwutiwes S, Sakihama N, Ferreira MU., Kho W, Kaneko A, Kanbara H, Hattori T, and Tanabe K. **Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus.** Proceedings National Academic Science of USA 2002, 99 (25) 16348–16353.

Putapornpit,C., S.Jongwutiwes, T. Iwasaki, H. Kanbara, and A. L. Hughes: **Ancient common ancestry of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* as inferred from its homologue in *Plasmodium knowlesi*.** Mol. Biochem. Parasitol, 2006 **146**:105–108.

Scopel KK, da Silva-Nunes M, Malafronte RS, Braga EM, Ferreira MU. **Variant-specific antibodies to merozoite surface protein 2 and clinical expression of *Plasmodium falciparum* malaria in rural Amazonians.** Am J Trop Med Hyg 2007, 6(6):1084-91.

Soares IS, Levitus G, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM: **Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria.** Infect Immunity 1997, **65**: 1606-1614.

SIVEP - 2012 - Epidemiological Surveillance System -Bulletin of malaria - Brazilian Health Ministry 2012). Data updated on 06/03/2012. Dados epidemiológicos de malária, por estado. Amazônia Legal, janeiro a dezembro de 2010 e 2011. Dados epidemiológicos de malária, por estado. Amazônia Legal, janeiro a maio de 2009 e 2010. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_malaria_2010_2011.pdf.
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/avaliacao_malaria_jan_maio_19_07_2010.pdf

Takala SL, Coulibaly D, Thera MA, Batchelor AH, Cummings MP, Escalante AA, Ouattara A, Traoré K, Niangaly A, Djimdé AA, Doumbo OK, Plowe CV. **Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development.** Sci Transl Med 2009, 1:2ra5.

Tetteh KK, Cavanagh DR, Corran P, Musonda R, McBride JS, Conway DJ: **Extensive antigenic polymorphism within the repeat sequence of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 block 2 is incorporated in a minimal polyvalent immunogen.** Infection and Immunity 2005, 73(9):5928-35.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J: **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Proc Natl Acad Sci USA. 1979 Sep;76 (9):4350-4.

Versiani FG, Almeida MEM, Melo GC, Versiani FOL, Orlandi PP, Mariúba LAM, Soares LA, Souza LP, Monteiro WM, Costa FTM, del Portillo HA, Lacerda MVG, Nogueira PA. **Clinical protection from malaria is associated with high levels of IgG3 against the N-terminus of Plasmodium vivax merozoite surface antigen-1.** Submitted. 2013.

Weedall GD, Conway DJ. **Detecting signatures of balancing selection to identify targets of anti-parasite immunity.** Trends Parasitol 2010, **26**:363–9.

Woodberry T, Minigo G, Piera KA, Hanley JC, de Silva HD, Salwati E, Kenangalem E, Tjitra E, Coppel RL, Price RN, Anstey NM, Plebanski M: **Antibodies to Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax merozoite surface protein 5 in Indonesia: species-specific and cross-reactive responses.** J Infect Dis 2008, **198 (1)**:134-42.

Legends

Figure 1. The genetic diversity of *PvMSP1* Block 2 in studied area. A) Alignment of amino acid sequences of *PvMSP-1* Block 2 among field isolates from Manaus. B) The frequency of haplotypes circulating in an endemic area of Manaus.

Figure 2. Schematic representation of the proteins constructed from Block 2 and analysis of protein expression. A) Location and arrangement of amine acids sequences according to two classifications of Pv-MSP1. B) Construction of chimera pSMART (IDT Integrated DNA Technologies) with three synthetic DNA sequences corresponding to amino acids of a conserved region located upstream of Block2 (P2); P1 corresponding to the repeats of haplotype *belem* and P3 corresponding to the repeats of haplotype of Pv-MSP1 Block 2 circulating in Manaus. Samples from cell growth and purification steps were resolved by SDS-PAGE (C) and characterised by Western blotting (D). C) The profiles a, b and c represent the purified proteins P3, P2 and P1 from haplotypes of Pv-MSP1 Block 2 (arrow), respectively, and d represents the molecular marker protein. D) A nitrocellulose membrane blotted from an identical gel to that shown in Panel A was probed with a monoclonal antibody specific for his-tag (Invitrogen). The mAb recognises the 16.0 kDa dimeric form of the P3 (a) and P2 (b) and a dominant band (8.0 kDa) of the monomeric form of P1 (c). Some degradation products are also detected by the mAb in all lanes.

