

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA**

**PROTEÍNA 1 DE MEROZOÍTO DE *Plasmodium vivax*: ESTUDO
DA RESPOSTA IMUNE ESPECÍFICA CONTRA DOMÍNIOS
POLIMÓRFICOS E CONSERVADOS EM POPULAÇÕES
BRASILEIRAS**

CRISTIANE GUIMARÃES MORAIS

BELO HORIZONTE

2011

CRISTIANE GUIMARÃES MORAIS

**PROTEÍNA 1 DE MEROZOÍTO DE *Plasmodium vivax*: ESTUDO
DA RESPOSTA IMUNE ESPECÍFICA CONTRA DOMÍNIOS
POLIMÓRFICOS E CONSERVADOS EM POPULAÇÕES
BRASILEIRAS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do
título de Doutor em Parasitologia.**

Área de Concentração: Protozoologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Érika Martins Braga

BELO HORIZONTE

2011

Trabalho realizado no Laboratório de Malária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais. Estudo financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (CBB PPM-0003-09), Pronex Malária, DECIT/MS (555646/2009-2) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) (Bolsa de Doudorado 2007 – 2011; processo: 141670/2007-0).

AGRADECIMENTOS

É com muito carinho que escrevo esta sessão de agradecimentos, pois as pessoas que aqui menciono, contribuíram de muitas formas para a elaboração dessa tese. Algumas de forma direta, agregando conteúdos e boas energias, outras mesmo sem se dar conta, foram muito importantes.

À Prof^a Érika Martins Braga, por ter mais uma vez acreditado e me incentivado a ingressar nesta caminhada. Obrigada pelos bons anos de convivência, pelas discussões e ensinamentos adquiridos ao longo destes anos.

À minha amada família, pelo amor incondicional, presença e incentivo em todos os momentos.

Ao Rodrigo, por todo apoio e conforto nas horas difíceis. Obrigada por seu amor, dedicação, paciência, incentivo e por me fazer feliz.

Ao Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira, da Universidade de São Paulo, por ter cedido os plasmídeos recombinantes utilizados neste estudo.

Aos Professores Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes, da Universidade Federal de Mato Grosso e ao Dr. Marcus Vinícius Lacerda, da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, por fornecerem as amostras biológicas.

Ao Prof. Dr. Ricardo Araújo Nascimento, pelas contribuições durante o processo de qualificação e pelo auxílio inicial com a expressão das proteínas recombinantes.

Ao Prof. Dr. Ricardo Fujiwara, pelas discussões científicas, amizade e por estar sempre disposto a ajudar.

À Prof^a Daniella Bartholomeu, pela importante contribuição para a purificação das proteínas recombinantes.

À Lílian Bueno, companheira de viagens a quem gostaria de agradecer de uma forma especial. Obrigada pelas discussões, pela imensurável ajuda nos experimentos, por ter compartilhado as ansiedades, pelos bons momentos vividos, enfim... Obrigada por ter se tornado uma grande amiga durante esta caminhada.

Ao Matheus França Freire, uma pessoa querida que tive o privilégio de conhecer e orientar seu trabalho de iniciação científica. Obrigada por sua dedicação, disposição e pela valiosa ajuda com a expressão das proteínas recombinantes.

Às amigas Luiza Mourão, Nayara Belo e Patrícia Silveira, por tornarem os dias no Laboratório de Malária bastante divertidos, sempre dispostas a ajudar. Em especial, à Luiza pela ajuda com a estatística.

À Michele Penna, pela grande ajuda com a produção inicial das proteínas recombinantes.

Aos colegas do Laboratório de Malária, Adriana Fonseca, Gabriel Félix e Zélia Almeida pelos bons momentos de convivência.

Ao pessoal da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em especial à Erecilda e ao Dr. Roberto Reys pela ajuda com as coletas de sangue.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia pelos ensinamentos.

À Sumara, secretária do curso de Pós-Graduação em Parasitologia, pelo carinho e atenção.

Aos pacientes avaliados neste estudo, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, a Deus, por estar sempre presente, por ser sempre o sinal e caminho para todo o sentido da minha vida e por tornar tudo isso possível.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 Agente etiológico.....	1
1.2 Ciclo dos plasmódios no hospedeiro vertebrado	2
1.3 Epidemiologia da malária no Brasil e no mundo.....	4
1.4 Resposta imune contra formas sanguíneas do Plasmodium	8
1.4.1 História natural da malária em regiões de intensa transmissão.....	9
1.4.2 Imunidade em populações brasileiras.....	11
1.4.3 O papel dos anticorpos na imunidade antimalárica.....	13
1.5 Proteína 1 de superfície de merozoítos (MSP-1): um promissor candidato vacinal.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Indivíduos e área de estudo	28
4.2 Antígenos recombinantes.....	31
4.2.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	31
4.3 ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-MSP-1 de P. vivax.....	36
4.4 Detecção de espécies de plasmódio pela técnica de PCR.....	37
4.5 Determinação do polimorfismo no gene pvmsp1	38
4.6 Análise dos dados	40
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Descrição da população de estudo.....	42
5.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	43

5.3 <i>Análise do reconhecimento imune das proteínas recombinantes correspondentes a diferentes domínios e variantes alélicas da PvMSP-1</i>	48
5.3.1 <i>Padrão da resposta de IgG anti-PvMSP-1 na população de estudo</i>	49
5.3.2 <i>Correlação entre os níveis de IgG anti-PvMSP-1 e o grau de identidade entre as sequências de aminoácidos dos antígenos recombinantes</i>	52
5.3.3 <i>Influência da parasitemia sanguínea na resposta de IgG anti-PvMSP-1</i>	54
5.3.4 <i>Influência da exposição ao Plasmodium na resposta de IgG anti-PvMSP-1</i>	56
5.3.5 <i>Associações entre a resposta de IgG e parâmetros de morbidade</i>	59
5.4 <i>Relação entre anemia e variante antigênica da PvMSP-1 determinada nos parasitos infectantes</i>	68
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÕES GERAIS	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Distribuição mundial da malária em 2009 (Fonte: OMS, 2010)..... 5**
- FIGURA 2: Mapa de risco da malária por município de infecção, Amazônia Legal, 2008. Baixo risco: IPA < 10; médio risco IPA 10-49; alto risco IPA ≥ 50 (Fonte: SIVEP/SVS/MS, atualizado em 28/12/2009)..... 6**
- FIGURA 3: Modelo proposto para MSP-1 na superfície do parasito. Duas moléculas de MSP1 formam um dímero na superfície de esquizontes. O processamento primário cliva o precursor em fragmentos que permanecem como um complexo protéico na forma de dímeros na superfície do merozoíto. A liberação do complexo requer a clivagem de ambos os polipeptídeos MSP1₄₂ durante o processamento secundário, no momento da invasão dos eritrócitos. Após a clivagem, o complexo é liberado na forma dimérica devido à associação de dois polipeptídeos MSP1₃₃, enquanto os fragmentos MSP1₁₉, na superfície do estágio de “anel”, encontram-se na forma monomérica (Adaptado de BABON et al., 2007). 16**
- FIGURA 4: Representação esquemática da MSP-1 de *P. vivax*. (A) Divisão da PvMSP-1 em blocos conservados interespecíficos (ICB) (com similaridade de aminoácidos >48% entre ortólogos da MSP1 de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. yoelii*) [representado como regiões claras]; blocos semi-conservados (CB) (similaridade de aminoácidos >50% somente entre ortólogos da MSP-1 de *P. falciparum* e *P. vivax*) [representado como regiões hachuradas] e blocos polimórficos, (similaridade de aminoácidos <45%) [representado por regiões escuras]; segundo descrição de del PORTILLO et al., 1991. (B) Divisão da PvMSP-1 segundo PUTAPORNTIP et al. 2002 em blocos conservados (regiões claras) e polimórficos (regiões escuras) entre sequências de diferentes isolados de *P. vivax*. 18**
- FIGURA 5: Esquema do processo de purificação das proteínas recombinantes representando diferentes domínios da MSP-1 de *P. vivax*..... 34**
- FIGURA 6: Análise em SDS-PAGE 10% da cinética de expressão da proteína recombinante 10-BP39. Padrão de migração do extrato protéico da cultura de *E. coli* antes e após indução da expressão com 0,7mM de IPTG. 1: marcador de massa molecular. 2 a 5: precipitados protéicos após, respectivamente, 0, 2, 3 e 4 horas da adição de IPTG. Coloração com Coomassie blue R-250. 44**

FIGURA 7: Análise em SDS-PAGE 10% das frações protéicas obtidas após a lise da cultura de *E. coli* depois de 4 horas da indução da expressão da proteína recombinante 10-BP39. 1: marcador de massa molecular; 2: precipitado; 3: sobrenadante. Coloração com Coomassie blue R-250..... 45

FIGURA 8: Análise em SDS-PAGE 12,5% das frações eluídas após a purificação da proteína recombinante 2-BP39 utilizando o sistema de purificação de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) ÄKTA (GE Healthcare). 1: marcador de massa molecular; 2 a 8: frações eluídas com tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo 10mM de glutatona reduzida. Coloração com Coomassie blue R-250 46

FIGURA 9: Análise em SDS-PAGE 12,5% das proteínas recombinantes após purificação e diálise. Padrão de migração das proteínas recombinantes correspondentes as diferentes variantes dos blocos polimórficos 2 e 10 da PvMSP-1 (bandas 2 a 8), além da proteína recombinante controle GST (banda 9). 1. marcador de massa molecular; 2. 10-BP13; 3. 10-BR07; 4. 10-BP29; 5. 10-BP39; 6. 10-BP01; 7. 2-BEL; 8. 2-BR07; 9. GST Coloração com Coomassie blue R-250..... 47

FIGURA 10: Padrão respostas de anticorpos IgG anti-proteínas recombinantes correspondentes aos domínios polimórficos (blocos 2 e 10) e conservados (bloco 13, MSP1₁₉) da PvMSP-1 observado para os soros de 214 indivíduos com infecção patente por *P.vivax* avaliados neste estudo. (A) Frequências de respondedores positivos (teste exato de Fisher). (B) Níveis de IgG expressos como índices de reatividade (IR) dos soros (IR=média da absorvância do soro teste/ cut off). A linha pontilhada indica o limite de positividade (cut off). Letras idênticas indicam proporções (A) e medianas (B) estatisticamente iguais, como determinado no teste exato de Fisher ou Friedman acompanhado pelo teste pos hoc de Dunns, respectivamente. 49

FIGURA 11: Correlação entre as porcentagens de identidade compartilhada pelas variantes de um mesmo bloco polimórfico da PvMSP-1 e os coeficientes de correlação (r_s) entre os níveis de anticorpos IgG específicos para as respectivas variantes. (A) #Correlação para os antígenos do bloco 2 ($r=-0,03753$, $P=0,9180$). (B) #Correlação para as variantes do bloco 10 ($r=0,5445$, $P=0,1036$). #Correlação de Spearman. 54

FIGURA 12: Efeito da parasitemia (parasitos/ μ L de sangue) na determinação da resposta de anticorpos anti-proteínas recombinantes das regiões N- e C-terminais da PvMSP-1. Frequências (A) e níveis (B) de IgG anti-proteínas recombinantes correspondentes a variantes do bloco 2 da PvMSP-1. Frequências (C) e níveis (D) dos anticorpos IgG anti-proteínas recombinantes correspondentes às variantes antigênicas do bloco 10 da PvMSP-1 e à proteína conservada MSP1₁₉. Os níveis de anticorpos foram expressos como índices de reatividade (IR) observados para os soros de indivíduos com infecção patente por *P.vivax*. Os indivíduos foram divididos em quatro grupos conforme indicado na legenda. Qui-quadrado de tendência, ** $P < 0,001$; * $P < 0,0001$; Kruskal-Wallis one way ANOVA, * $P < 0,05$ 55**

FIGURA 13: Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgG anti-proteínas recombinantes da PvMSP-1. Frequências (A) e níveis de anticorpos IgG (médias, IC 95%) (B) anti-proteínas recombinantes do bloco 2 da PvMSP-1. (C) Frequências de respondedores positivos (Qui-quadrado de tendência, * $P < 0,05$) e níveis de anticorpos IgG (médias, IC 95%) (D) (* $P=0,0242$, ** $P=0,0067$, * $P<0,0001$, Kruskal-Wallis one way ANOVA) anti-proteínas recombinantes da região C-terminal da PvMSP-1 Os indivíduos foram divididos em quatro grupos como indicado na legenda, sendo 0M: primo-infectados, 1M: 1 episódio prévio, 2 - 5M: 2 a 5 malárias prévias e > 5M: mais de cinco episódios agudos anteriores. As linhas pontilhadas indicam o limite de positividade (cut off). 58**

FIGURA 14: Correlação entre níveis séricos de hemoglobina de 190 pacientes infectados com *P. vivax* e níveis de IgG (IR) anti-proteínas recombinantes da região C-terminal da PvMSP-1. (bloco 10 e MSP1₁₉). Correlação de Spearman..... 60

FIGURA 15: Associação entre a resposta de anticorpos IgG anti-proteínas recombinantes da PvMSP-1 e anemia. Frequências (A) e níveis de anticorpos IgG (médias, IC 95%) (B) anti-proteínas recombinantes do bloco 2 da PvMSP-1. Frequências (C) e níveis de anticorpos IgG (médias, IC 95%) (D) anti-proteínas recombinantes da região C-terminal da PvMSP-1. As linhas pontilhadas indicam o limite de positividade (cut off). * $P < 0,05$ 62

FIGURA 16: Associações entre as respostas de IgG variante-específica para PvMSP-1 e anemia. (A) Correlação entre os escores do segundo componente principal e os níveis de hemoglobina de 190 pacientes com infecção patente por *P. vivax*. (B) Médias dos escores referentes ao segundo componente principal de indivíduos anêmicos e não anêmicos. Os boxes indicam as médias e o intervalo interquartil. As barras indicam o mínimo e o máximo. * $P < 0,0001$ 67

FIGURA 17: Alinhamento das oito sequências do bloco 10 da PvMSP-1 encontradas em parasitos isolados de 41 pacientes com infecções patentes por *P. vivax*. Cinco sequências (I, II, III, VI e VIII que correspondem a 73% de todas as sequências do bloco 10) são idênticas às sequências dos antígenos recombinantes utilizados na sorologia (BR07, BP13, BP29, BP01, BP39, respectivamente). As sequências IV e V são similares às sequências do antígeno BP29 (74,0% e 67,1% de similaridade de aminoácidos, respectivamente), enquanto a sequência VII possui 63,7% de identidade com a sequência do antígeno BP01..... 70

FIGURA 18: Reconhecimento de anticorpos IgG contra antígenos do bloco de pacientes anêmicos (n=17) e não anêmicos (n=24) infectados com *P. vivax*. Diferentes níveis de anticorpos (IR) são representados com diferentes padrões de sombreamento. Sequências homologas às sequências dos antígenos recombinantes foram identificadas com o nome do respectivo antígeno com o qual ela compartilha 100% de identidade de aminoácidos. ID: identificação do paciente..... 72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Características da população avaliada neste estudo. As coletas foram realizadas nos meses de março de 2008 e maio de 2009.....	42
TABELA 2: Porcentagem de identidade de aminoácidos entre as variantes do bloco 2 da PvMSP1 expressas como antígenos recombinantes e coeficientes de correlação de Spearman (r_s) na comparação dos níveis de anticorpos IgG específicos para estas variantes .	52
TABELA 3: Porcentagem de identidade de aminoácidos entre as variantes do bloco 10 da PvMSP1 expressas como antígenos recombinantes e coeficientes de correlação de Spearman (r_s) na comparação dos níveis de anticorpos IgG específicos para estas variantes .	53
TABELA 4: Comparação entre proporções de respostas positivas e níveis (IR) de IgG específicos para os antígenos recombinantes dos blocos variáveis 2 e 10 e da região C-terminal conservada (MSP1₁₉) da PvMSP-1 de acordo com a contagem de plaquetas/mm³ de sangue em indivíduos infectados com <i>P. vivax</i>.....	64
TABELA 5: Variáveis incluídas na ACP e sua contribuição para os três eixos derivados.....	66
TABELA 6: Frequência dos haplótipos obtidos para os isolados de <i>P. vivax</i> de 41 pacientes com malária e associação entre estes haplótipos e os antígenos recombinantes do bloco polimórfico 10 da PvMSP-1.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

DO	–	Densidade óptica
CD	–	<i>Cluster of differentiation</i> /grupamento de diferenciação
EDTA	–	ácido etileno diamino tetracético
ELISA	–	<i>Enzyme-linked Immunosorbent assay</i> / Ensaio imunoenzimático
Hb	–	Hemoglobina
DTT	–	Ditiotreitol
IC	–	Intervalo de confiança
Ig	–	Imunoglobulina
IPA	–	Índice parasitário anual
IPTG	–	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
IR	–	Índice de reatividade
LB	–	Luria-Bertani
MSP1 ₁₉	–	Fragmento de 19 kDa da proteína 1 de superfície de merozoíto
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
PBMC	–	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	–	Tampão fosfato salina
PCR	–	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	–	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PvAMA-1	–	Antígeno 1 da Membrana Apical de <i>Plasmodium vivax</i>
PvMSP-1	–	Proteína 1 de Superfície de Merozoíto de <i>Plasmodium vivax</i>
SDS-PAGE	–	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TA	–	Temperatura ambiente
Th	–	Células T auxiliaadoras
TNF- α	–	Fator de necrose tumoral alfa
WHO	–	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

A maioria dos estudos sobre o papel da proteína MSP-1 de *Plasmodium vivax* na imunidade naturalmente adquirida contra a malária concentra-se na região conservada C-terminal da molécula. No entanto, evidências substanciais provenientes de estudos experimentais com roedores apontam as sequências polimórficas da MSP-1, as quais se encontram sob seleção balanceada, como alvos da resposta imune protetora alelo-específica. Apesar destas evidências, o nosso atual conhecimento a respeito da resposta de anticorpos naturalmente adquiridos contra domínios polimórficos da PvMSP-1 é muito limitado. Neste trabalho de doutorado, foi avaliada a resposta de IgG dirigida contra epitopos conservados (MSP1₁₉) e polimórficos (blocos 2 e 10) da PvMSP-1 em 214 pacientes com malária clínica, mono infectados por *P. vivax*, residentes na área endêmica brasileira. Dez proteínas recombinantes correspondentes às variantes alélicas do bloco 2 (BR07, BP29, BP39, BP30, BEL) e bloco10 (BR07, BP29, BP39, BP01, BP13) da PvMSP-1 já descritas entre os isolados brasileiros de *P. vivax*, além de uma recombinante correspondente a subunidade conservada C-terminal da PvMSP-1, a proteína MSP1₁₉ foram expressas em *Escherichia coli*. Com exceção das variantes antigênicas BR07 e BP13, cujo reconhecimento por anticorpos IgG foi superior a 40%, nossos dados mostram que as demais variantes foram pouco reconhecidas (13 a 31%) por soros dos indivíduos avaliados. Com relação à magnitude da resposta variante-específica, os níveis médios de IgG também foram baixos, com as maiores reatividades detectadas para anticorpos dirigidos contra as variantes BR07 e BP13. Diferente do padrão de resposta observado para os epitopos polimórficos, 89% dos indivíduos apresentaram IgG contra o domínio conservado C-terminal (MSP1₁₉); corroborando a alta imunogenicidade desta região da molécula. Presença e níveis de anticorpos detectados contra a variante BP13 do bloco 10 e anti-MSP1₁₉ foram associados ao tempo de exposição à malária (número de episódios clínicos prévios), sugerindo que durante um episódio agudo de malária, há um *boosting* na resposta de anticorpos dirigidos contra estes epitopos C-terminais da PvMSP-1. Um aspecto importante, mas ainda pouco explorado nas infecções por *P. vivax* é a associação de parâmetros clínicos associados à morbidade na malária, como anemia e plaquetopenia e a resposta de anticorpos alelo-específicos. Os resultados obtidos a partir de uma combinação de análises empregando técnicas estatísticas uni e multivariada (ACP), mostraram a presença de correlações negativas entre níveis séricos de hemoglobina e níveis de IgG contra as variantes BR07 e BP13 do bloco 10. Interessantemente, as mesmas sequências destas variantes foram identificadas, em maior prevalência, nos parasitos infectantes isolados de indivíduos anêmicos quando comparados aos não anêmicos, evidenciando uma associação entre a variante alélica infectante e a resposta de anticorpos específica. Estes dados sugerem o possível envolvimento dos anticorpos IgG específicos para a variante alélica infectante e direcionados para a região polimórfica C-terminal da PvMSP-1 na etiologia da anemia observada durante a malária por *P. vivax*. De modo geral, nossos resultados evidenciam o padrão de reconhecimento imune distinto, em termos de anticorpos variante-específicos, entre os domínios N- e C- terminais da PvMSP1, o que pode ter implicações para o desenvolvimento de vacinas baseadas na PvMSP1; além de destacarem a real necessidade de se ampliar os estudos sobre a resposta imune dirigida contra epitopos polimórficos desta proteína em diferentes realidades epidemiológicas.

Palavras-chave: Anemia; Anticorpo variante-específico; Malária; MSP-1; *Plasmodium vivax*; Polimorfismo antigênico.

ABSTRACT

Most studies regarding the role of *Plasmodium vivax* MSP-1 (PvMSP1) in protective immunity against malaria have focused on C-terminal conserved region of molecule. However, there are convincing evidences suggesting the polymorphic sequences of MSP-1, which are under balancing selection, as target of protective immune response. Despite this evidence, our current knowledge regarding the naturally acquired antibody responses against the polymorphic domains of PvMSP-1 is very limited. Here, we evaluated the IgG response directed against conserved (MSP1₁₉) and polymorphic (block 2 and 10) epitopes of PvMSP-1 in 214 patients with clinical malaria, only infected by *P. vivax*, living in Brazilian endemic area. Ten recombinant proteins corresponding to allelic variants of blocks 2 (variants BR07, BP29, BP39, BP30, BEL) and 10 (BR07, BP29, BP39, BP01, BP13) of PvMSP-1 commonly found in Brazilian *P. vivax* isolates were expressed in *Escherichia coli*, in addition to a recombinant corresponding to the conserved 19-kDa C-terminal subunit of PvMSP-1, the MSP1₁₉ protein. Our data show that the most of recombinant proteins corresponding to PvMSP-1 variants were poorly recognized (13-31%) by serum of individuals evaluated; with exception of responses detected for BR07 and BP13 variants, which recognition by IgG antibodies was higher than 40%. Regarding the magnitude of the variant-specific response, the average of IgG levels were also low, with the highest reactivity detected for antibodies against the variants BR07 and BP13. Unlike the response pattern observed for polymorphic epitopes, 89% of individuals had IgG against the C-terminal conserved domain (MSP1₁₉), confirming the high immunogenicity of this region of the molecule. Proportion and levels of antibodies to BP13 variant of block 10 and to MSP1₁₉ were associated with exposure to malaria (number of previous clinical episodes), suggesting that during an acute *P. vivax* infection, there is a boosting in antibody response directed against these C-termini PvMSP-1 epitopes. An important but that remains poorly investigated in *P. vivax* infections is the association of clinical parameters of morbidity, such as anemia and thrombocytopenia and allele-specific antibody response to *P. vivax* antigens. By using a combination of statistical analyses that employed univariate and multivariate approaches (PCA); we showed negative correlations between levels of hemoglobin and IgG antibodies against BR07 and BP13 versions of block 10 (Spearman correlation test, $P < 0.0001$). Interestingly, the sequences of these variants were identified in higher prevalence in infecting parasites from anemic patients when compared to non-anemic; showing that the specificity of IgG antibodies matched the block 10 PvMSP-1 variant found in infecting parasites. These data suggest the possible involvement of IgG to allelic-specific epitope of infecting variant form and targeted to polymorphic C-terminal region of PvMSP-1 in the immunological mechanisms that have been implicated in aetiology of malarial anemia by *P. vivax*. Overall, our results show a distinct pattern of immune recognition, in terms of variant-specific antibodies, between N- and C-termini PvMSP-1 domains. These findings may have implications for PvMSP-1 -based vaccine development and highlight the real need to expand the studies on the immune response directed against polymorphic epitopes of PvMSP-1 in different epidemiological situations.

Keywords: Allele-specific antibodies; Anemia; Malaria; MSP-1; *Plasmodium vivax*

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Agente etiológico

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium* que inclui várias espécies parasitas em diferentes hospedeiros vertebrados. Apenas cinco espécies parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, um plasmódio de símios do sudeste asiático. A inclusão do *P. knowlesi* como quinta espécie de plasmódio humano é justificada em função de, nos últimos anos, ter sido relatado um grande número de pacientes na Malásia, Tailândia, Mianmar, Filipinas e Singapura diagnosticados com malária por esta espécie (COX-SINGH et al., 2008; LUCHAVEZ et al., 2008; NG et al., 2008; LEE et al., 2009). Entretanto, diferente da malária por *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* consideradas antroponoses, a infecção por *P. knowlesi* possui caráter zoonótico, uma vez que esta espécie circula entre símios (*Macaca fascicularis* e *Macaca nemestrina*) e humanos.

Dentre estas cinco espécies, *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes no mundo, sendo o *P. falciparum* considerado, justificavelmente, a espécie de maior impacto global devido ao grande número de cepas resistentes a antimaláricos e aos altos níveis de mortalidade registrados principalmente no continente africano (WHO, 2004). Apesar das infecções por *P. vivax* raramente resultarem em óbito, esta espécie não pode ser negligenciada, pois recentemente, o número de casos de malária grave por *P. vivax* aumentou consideravelmente, bem como os relatos de cepas resistentes a antimaláricos em diferentes partes do mundo (BAIRD et al., 2004; BAIRD et al., 2007; ARÉVALO-HERRERA et al., 2010).

1.2. Ciclo dos plasmódios no hospedeiro vertebrado

O ciclo de vida do *Plasmodium sp.* é complexo e envolve dois hospedeiros: o mosquito (vetor e hospedeiro definitivo) e o vertebrado (hospedeiro intermediário). Este ciclo pode variar dependendo da espécie de parasita e do tipo de hospedeiro, mas mantém um padrão básico em todas elas. Todos os plasmódios que parasitam humanos realizam o ciclo sexuado de desenvolvimento em fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*.

A infecção no hospedeiro vertebrado tem início quando o anofelino infectado ao exercer seu repasto sanguíneo, juntamente com a saliva, inocula esporozoítos na circulação sanguínea e/ou no tecido subcutâneo do hospedeiro. Estudos com modelo murino mostraram que alguns esporozoítos são drenados para os vasos linfáticos, atingindo os linfonodos (AMINO et al., 2006) onde, apesar de poderem se desenvolver parcialmente como formas exo-eritrocíticas, não dão continuidade ao ciclo, pois são degradados por leucócitos aí presentes. Apenas aqueles esporozoítos que atingem a circulação sanguínea são capazes de se desenvolverem dentro das células hepáticas (AMINO et al., 2006). No fígado, antes de invadirem um hepatócito, os esporozoítos realizam sucessivas passagens por várias células (transmigração dos esporozítos), podendo causar sérios danos às mesmas. Algumas células são capazes de reparar o dano enquanto outras morrem por necrose em poucos minutos (MOTA et al., 2001). O processo de transmigração dos esporozoítos parece ser um evento primordial para o ciclo de vida dos plasmódios, pois induz a secreção de uma substância chamada fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), a qual torna tais células mais susceptíveis à infecção (CARROLO et al., 2003). Pelo menos duas proteínas estão envolvidas neste processo de reconhecimento e invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos: a proteína circum-esporozoíto (CS) (CERAMI et al., 1992; FREVERT et al., 1993) e a proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP) (ROBSON et al., 1995).

Após invasão dos hepatócitos, os esporozoítos se multiplicam por reprodução assexuada dando origem a milhares de merozoítos (ciclo exo-eritrocítico). O desenvolvimento nas células do fígado requer aproximadamente

uma semana para o *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para o *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, ocorrem formas que ficam em estado de latência no hepatócito, os chamados hipnozoítos (KROTOSKI, 1985), responsáveis pelas recaídas da doença após períodos variáveis de incubação.

Os merozoítos formados durante a fase exo-eritrocítica são liberados do fígado para a circulação sanguínea por meio de estruturas vesiculares denominadas merossomos (STURM et al., 2006). Esses merossomos se deslocam para os sinusóides hepáticos garantindo que a liberação de merozoítos vivos ocorra diretamente na circulação sanguínea. Foi demonstrado que os hepatócitos parasitados entram em processo de morte celular, mas, no entanto, não são fagocitados pelas células de Kupffer e/ou outras células fagocíticas presentes nos sinusóides hepáticos. A capacidade dos fagócitos de reconhecerem distintamente células viáveis de células apoptóticas depende, pelo menos em parte, da exposição de resíduos de fosfatidilserina na camada externa da membrana plasmática de células em apoptose (VERHOVEN et al., 1995; FADOK et al., 2001; LI et al., 2003). STURM e colaboradores em 2006 demonstraram que as membranas dos hepatócitos infectados, da mesma forma que observado em células viáveis, mantêm a distribuição assimétrica dos resíduos de fosfatidilserina em suas camadas externas, evitando, portanto que as células hepáticas infectadas sejam reconhecidas pelas células do sistema imune. Um dos sinais necessários para a inversão dos resíduos de fosfatidilserina é o aumento da concentração de cálcio no citoplasma da célula a partir da liberação de íons Ca^{2+} presentes em estoques internos como mitocôndrias e retículo endoplasmático. O parasito manipula a maquinaria de sinalização da célula hospedeira na medida em que os merozoítos acumulam ativamente o Ca^{2+} intracelular que é liberado dos estoques internos dos hepatócitos, mantendo os níveis de Ca^{2+} citoplasmáticos baixos e impedindo a inversão dos resíduos de fosfatidilserina (STURM et al., 2006).

Cada hepatócito infectado pode liberar na circulação sanguínea até 40.000 merozoítos (NARDIN & NUSSENZWEIG, 1993; GOOD et al., 1998) que após deixarem os hepatócitos invadem os eritrócitos iniciando, assim, o ciclo assexuado sanguíneo (ciclo eritrocítico). O desenvolvimento intra-eritrocítico do

parasito segue duas vias distintas: multiplicação assexuada por esquizogonia originando merozoítos sanguíneos que invadirão novos eritrócitos ou diferenciação em estágios sexuais, denominados gametócitos, que irão evoluir no mosquito vetor dando origem aos esporozoítos. O ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes, conduzindo a lise de eritrócitos e sendo responsável pelas manifestações clínicas e patogênese associada à doença.

Desta maneira, pode-se dizer que durante o ciclo de desenvolvimento no hospedeiro vertebrado, o parasito pode, portanto, ser alvo da resposta imune em maior ou menor grau em função do seu estágio de desenvolvimento: esporozoítos e merozoítos extracelulares e parasitos intra-hepáticos e intra-eritrocitários. Mas é durante o ciclo eritrocítico que, fundamentalmente, o sistema imune do hospedeiro responde aos antígenos parasitários levando à resposta imune efetiva contra o parasito ou à imunopatologia.

1.3. Epidemiologia da malária no Brasil e no mundo

A malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública em países tropicais e subtropicais, onde, em muitas vezes, aparece como a principal causa de morbidade e mortalidade. São estimados que 515 milhões de casos de malária ocorram a cada ano, gerando um impacto negativo na sociedade, uma vez que a doença diminui a produtividade e o crescimento econômico e aumenta a pobreza. Embora erradicada em algumas partes do mundo, estima-se que 40% da população mundial viva em áreas endêmicas para malária (SNOW et al., 2005) **(FIGURA 1)**.

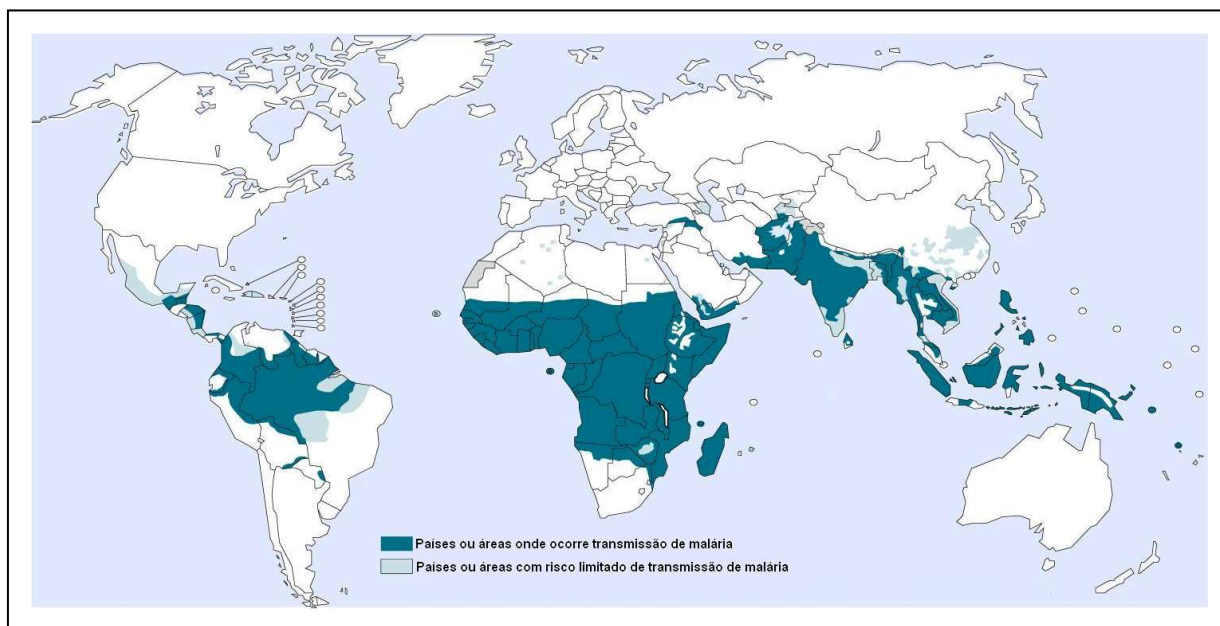


FIGURA 1: Distribuição mundial da malária em 2009 (Fonte: OMS, 2010).

A transmissão da malária ocorre em aproximadamente 100 países expondo dois bilhões de pessoas à infecção, principalmente, pelo *P. falciparum* e *P. vivax*. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), na África sub-Saara, a malária por *P. falciparum* é a principal causa de morte entre crianças com menos de cinco anos de idade. Enquanto o *P. falciparum* prevalece no continente africano, o *P. vivax* é a espécie prevalente na Ásia e América Latina, causando raramente quadros letais, apesar de, em alguns casos, levar ao desenvolvimento de malária grave (SNOW et al., 2005).

No Brasil, 99,8% da transmissão de malária concentra-se na Amazônia Legal (Estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão), onde a doença tornou-se uma das principais causas de morbidade, com 304.233 casos registrados em 2009 (MALÁRIA/SVS/MS, 2010). O padrão de transmissão no Brasil é diferente do observado nas áreas hiper a holoendêmicas da África e Ásia, caracterizando-se como uma área de hipo a mesoendemicidade, de transmissão instável com flutuações sazonais anuais (CAMARGO et al., 1996). Além disso, a malária não se apresenta distribuída uniformemente em toda a região amazônica, uma vez que se observam áreas com diferentes níveis de transmissão da doença (alto, médio e baixo risco)

(**FIGURA 2**). Os números deixam evidente a irregularidade na distribuição dos casos da doença na área endêmica brasileira. Segundo dados do Ministério da Saúde, apenas 57 (7,1%) dos 807 municípios da região Amazônica foram responsáveis por 80% do total de casos de malária registrados em 2008; sendo que dentre estes 57, apenas três municípios responderam por 18% dos casos registrados naquele ano (MALÁRIA/SVS/MS, 2009).

A alta prevalência de malária na região da Amazônia brasileira deve-se principalmente às condições socioeconômicas e ambientais da região. A ocupação da floresta por projetos agropecuários, extração de madeira, mineração e construção de usinas hidroelétricas somado ao intenso movimento populacional desordenado e a presença do mosquito vetor em altas densidades, favorecem a disseminação da doença, dificultando o controle e expondo grandes contingentes populacionais ao risco de infecção (MARQUES et al., 1986; DEANE, 1988; MCGREEVY et al., 1989; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

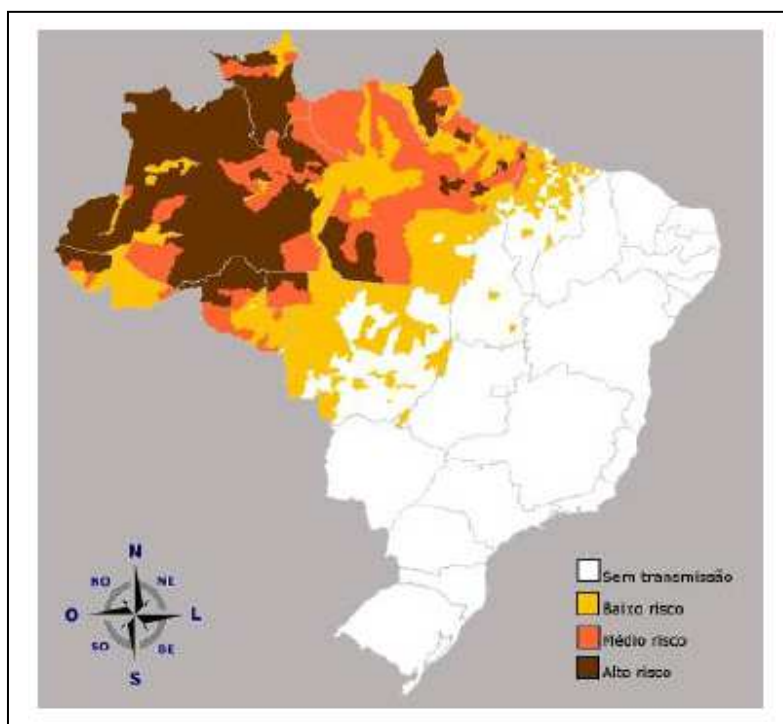


FIGURA 2: Mapa de risco da malária por município de infecção, Amazônia Legal, 2008. Baixo risco: IPA < 10; médio risco IPA 10-49; alto risco IPA ≥ 50 (Fonte: SIVEP/SVS/MS, atualizado em 28/12/2009).

As espécies de plasmódio presentes no Brasil são o *P. falciparum*, *P. vivax* e em menor prevalência o *P. malariae*. No entanto, as infecções causadas por *P. vivax* predominam. Em 2009 esta espécie foi responsável por 83,7% dos casos registrados, enquanto outros 16,3% foram devidos ao *P. falciparum* (MALÁRIA/SVS/MS, 2009).

Embora a taxa de mortalidade causada pelo *P. vivax* seja consideravelmente menor que a do *P. falciparum*, esta espécie não pode ser negligenciada, uma vez que os registros de cepas de *P. vivax* resistentes a anti-maláricos estão aumentando e, conseqüentemente, dificultando o tratamento de casos clínicos. Além disso, patologias graves associadas à malária por *P. vivax*, tais como estresse respiratório e coma têm sido relatadas, desafiando a antiga descrição da malária vivax como “benigna” (PRICE et al., 2007; ARÉVALO-HERRERA et al., 2010).

A malária no Brasil apresentou-se ascendente até 1989, atingindo mais de 570.000 casos diagnosticados. Posteriormente, verificou-se a estabilização deste número em níveis elevados, freqüentemente acima de 500 mil casos/ano. Segundo avaliação do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), em 1999 foi registrado um aumento da incidência da doença que chegou a atingir níveis insustentáveis, colocando em risco o desenvolvimento da região Amazônica, com 637.434 casos da doença registrados neste ano (FNS, 2002). No entanto, nos anos de 2001 e 2002 houve redução da incidência em resposta à implantação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM) na Amazônia Legal. Os dados de 2001 revelaram uma redução de 40% dos casos quando comparados a 1999, ocasionando diminuição em 70% no número de internações e, conseqüentemente redução de 36,5% no número de óbitos por malária.

Apesar da redução no número de casos entre 2001 e 2003, essa queda não foi mantida, e no período de 2003 a 2005, observou-se crescimento no registro de casos da doença. Porém, em 2006 e 2007, houve uma reversão desta tendência de crescimento, com uma importante redução de 9% em 2006, quando comparado com 2005. No ano de 2007 em relação a 2005, a redução de casos de

malária foi de 24%, sendo que de janeiro a setembro de 2008 em relação ao mesmo período de 2007, a redução foi de 34% (SVS, 2008). Analisando os dados fornecidos pelo SIVEP-Malária em 2008, pode-se ainda constatar que muitos municípios saíram da fase crítica da alta transmissão da malária, graças ao maior investimento de recursos pelas três esferas de governo para o controle da malária. Entretanto, a intensa e desordenada ocupação das periferias das cidades tem levado a concentração de casos, fato que pode ser constatado com a concentração de 50% dos casos de malária em 19 municípios, dentre eles Manaus, Porto Velho e Cruzeiro do Sul (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Mesmo diante dos avanços na redução do número de casos, a malária continua sendo um desafio para a saúde pública na região amazônica. Devido a sua ampla incidência e aos efeitos debilitantes, a doença ainda prejudica o nível de saúde da população e o desenvolvimento socioeconômico da região.

Enquanto os conhecimentos e técnicas disponíveis não permitem vislumbrar a completa interrupção da transmissão da malária na Amazônia Brasileira, a manutenção de um programa permanente de controle contribui para minimizar os efeitos graves da mesma, abrindo perspectivas para a busca de novas estratégias de controle, como o desenvolvimento de uma possível vacina.

1.4. Resposta imune contra formas sanguíneas do *Plasmodium*

As formas sanguíneas dos plasmódios são as responsáveis pelas manifestações patológicas da malária, uma vez que os sintomas clínicos são decorrentes do desenvolvimento parasitário durante o ciclo assexuado sanguíneo. Sendo assim, a imunidade adquirida contra os estágios sanguíneos pode reduzir ou eliminar os parasitos e, conseqüentemente, as manifestações clínicas da doença.

Indivíduos sem nenhuma experiência prévia de malária quase invariavelmente adoecem durante a sua primeira exposição ao parasito. Estes indivíduos desenvolvem uma doença febril, que pode tornar-se grave e, em alguns casos,

pode levar a morte. Nas áreas endêmicas para malária, crianças menores que cinco anos são particularmente suscetíveis, sendo estimado que um quarto das mortes registradas na infância nestas regiões seja devido à malária (SNOW et al., 2001). Entretanto, com a exposição contínua, crianças e adultos desenvolvem completa proteção contra doença grave e morte, embora imunidade estéril, provavelmente, nunca seja alcançada. Na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos na imunidade naturalmente adquirida, o quadro definido a partir de estudos imunoepidemiológicos sugere que a aquisição de imunidade contra sintomas clínicos é relativamente lenta e incompleta; embora imunidade à malária grave possa ser adquirida mais rapidamente, mesmo após um único episódio da doença (GUPTA et al., 1999).

É importante ressaltar que a resposta de indivíduos contra as formas sanguíneas do parasito, particularmente em pessoas não imunes, pode contribuir para a patologia da doença, mas por outro lado, a resposta imune pode ser também altamente efetiva, moderando ou até mesmo protegendo dos efeitos clínicos da infecção e, conseqüentemente, reduzindo a mortalidade (STEVENSON & RILEY, 2004).

1.4.1. História natural da malária em regiões de intensa transmissão

A aquisição natural da imunidade anti-malárica é bastante evidente em áreas de hiper a holoendemicidade, onde os indivíduos são expostos intensamente a repetidas infecções ao longo da vida. Nestas regiões de transmissão intensa e estável, com predomínio do *P. falciparum*, os recém nascidos são relativamente resistentes à infecção durante os três primeiros meses de vida. Essa defesa ou resistência tem sido atribuída principalmente, à transferência passiva de anticorpos protetores IgG da mãe imune para o feto durante a gestação (COHEN et al., 1961; MCGREGOR, 1964; SEHGAL et al., 1989; CHIZZOLINI et al., 1991; HOGH et al., 1995). Entretanto, outros fatores como a presença de eritrócitos contendo hemoglobina fetal (PASVOL et al., 1977) e a deficiência de ácido para-aminobenzóico (PABA) na dieta da criança (HAWKING, 1965) podem também estar relacionados a esta proteção. Após este período de três meses, essas

crianças tornam-se altamente suscetíveis à doença, sendo comuns infecções fatais durante os primeiros cinco anos de vida. Este é o período em que se registram os maiores índices de mortalidade nestas áreas endêmicas.

Com o aumento da idade, observa-se que os indivíduos intensamente expostos à transmissão sofrem progressivamente menos episódios clínicos de malária aguda, embora possam apresentar altas parasitemias sangüíneas (MSHANA et al., 1993; EGAN et al., 1996). Esta “tolerância” às altas parasitemias pode refletir um estado de imunidade “anti-tóxica” dirigida contra componentes solúveis do parasito responsáveis pelas manifestações patogênicas da doença (PLAYFAIR et al., 1990). Atingindo a idade adulta, os sintomas clínicos da doença são menos pronunciados e os níveis de parasitos sangüíneos muito baixos, refletindo um estado de equilíbrio entre parasito e hospedeiro denominado premunição (DRUILHE & KHUSMITH, 1987; DRUILHE & PÉRIGNON, 1994).

Alguns estudos sugerem que para aquisição desta imunidade protetora é necessária uma longa e permanente exposição a picadas infectantes do inseto transmissor (LUNEL & DRUILHE, 1989; DRUILHE & PÉRIGNON, 1994; DUBOIS & PEREIRA-SILVA, 1995; SHI et al., 1996). A premunição não possui caráter esterilizante e na ausência ou diminuição dos padrões de inoculações sua eficiência tende a diminuir com o tempo (MERCEREAU-PUIJALON et al., 1991; DRUILHE & PÉRIGNON, 1994). A baixa imunogenicidade e a grande diversidade ou polimorfismo genético dos antígenos maláricos podem ser indicados como prováveis causas da perda dessa imunidade quando indivíduos “imunes” se afastam da área endêmica (MERCEREAU-PUIJALON et al., 1991; THEANDER, 1992).

Contrariando a hipótese de que a premunição só é adquirida após longa exposição ao parasito, alguns pesquisadores, defendem a idéia de que esta imunidade pode estar diretamente relacionada a fatores intrínsecos associados à idade (BAIRD et al., 1991; BAIRD, 1998). Estes autores relatam que em áreas de transmissão intensa, o estado de premunição pode ser alcançado após relativamente poucas infecções, sendo determinado por fatores imunes intrínsecos do hospedeiro, os quais sofrem mudanças com o aumento da idade.

Nos mais jovens, quando um grande número de parasitos está presente na circulação, ocorreriam deficiências na regulação imune determinando maior susceptibilidade à malária (BAIRD et al., 1991; BAIRD et al., 1993; BAIRD, 1998). Se esta hipótese for verdadeira, a proteção contra a malária pode ser adquirida independentemente da longa exposição ao parasito e, portanto, independente do polimorfismo antigênico.