Figure 3. IgG responses of febrile patients from Manaus infected with *P. vivax* against studied proteins. Levels of IgG against ICB2-5, P1, P2 and P3 and comparison of means of index reaction (IR) by nonparametric T-test (Kruskal Wallis). Significant differences were observed with p-values <0.0001.

Figure 4. Broadening serotype-specific responses with a repertoire of proteins of Pv-MSP1 Block 2. A) Frequencies of the sera containing IgG3 and IgG2 against ICB2-5,

P1, P2 and P3 and repertoire of proteins combined at groups (P2+P3) or (P1+P2+P3) or (ICB2-5+P1+P2+P3). B) The distribution of reactivity confirming the exclusivity of some sera against the combination P1+P2+P3 compared to the response against ICB2-5 (stars). IR<2.0 (light grey), IR: 2.1 to 3.9 (dark grey) and IR>4.0 (black). Negatives: IR <1 (white).

Table 1. Repeats and synonymous substitutions observed 7 haplotypes Pv-MSP1 circulating in Manaus

	Di Tripeptides	or	Haplotypes								Nucleotide sequence	
			1	2	3	4	5	6	7	8		
1	SSE			X	X	X	X	X	X	X	1	AGT-TCG-GAA
2	SSG			X	X	X	X	X	X	X	2	TCT-TCT-GGA
											<u>2</u>	TCA-TCT-GGC
											2*	TCG-AGT-GGC
											2 [#]	TCA-TCT-GTC
3	SSV			X		X	X	X			3	AGT-TCT-GTT
											<u>3</u>	TCA-TCT-GTC
4	SST		X	X	X		X		X	X	4	TCT-TCA-ACA
5	SSA		X								5	AGT-TCT-GCT
6	SSN		X		X		X		X	X	6	TCG-TCT-AAC
											<u>6</u>	TCA-TCT-AAC
7	SSP		X								7	TCT-TCT-CCA
8	SSS						X				8	TCA-TCT-TCT
9	GST		X	X	X	X	X	X	X	X	9	GGT-TCA-ACT
											<u>9</u>	GGT-TCG-ACT
											9*	GGT-TCA-ACA
											10	GGC-ACG
											<u>10</u>	GGT-ACT
											10*	GGT-ACA
10	GT		X	X	X	X	X	X	X	X	10 [#]	GGT-ACG
											10 ^{&}	GGA-ACC
											10**	GGA-ACA
											10 ^{###}	GGC-ACT

Three types of repeats could distinguish the haplotypes, including two trimers and one dimer. The first repeat is a degenerating 3-mer SSX (X stands for any residue); the second repeat is a conserved 3-mer (GST); and the third is a conserved dimer repeat (GT). Nucleotide sequences show synonymous mutations among majority of repeats.

Table 2. Spearman's correlation coefficients of IgG index reaction of asymptomatic and symptomatic individuals against studied proteins

	ICB2-5	P1	P2
Asymptomatic			
ICB2-5			
P1	0.501[*]		
P2	0.516[*]	0.595[*]	
P3	0.579[*]	0.770^{**}	0.646^{**}
Symptomatic/RP			
ICB2-5			
P1	0.403[*]		
P2	0.499[*]	0.396[*]	
P3	0.286	0.570[*]	0.357

★ Spearman's correlation coefficients are significant ($P < 0.01$).

★★ Spearman's correlation coefficients are significant ($P < 0.001$).

Table 3. Spearman's correlation coefficients of IgG subclasses index reaction of asymptomatic individuals against studied proteins

		ICB2-5			P1			P2			P3	
		G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2
ICB2-5	G1											
	G2											
	G3		0.487[*]									
P1	G1											
	G2		0.147	0.088								
	G3		0.321	-0.043		0.176						
P2	G1		0.387	0.411		0.729^{**}	-0.137					
	G2		0.147	0.088		1.000	0.176	0.729^{**}				
	G3		-0.019	-0.022		-0.133	0.223	-0.091	-0.133			
P3	G1											
	G2		0.529[*]	0.539[*]		0.395	-0.253	0.614^{**}	0.395	-0.168		
	G3		0.272	0.519[*]		0.233	-0.347	0.443	0.233	0.136	0.812^{**}	

^{*} Spearman's correlation coefficients are significant (P < 0.01).

^{**} Spearman's correlation coefficients are significant (P < 0.001).