1.4.2. Imunidade em populações brasileiras

A proteção contra malária adquirida por indivíduos expostos em áreas endêmicas é amplamente modulada pelo padrão de transmissão. No Brasil, onde a transmissão de malária é hipo a mesoendêmica, crianças e adultos são igualmente acometidos e a infecção tende a ser seguida por doença clínica com sintomas de intensidade variável. Podem ocorrer vários episódios sucessivos de malária sendo a maioria das infecções consideradas de caráter sintomático. No entanto, casos assintomáticos, antes considerados raros (PRATA et al., 1988; CAMARGO et al., 1994), começaram ser descritos em nosso país.

ANDRADE e colaboradores (1995) em um estudo realizado no estado de Mato Grosso (MT) observou 14% de infecção assintomática entre os indivíduos avaliados por 48 horas após a detecção do parasito pela gota espessa. Vários casos de infecções assintomáticas por *P. falciparum* e/ou *P. vivax* foram descritos entre populações amazônicas ribeirinhas do estado de Rondônia (CAMARGO et al., 1999; ALVES et al., 2002), as quais são expostas desde a infância a picadas infectantes do mosquito transmissor. Nestes estudos, os autores verificaram alta prevalência de infecções assintomáticas entre adultos e sugerem que estes possam servir como fonte de infecção para os vetores, sendo responsáveis pela presença constante da malária nestas regiões.

Estudos sobre a prevalência de malária assintomática por *P. falciparum* e/ou *P. vivax* também foram realizados por nosso grupo (FONTES, 2001; BRAGA et al., 2002; SCOPEL, 2003; SCOPEL et al., 2005) no município de Apiacás (MT). Essa região foi considerada mesoendêmica com prevalência de 7,2% de casos

assintomáticos entre os 527 garimpeiros avaliados no exame parasitológico de gota espessa (FONTES, 2001). Posteriormente, SCOPEL (2003) avaliando esta mesma população utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em associação com a gota espessa detectou 27,3% de infecções assintomáticas entre esses garimpeiros. Recentemente, novos casos de malária assintomática foram descritos na região do Parque Nacional do Rio Jaú, no Estado do Amazonas, utilizando como ferramentas de diagnóstico a PCR em associação com a gota espessa. Prevalência de 25% de casos assintomáticos foi detectada entre os ribeirinhos desta localidade após acompanhamento clínico dos pacientes por 150 dias (COURA et al., 2006; LADEIA-ANDRADE et al., 2007).

A imunidade adquirida contra *P. falciparum* não parece ser eficaz para o *P. vivax*, mostrando que a imunidade é específica para cada espécie (COLLINS & JEFFERY, 1999). A razão pela qual a imunidade cruzada entre estas duas espécies é baixa pode ser devido às diferenças nos genes codificadores dos principais antígenos alvos da imunidade protetora. Alternativamente, os mecanismos imunológicos efetores envolvidos durante a infecção por *P. vivax* podem ser diferentes dos envolvidos em infecções pelo *P. falciparum*.

Considerando que populações brasileiras residentes em áreas de transmissão instável podem adquirir proteção contra as manifestações clínicas da doença e, que o *P. vivax* é a espécie prevalente em nosso país, torna-se evidente a necessidade de ampliar os estudos sobre a resposta imune adquirida em infecções por esta espécie, a fim de se compreender os mecanismos envolvidos na aquisição da imunidade protetora. Além disso, o conhecimento sobre a resposta imune naturalmente adquirida em populações com diferentes graus de exposição ao *Plasmodium* é um pré-requisito para o desenvolvimento de uma vacina protetora, uma vez que estudos realizados com populações de diferentes áreas endêmicas do mundo, expostas as distintas situações epidemiológicas, demonstram uma grande variação na resposta imune celular e humoral contra os antígenos de *Plasmodium* (BRAGA & KRETTLI, 2000).

1.4.3. O papel dos anticorpos na imunidade antimalárica

O ciclo de vida dos plasmódios é bastante complexo, com um amplo repertório de diferentes antígenos sendo expressos nos distintos estágios de desenvolvimento do parasito. Tal complexidade traduz em sérias implicações para o combate do parasito pelo sistema imune do hospedeiro, na medida em que diferentes respostas imunes efetoras são requeridas durante cada estágio do ciclo de vida.

Experimentos de transferência passiva de anticorpos, realizados nas décadas de 60 e 70, demonstraram claramente que anticorpos contra as formas sanguíneas estão envolvidos na imunidade protetora (COEHN et al., 1961; COHEN & BUTCHER, 1971). Estes experimentos foram, posteriormente repetidos, confirmando que anticorpos IgG purificados de soros de adultos imunes residentes em áreas hiperendêmicas são capazes de controlar a infecção por *P. falciparum* em crianças, reduzindo a parasitemia e protegendo-as de doença grave (SABCHAREON et al., 1991).

Inicialmente, foi proposto que a participação dos anticorpos seria, principalmente, através da neutralização de merozoítos impedindo sua penetração nos eritrócitos. Evidências obtidas na última década mostraram que, pelo menos, dois mecanismos estão envolvidos: a participação de anticorpos opsonizantes que promovem a fagocitose de eritrócitos infectados (GARRAUD et al., 1989, GARRAUD et al., 1994) e a presença de anticorpos citofílicos (isotipos IgG1 e IgG3 em humanos) que promovem a inibição do crescimento do parasito intra-eritrocítico em associação com monócitos (DRUILHE & KHUSMITH, 1987; LUNEL & DRUILHE, 1989; OEUVRAY et al., 1994). Este último mecanismo é denominado ADCI (*antibody dependent cell inhibition*), ou seja, inibição do crescimento parasitário dependente de anticorpos. Alguns estudos soropidemiológicos realizados em áreas holo-hiperendêmicas mostraram que anticorpos citofílicos são predominantes nos soros de indivíduos protegidos, enquanto os isotipos não citofílicos (IgG2, IgG4 e IgM) predominam em indivíduos não-protegidos (revisto por DRUILHE & PÉRIGNON, 1994; DUBOIS & PEREIRA-SILVA, 1995). No entanto, em infecções naturais, os antígenos-alvo destes

anticorpos protetores ainda não são conhecidos, mas já foi demonstrado que anticorpos anti-formas sanguíneas de *Plasmodium falciparum* podem se ligar tanto aos merozoítos livres (HOLDER et al., 1999; VERRA & HUGHES, 1999) quanto aos antígenos presentes na superfície das hemácias parasitadas.

Apesar da expressiva realização de estudos soroepidemiológicos em diferentes áreas endêmicas, pouco é conhecido sobre as interações celulares que ocorrem durante a fase efetora da resposta imune do hospedeiro contra o *Plasmodium*. Entretanto, é inquestionável a importância da participação de componentes celulares como um fator primordial na eliminação do parasito (GOOD et al., 2005).

1.5. Proteína 1 de superfície de merozoítos (MSP-1): um promissor candidato vacinal

O desenvolvimento de uma vacina antimalárica efetiva tem sido um desafio devido à complexidade biológica e molecular dos plasmódios, além do fato da imunidade protetora anti-malárica permanecer muito pouco entendida. Em virtude dos sintomas clínicos decorrentes da malária serem atribuídos ao ciclo sanguíneo realizado pelos estágios de desenvolvimento intra-eritrocíticos, grande parte dos estudos sobre vacinas em malária baseiam-se em antígenos presentes nos merozoítos. Portanto, espera-se que uma vacina desta natureza limite a multiplicação do parasito e, portanto, reduza as taxas de morbidade e mortalidade associadas à malária.

Dentre os antígenos de estágios sanguíneos, as proteínas de superfície dos merozoítos (MSP) têm sido consideradas candidatos de primeira escolha, uma vez que estas moléculas são expostas a mecanismos potencialmente efetores do sistema imune importantes para interrupção do ciclo sanguíneo do parasito, e conseqüentemente dos sintomas clínicos da doença. Dez membros pertencentes à família de proteínas MSP já foram descritos para *P. falciparum* (PfMSP1-10), dos quais, dez foram identificados em *P. vivax* (PvMSP-1, PvMSP-185, PvMSP-

3 α , PvMSP-3 β , PvMSP3 γ , PvMSP-4, PvMSP-5, PvMSP-8, PvMSP-9, e PvMSP-10)(revisto por SERRANO et al, 2006).

Entre as MSPs, a proteína 1 de superfície de merozoítos (MSP1) destaca-se como principal alvo potencial para compor uma vacina protetora (EGAN et al., 2000; STOWERS et al., 2001). Estudos realizados principalmente com a MSP1 de *P. falciparum* demonstraram que esta proteína é sintetizada durante a esquizogonia e expressa na superfície do parasito como um abundante precursor de alto peso molecular (190 a 200 kDa) (HOLDER & FREEMAN, 1982). Durante a maturação dos merozoítos (momentos antes ou durante a liberação dos merozoítos maduros), este precursor passa por duas clivagens proteolíticas sucessivas. Primeiro ele é clivado em quatro fragmentos de 83, 30, 38 e 42 kDa, sendo os três primeiros liberados e o somente o fragmento C-terminal de 42 kDa permanece ancorado na membrana do merozoíto. Antes da invasão de um novo eritrócito, este fragmento de 42kDa sofre um segundo processamento do qual resultam dois polipeptídeos: um de 33kDa e outro de 19kDa, denominados MSP1₃₃ e MSP1₁₉, respectivamente. Durante a invasão de um novo eritrócito somente o fragmento C-terminal de 19 kDa (MSP1₁₉) permanece ancorado, via âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI), sobre superfície do merozoíto sendo carregado para dentro da célula hospedeira (BLACKMAN et al., 1990; 1991). BABON e colaboradores (2007) propõem um modelo para este processamento proteolítico, baseado no processamento da MSP1 de *P. falciparum*, conforme especificado na **FIGURA 3**.

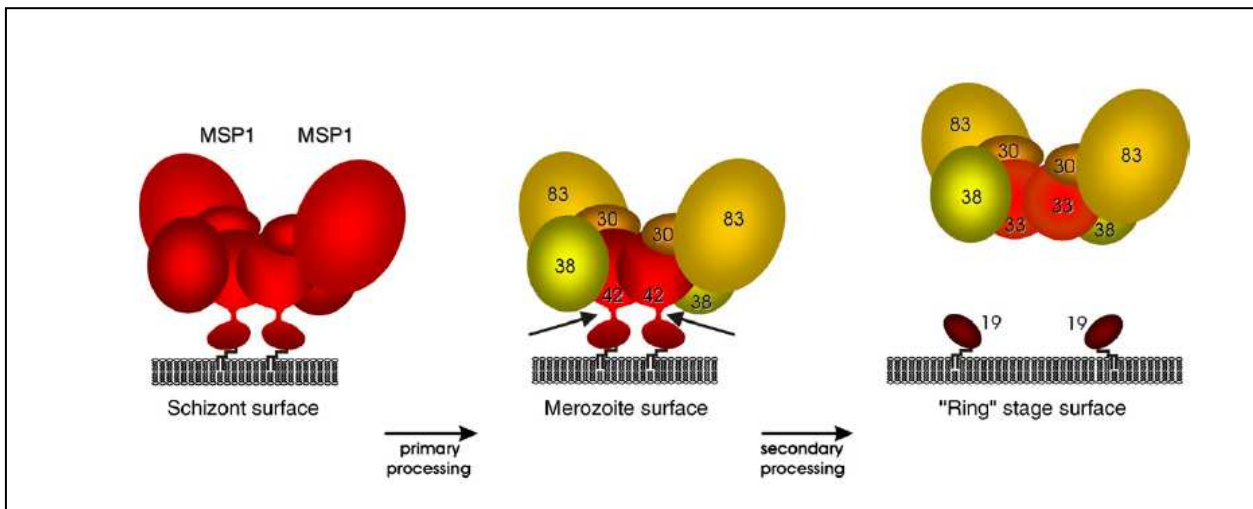


FIGURA 3: Modelo proposto para MSP-1 na superfície do parasito. Duas moléculas de MSP-1 formam um dímero na superfície de esquizontes. O processamento primário cliva o precursor em fragmentos que permanecem como um complexo protéico na forma de dímeros na superfície do merozoíto. A liberação do complexo requer a clivagem de ambos os polipeptídeos MSP1₄₂ durante o processamento secundário, no momento da invasão dos eritrócitos. Após a clivagem, o complexo é liberado na forma dimérica devido à associação de dois polipeptídeos MSP1₃₃, enquanto os fragmentos MSP1₁₉, na superfície do estágio de "anel", encontram-se na forma monomérica (Adaptado de BABON et al., 2007).

A MSP1₁₉ de diferentes espécies consiste de dois domínios, cada um contendo quatro ou seis resíduos de cisteína configurados de maneira semelhante aos fatores de crescimento epidermal (EGF) (CHITARRA et al., 1999). Os dois domínios apresentam vários contatos interdomínio, são muito próximos e alinhados de forma antiparalela, o que resulta em uma conformação em forma de U, deixando as extremidades N- e C-terminais intimamente próximas. Como a extremidade C-terminal está diretamente ligada à membrana do merozoíto via âncora de GPI, esta configuração significa que ambas as extremidades ficam próximas à membrana *in vivo* (BABON et al., 2007).

Estudos demonstram que a conformação dos epitopos criados por estes domínios é alvo de anticorpos protetores (LING et al., 1995; CALVO et al., 1996). Embora a função precisa da MSP1₁₉ não seja conhecida, já foi demonstrado que anticorpos monoclonais dirigidos contra esta proteína de *P. falciparum* são capazes de inibir a invasão de eritrócitos pelos merozoítos *in vitro* (BLACKMAN et al., 1990; 1994; CHANG et al., 1992; CHAPPEL & HOLDER, 1993; GOZALO et al., 1998).

A MSP-1 de diferentes espécies de plasmódio exibe um grande polimorfismo antigênico (TANABE et al., 1987; PUTAPORNTIP et al., 2002) que parece ser mantido por seleção natural positiva tanto em *P. falciparum* (HUGHES, 1992; ESCALANTE et al., 1998; CONWAY et al., 2000) como em *P. vivax* (PUTAPORNTIP et al., 2006). Observações similares têm sido feitas para outros antígenos de plasmódio nos quais, a pressão exercida pelo sistema imune do hospedeiro pode favorecer a seleção de alelos polimórficos, acelerando desta maneira a diversidade antigênica. O gene que codifica a MSP1 de *P. vivax* (PvMSP1) apresenta várias similaridades com os genes de outras espécies de *Plasmodium*. A comparação das sequências de nucleotídeos dos genes *msp1* de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. yoelii* revelou a existência de blocos conservados entre as espécies alternando com regiões de maior diversidade (del PORTILLO et al., 1991) (**FIGURA 4A**). Posteriormente, PUTAPORNTIP e colaboradores em 2002 comparando as sequências de nucleotídeos do gene *msp1* de 40 isolados de *P. vivax* de diferentes regiões geográficas, verificaram que a proteína PvMSP1 apresenta seis blocos altamente polimórficos (similaridade de aminoácidos de 21 a 34%) flanqueados por sete blocos bastante conservados entre os diferentes isolados (**FIGURA 4B**) (PUTAPORNTIP et al., 2002).

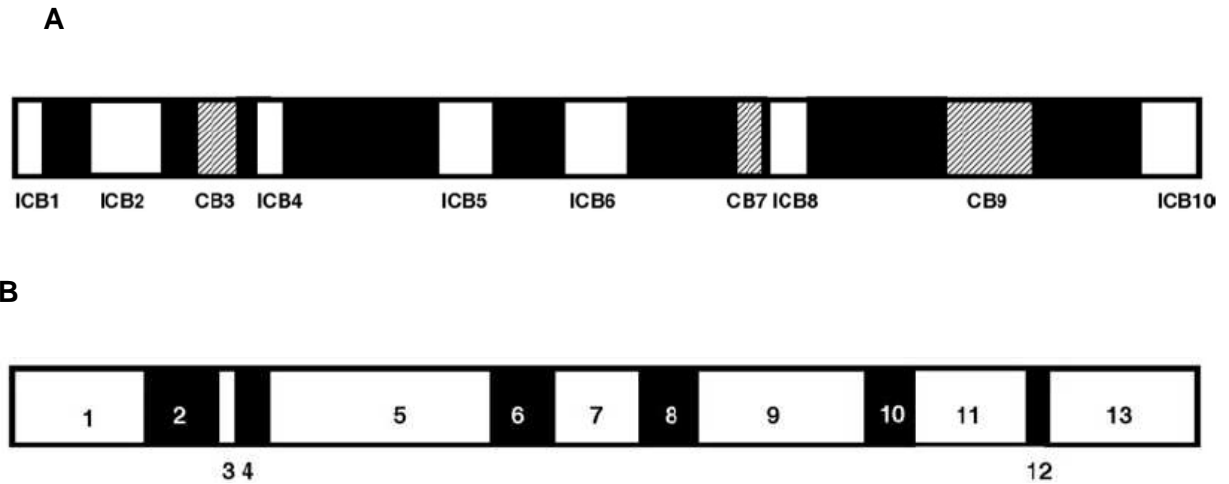


FIGURA 4: Representação esquemática da MSP1 de *P. vivax*. **(A)** Divisão da PvMSP1 em blocos conservados interespecíficos (**ICB**) (com similaridade de aminoácidos >48% entre órtologos da MSP1 de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. yoelii*) [representado como regiões claras]; blocos semi-conservados (**CB**) (similaridade de aminoácidos >50% somente entre órtologos da MSP1 de *P. falciparum* e *P. vivax*) [representado como regiões hachuradas] e blocos polimórficos, (similaridade de aminoácidos <45%) [representado por regiões escuras]; segundo descrição de del PORTILLO et al., 1991. **(B)** Divisão da PvMSP1 segundo PUTAPORNTIP et al. 2002 em blocos conservados (regiões claras) e polimórficos (regiões escuras) entre sequências de diferentes isolados de *P. vivax*.

O potencial imunogênico da MSP-1 tem motivado pesquisas para desenvolver proteínas recombinantes que representem diferentes porções da molécula a fim de serem utilizadas em ensaios experimentais. Imunizações com a MSP1₄₂ e MSP1₁₉ demonstraram que tais proteínas podem desencadear imunidade parcial contra estágios sanguíneos de *P. falciparum* em macacos *Aotus* (KUMAR et al., 1995; KUMAR et al., 2000; STOWERS et al., 2001). Em humanos, estudos prévios demonstraram a presença de anticorpos naturalmente adquiridos contra as regiões N- (CAVANAGH & McBRIDE, 1997; CAVANAGH et al., 2001) e C-terminal da PfMSP1 (RYLEY et al., 1993; SHAI et al., 1995; EGAN et al., 1999).

Ao contrário dos intensivos estudos realizados com a MSP1 de *P. falciparum* e *Plasmodium yoelii*, relativamente pouco é conhecido sobre a resposta imune dirigida contra a MSP1 de *P. vivax*. Os resultados obtidos com as imunizações experimentais de roedores utilizando a MSP1₁₉ de *P. yoelii* estimularam tentativas de vacinações experimentais utilizando proteínas recombinantes representando antígenos de *P. vivax* e *Plasmodium cynomolgi*.

A imunização com uma proteína recombinante expressa em baculovírus representando a MSP1₁₉ de *P. cynomolgi* foi altamente efetiva induzindo altos títulos de anticorpos contra merozoítos reduzindo significativamente a parasitemia após o desafio de macacos com as formas sangüíneas deste parasito (PERERA et al., 1998). Proteção parcial após desafio com cepa homóloga também foi desenvolvida por macacos *Saimiri* imunizados com um antígeno recombinante representando a MSP1₁₉ de *P. vivax* (cepa Sal-1) (COLLINS et al., 1999; YANG et al., 1999). Posteriormente, proteção parcial contra a infecção com formas sangüíneas de *P. vivax* de uma cepa heteróloga foi verificada em macacos *Aotus* imunizados com uma mistura de polipeptídeos recombinantes correspondentes ao fragmento C-terminal de 33 kDa da PvMSP1 (cepa Belem) (SIERRA et al., 2003).

Estudos caracterizando a resposta imune humana naturalmente adquirida contra a PvMSP1 têm sido realizados em alguns países, inclusive na região amazônica brasileira. Estudos imunoepidemiológicos realizados no Brasil utilizando proteínas recombinantes baseadas na MSP-1₁₉ de *P. vivax* (PvMSP1₁₉), demonstraram que esta molécula é altamente imunogênica durante infecções naturais em indivíduos expostos ao *P. vivax* no estado do Pará (SOARES et al., 1997; SOARES et al., 1999b; SOARES et al., 1999c; RODRIGUES et al., 2003). Além disso, SOARES et al. (1997) verificaram que a frequência de respondedores que reconheciam este antígeno aumentou de acordo com o número de episódios prévios de malária, alcançando 83% entre os indivíduos com relato de mais de quatro episódios da doença. A análise da sequência de nucleotídeos da PvMSP1₁₉ de 28 isolados de *P. vivax* no Brasil revelou que as sequências de DNA codificadoras desta proteína são conservadas, não apresentando polimorfismo genético e que os anticorpos de indivíduos naturalmente expostos

reconhecem predominantemente epitopos conservados presentes em ambas as formas alélicas da proteína (SOARES et al., 1999a).

A alta imunogenicidade da PvMSP1₁₉ também foi confirmada em um estudo realizado na Coréia, onde aproximadamente 90% dos indivíduos infectados com *P. vivax* apresentaram anticorpos (IgG e IgM) anti-MSP-1₁₉ (PARK et al., 2001). Recentemente, em um estudo realizado por nosso grupo, avaliamos diversos aspectos da resposta imune humana naturalmente adquirida contra a MSP-1₁₉ de *P. vivax* em indivíduos expostos a diferentes níveis de transmissão de malária no Brasil (MORAIS et al., 2005). Neste estudo verificamos que esta proteína foi altamente imunogênica (reconhecida por 80% dos indivíduos), não ocorrendo, entretanto, associação positiva entre grau de exposição e prevalência de anticorpos IgG específicos ou entre níveis de anticorpos anti-PvMSP1₁₉ e status clínico da infecção. Além disso, anticorpos anti-PvMSP1₁₉ persistiram por até sete anos na ausência de re-infecção ou re-exposição ao parasito em indivíduos brevemente expostos à malária durante um surto de transmissão ocorrido fora da área endêmica brasileira.

Apesar da maioria dos estudos com a MSP-1 consistirem de avaliações sobre a resposta de anticorpos induzida naturalmente ou por vacinação, a habilidade de um imunógeno de induzir uma proteção efetiva depende, em grande parte, da presença em sua molécula de sítios para reconhecimento por células T (GOOD et al., 1998). Estudos prévios demonstraram que apesar da MSP1₁₉ de *P. falciparum* desencadear uma forte resposta de anticorpos esta molécula não induz produção significativa de citocinas, talvez por conter um pequeno número de epitopos específicos para células T, ou até mesmo, por apresentar uma estrutura molecular compacta capaz de interferir com o seu processamento e apresentação para células T (EGAN et al., 1997; HENSMANN et al., 2004; HUAMAN et al., 2008). De fato, dois estudos anteriores já haviam identificado a presença de epitopos específicos para células T localizados principalmente na região da PfMSP1₃₃ (RILEY et al., 1992; UDHAYAKUMAR et al., 1995). Estes dados foram recentemente corroborados em um trabalho de HUAMAN et al. (2008) realizado com voluntários americanos vacinados com a PfMSP1₄₂ formulada em *alhydrogel*. Neste estudo os autores demonstraram que os epitopos responsáveis pela

proliferação celular e produção de citocinas do tipo IFN- γ , IL-2, IL-5, IL13 e IL10 estavam localizados na região correspondente ao fragmento de 33 kDa da PfMSP1₄₂. Interessantemente, em um estudo analisando de forma comparativa as propriedades imunogênicas de duas proteínas recombinantes representando a PvMSP1₄₂ e a PvMSP1₁₉ foi observado que ambos antígenos estimularam a proliferação de células T e induziram uma produção significativa de anticorpos em camundongos imunizados com diferentes formulações destes antígenos (SACHDEVA et al., 2004).

Embora a maioria dos estudos soroepidemiológicos e de imunização experimental aponte a região C-terminal da MSP-1 como um importante alvo da resposta imune contra os plasmódios, alguns trabalhos sugerem que as regiões polimórficas desta molécula representam candidatos potenciais para inclusão em uma vacina de subunidades (CONWAY, 1997; CONWAY et al., 2000). A suposição que a imunidade protetora é direcionada predominantemente para regiões altamente polimórficas da MSP1 foi recentemente suportada por experimentos realizados com plasmódios de roedores onde foi demonstrado que os domínios variáveis são selecionados, de uma maneira variante específica, nos camundongos previamente imunizados com parasitos apresentando variantes heterólogas da MSP1 (MARTINELLI et al., 2005). Estudos com a MSP-1 de *P. falciparum* demonstraram que o perfil de anticorpos IgG específicos para antígenos representando o bloco 2 polimórfico foi claramente associado à proteção clínica ou a um reduzido risco de infecção em indivíduos africanos adultos residentes em áreas de intensa transmissão de malária (CONWAY et al., 2000; JOUIN et al., 2001).

No entanto, o reconhecimento imune das regiões variáveis da PvMSP-1 e sua função na imunidade anti-malárica permanece muito pouco investigado. Em um estudo realizado com pacientes colombianos foi demonstrado que os indivíduos apresentavam anticorpos que discriminavam entre antígenos recombinantes representando duas versões altamente divergentes do bloco 6 polimórfico, mas nenhuma associação foi feita entre resposta de anticorpos e imunidade clínica (MANCILLA et al., 1994). Em um trabalho conduzido no Brasil, a presença de anticorpos dirigidos contra uma proteína recombinante compreendendo os blocos

polimórficos 2 e 4 e três blocos conservados localizados na região N-terminal da PvMSP-1 (ICB2-5) foi associada com reduzido risco de infecção e proteção clínica (NOGUEIRA et al., 2006). No entanto, neste estudo os autores não investigaram se estes anticorpos eram variante-específicos, pois uma única versão dos domínios altamente polimórficos foi utilizada e, além disso, as variantes da PvMSP-1 dos parasitos responsáveis pela infecção não foram caracterizadas. Em um estudo recente, FERNANDEZ-BECERRA e colaboradores (2010) demonstraram diferenças no perfil de subclasses de IgG específicas para proteínas recombinantes correspondentes às regiões N- e C-terminais da PvMSP-1 entre indivíduos expostos ao *P. vivax* em regiões endêmicas de Papua Nova Guiné (PNG) e Brasil. Os autores observaram que as crianças de PNG apresentavam predominantemente respostas de IgG1 contra a região C-terminal da PvMSP-1, enquanto os adultos no Brasil apresentaram predomínio de respostas de anticorpos IgG3 para ambas as regiões da proteína (FERNANDEZ-BECERRA et al., 2010). Para confirmar se esta diferença no padrão de resposta de IgG é consequência da existência de reais diferenças na imunoepidemiologia de *P. vivax* entre as duas áreas endêmicas ou, se este resultado deve-se às diferenças de idade entre os grupos avaliados, novos estudos nestas áreas incluindo todos os grupos de idade fazem-se necessários.

BASTOS e colaboradores avaliando a resposta de anticorpos naturalmente adquirida contra um painel de recombinantes representando diferentes variantes dos domínios polimórficos da PvMSP-1 encontrados entre os parasitos locais, verificaram associação entre exposição cumulativa à malária e níveis de anticorpos específicos para domínios polimórficos (BASTOS et al., 2007). Estes autores sugerem que a resposta de anticorpos contra um repertório de variantes dos domínios polimórficos da PvMSP-1, aos quais os indivíduos estão continuamente expostos, são obtidas somente após várias infecções repetidas e podem requerer freqüente *boosting* (BASTOS et al., 2007).

Embora existam dados persuasivos mostrando que anticorpos anti-MSP1 podem conferir proteção contra malária, a relativa contribuição das diferentes regiões da molécula na indução de anticorpos protetores permanece desconhecida. Além disso, a maioria dos trabalhos concentra-se na resposta

humoral, não explorando o papel destes domínios polimórficos no desencadeamento de mecanismos imunes celulares. Portanto, uma caracterização detalhada da resposta imune celular variante-específica para os diferentes domínios polimórficos da PvMSP-1 se faz necessária.

2. JUSTIFICATIVA

A malária constitui atualmente um dos principais problemas de saúde pública enfrentados por países em desenvolvimento. São registrados anualmente cerca de 250 a 500 milhões de casos que resultam em 2,7 milhões de mortes, principalmente entre crianças residentes na África sub-Saara (OMS, 2008). Enquanto o *P. falciparum* é a espécie prevalente na África, o *P. vivax* representa um desafio ao sistema de saúde pública nas Américas, Ásia e Oceania, expondo cerca de 2,8 bilhões de pessoas à infecção (GUERRA et al., 2006; 2010).

Estratégias de prevenção e tratamento são continuamente dificultadas por questões relacionadas à resistência do parasito a drogas, custos consideráveis e problemas logísticos de infra-estruturas políticas. Diante desta situação, umas das principais estratégias para reverter este quadro poderá ser o desenvolvimento de uma vacina efetiva. Entretanto, esforços para desenvolver vacinas eficazes têm obtido sucesso limitado. Uma das razões para isso constitui a falta de conhecimento básico sobre como o sistema imune do hospedeiro responde aos antígenos do parasito, uma vez que os eventos iniciais durante a indução de uma resposta imune influenciam a aquisição de mecanismos efetores e o desenvolvimento da memória imunológica (STEVENSON & RILEY, 2004).

Similar ao *P. falciparum*, muitos casos de malária grave por *P. vivax* tem sido recentemente relatados, inclusive em pacientes na área endêmica brasileira (LACERDA et al., 2008; KOCHAR et al., 2009; SHARMA & KHANDURI., 2009). No entanto, como o *P. vivax* é raramente letal e o seu cultivo contínuo *in vitro* ainda não é possível, esta espécie permanece relativamente pouco estudada em comparação ao *P. falciparum*. Tal fato torna-se claro, visto que aproximadamente 23 antígenos de *P. falciparum* encontram-se em estágios avançados de ensaios clínicos vacinais, enquanto somente poucos antígenos de *P. vivax* estão em testes de fase I (GENTON & REED, 2007). Entretanto, diante da eminência do aumento do impacto global da

malária vivax, uma vez que relatos de resistência à cloroquina por cepas de *P. vivax* estão tornando-se cada vez mais freqüentes, muitas pesquisas estão em andamento com o objetivo de identificar e caracterizar antígenos potenciais de *P. vivax* para posterior inclusão em vacinas. Assim, nos últimos anos, vários antígenos de *P. vivax* vêm sendo intensivamente estudados, incluindo dentre eles a PvMSP-1, uma proteína de 200kDa presente abundantemente na superfície dos merozoítos. Estudos prévios já demonstraram que PvMSP-1 é alvo de anticorpos naturalmente adquiridos ou induzidos por vacinação (HERRERA et al., 2007; YANG et al, 1999). Esta proteína contém seis domínios altamente polimórficos alternados com sequências conservadas inter e intra-específicas. Embora a maior parte dos estudos sobre a imunogenicidade da MSP-1 é centrada em sua região C-terminal conservada, especificamente na subunidade MSP1₁₉; um estudo recente mostrou que em infecções por *Plasmodium chabaudi chabaudi*, um plasmódio de roedor, a seleção exercida pela pressão do sistema imune do hospedeiro atua principalmente na região que contém o gene que codifica a MSP-1 (CHEESMAN et al., 2010). Estes resultados têm implicações importantes sobre o desenvolvimento de vacinas baseadas na MSP-1, uma vez que apontam as regiões polimórficas da molécula como candidatos vacinais.

Apesar da imunidade alelo-específica ser alvo de muitos estudos em modelos experimentais e em *P. falciparum*, o nosso atual conhecimento a respeito da imunidade naturalmente adquirida contra epitópos polimórficos da MSP-1 de *P. vivax* é bastante limitado. Uma questão que permanece desconhecida é saber se a resposta de anticorpos variante-específicos anti-PvMSP-1 pode estar associada com a morbidade da malária por *P. vivax*. Esta questão tem sido investigada nas infecções por *P. falciparum* com evidências que os anticorpos protetores distinguem os diferentes tipos de alelos do bloco 2 polimórfico da PfMSP-1 (CONWAY et al, 2000; CAVANAGH et al, 2004).

Diante disto, o presente trabalho pretendeu expressar e purificar proteínas recombinantes representando domínios polimórficos e conservados da PvMSP-1, com o intuito de testá-las em ensaios imunoenzimáticos, utilizando para isso soros de pacientes expostos à malária por *P. vivax* na área

endêmica brasileira. Foi avaliada a associação da resposta imune humoral e parâmetros clínicos ligados à morbidade da malária, bem como a associação de anticorpos variante-específicos à exposição, parasitemia e polimorfismo dos parasitos infectantes.

Este estudo pretende contribuir para ampliar o nosso atual conhecimento sobre a resposta imune variante-específica anti-MSP-1 de *P. vivax* em populações expostas nas áreas endêmicas, um requisito importante para a elaboração de uma vacina anti-malária baseada na PvMSP-1.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar o perfil da resposta imune humoral frente a proteínas recombinantes correspondentes a regiões polimórficas e ao domínio conservado C-terminal da proteína PvMSP-1 em pacientes infectados com *P. vivax* residentes na área endêmica brasileira.

3.2. Objetivos específicos

- Expressar e purificar proteínas recombinantes correspondentes às variantes alélicas dos blocos polimórficos 2 e 10 e à região conservada C-terminal (MSP1₁₉) da proteína MSP-1 de *P. vivax*;
- Avaliar a resposta de anticorpos IgG contra proteínas recombinantes correspondentes a diferentes blocos da PvMSP-1 em pacientes infectados por *P. vivax*;
- Avaliar o efeito da parasitemia e da exposição na resposta de anticorpos anti-MSP1₁₉ e variante-específicos em pacientes infectados por *P. vivax*;
- Determinar possíveis associações entre resposta de anticorpos variante-específicos e anti-MSP1₁₉ e os parâmetros que medem morbidade na infecção pelo *P. vivax* como, anemia e plaquetopenia;
- Determinar o polimorfismo da região do gene *pvmsp1* correspondente ao bloco 10 da MSP-1 de *P. vivax*, a fim de verificar possíveis associações entre variante alélica do parasito infectante e resposta de anticorpos alelo-específica anti-PvMSP-1.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Indivíduos e área de estudo

Foram selecionados para este estudo 214 indivíduos do gênero masculino ou feminino residentes na área endêmica brasileira que apresentavam número variável de episódios prévios de malária por *P. falciparum* e/ou *P. vivax*. Todos os 214 indivíduos apresentavam infecção patente por *P. vivax* diagnosticada no exame de gota espessa, sendo que 141 destes indivíduos consistiam de pacientes atendidos no Hospital Universitário Júlio Müller em Cuiabá, estado do Mato Grosso (MT) e os outros 73 de pacientes que procuraram atendimento na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, localizada em Manaus (FMT-AM), estado do Amazonas (AM).

As coletas de sangue realizadas no Hospital Universitário Júlio Müller foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes onde foi possível obter amostras de plasma dos pacientes para posterior utilização das mesmas em ensaios imunoenzimáticos. Além das amostras de plasmas, também foram obtidos questionários pré-codificados previamente elaborados contendo informações sobre dados demográficos, história migracional, medidas de exposição à malária (tempo de residência na área endêmica, número de episódios prévios de malária, etc.), bem como hemograma completo e descrição dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes.

Manaus, a capital do estado do Amazonas é um dos três municípios que juntamente com Porto Velho (estado de Rondônia) e Cruzeiro do Sul (estado do Acre) acometem por cerca de 1/5 do número total de casos de malária notificados no Brasil em 2008 (MALÁRIA/SVS/MS, 2009). A FMT-AM (referência para atenção terciária de doenças infecciosas no estado do Amazonas) atende cerca de 30% dos casos de malária registrados na cidade de Manaus. Em um estudo retrospectivo (2001-2002) realizado na FMT-AM, aplicando critérios de gravidade na malária (tradicionalmente empregados para malária por *P. falciparum*), observou-se que 12,8% dos pacientes apresentavam malária grave por *P. vivax* (43/336), com complicações clínicas

muito similares àquelas associadas à malária por *P. falciparum*, como hiperbilirrubinemia, anemia grave, falência renal aguda, edema pulmonar e malária álgida (ALEXANDRE, 2004). Dados de um estudo a respeito do número de hospitalizações devido a malária no Brasil mostram que o número total de internações devido à malária vivax parece estar aumentando na FMT-AM (SANTOS-CIMINERA et al., 2007), sendo a plaquetopenia a principal complicação encontrada nos pacientes infectados com *P. vivax* (ALECRIM, 2000; LACERDA, 2007). Na maior parte dos casos, plaquetopenia grave (<50.000 plaquetas/mm³) não está associada com desordens na coagulação, tais como coagulação intravascular disseminada (ROJANASTHIEN et al., 1992). Em virtude destas características epidemiológicas, da facilidade de acesso e de uma sólida colaboração estabelecida com o Prof. Dr. Marcus Vinícius Guimarães Lacerda, a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado foi o local escolhido para coleta de amostras biológicas provenientes de pacientes com malária por *P. vivax*.

Nos meses de maio de 2008 e março de 2009 foram realizadas duas viagens a Manaus com o intuito de obter amostras de plasma, DNA e células mononucleares do sangue periférico de pacientes infectados com *P. vivax*. Setenta e três indivíduos adultos, do gênero masculino ou feminino, apresentando infecção patente por *P. vivax* foram então selecionados a partir do resultado obtido em exames de gota espessa realizados na rotina laboratorial da FMT-AM. Durante a coleta de sangue foi aplicado um questionário padrão contendo informações sobre dados pessoais do paciente, histórico dos episódios prévios de malária e sintomatologia. Além disso, para todos os pacientes foi realizado hemograma completo e determinada a parasitemia sanguínea. Após a coleta de sangue, todos os pacientes foram tratados de acordo com a política nacional de tratamento da malária no Brasil conforme preconizado no Manual de Terapêutica da Malária.

É importante salientar que os indivíduos avaliados neste estudo não apresentavam outras enfermidades como dengue, hepatite e HIV, as quais foram descartadas após exames laboratoriais.

Como controles negativo, foram incluídos no estudo, 20 indivíduos nunca expostos à malária, residentes em Belo Horizonte, área não-endêmica para a doença. De todos os indivíduos avaliados foi obtido o consentimento para participação no estudo conforme normatiza o Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais em abril de 2007, Parecer ETIC60/07).

Processamento das amostras sanguíneas coletadas em Manaus

Após o resultado do exame de gota espessa positivo somente para *P. vivax* e antes dos pacientes receberem a medicação específica, foram coletados de cada paciente, aproximadamente, 35mL de sangue venoso em tubos a vácuo heparinizados para posterior obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e plasma. Além do sangue em heparina foram coletados de cada indivíduo cerca de 3mL de sangue em tubos com EDTA para extração de DNA. As amostras de sangue dos 73 indivíduos selecionados foram processadas no Laboratório de Plaquetopenia (Gerência de Malária, FMT - AM) sendo as amostras de plasmas, DNAs e PBMCs, posteriormente enviadas ao Laboratório de Malária (ICB, UFMG) para realização dos experimentos.

Obtenção das amostras de plasma – As amostras de plasmas foram retiradas após a centrifugação do sangue para obtenção dos PBMCs, posteriormente distribuídas em alíquotas e armazenadas a -20°C para utilização nos ensaios imunoenzimáticos.

Obtenção de DNA para diagnóstico molecular por PCR e determinação do polimorfismo no gene *pvmsp1* – Para extração de DNA a partir de sangue periférico dos 73 indivíduos infectados, foram coletados aproximadamente 3mL de sangue em um tubo a vácuo contendo EDTA. Posteriormente, 300µL deste sangue foram adicionados a um tubo de microcentrífuga (1,5mL) contendo solução de lise de eritrócitos fornecida pelo kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI). As amostras foram mantidas nesta

solução a 4°C até o momento da extração que foi realizada seguindo as recomendações do fabricante do kit. As amostras de DNA foram estocadas a -20°C até o momento de uso.

4.2. Antígenos recombinantes

O estudo envolveu a expressão e purificação de proteínas recombinantes correspondentes a domínios polimórficos (blocos 2 e 10) e conservados (bloco 13) da molécula, segundo a descrição de PUTAPORNTIP e colaboradores (2002) (**FIGURA 4B**). Todas as proteínas foram expressas em fusão com a proteína glutatona S-transferase de *Schistosoma japonicum* (GST) na extremidade C-terminal. Como os blocos 2 e 10 representam domínios altamente polimórficos, para cada um destes blocos foram produzidos recombinantes que incluíam algumas das variações antigênicas já descritas entre os parasitos circulantes no Brasil (PUTAPORNTIP et al., 2002). Foram produzidas, portanto, um total de 12 recombinantes incluindo cinco versões do bloco 2 (isolados Belém, BP29, BP39, BR07 e BP30), cinco do bloco 10 (isolados BP29, BP39, BP13, BR07 e BP01), uma versão do bloco 13 conservado que corresponde a proteína MSP1₁₉ (isolado Belém), além da proteína controle GST.

4.2.1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Construção dos plasmídeos recombinantes – Os 12 plasmídeos contendo os insertos para a expressão das proteínas nos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Marcelo Urbano Ferreira (USP). Portanto, toda a etapa de construção dos plasmídeos foi realizada conforme descrito por BASTOS e colaboradores (2007). Resumidamente, as seqüências de nucleotídeos codificantes para os blocos 2, 10 e 13 da PvMSP-1 foram reamplificadas por PCR a partir dos amplicons purificados, gentilmente cedidos por Somchai Jongwutiwes e Chaturong Putaporntip (Universidade de Chulalongkorn, Bangkok, Tailândia).

Os produtos de PCR foram clonados no vetor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) e, posteriormente, subclonados no vetor de expressão pGEX-3X da Amersham Pharmacia Biotech.

Transformação de bactérias *E. coli* – Para induzir a expressão das proteínas de fusão, os plasmídeos foram introduzidos por eletroporação em bactérias *E. coli* cepa BL21(DE3). De maneira geral, para eletroporação foram adicionados 20 – 30ng de DNA a 100µL de células competentes mantidas em gelo. A mistura foi então colocada em cubeta de eletroporação resfriada em gelo e as células eletroporadas de acordo com as instruções do aparelho (Eletroporador Cell-Porator® Electroporation System – Life Technologies, Gaithersburg, EUA), ajustado nas seguintes condições: resistência de 200 Ω; capacitância de 300 µF e voltagem 4 kV. Imediatamente após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 1mL de meio SOC sem antibiótico e incubadas sob agitação de 200 rpm a 37°C, durante 1 hora. Posteriormente, 200µL da suspensão foram plaqueadas em meio LB seletivo (100µg/mL de ampicilina) e incubadas a 37°C durante 12 a 16 horas.

Estabelecimento das condições ótimas para expressão das proteínas recombinantes – Para estabelecer as condições ideais de expressão das proteínas recombinantes foram realizados estudos de dose-resposta de IPTG (0,01mM, 0,1mM, 0,7mM e 1mM), cinética de tempo (2h a 6h) e temperatura de indução (TA, 30°C, 37°C). Os estudos iniciais foram realizados em pequena escala de crescimento bacteriano (10mL). Resumidamente, colônias transformantes foram inoculadas em 10mL de meio LB contendo 100µg/mL de ampicilina e incubadas a TA, 30°C ou 37°C sob agitação de 200 rpm até a cultura atingir uma absorbância entre 0,6 a 0,8 em comprimento de onda de 600nm. Nestas condições, a expressão das proteínas foi induzida pela adição de IPTG em diferentes concentrações, mantendo as culturas sob agitação constante nas temperaturas citadas anteriormente. Foram coletadas alíquotas de 250µL de cada cultura nos tempos 0, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a adição de IPTG. Estas alíquotas foram centrifugadas (14.000 rpm/ 1min/ TA) e o sobrenadante descartado. Posteriormente, os precipitados foram analisados por separação eletroforética em SDS-PAGE 10% com coloração pelo

Coomassie R-250 para visualização das bandas correspondentes às proteínas e escolha das condições ideais temperatura, tempo e concentração de IPTG. As condições ótimas resultantes destes estudos iniciais foram de 4 horas de indução a TA sob agitação de 200 rpm com 0,7mM de IPTG após a fase logarítmica. Uma vez padronizadas as condições ótimas de expressão, as proteínas foram, então, produzidas em média escala (100mL). Nesta etapa, as expressões foram iniciadas cultivando-se uma colônia transformante em 5mL de meio LB (100µg/mL de ampicilina) a 37°C sob agitação por 8-12 horas. Posteriormente, 3mL deste pré-inóculo foram adicionados em 100mL de meio LB com ampicilina (100µg/mL) e cultivados segundo as condições pré-estabelecidas nos experimentos anteriores.

Rompimento das células e solubilização dos corpos de inclusão – Mesmo após vários testes alterando as condições de expressão, constatamos que as proteínas formaram agregados insolúveis conhecidos como corpos de inclusão. O procedimento adotado para rompimento das células por sonicação, separação dos corpos de inclusão do extrato solúvel, solubilização e purificação das proteínas estão resumidos na **FIGURA 5**.

Rompimento das Células e Solubilização dos Corpos de Inclusão

E. coli BL21(DE3)+pGEX (100 mL)
Células ressuspensas em 5 mL de tampão de lise/15 min TA
Sonicação - 3x10 segundos



Lisado
Centrifugação/14.000 rpm – 15 minutos, 4°C



Precipitado (1) = corpos de inclusão
Sobrenadante (1) = S1 (descartado)



Isolamento e Solubilização dos Corpos de Inclusão

Precipitado (1)



5 mL tampão de solubilização/TA – 10 min.
Sonicação - 3x10 segundos
Centrifugação 14.000 rpm – 5 min., 4°C

Precipitado (2) = proteína insolúvel (descartado)
Sobrenadante (2) = S2 (proteínas solubilizadas)



Purificação – Cromatografia de Afinidade



Lavagem
Eluição
Diálise das frações reunidas

Proteína purificada

FIGURA 5: Esquema do processo de purificação das proteínas recombinantes representando diferentes domínios da MSP-1 de *P. vivax*.

Após o tempo necessário para a ótima expressão das proteínas, as células foram sedimentadas por centrifugação (3.000 rpm/ 20 min/ 4°C) e a massa celular ressuspensa em tampão de lise gelado (PBS, 5mM DTT, 1mM EDTA, 1mM PMSF e 4mg/mL de lisozima) e incubada por 15 minutos a TA. Após o período de incubação, as bactérias foram lisadas em banho de gelo com auxílio de um sonicador (Ultrasonic processor XL, Heat Systems). Foram aplicados 3 ciclos de sonicação de 10 segundos em pulso constante e intervalos de 10 segundos entre os pulsos para que não haja demasiada elevação térmica do extrato bacteriano. Em seguida, o lisado de células foi centrifugado (14.000 rpm/ 15min/ 4°C) para obtenção das frações solúvel (S1) e insolúvel (P1) que foram posteriormente analisadas por separação eletroforética em SDS-PAGE 10% com coloração pelo Coomassie R-250 e constatado a presença das proteínas recombinantes na fração insolúvel (com exceção da proteína recombinante controle GST). O precipitado (P1) foi então submetido a um tratamento para solubilização dos agregados protéicos. Após a realização de vários protocolos (incluindo a utilização de uréia 8M), a solubilização dos corpos de inclusão foi possível quando o precipitado foi ressuspendido em tampão de solubilização (PBS, 5mM DTT, 1mM EDTA, 1mM PMSF e 1,5% de sarcosil) e incubado por 5 minutos a TA. Após este período, esta suspensão foi novamente sonicada em gelo (3x10 segundos com intervalos de 1 minuto) e centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C para recuperação das proteínas que estavam presentes na fração solúvel (S2). Após a solubilização, as frações sobrenadantes foram tratadas com Triton X-100 para uma concentração final de 4%.

Purificação das proteínas recombinantes – As frações sobrenadantes (S2) contendo as proteínas solubilizadas foram submetidas à filtração em membrana de 0,22 µm e, posteriormente, purificadas por cromatografia de afinidade. Na fase inicial dos experimentos, as proteínas foram purificadas utilizando o kit GST SpinTrap Purification Module (GE Healthcare, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Este sistema é utilizado para purificar proteínas recombinantes em fusão com a GST a partir de culturas de bactérias de pequena escala (até 12 mL). Na fase de produção em média

escala os sobrenadantes foram aplicados na coluna e purificados utilizando o sistema de purificação de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) ÄKTA (GE Healthcare). As proteínas foram eluídas com tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo 10mM de glutathiona reduzida. O material eluído foi analisado em SDS-PAGE 12% para avaliar a eficiência do processo de purificação e confirmar o tamanho das bandas correspondentes às proteínas recombinantes. Para finalizar o processo de purificação, as proteínas recombinantes foram dialisadas contra um grande volume de PBS (2000 mL), a 4°C por 18 horas. A concentração de todas recombinantes foi determinada utilizando o kit BCA (Pierce, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.3. ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-MSP-1 de *P. vivax*

O padrão de reconhecimento de anticorpos IgG específicos para os antígenos recombinantes da PvMSP-1 foi avaliado por ELISA conforme protocolo descrito a seguir. Brevemente, microplacas de 96 poços (Costar, Cambridge, MA) foram sensibilizadas com 50µL dos antígenos recombinantes e do antígeno-controle (GST) em concentração de 25ng/poço diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9.6; 0,1M) por 18 horas a 4°C. Após a incubação, as microplacas foram lavadas quatro vezes (4x) com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T) e em seguida bloqueadas com leite desnatado (Molico - Nestlé®) a 5% em PBS/T (200µL/poço) por 2 horas a 37°C. Posteriormente, repetiu-se o processo de lavagem por 4x consecutivas e 50µL das amostras de soros diluídas a 1/160 em PBS/T foram adicionados aos poços em duplicatas. Após o tempo de incubação de 1 hora e 30 minutos a 37°C, as placas foram novamente submetidas a quatro lavagens com PBS/T e o conjugado anti-IgG humano ligado a peroxidase (Sigma, EUA) diluído 1/2000 em PBS/T (50µL/poço) foi adicionado, seguindo novamente incubação a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Transcorrido este tempo, as placas foram lavadas por quatro vezes e a reação enzimática revelada pela adição de OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride substrate – Sigma, EUA) diluído em tampão fosfato-citrato, pH 5,0 contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (50µL/poço). As

placas foram incubadas a TA e protegidas da luz até a reação ser interrompida pela adição de 50µL de uma solução de H₂SO₄ 4N.

Os valores de absorvâncias (DO) foram medidos a 490 nm utilizando leitor de microplacas automático (SpectraMax 240 PC, Molecular Devices). Como as proteínas recombinantes da PvMSP1 foram expressas em fusão com a GST, os valores de DO foram calculados, subtraindo-se os valores de DO obtidos para os antígenos recombinantes dos valores individuais de DO verificados para GST.

A absorvância discriminante entre os resultados positivos e negativos (*cut off*) foi estabelecida pela média das absorvâncias das amostras de indivíduos sem história clínica de malária, acrescida de três desvios-padrão. Considerando que podem ocorrer variações diárias nas leituras da DO dos soros testados, os valores do *cut off* foram calculados diariamente, incluindo cinco diferentes controles negativos em cada placa testada, além de dois soros positivos para o controle interno do teste. A média da absorvância de cada amostra testada foi dividida pelo valor do “cut off” da placa para determinar o índice de reatividade da amostra (IR), sendo os soros com $IR \geq 1$ considerados positivos.

4.4. Detecção de espécies de plasmódio pela técnica de PCR

O diagnóstico parasitológico inicial foi realizado por equipe técnica treinada da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado com base na observação microscópica de gotas espessas. O diagnóstico parasitológico das amostras provenientes de Manaus (FMT-AM) foi confirmado pela técnica de PCR segundo o protocolo descrito por KIMURA e colaboradores (1997) e modificado por SCOPEL e colaboradores (2004), para diferenciação entre infecções por *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e determinação de possíveis infecções mistas.

4.5. Determinação do polimorfismo no gene *pvmsp1*

Amostras de sangue dos pacientes de Manaus (n=41) foram empregadas para determinação da variante do bloco 10 da PvMSP-1 presente nos parasitos infectantes. Para caracterizar as variantes da PvMSP-1 presentes nos parasitos circulantes nesta área, a região do gene *mSP1* que codifica para o bloco 10 polimórficos da PvMSP-1 (PUTAPORNTIP et al., 2002) foi amplificado e sequenciado utilizando iniciadores que anelam em regiões conservadas que flanqueiam este bloco polimórfico. As sequências dos iniciadores foram desenhadas com base na sequência do gene *pvmsp1* da cepa Salvador-I. Foram utilizados os seguintes iniciadores: PVF7 (5'-CCTTAAGAATACCGAGATTTTGCTGAAG-3' [nucleotídeos 3429 a 3456]) e PVR3 (5'-GCGATTACTTTGTCGTAG-3' [nucleotídeos 4007 a 3990]). A reação de PCR foi realizada conforme descrito por BASTOS e colaboradores (2007). Brevemente, 2,0µL do DNA molde foi amplificado em um volume final de 50µl na presença de 0,2µM de cada iniciador, 5,0µL de tampão 10X (10mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton®X-100), 100µM de cada DNTP e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria, MG, Brasil). A mistura da reação foi incubada por 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% corados com solução de nitrato de prata para visualização de bandas de aproximadamente 578 pb. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit GFX PCR (Amersham Pharmacia Biotech) e submetidos ao sequenciamento direto utilizando o kit BigDye v3.1 Terminator Chemistry (Applied Biosystems, CA, EUA) em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems, CA, EUA) usando os mesmos iniciadores direto e reverso como descrito acima. Para cada amostra de DNA foram realizadas duas reações de PCR independentes, sendo que para cada produto de PCR foram realizadas duas reações de sequenciamento. Ambas as fitas de DNA foram sequenciadas conforme o seguinte protocolo:

Mix da reação (volume final: 10µL)	Programa
DNA (~100ng)	96°C – 2min – 1x
<i>Primer</i> (1,6 pmoles)	96°C – 15 seg
Tampão de sequenciamento 5x	55°C – 15 seg 44x
0,5µL de BigDye v3.1	60°C – 4 min
	4°C

Os produtos das reações de sequenciamento foram precipitados adicionando-se solução de precipitação (1µL de EDTA 125mM, 1µL de acetato e sódio 3M e 25µL de etanol 100%), seguindo de incubação a TA por 15 minutos e posterior centrifugação a 2000 x g por 55 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e 35µL de etanol 70% foram adicionados e as etapas de centrifugação (1650 x g, 15 minutos) e descarte do sobrenadante repetidas. Finalizando, os produtos das reações de sequenciamento foram secos por aquecimento a 37°C e armazenados a -20°C. Os sequenciamentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (Departamento Biologia Geral, ICB/UFMG).

As sequências obtidas foram analisadas utilizando-se os programas SEQUENCE SCANNER v1.0 (<http://www.appliedbiosystems.com>) e BIOEDIT v.7.0.5.3 (HALL, 1999) para obtenção das sequências consenso. Posteriormente, estas sequências foram alinhadas pelo CLUSTAL W contido no programa BIOEDIT com os haplótipos (alelos) descritos por PUTAPORNTIP e colaboradores (2002) e por BASTOS e colaboradores (2007) para determinação do haplótipo de cada sequência.

4.6. Análise dos dados

Inicialmente foi construído um banco de dados no MICROSOFT EXCEL, contendo todas as informações referentes às características demográficas e clínico-epidemiológicas dos pacientes incluídos no presente trabalho.

As análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPad Prism version 5.01* e MINITAB (Minitab, Inc., PA). Em todos os modelos, significância estatística foi definida como $P < 0,05$.

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste estatístico de Kolmogorov-Sminov. As diferenças na prevalência de anticorpos, bem como as comparações entre todas as outras frequências de interesse foram analisadas utilizando-se os testes estatísticos de Qui-quadrado, Qui-quadrado de tendência, ou ainda, teste exato de Fisher. Para comparar os níveis de anticorpos entre os diferentes grupos de estudo, utilizou-se o teste Mann-Whitney ou a versão *One Way ANOVA* do teste de Kruskal-Wallis, acompanhado pelo teste *post hoc* de Dunns.

No presente trabalho, foi utilizada a técnica de estatística multivariada de análise fatorial por meio dos componentes principais (ACP), uma ferramenta que possibilita a redução da dimensionalidade de um conjunto de dados, facilitando a interpretação e evitando a perda de informação. Isso porque, cada componente (CP) é uma combinação linear de todas as variáveis originais, e é obtida em ordem decrescente da máxima variância. Dessa forma, n -variáveis originais geram n -componentes principais não relacionados, que contêm a maior parte da informação do conjunto original (JOLLIFE, 2002; ABDI & WILLIAMS, 2010).

Como a resposta imune humoral envolve atuação simultânea de anticorpos que agem em diferentes alvos, uma ACP foi realizada com todos os dados das respostas de IgG para as 11 recombinantes, objetivando-se avaliar, simultaneamente, os efeitos de todos os anticorpos em uma única análise, uma vez que isso reflete melhor a situação biológica. A ACP permitiu a redução dos

dados referentes às respostas de anticorpos em componentes compostos independentes, representativos dos principais padrões de resposta imune observados na população de estudo. Uma rotação do tipo varimax foi aplicada para maximizar o contraste dos *loadings* das variáveis entre os diferentes fatores. Como o tamanho da amostra avaliada neste estudo foi superior a 150, utilizou-se para a interpretação apenas variáveis com *loadings* iguais ou superiores a 0,6, a fim de fornecer um modelo que representasse bem o padrão populacional (GUADAGNOLI & VELICER, 1988). Como os CPs extraídos apresentavam uma distribuição normal, seus escores foram comparados entre pacientes anêmicos e não anêmicos, bem como entre trombocitopênicos e não trombocitopênicos, por meio do teste estatístico de t Student. Esse procedimento foi adotado numa tentativa de se definir o padrão de resposta que poderia ser associado à morbidade. As relações entre os escores dos CPs e os níveis de hemoglobina ou plaquetas foram analisados utilizando-se o coeficiente de correlação de Spearman.

5. RESULTADOS

5.1. Descrição da população de estudo

A população estudada consistiu de 214 indivíduos, sendo a maioria deles do gênero masculino; razão entre homens e mulheres de 2,5:1. A faixa etária oscilou entre 12 e 68 anos (mediana 40 anos). Em relação à exposição, verificou-se que estes indivíduos tinham entre dois meses e 61 anos de residência em área endêmica (mediana 35 anos). Apesar do considerável tempo de residência em área endêmica, os pacientes relataram baixa exposição ao parasito, pois apresentaram em média, cerca de 5,4 episódios prévios de malária, sendo que a maioria (48,6%) das infecções passadas foi causada pelo *P. vivax*. (TABELA 1)

TABELA 1. Características da população avaliada neste estudo. As coletas foram realizadas nos meses de março de 2008 e maio de 2009.

Características	Média ± DP	95% IC
Idade (anos)	37,91 ± 14,28	35,70 – 40,13
Episódios prévios de malária (n)	5,40 ± 11,22	3,64 – 7,15
Parasitemia (parasitos/ μ L sangue)	4.185,00 ± 9.184,00	2.713,00 – 5.656,00
Hemoglobina(g/dL)	13,02 ± 1,86	12,76 – 13,29
Plaquetas (/mm ³)	120.119,00 ± 56.229,00	112.073,00 – 128.166,00

O exame de gota espessa revelou que os níveis de parasitemia variaram de 16 a 21.150 parasitas / μ L de sangue, com média de 3.392 (IC 95%, 1.508-2.242). A avaliação dos hemogramas de 190 pacientes mostrou que as concentrações de hemoglobina variaram de 4,50 g / dL - 17,30 g / dL (13,02 ± 1,86 g / dL). Anemia foi definida como o nível de hemoglobina inferior a 12,0 g / dL e esteve presente em 50 pacientes (26,3%), com média de 10,7 ± 1,31 g / dL. A contagem de plaquetas variou entre 13.000 - 269.000 / mm³ (120.119 ±

56.229 / mm³). Plaquetopenia (contagem de plaquetas <150.000 / mm³), com média de 91.853 ± 31.965.00 plaquetas/ mm³ de sangue foi observada em 138 pacientes (72,6%) (**TABELA 1**).

5.2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.

O objetivo inicial do trabalho era produzir 16 proteínas recombinantes representando 15 variantes de três diferentes domínios polimórficos da PvMSP-1 (blocos 2, 6 e 10) e um antígeno recombinante da região C-terminal conservada (MSP1₁₉), totalizando 16 proteínas recombinantes expressas em fusão com a GST de *S. japonicum*. No entanto, não foi possível expressar cinco proteínas dos domínios polimórficos, incluindo a variante BP13 do bloco 2 e todas as quatro variantes propostas para o bloco 6 (BEL, BP39, BR07 e BP01). O nível de expressão para estas cinco proteínas era baixíssimo e mesmo após exaustivos testes para melhorar a expressão das mesmas não conseguimos obtê-las em níveis satisfatórios para purificação. Resolvemos então, investir somente nas variantes dos blocos 2 e 10 e na proteína conservada MSP1₁₉, conseqüentemente, 11 recombinantes foram avaliadas neste estudo e dentre elas nenhuma representando o bloco 6 polimórfico da PvMSP-1. A escolha dos blocos polimórficos 2 e 10 foi motivada por dois achados descritos em estudos prévios: i) a associação de anticorpos IgG3 dirigidos contra a região N-terminal da PvMSP-1 e reduzido risco de infecção/proteção clínica em indivíduos expostos ao *P. vivax* no Brasil (NOGUEIRA et al., 2006); ii) maior antigenicidade de proteínas correspondentes a variantes antigênicas do bloco 10 quando comparada às variantes dos blocos 2 e 6 da PvMSP-1 (BASTOS et al., 2007).

As condições ideais para a expressão das proteínas recombinantes foram obtidas após estudos de dose-resposta de IPTG, cinética de tempo e variações de temperatura. As proteínas recombinantes foram detectadas em bom nível de expressão com massas moleculares de aproximadamente 46kDa para as

proteínas recombinantes representando as diferentes variantes dos blocos polimórficos 2 e 10; ~36kDa para a recombinante correspondente ao bloco 13 conservado e ~26kDa para a GST. Na **FIGURA 6** pode-se observar o padrão de migração do extrato protéico proveniente da cultura de *E. coli* cujas células foram transformadas com o plasmídeo contendo o inserto para expressão da proteína recombinante correspondente a variante BP39 do bloco 10 (10-BP39). Para as demais proteínas, o padrão de migração após análise em SDS-PAGE 10%, foi similar ao observado para a proteína 10-BP39 (dados não mostrados).

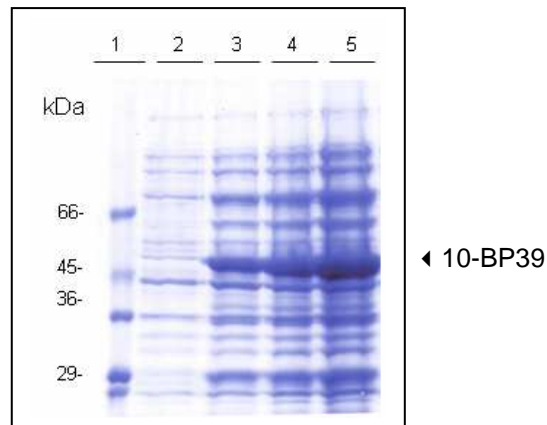


FIGURA 6: Análise em SDS-PAGE 10% da cinética de expressão da proteína recombinante 10-BP39. Padrão de migração do extrato protéico da cultura de *E. coli* antes e após indução da expressão com 0,7mM de IPTG. 1: marcador de massa molecular. 2 a 5: precipitados protéicos após, respectivamente, 0, 2, 3 e 4 horas da adição de IPTG. Coloração com Coomassie blue R-250.

Apesar do bom nível de expressão detectado durante a análise do extrato protéico, quando a expressão das proteínas foi avaliada após submeter o precipitado de bactérias à lise por sonicação em tampão de lise, constatou-se que as proteínas foram expressas na fração insolúvel (precipitado) (**FIGURA 7**).

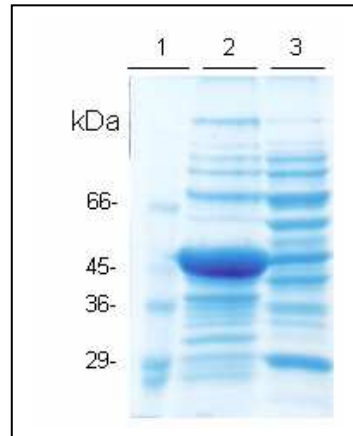


FIGURA 7: Análise em SDS-PAGE 10% das frações protéicas obtidas após a lise da cultura de *E.coli* depois de 4 horas da indução da expressão da proteína recombinante 10-BP39. 1: marcador de massa molecular; 2: precipitado; 3: sobrenadante. Coloração com Coomassie blue R-250.

Na tentativa de obter a expressão das proteínas na fração solúvel foram realizados novos testes de expressão utilizando outras cepas de *E.coli* como a DH5 α , ou mesmo a mesma cepa BL21 (DE3), mas proveniente de laboratório diferente (Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, Departamento Biologia Geral, ICB/UFMG). Vários protocolos de expressão foram testados, no entanto, as proteínas recombinantes foram expressas apenas como corpos de inclusão. Diante disso, diferentes formas de rompimento celular foram então testadas para evitar protocolos de desnaturação e renaturação.

Após a realização de vários protocolos (incluindo a utilização de uréia 8M), a solubilização dos corpos de inclusão foi possível quando o rompimento celular foi realizado na presença de 1,5% de sarcosil, conforme descrito em Material e Métodos. Na etapa subsequente foram realizados os testes de purificação utilizando colunas cromatográficas de afinidade. As frações eluídas durante o processo cromatográfico foram analisadas por SDS-PAGE 12,5%. A **FIGURA 8** mostra as bandas obtidas após a purificação da proteína recombinante representando a variante BP39 do bloco 2 polimórfico da PvMSP-1. (2-BP39). Como se pode observar a proteína migra com um padrão de banda única e praticamente não apresenta contaminantes ou produtos de degradação.

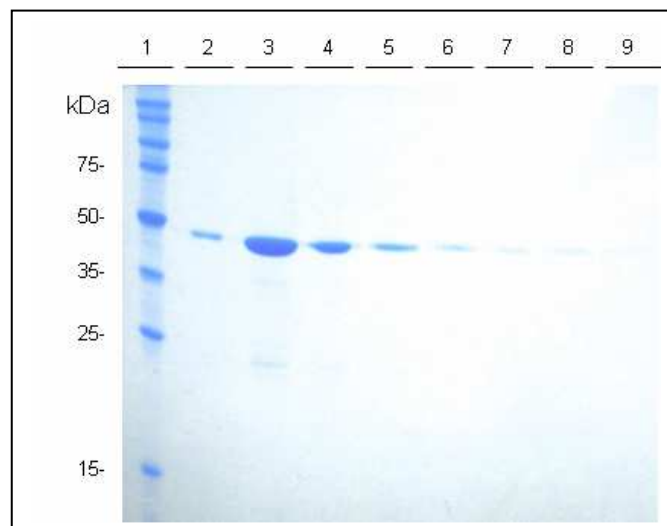


FIGURA 8: Análise em SDS-PAGE 12,5% das frações eluídas após a purificação da proteína recombinante 2-BP39 utilizando o sistema de purificação de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) ÄKTA (GE Healthcare). 1: marcador de massa molecular; 2 a 8: frações eluídas com tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo 10mM de glutathione reduzida. Coloração com Coomassie-blue R-250.

Após o processo de purificação as frações eluídas foram reunidas e dialisadas utilizando membranas de diálise com *cut off* de 10 kDa contra

solução de PBS. Alíquotas das proteínas dialisadas foram submetidas à análise por SDS-PAGE 12,5% e posteriormente dosadas utilizando o kit BCA (Pierce, EUA). Aproximadamente 0,5 a 0,8mg/mL de cada proteína recombinante foram obtidos a partir de 100mL de cultura de bactérias transformadas. A **FIGURA 9** mostra o padrão de migração de algumas das proteínas recombinantes purificadas após serem dialisadas.

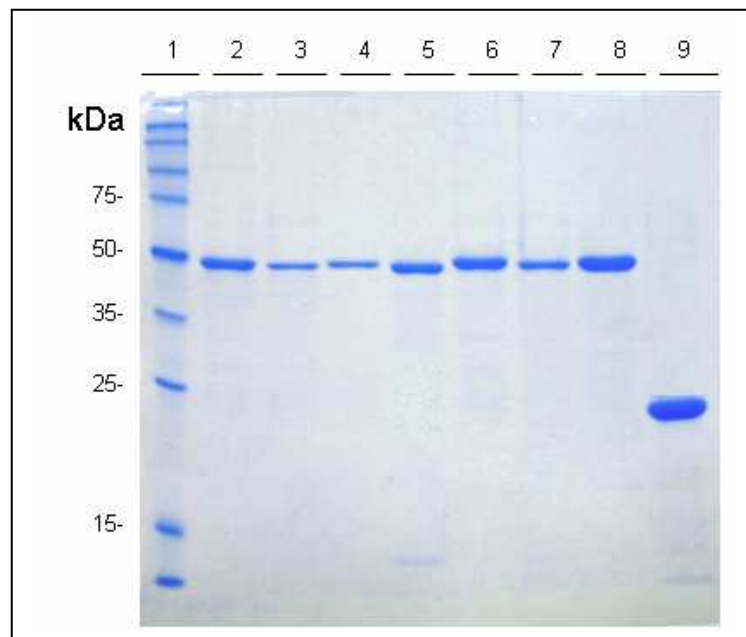


FIGURA 9: Análise em SDS-PAGE 12,5% das proteínas recombinantes após purificação e diálise. Padrão de migração das proteínas recombinantes correspondentes as diferentes variantes dos blocos polimórficos 2 e 10 da PvMSP1 (bandas 2 a 8), além da proteína recombinante controle GST (banda 9). **1.** marcador de massa molecular; **2.** 10-BP13; **3.** 10-BR07; **4.** 10-BP29; **5.** 10-BP39; **6.** 10-BP01; **7.** 2-BEL; **8.** 2-BR07; **9.** GST. Coloração com Coomassie blue R-250.

5.3. Análise do reconhecimento imune das proteínas recombinantes correspondentes a diferentes domínios e variantes alélicas da PvMSP-1

As proteínas recombinantes produzidas neste estudo foram analisadas em relação ao seu reconhecimento imune por um painel de 214 soros provenientes de indivíduos com infecção patente por *P. vivax* residentes na área endêmica brasileira (Estados do Amazonas e Mato Grosso). Foi avaliada a resposta de IgG contra 10 proteínas recombinantes representando variantes alélicas dos domínios polimórficos 2 e 10 da PvMSP-1; além da resposta contra o antígeno MSP1₁₉, uma sub-unidade altamente conservada, resultante do processamento proteolítico que ocorre na região C-terminal da PvMSP-1 durante o processo de invasão do eritrócito pelo merozoíto.

Inicialmente, foram realizados testes para padronização dos ensaios de ELISA utilizando amostras de soros de indivíduos nunca expostos à malária, além de soros de indivíduos residentes na área endêmica, que apresentavam resposta positiva de IgG (IR>1) para antígenos de *P. vivax*. Estes soros foram testados em diluições seriadas, contra diferentes concentrações dos antígenos (4,0ng/μL a 0,5ng/μL) e do anticorpo conjugado anti-IgG humano. Os valores de *cut off* determinados para as recombinantes do bloco 2 variaram de 0,200 a 0,340, enquanto variação de 0,150 a 0,350 foi verificada para os valores de *cut off* dos antígenos recombinantes do bloco 10 da PvMSP-1. Para o antígeno conservado MSP1₁₉, o limite de positividade foi de 0,300. Para permitir comparações entre as respostas de anticorpos contra os diferentes antígenos,

os dados de absorvâncias dos soros foram transformados para índices de reatividade, cujo cálculo está detalhado em Material e Métodos.

5.3.1. Padrão da resposta de IgG anti-PvMSP-1 na população de estudo

As **FIGURAS 10A** e **10B** mostram, respectivamente, as frequências e os valores médios dos índices de reatividade de IgG específicos para os antígenos recombinantes que representam diferentes variantes e domínios da PvMSP-1 observados para os 214 pacientes avaliados. Os dados revelam que, com exceção das variantes antigênicas BR07 e BP13, as demais proteínas correspondentes aos blocos polimórficos foram pouco reconhecidas (proporções de soros com reatividade inferiores a 30%).

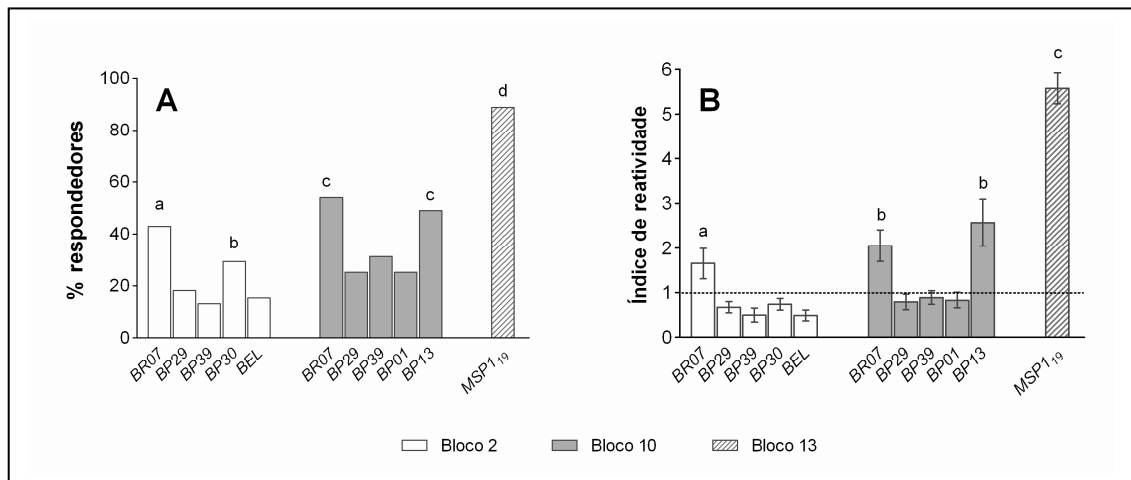


FIGURA 10: Padrão da respostas de anticorpos IgG anti-proteínas recombinantes correspondentes aos domínios polimórficos (blocos 2 e 10) e conservados (bloco 13, MSP1₁₉) da PvMSP-1 observado para os soros de 214 indivíduos com infecção patente por *P.vivax* avaliados neste estudo. **(A)** Frequências de respondedores positivos (teste exato de Fisher). **(B)** Níveis de IgG expressos como índices de reatividade (IR) dos soros (médias e os respectivos intervalos de confiança de 95%). A linha pontilhada indica o limite de positividade (*cut off*). Letras idênticas indicam proporções **(A)** e medianas **(B)** estatisticamente iguais, como determinado no teste exato de Fisher ou Friedman acompanhado pelo teste *pos hoc* de Dunns, respectivamente. IR=média da absorvância do soro teste/ *cut off*.

A frequência de respondedores variou de 13 a 43% para os antígenos do bloco 2 (BR07: 43,0%; BP29: 18,2%; BP39: 13,1%; BP30: 29,4%; BEL: 15,4%), enquanto para as variantes do bloco 10 foram observadas de 25 a 54% de respostas positivas de IgG (BR07: 54,2%; BP29: 25,2%; BP39: 31,3%; BP01: 25,2%; BP13: 49,1%) (**FIGURA 10A**). Entre as variantes antigênicas do bloco 2, BR07 e BP30, foram as mais reconhecidas ($P < 0,05\%$), sendo a proporção de soros com resposta de IgG anti-BR07 superior a proporção detectada para a variante BP30 ($P = 0,0048$). Com relação às proteínas do bloco 10, as variantes BR07 e BP13 foram as mais reconhecidas ($P < 0,0001$) entre as demais, sem diferenças entre as frequências de respondedores positivos observadas para estas duas variantes ($P = 0,3334$).

Com relação aos níveis de anticorpos, expressos como índices de reatividade de IgG, observou-se que as respostas contra os domínios polimórficos foram, em geral, de baixa magnitude (**FIGURA 10B**). Os maiores níveis de IgG foram detectados para as variantes antigênicas BR07 (bloco 2 e 10) e BP13 (bloco 10), cujos níveis foram maiores quando comparados aos níveis obtidos para as demais variantes pertencentes ao mesmo bloco polimórfico ($P < 0,0001$). Níveis de IgG detectados para as proteínas BR07 e BP13 do bloco 10 não diferiram entre si ($P > 0,05$).

Com intuito de comparar a imunogenicidade de diferentes domínios da PvMSP-1 independente do polimorfismo antigênico foram avaliadas as respostas de IgG, em termos de proporção de respondedores positivos e reatividade obtidas para variantes correspondentes nos blocos 2 e 10 da proteína (BR07, BP29 e BP39). Observou-se que tanto as frequências de respondedores positivos quanto os níveis médios de IgG detectados para as variantes BR07 e BP39 do bloco 10 foram significativamente maiores quando comparados às respostas verificadas para os antígenos correspondentes no bloco 2 (BR07: $P = 0,0260$, teste de McNemar; $P = 0,0075$, teste de Wilcoxon) (BP39: $P < 0,0001$, teste de McNemar; $P < 0,0001$, teste de Wilcoxon). Para as variantes BP29 não foram observadas diferenças significativas entre as respostas de IgG verificadas para a recombinante do bloco 2 e as respostas para a recombinante do bloco 10 ($P = 0,1005$, teste de McNemar; $P = 0,8174$,

teste de Wilcoxon) (**FIGURA 10A e 10B**). Estes dados sugerem diferenças com relação ao reconhecimento imune das regiões polimórficas N- e C- terminais da PvMSP-1, evidenciando a maior imunogenicidade da região C-terminal (bloco 10) em relação ao bloco 2 N-terminal. No entanto, é importante ressaltar que as médias de reatividade dos anticorpos contra a variante BP39 foram inferiores ao *cut off*, provavelmente não apresentando significado biológico com relação ao reconhecimento de regiões diferentes da PvMSP-1.

Ao contrário dos resultados observados para os blocos polimórficos, a proteína correspondente à região C-terminal conservada da PvMSP-1 (MSP1₁₉) foi altamente reconhecida (89%), apresentando níveis de IgG específicos significativamente maiores quando comparados aos demais antígenos representando as regiões variáveis da proteína ($P < 0,0001$). Estes dados corroboram dados da literatura que evidenciam a alta imunogenicidade da região C-terminal da PvMSP-1 (SOARES et al.1997, MORAIS et al., 2005).

5.3.2. Correlação entre os níveis de IgG anti-PvMSP-1 e o grau de identidade entre as sequências de aminoácidos dos antígenos recombinantes

Nas **TABELAS 2 e 3** estão apresentados os níveis de identidade entre as proteínas recombinantes dos blocos variáveis 2 e 10, além das análises de correlação entre os níveis de anticorpos IgG contra diferentes antígenos pertencentes a um mesmo bloco da PvMSP-1. Os pares de antígenos do bloco 2 com sequências de aminoácidos relativamente similares não apresentaram, necessariamente, as maiores estimativas para os coeficientes de correlação, os quais variaram significativamente (**TABELA 2**). No entanto, para os antígenos do bloco 10 a maior estimativa ($r_s=0,731$) foi obtida para o par de antígenos 10-BR07/10-BP13, o qual apresentou a maior porcentagem de identidade de aminoácidos (93,4%) (**TABELA 3**).

TABELA 2: Porcentagem de identidade de aminoácidos entre as variantes do bloco 2 da PvMSP-1 expressas como antígenos recombinantes e coeficientes de correlação de Spearman (r_s) na comparação dos níveis de anticorpos IgG específicos para estas variantes.

Antígeno	Correlação entre níveis de anticorpos IgG [#] (diagonal inferior) e % de identidade de aminoácidos (diagonal superior)				
	BR07	BP29	BP39	BP30	Belém
BR07		69,6	67,5	71,4	66,9
BP29	0,160*		70,7	71,0	67,5
BP39	0,386**	0,256**		65,0	93,0
BP30	0,358**	-0,046	0,070		63,7
Belém	0,265**	0,525***	0,208*	0,143*	

Com exceção dos coeficientes de correlação para os pares de antígenos BP29/BP30 e BP39/BP30, todos os demais são significantes (* $P<0,05$; ** $P<0,001$; *** $P<0,0001$).

TABELA 3: Porcentagem de identidade de aminoácidos entre as variantes do bloco 10 da PvMSP1 expressas como antígenos recombinantes e coeficientes de correlação de Spearman (r_s) na comparação dos níveis de anticorpos IgG específicos para estas variantes.

Antígeno	Correlação entre níveis de anticorpos IgG (diagonal inferior) e % de identidade de aminoácidos (diagonal superior)				
	BR07	BP29	BP39	BP01	BP13
BR07		87,3	86,7	80,1	93,4
BP29	0,210		71,4	71,7	88,7
BP39	0,368***	0,088		77,1	82,3
BP01	0,414***	0,328***	0,144*		74,2
BP13	0,731***	0,325***	0,346***	0,432***	

Com exceção do coeficiente de correlação para o par de antígenos BP29/BP39, todos os demais são significantes (* $P < 0,05$; *** $P < 0,0001$).

Quando os dados foram analisados considerando o grau de identidade entre as diferentes variantes de cada bloco, verificou-se que não foram observadas correlações significantes entre a porcentagem de identidade de aminoácidos e os respectivos coeficientes de correlação para os níveis de IgG anti-blocos polimórficos (**FIGURA 11**).

Estes dados sugerem que uma proporção substancial dos anticorpos IgG naturalmente adquiridos reconhecem as sequências variáveis dentro dos antígenos recombinantes dos blocos polimórficos 2 e 10 ao invés das sequências conservadas flangeadoras que são compartilhadas por todas as variantes do mesmo bloco.

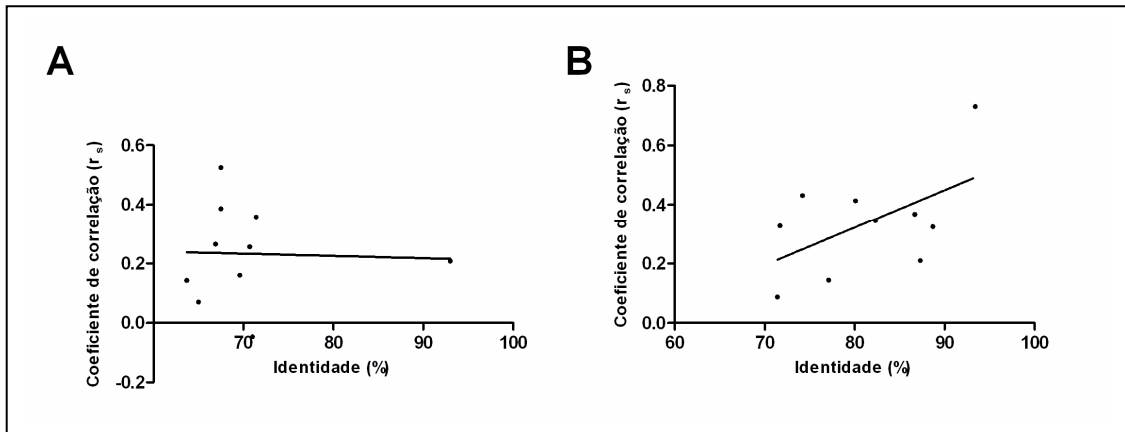


FIGURA 11: Correlação entre as porcentagens de identidade compartilhada pelas variantes de um mesmo bloco polimórfico da PvMSP1 e os coeficientes de correlação (r_s) entre os níveis de anticorpos IgG específicos para as respectivas variantes. **(A)** [#]Correlação para os antígenos do bloco 2 ($r=-0,03753$, $P=0,9180$). **(B)** [#]Correlação para as variantes do bloco 10 ($r=0,5445$, $P=0,1036$). [#]Correlação de Spearman.

5.3.3. Influência da parasitemia sanguínea na resposta de IgG anti-PvMSP-1

Para avaliar o efeito da densidade parasitária no reconhecimento de anticorpos anti-PvMSP-1, as respostas de IgG foram analisadas comparativamente em relação aos níveis de parasitos circulantes detectados no exame de gota espessa e expressos em número de parasitos por microlitro de sangue. Para esta análise, 152 pacientes que possuíam dados de parasitemia disponíveis, foram divididos em quatro grupos: i) pacientes com parasitemias inferiores a 1000 parasitos/ μ L ($n=36$), ii) pacientes com parasitemias entre 1000-2000 parasitos/ μ L ($n=37$), iii) pacientes com parasitemias entre 2001-5000 parasitos/ μ L ($n=42$) e iv) pacientes com parasitemias superiores a 5000 parasitos/ μ L ($n=37$).

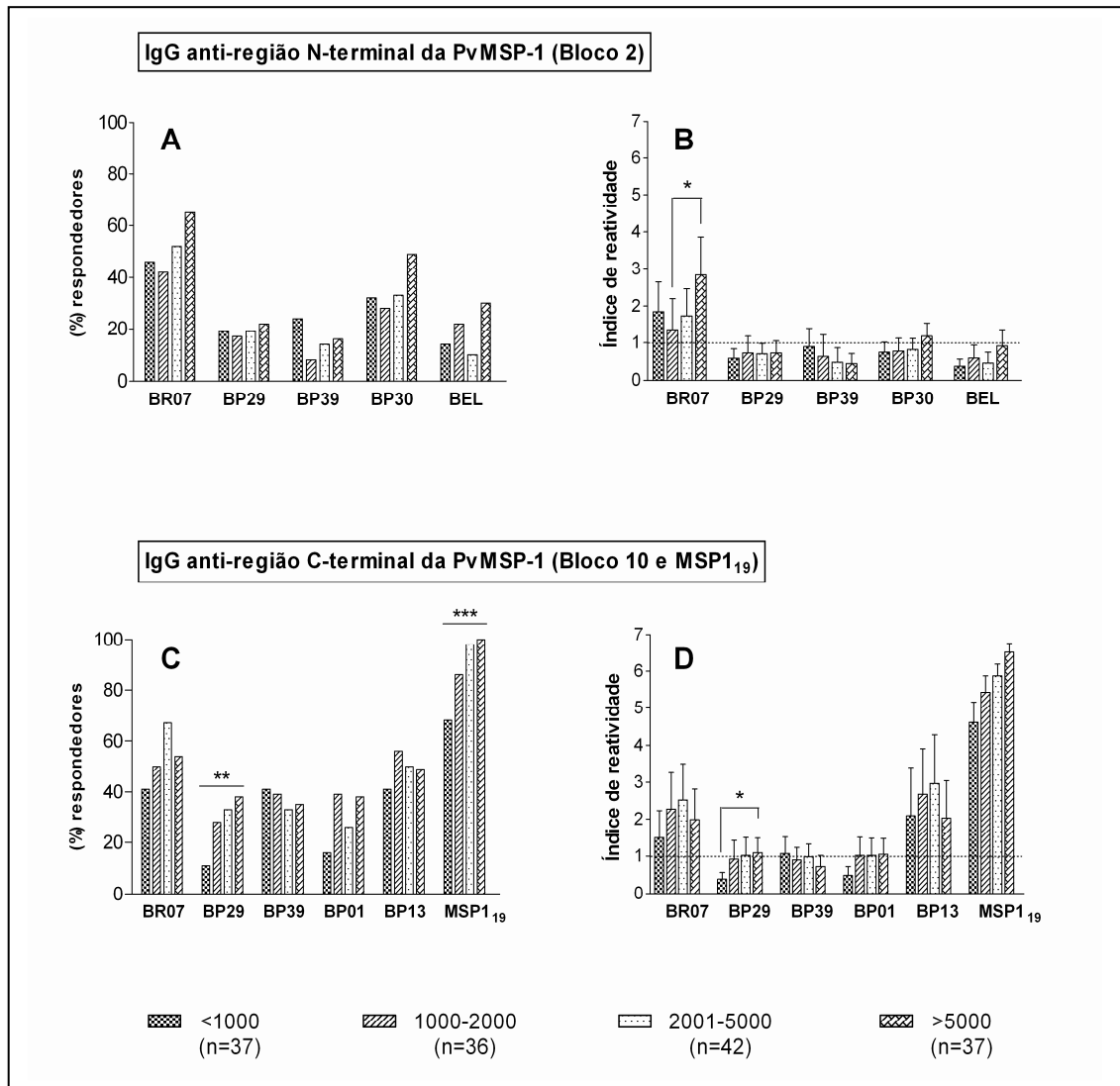


FIGURA 12: Efeito da parasitemia (parasitos/ μ L de sangue) na determinação da resposta de anticorpos anti-proteínas recombinantes das regiões N- e C-terminais da PvMSP-1. Frequências (A) e níveis (B) de IgG anti-proteínas recombinantes correspondentes a variantes do bloco 2 da PvMSP-1. Frequências (C) e níveis (D) dos anticorpos IgG anti-proteínas recombinantes correspondentes às variantes antigênicas do bloco 10 da PvMSP-1 e à proteína conservada MSP1₁₉. Os níveis de anticorpos foram expressos como índices de reatividade (IR) observados para os soros de indivíduos com infecção patente por *P. vivax*. Os indivíduos foram divididos em quatro grupos conforme indicado na legenda. Qui-quadrado de tendência, ** $P < 0,001$; *** $P < 0,0001$; Kruskal-Wallis one way ANOVA, * $P < 0,05$.

Conforme mostrado na **FIGURA 12**, com exceção para as variantes antigênicas BR07, do bloco 2 e BP29 do bloco 10, a carga parasitária parece não afetar as respostas de anticorpos IgG contra domínios variáveis de PvMSP-1. Para o antígeno BR07, do bloco 2, diferenças significantes foram observadas entre os níveis de IgG de indivíduos com parasitemias entre 1000 a 2000 parasitos/ μ L e indivíduos apresentando mais de 5000 parasitos/ μ L de sangue. Com relação as proteínas do bloco 10, a carga parasitária influenciou somente na resposta de IgG contra a variante antigênica BP29 do bloco 10, em termos de frequência e níveis de anticorpos. Diferente do padrão observado para a maioria das proteínas dos blocos polimórficos, as proporções de respondedores para o antígeno C-terminal conservado (MSP1₁₉) tendem a aumentar a medida que os pacientes apresentam maiores cargas parasitárias ($P = 0,0400$). Esta tendência também foi observada em relação aos níveis de anticorpos para este mesmo antígeno, embora esta tendência não seja estatisticamente significativa ($P = 0,1397$).

5.3.4. Influência da exposição ao *Plasmodium* na resposta de IgG anti-PvMSP-1

Como o tempo de exposição em áreas endêmicas é um fator importante na determinação da resposta imune adquirida por populações naturalmente expostas ao *Plasmodium*, nesta etapa foi avaliada a influência do número de episódios prévios de malária, uma medida indireta de exposição ao parasito, na resposta de anticorpos específicos. Foram analisadas as frequências e os níveis de IgG anti-PvMSP-1 em relação ao número de malárias anteriores relatado pelos pacientes durante questionário aplicado no momento da coleta de sangue. Desta forma, 159 pacientes infectados com *P. vivax* que informaram o número de episódios prévios de malária foram divididos em quatro grupos: i) primo-infectados (n=36), ii) indivíduos com relato de apenas um episódio prévio (n=30), iii) indivíduos que tiveram entre 2 a 5 episódios

prévios (n=55) e iv) indivíduos com relato de mais de 5 episódios de malária (n=38).

Os dados da **FIGURA 13** mostram que o número de exposições prévias ao *P. vivax* influencia nas respostas de anticorpos IgG para a variante antigênica BP13 do bloco 10 e para a proteína conservada MSP1₁₉. Diferenças significativas foram observadas entre as proporções de respondedores dos indivíduos primo-infectados e as proporções observadas para os demais grupos de pacientes que relataram terem sofrido episódios prévios de malária ($P = 0,0065$ e $P < 0,0001$ para BP13 e MSP1₁₉). (**FIGURA 13C**). Os níveis de IgG específicos detectados para estes dois antígenos também aumentaram de acordo com o número de episódios prévios de malária (**FIGURA 13D**). Para o antígeno BP13 diferenças significativas foram observadas entre os níveis de IgG dos pacientes primo-infectados e os níveis detectados para pacientes com relato de 2 a 5 infecções prévias, bem como para os pacientes relatando mais de 5 episódios anteriores de malária ($P = 0,0055$). Os resultados obtidos para os níveis de IgG anti-MSP1₁₉ também revelaram diferenças entre a mediana de IgG dos primo-infectados e medianas detectadas para os demais grupos com relato de infecções prévias por *Plasmodium* ($P < 0,0001$). Para os antígenos BR07 e BP39 do bloco 10, indivíduos com relato de exposição prévia apresentaram respostas e níveis de IgG superiores aos primo-infectados, mas em ambos casos, estas diferenças não alcançaram significância estatística ($P > 0,05$).

O fator exposição prévia parece não influenciar as respostas de anticorpos IgG variante-específicos dirigidos contra a região N-terminal (bloco 2) da PvMSP-1 ($P > 0,05$) (**FIGURA 13 A e B**).

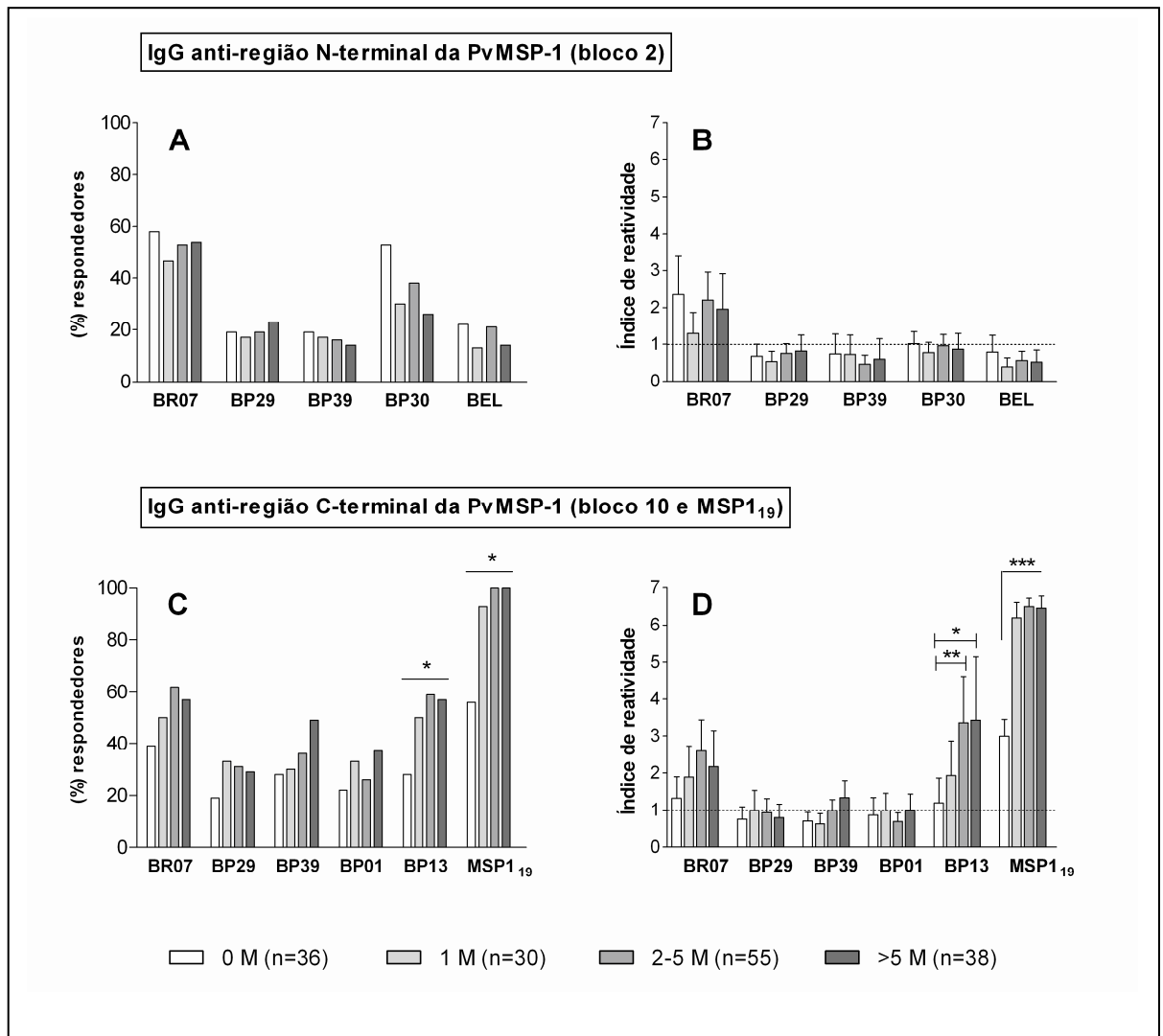


FIGURA 13: Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgG anti-proteínas recombinantes da PvMSP-1. Frequências (A) e níveis de anticorpos IgG (médias, IC 95%) (B) anti-proteínas recombinantes do bloco 2 da PvMSP-1. (C) Frequências de respondedores positivos (Qui-quadrado de tendência, $*P < 0,05$) e níveis de anticorpos IgG (médias, IC 95%) (D) ($*P=0,0242$, $**P=0,0067$, $***P<0,0001$, Kruskal-Wallis one way ANOVA) anti-proteínas recombinantes da região C-terminal da PvMSP-1. Os indivíduos foram divididos em quatro grupos como indicado na legenda, sendo 0M: primo-infectados, 1M: 1 episódio prévio, 2 - 5M: 2 a 5 malárias prévias e > 5M: mais de cinco episódios agudos anteriores. As linhas pontilhadas indicam o limite de positividade (*cut off*).

5.3.5. Associações entre a resposta de IgG e parâmetros de morbidade

Nas infecções maláricas, anemia e plaquetopenia são duas manifestações clínicas comuns. Com o intuito de investigar como estes dois parâmetros clínicos associados à morbidade na malária, afetam a resposta de anticorpos IgG anti-PvMSP-1, avaliou-se comparativamente os níveis e as frequências de IgG específicos em relação à presença ou não de anemia e plaquetopenia nos pacientes infectados com *P. vivax*.

1. Resposta de IgG anti-PvMSP-1 e anemia

Para avaliar este parâmetro clínico, foram selecionados indivíduos infectados com *P. vivax* cujos resultados do hemograma para níveis de hemoglobina sérica detectaram a presença ou a ausência de anemia. Foram avaliados 190 indivíduos, sendo 50 deles classificados como anêmicos ($HgB < 12,0g/dL$) e 140 como não anêmicos ($HgB \geq 12,0g/dL$).

Primeiramente, foram avaliadas as correlações entre níveis de IgG anti-proteínas recombinantes da PvMSP-1 e níveis de hemoglobina presentes nos soros dos pacientes avaliados. Para todos os antígenos do bloco 2 não foram verificadas correlações significantes ($P > 0,05$). Entretanto, para os antígenos representado as variantes antigênicas do bloco 10 (exceto BP29) e para a proteína conservada MSP1₁₉, foram observadas correlações negativas entre níveis de IgG específicos e níveis de hemoglobina sérica. A **FIGURA 14** apresenta os resultados de correlação significativa observados para as variantes do bloco 10 e para a proteína conservada MSP1₁₉.

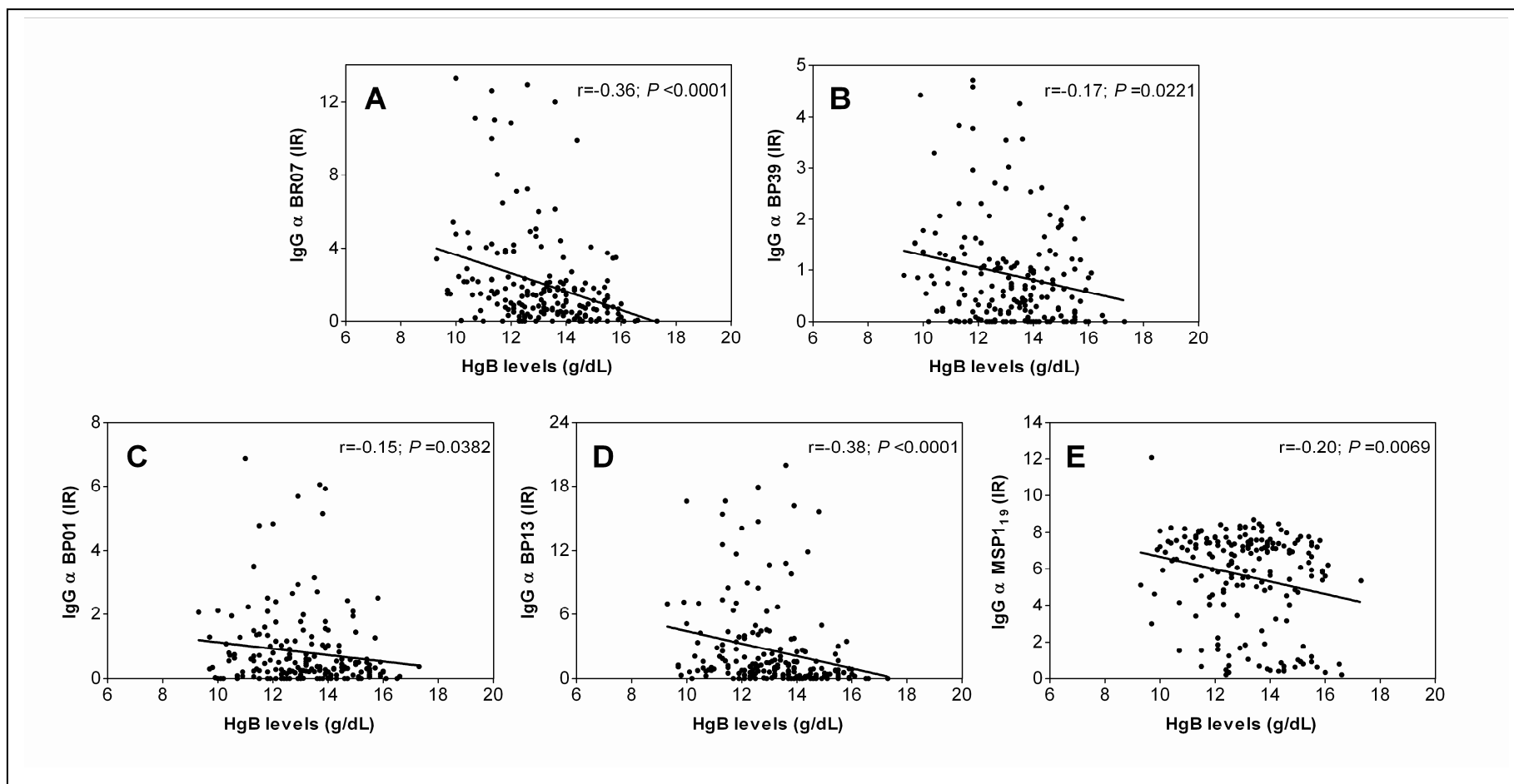


FIGURA 14: Correlação entre níveis séricos de hemoglobina de 190 pacientes infectados com *P. vivax* e níveis de IgG (IR) anti-proteínas recombinantes da região C-terminal da PvMSP-1. (bloco 10 e MSP1₁₉). Correlação de Spearman.

Posteriormente, foram avaliados comparativamente as frequências e níveis de IgG (IR) nos soros de 50 indivíduos anêmicos ($HgB < 12,0g/dL$) e 140 não anêmicos ($HgB \geq 12,0g/dL$).

Dentre os antígenos representando variantes do bloco 2 foram encontradas diferenças entre as frequências de respondedores positivos de IgG para as variantes antigênicas BP29 ($P = 0,0181$) e BEL ($P = 0,0072$). Para estes antígenos observou-se que os indivíduos anêmicos apresentaram maior proporção de respostas positivas de IgG quando comparados aos indivíduos não anêmicos (**FIGURA 15A**). Com relação à reatividade dos anticorpos, não foram observadas diferenças significativas entre as proporções de respostas positivas de indivíduos anêmicos e não-anêmicos ($P > 0,05$) (**FIGURA 15B**).

Com exceção da variante antigênica BP29, verificou-se que, para as demais proteínas do bloco 10, a frequência de soropositivos foi superior em pacientes anêmicos do que em não-anêmicos ($P < 0,05$). Um comportamento semelhante foi observado para a proteína MSP1₁₉ (anêmicos: 98% vs não-anêmicos: 85,7%; $P = 0,0167$) (**FIGURA 15C**). Em relação à magnitude da resposta, as diferenças entre pacientes anêmicos e não anêmicos permaneceram para as variantes antigênicas do bloco (BR07, BP39 e BP01, BP13); os níveis medianos de IgG específicos para estas proteínas foram significativamente superiores em pacientes anêmicos quando comparados aos pacientes não anêmicos. Os níveis de IgG anti-MSP1₁₉ foram similares entre indivíduos anêmicos e não-anêmicos ($P = 0,0595$) (**FIGURA 10D**).

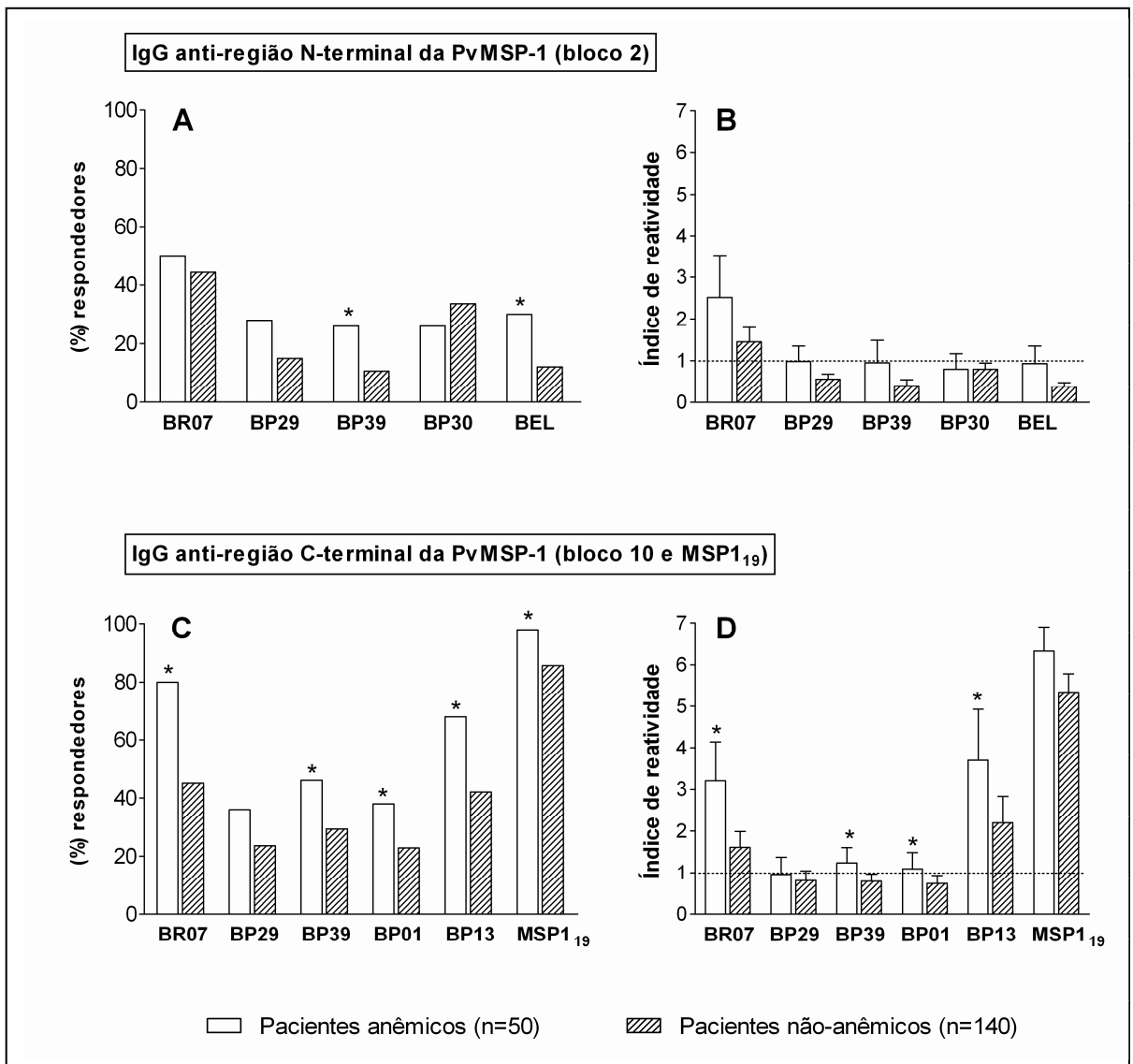


FIGURA 15: Associação entre a resposta de anticorpos IgG anti-proteínas recombinantes da PvMSP-1 e anemia. Frequências **(A)** e níveis de anticorpos IgG (médias, IC 95%) **(B)** anti-proteínas recombinantes do bloco 2 da PvMSP-1. Frequências **(C)** e níveis de anticorpos IgG (médias, IC 95%) **(D)** anti-proteínas recombinantes da região C-terminal da PvMSP-1. As linhas pontilhadas indicam o limite de positividade (*cut off*). * $P < 0,05$.

2. Resposta de IgG anti-PvMSP-1 e plaquetopenia

A resposta de anticorpos específicos para proteínas recombinantes da PvMSP-1 foi avaliada quanto à presença ou ausência de plaquetopenia em indivíduos infectados com *P. vivax*. Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com o número de plaquetas por mm^3 de sangue. Indivíduos com número de plaquetas inferior a $150.000/\text{mm}^3$ foram classificados como plaquetopênicos ($n=138$), enquanto os indivíduos com número de plaquetas superior ou igual a $150.000/\text{mm}^3$ foram classificados como não plaquetopênicos ($n=52$).

Não foram obtidas correlações significantes entre níveis de anticorpos IgG anti-PvMSP-1 e número de plaquetas por mm^3 de sangue, determinado no hemograma dos pacientes avaliados (dados não mostrados).

A **TABELA 4** apresenta as frequências de respondedores positivos e os níveis de anticorpos IgG específicos (IR) para os antígenos recombinantes da PvMSP-1 observados entre os pacientes plaquetopênicos e não plaquetopênicos.

Para todos os antígenos do bloco polimórfico 10 e para a proteína conservada MSP1₁₉ não foi verificada diferença entre frequências e níveis de anticorpos IgG detectados nos indivíduos plaquetopênicos e não plaquetopênicos ($P > 0,05$). Apesar dos indivíduos não plaquetopênicos apresentarem maiores níveis de IgG anti-2-BP29 ($P=0,0224$), a média de reatividade destes anticorpos foi negativa e portanto, sem significado biológico.

TABELA 4: Comparação entre proporções de respostas positivas e níveis (IR) de IgG específicos para os antígenos recombinantes dos blocos variáveis 2 e 10 e da região C-terminal conservada (MSP1₁₉) da PvMSP-1 de acordo com a contagem de plaquetas/mm³ de sangue em indivíduos infectados com *P. vivax*

Anticorpos IgG anti-proteínas recombinantes da PvMSP1 em indivíduos plaquetopênicos e não plaquetopênicos infectados com <i>P. vivax</i>						
Antígenos	Nº de soros positivos (%)		Análise Estatística [§]	Índice de Reatividade – IR ($\bar{x} \pm dp$)		Análise Estatística [#]
	<150.000mm ³ (n=138)	≥150.000mm ³ (n=52)	<i>P</i>	<150.000mm ³ (n=138)	≥150.000mm ³ (n=52)	<i>P</i>
Bloco 2						
BR07	52 (37,7)	16 (30,8)	0,4014	1,27 ± 1,88	1,09 ± 1,65	0,9550
BP29	18 (13,4)	08 (15,4)	0,6439	0,46 ± 0,66	0,72 ± 1,05	0,0224
BP39	18 (13,4)	10 (19,2)	0,3580	0,47 ± 1,03	0,75 ± 1,67	0,0501
BP30	34 (24,6)	09 (17,3)	0,3343	0,63 ± 0,72	0,59 ± 0,95	0,1839
BEL	11 (8,0)	03 (5,8)	0,7615	0,27 ± 0,52	0,32 ± 0,45	0,0560
Bloco 10						
BR07	52 (37,7)	16 (30,8)	0,4014	1,19 ± 1,65	0,86 ± 1,05	0,4089
BP29	14 (10,1)	04 (7,7)	0,7835	0,35 ± 0,55	0,33 ± 0,52	0,9310
BP39	19 (13,8)	05 (9,6)	0,6247	0,45 ± 0,53	0,41 ± 0,58	0,4976
BP01	18 (13,04)	04 (7,7)	0,4460	0,48 ± 0,72	0,42 ± 0,56	0,6932
BP13	29 (21,0)	09 (17,3)	0,6857	0,071 ± 1,11	0,72 ± 1,16	0,4282
Bloco 13						
MSP1₁₉	125 (90,6)	44 (84,6)	0,2988	5,65 ± 2,49	5,48 ± 2,63	0,2467

\bar{x} = média

dp = desvio padrão

[§] Teste exato de Fisher

[#] Teste de Mann-Whitney – U

3. Redução dos dados de respostas de IgG anti-PvMSP-1

Os resultados obtidos nas análises univariadas indicaram uma considerável associação entre a resposta imune variante-específica dirigida contra a região C-terminal da PvMSP-1 (bloco 10) e presença de anemia em indivíduos com infecção patente por *P. vivax*. Diante destes resultados e considerando que a resposta imune humoral envolve anticorpos com diferentes especificidades atuando simultaneamente em diferentes regiões dos antígenos-alvo; nesta etapa realizamos uma Análise de Componentes Principais (ACP) com todos os dados referentes às respostas de IgG obtidas para as 11 proteínas envolvidas neste estudo. A ACP foi utilizada com o intuito de avaliar os efeitos de todos estes anticorpos em uma única análise e extrair os padrões de respostas mais importantes, para depois associá-los à morbidade. Além disso, pretendemos avaliar se as associações entre anticorpos variantes-específicos anti-bloco 10 e anemia se manteriam em um sistema de análise multivariada, uma vez que estes dados podem ter implicações na elaboração de vacinas baseadas na PvMSP-1.

Os resultados da ACP mostraram que os três primeiros componentes explicaram da 60,8% da variação total dos dados. O primeiro componente contribuiu com 30,8% da variabilidade e deu os maiores pesos para IgG anti-bloco 2 (variantes BR07, BP29, BP39 e BEL), ao passo que o componente 2 foi melhor representado por IgG anti-bloco 10 (BR07 e BP13), contribuindo com 19,4% da variação observada. O terceiro componente, por sua vez, foi capaz de explicar 10,6% da variabilidade dos dados e deu os maiores pesos para IgG anti-bloco 10 (variantes BP29 e BP01). Estes dados evidenciam um padrão de reconhecimento de IgG distinto para diferentes regiões da molécula com uma forte dicotomia entre as regiões N- e C-terminais da proteína (**TABELA 5**).

TABELA 5: Variáveis incluídas na ACP e sua contribuição para os três eixos derivados.

Resposta de IgG contra PvMSP-1		Correlação das variáveis com os componentes (<i>Factor loadings</i>) ¹		
Domínio	Antígeno	CP1	CP2	CP3
Bloco 2	BR07	0.794	0.145	0.044
	BP29	0.769	0.040	-0.135
	BP39	0.706	0.295	0.136
	BP30	0.527	-0.261	-0.097
	BEL	0.726	0.067	-0.320
Bloco 10	BR07	0.086	0.761	-0.350
	BP29	0.139	0.241	-0.776
	BP39	-0.020	0.530	-0.038
	BP01	0.049	0.055	-0.767
	BP13	0.016	0.812	-0.334
Bloco 13	MSP1 ₁₉	0.145	0.562	0.077

¹ Os maiores *loadings* (>0,6) estão indicados em negrito.

Os padrões de respostas de IgG extraídos da ACP foram então relacionados com os parâmetros indicativos de morbidade, em uma tentativa de se determinar o perfil da resposta humoral anti-PvMSP-1 que poderia ser associado a anemia e a trombocitopenia na malária por *P. vivax*.

Os três principais componentes foram então usados para determinar os efeitos da resposta de anticorpos no estado de anemia. Análises de correlações de Spearman mostraram que os níveis de hemoglobina foram negativamente correlacionados com os escores do segundo componente principal ($r = -0,03885$; $P < 0,0001$), indicando que a uma redução nos níveis de hemoglobina

está associada ao aumento nos níveis de IgG contra as variantes antigênicas BR07 e BP13, do bloco 10 da PvMSP-1 (**FIGURA 16A**).

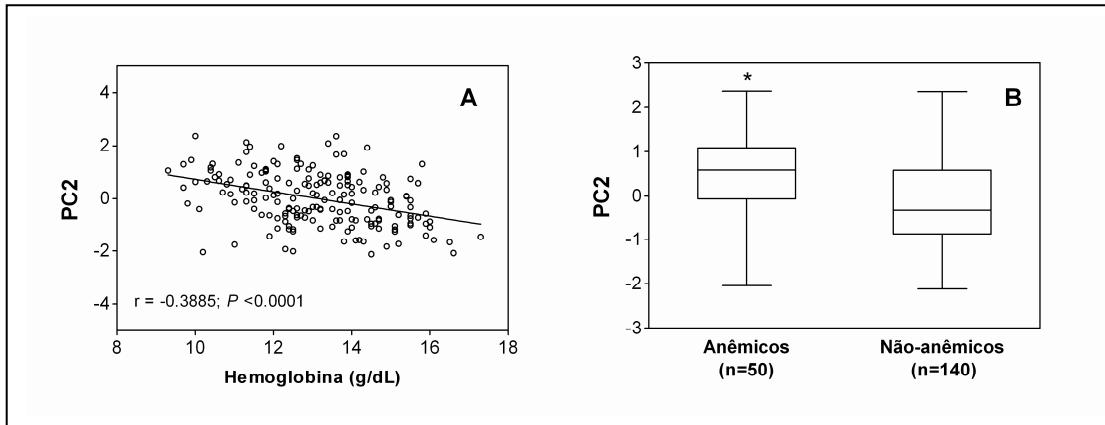


FIGURA 16: Associações entre as respostas de IgG variante-específica para PvMSP-1 e anemia. **(A)** Correlação entre os escores do segundo componente principal e os níveis de hemoglobina de 190 pacientes com infecção patente por *P. vivax*. **(B)** Médias dos escores referentes ao segundo componente principal de indivíduos anêmicos e não anêmicos. Os boxes indicam as médias e o intervalo interquartil. As barras indicam o mínimo e o máximo. * $P < 0,0001$.

Além disso, os escores do segundo componente foram maiores em pacientes anêmicos do que em não-anêmicos (**FIGURA 16B**). Interessantemente, entre os antígenos do bloco 10, BR07 e BP13 são as variantes que compartilham maior proporção de identidade de aminoácidos (93,4%).

Escore do primeiro (representado pelas respostas de IgG anti-bloco 2) e do terceiro (IgG anti- BP29 e anti-BP01 do bloco de 10) componentes não apresentaram correlações com os níveis de hemoglobina ($r = -0,078$, $P = 0,286$ e $r = 0,107$, $P = 0,146$, para CP1 e CP2, respectivamente).

Quanto à contagem de plaquetas, não foram verificadas correlações significativas entre os níveis de plaquetas e os escores de nenhum dos três primeiros componentes principais ($P > 0,05$) (dados não mostrados).

5.4. Relação entre anemia e variante antigênica da PvMSP-1 determinada nos parasitos infectantes

A análise de APC mostrou que o *status* clínico de anemia foi significativamente afetado pelo segundo componente, o qual foi representado principalmente pelas respostas de IgG anti-BR07 e anti-BP13; dois antígenos derivados do bloco 10 da PvMSP-1. Com o objetivo de avaliar o possível envolvimento das sequências dos parasitos infectantes na determinação das respostas de anticorpos variante-específicos associados à anemia na malária por *P. vivax*; foi realizado o sequenciamento da região do gene *pvmSP1* correspondente ao bloco 10, utilizando amostras de DNA dos parasitos infectantes de indivíduos anêmicos (n=17) e não-anêmicos (n=24).

A **TABELA 6** apresenta a correspondência entre os haplótipos detectados e os antígenos recombinantes, bem como a frequência de cada haplótipo na amostra estudada.

TABELA 6: Frequência dos haplótipos obtidos para os isolados de *P. vivax* de 41 pacientes com malária e associação entre estes haplótipos e os antígenos recombinantes do bloco polimórfico 10 da PvMSP-1.

HAPLÓTIPO	ANTÍGENO CORRESPONDENTE (% DE SIMILARIDADE)	FREQUÊNCIA
I	10-BR07 (100%)	13 (32%)
II	10-BP13 (100%)	3 (7%)
III	10-BP29 (100%)	6 (15%)
IV	10-BP29 (74,0%)	3 (7%)
V	10-BP29 (67,1%)	6 (15%)
VI	10-BP01 (100%)	4 (10%)
VII	10-BP01 (63,7%)	2 (5%)
VIII	10-BP39 (100%)	4 (10%)

O resultado do sequenciamento revelou que sequências idênticas às sequências dos antígenos recombinantes foram encontradas em parasitos infectantes, sendo a sequência idêntica ao antígeno BR07 a mais frequente na amostra avaliada (31,7%). Quatro sequências identificadas como tipo II, III, VI e VIII apresentaram 100% de similaridade com sequências dos antígenos recombinantes BP13, BP29, BP01 e BP39, e foram detectadas, respectivamente, em 7,3%, 14,6%, 9,8% e 9,8% das amostras sequenciadas. Entretanto, isolados de *P. vivax* de 11 amostras (28,6%) apresentaram homologia com sequências diferentes das descritas nos antígenos utilizados neste estudo. Dois haplótipos, V e VII apresentaram homologia de 99% e 91%, respectivamente, com isolados asiáticos, enquanto para o haplótipo IV foi observado similaridade de 100% com o isolado brasileiro BP30. Comparando as sequências de aminoácidos destes haplótipos com as sequências dos antígenos recombinantes do bloco 10, verificou-se que o haplótipo VI possui 74% de similaridade com a sequência do antígeno BP29, enquanto os haplótipos V e VII compartilham 67% e 64% de identidade de aminoácidos com a sequência do antígeno BP29. A **FIGURA 17** apresenta as sequências de aminoácidos dos oito haplótipos do bloco polimórfico 10 da PvMSP-1 identificados nas 41 amostras sequenciadas.

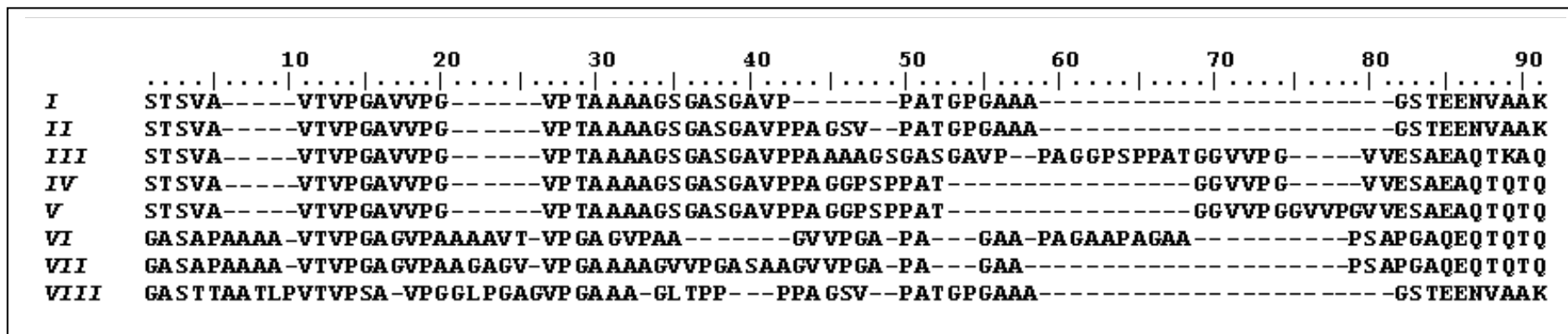


FIGURA 17: Alinhamento das oito seqüências do bloco 10 da PvMSP-1 encontradas em parasitos isolados de 41 pacientes com infecções patentes por *P. vivax*. Cinco seqüências (I, II, III, VI e VIII que correspondem a 73% de todas as seqüências do bloco 10) são idênticas às seqüências dos antígenos recombinantes utilizados na sorologia (BR07, BP13, BP29, BP01, BP39, respectivamente). As seqüências IV e V são similares às seqüências do antígeno BP29 (74,0% e 67,1% de similaridade de aminoácidos, respectivamente), enquanto a seqüência VII possui 63,7% de identidade com a seqüência do antígeno BP01.

Considerando que entre as variantes antigênicas do bloco 10, os antígenos BR07 e BP13 foram imunodominantes (maiores proporções e níveis de IgG), observou-se uma correspondência entre a maior prevalência de parasitos infectantes com sequências homólogas a do antígeno BR07 e magnitude da resposta de IgG detectada para este antígeno. Esta correspondência não foi de 100%, pois dos 13 indivíduos expostos a sequência tipo I, 10 reconheceram o antígeno homólogo BR07 (77%). De modo geral, os indivíduos expostos às demais sequências homólogas aos antígenos recombinantes utilizados na sorologia (II, III, VI, VIII), apresentam anticorpos IgG contra o antígeno homólogo, mas também reconhecem outra variante não relacionada (**FIGURA 18**).

Nas análises comparativas das sequências obtidas de parasitos isolados de pacientes anêmicos e não anêmicos, verificou-se que parasitos com sequências homólogas a variante antigênica BR07 foram predominantes em indivíduos anêmicos (9/17, 53%) quando comparados aos não anêmicos (4/24, 17%) (**FIGURA 18**). Embora, o pequeno número de amostras sequenciadas não permita inferências estatísticas, estes dados apontam para um possível envolvimento da resposta de anticorpos variante-específicos contra o domínio polimórfico C-terminal da PvMSP-1 e uma determinada variante antigênica da PvMSP-1 na determinação do estado de anemia observada durante a infecção aguda por *P. vivax*.

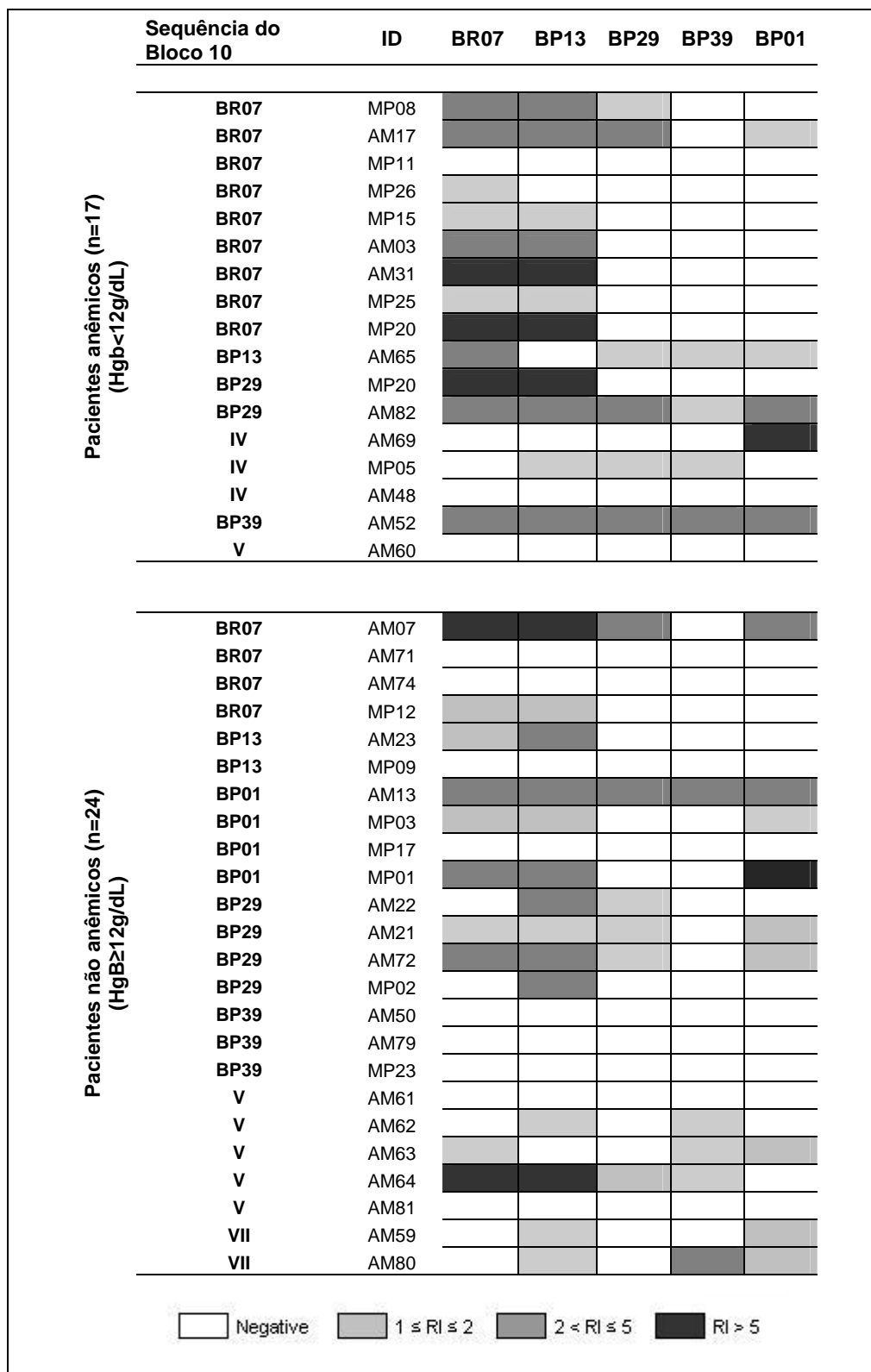


FIGURA 18: Reconhecimento de anticorpos IgG contra antígenos do bloco de pacientes anêmicos (n=17) e não anêmicos (n=24) infectados com *P. vivax*. Diferentes níveis de anticorpos (IR) são representados com diferentes padrões de sombreamento. Sequências homologas às sequências dos antígenos recombinantes foram identificadas com o nome do respectivo antígeno com o qual ela compartilha 100% de identidade de aminoácidos. ID: identificação do paciente.

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos um padrão incomum de complicações clínicas em casos fatais associados à infecção por *P. vivax* tem sido relatado no Brasil e no mundo, além de casos de cepas resistentes à cloroquina (ARÉVALO-HERRERA et al., 2010). Tais fatos fizeram com que a comunidade científica voltasse a atenção para esta espécie que até então era considerada benigna. Diante deste novo contexto da malária vivax no Brasil e no mundo, estudos soropidemiológicos investigando o tipo e a magnitude da resposta imune de populações naturalmente expostas têm provido informações importantes a respeito do potencial imunogênico de antígenos de *P. vivax*, candidatos a compor uma vacina anti-malárica.

Dentre as proteínas de estágios sanguíneos, a MSP-1 destaca-se como uma das moléculas mais promissoras para compor uma vacina de subunidades. Entretanto, a alta diversidade alélica da MSP-1 presente nos isolados de *Plasmodium* é apontada como uma das principais causas para explicar os resultados insatisfatórios até então obtidos com vacinas baseadas nesta proteína. Neste sentido, as regiões polimórficas da proteína ganham destaque como possíveis alvos dos anticorpos envolvidos na proteção contra malária. De fato, estudos com *P. chabaudi* sugerem que a MSP-1 é a principal proteína do parasito alvo da imunidade protetora cepa-específica na malária murina (CHEESMAN et al., 2010). Em *P. falciparum*, estudos soropidemiológicos têm evidenciado que anticorpos protetores anti-MSP-1 são capazes de discriminar entre variantes antigênicas que integram famílias alélicas distintas do bloco 2 polimórfico (CONWAY et al., 2000; CAVANAGH et al., 2004).

Reconhecendo a importância do polimorfismo antigênico na determinação da resposta imune protetora, somado ao conhecimento limitado a respeito da resposta de anticorpos dirigidos a epitopos polimórficos da MSP-1 de *P. vivax*, no presente estudo avaliou-se a resposta de anticorpos IgG contra epitopos polimórficos (blocos 2 e 10) e conservados (MSP1₁₉) da proteína

PvMSP-1. A resposta de anticorpos foi analisada em associação a dois importantes parâmetros clínicos relacionados à morbidade na malária por *P. vivax*, anemia e plaquetopenia; além da associação da resposta humoral com exposição ao parasito e níveis de parasitos sanguíneos.

Nossos resultados mostram que dentre as 10 recombinantes representando variantes antigênicas dos blocos 2 e 10 da PvMSP-1, duas variantes, BR07 (blocos 2 e 10) e BP13 (bloco 10), apresentaram um reconhecimento distinto em relação às demais variantes do mesmo bloco (43% e 54%, para BR07 dos blocos 2 e 10, respectivamente e 49% para a variante BP13, bloco10). Estes dados diferem dos resultados obtidos por BASTOS et al., 2007, onde os autores observam um padrão similar de reconhecimento das proteínas recombinantes do bloco 10, com alta prevalência de anticorpos IgG, detectada para todas as versões antigênicas testadas (75-100%) no soro de 27 indivíduos com infecção aguda por *P. vivax* residentes no Acre. Os autores atribuem o padrão de reconhecimento observado para os antígenos do bloco 10 ao fato dos antígenos deste bloco incluírem em suas sequências a metade 3' da sequência do bloco 9 conservado, a qual pode conter epitopos de células B comuns, podendo justificar a alta e similar prevalência de anticorpos observada para os antígenos derivados do bloco 10 da PvMSP-1 (BASTOS et al., 2007).

Considerando este aspecto podemos sugerir que as respostas observadas em nosso trabalho para as variantes antigênicas BR07 e BP13 do bloco 10 estão relacionadas às características inerentes de seus epitopos, mesmo porque dentre as cinco versões antigênicas do bloco 10 produzidas neste trabalho, estas duas variantes são as mais similares, compartilhando alta proporção de identidade de aminoácidos (93,4%). Diferente dos resultados observados no estudo realizado no Acre, podemos sugerir que neste estudo os anticorpos detectados contra os antígenos do bloco 10 da PvMSP-1 foram variante-específicos. De fato, este resultado pode ainda ser apoiado pelas correlações obtidas entre as respostas de IgG detectadas para antígenos do mesmo bloco polimórfico, onde observamos correlações significativas entre pares de antígenos que compartilham maior similaridade de sequências de

aminoácidos. Este dado sugere que uma proporção substancial dos anticorpos naturalmente adquiridos reconhecem sequências dos epitopos polimórficos presentes nos domínios 2 e 10 da PvMSP-1, ao invés das sequências flanqueadoras conservadas compartilhadas por todos os antígenos recombinantes do mesmo bloco.

O fato da variante BR07 também ter sido a mais reconhecida dentre as proteínas do bloco 2, abriu perspectivas para investigar se os parasitos circulantes locais apresentavam sequências similares ou até mesmo idênticas às sequências dos antígenos BR07 e BP13 utilizados nos ensaios imunoenzimáticos. Os dados de sequências referentes à região do bloco 10 da PvMSP-1 de isolados de *P. vivax* de 41 pacientes, mostraram que 31,7% das sequências identificadas correspondem (100% de identidade), às sequências da variante BR07. A maior frequência de parasitos circulantes identificados com sequências homólogas a do antígeno BR07 do bloco 10, pode justificar o maior reconhecimento deste antígeno por anticorpos IgG no soro da população avaliada. Neste sentido, nossos dados sugerem uma correspondência entre a maior prevalência da variante antigênica a qual os indivíduos estão expostos e a resposta de anticorpos variante-específicos.

Esta associação observada para o antígeno BR07 não pode ser extrapolada para explicar a alta proporção de respondedores positivos e níveis de IgG também observados para a variante antigênica BP13, pois sequência homóloga à sequência deste antígeno não foi uma das mais frequentes entre os parasitos infectantes (7,3%). No entanto, como estas duas variantes antigênicas compartilham alto grau de similaridade de sequências de aminoácidos, especulamos que a alta frequência de respostas e níveis de IgG anti-BP13 possa ser atribuída à reatividade cruzada dos anticorpos IgG que reconhecem as sequências polimórficas comuns a estes dois antígenos que não constam nas sequências das demais recombinantes do bloco 10 (BP29, BP39 e BP01).

A associação entre a especificidade dos anticorpos circulantes e as variantes detectadas em isolados de parasitos é bastante investigada em *P.*

falciparum. Estudos realizados na área endêmica brasileira não demonstraram associação entre a resposta de anticorpos alelo-específica e as variantes da proteína MSP-1 e MSP-2 de *P. falciparum* circulantes (da SILVEIRA et al., 1999; SCOPEL et al., 2007). Estudo recente realizado no Irã avaliando a resposta de IgG contra a proteína PfMSP1₁₉ mostrou que o polimorfismo nesta proteína não era importante para determinar a resposta de anticorpos variante-específicos (ZAKERI et al., 2010). Similar ao que foi observado em nosso estudo, em um trabalho conduzido na África foi verificado que a maior prevalência na resposta de anticorpos contra a variante alélica 3D7 da proteína MSP-3 parece refletir a maior prevalência desta forma alélica detectada em isolados de *P. falciparum* locais (OSIER et al., 2007).

Para *P. vivax*, no estudo de BASTOS e colaboradores (2007) não foi demonstrado associação entre resposta de anticorpos contra a PvMSP-1 e a sequência dos parasitos infectantes. Diferenças nos padrões de transmissão das áreas endêmicas estudadas podem contribuir para estas diferenças observadas entre dois estudos. Indivíduos avaliados neste estudo são pouco expostos, a julgar pela média do número de episódios prévios de malária que foi relatado pela população avaliada em nosso trabalho (5,4 malárias), enquanto os indivíduos avaliados no estudo anterior são mais expostos. Esta diferença no padrão de resposta para proteínas homólogas demonstra a importância de realizar estudos em diferentes realidades epidemiológicas, evidenciando a necessidade de ampliar os estudos com a MSP-1 de *P. vivax*.

Embora a maioria das proteínas recombinantes que correspondem às variantes antigênicas dos blocos 2 e 10 da PvMSP-1 comumente encontradas em parasitos circulantes na região endêmica brasileira foram pouco reconhecidas por indivíduos infectados com *P. vivax*, 89% dos pacientes apresentaram IgG contra o domínio conservado C-terminal da PvMSP-1 (MSP1₁₉). Este dado corrobora a alta imunogenicidade desta porção em relação a N-terminal (SOARES et al., 1997; BASTOS et al., 2007). A análise da imunogenicidade dos blocos polimórficos 2 e 10, localizados, respectivamente, nas porções N- e C-terminal da PvMSP-1, demonstrou que além da baixa frequência de respostas positivas, os níveis de IgG detectados foram de baixa

magnitude. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por BASTOS e colaboradores (2007), onde os autores demonstraram a baixa imunogenicidade dos domínios polimórficos da PvMSP-1 em indivíduos não infectados expostos ao parasito na área endêmica brasileira.

A baixa imunogenicidade observada para as demais variantes antigênicas da PvMSP-1 (BP29, BP39, BP30, BEL, BP01) produzidas neste trabalho não pode ser explicada pelo fato dos indivíduos não estarem sendo expostos a estas formas alélicas, haja visto o resultado do sequenciamento. Além disso, para estas proteínas, diferente do que já foi discutido para as variantes antigênicas BR07 e BP13 do bloco 10, não observamos correspondência entre a resposta de anticorpos e a variante antigênica dos parasitos infectantes. De modo geral, apesar do pequeno número de amostras sequenciadas, observamos que os pacientes expostos às variantes de sequências diferentes dos antígenos BR07 e BP13 tendem, ainda sim, a apresentarem respostas de IgG de maior magnitude contra estes dois antígenos. Neste sentido, podemos especular duas hipóteses que são propostas em estudos com *P. falciparum* para tentar explicar observações referentes à falta de associação entre família alélica e respostas de anticorpos. A primeira baseia-se na presença de anticorpos com diferentes especificidades induzidos por infecções prévias. Pode ser que os indivíduos que apresentam altas respostas para os antígenos BP13 e BR07 tenham sofrido um episódio prévio e recente por *P. vivax* que expressavam sequências homólogas ou muito similares às sequências destes dois antígenos.

A segunda hipótese refere-se à ocorrência do mecanismo de impressão clonal (*clonal imprinting*) ou *original antigenic sin* (TAYLOR et al., 1996). A ocorrência deste fenômeno foi proposta para explicar a falta de reconhecimento de variantes da proteína MSP-2 de *P. falciparum* em diferentes estudos conduzidos em populações africanas (TAYLOR et al., 1996; FRANKS et al., 2003, SCOPEL et al., 2005). De acordo com esta hipótese, espera-se que frequentes reinfecções com populações de parasitos geneticamente distintas induzam um *booster* no perfil de anticorpos pré-existentes, mas não a produção de anticorpos com novas especificidades. Mais detalhadamente, durante uma

primeira infecção, ocorreriam expansão e maturação de células T e B que se tornariam células de memória, expressando receptores de superfície para antígenos e moléculas co-estimulatórias. As interações entre células B e T permitiriam a produção de anticorpos com especificidades definidas. Em uma resposta secundária a outras variantes antigênicas, ocorreria a competição de células B de memória (apresentando alta densidade de receptores antigênicos de superfície) e células B não primadas. Neste caso, as células B de memória apresentariam os antígenos diretamente para células T de memória, originando uma resposta de anticorpos dirigida contra epitópos relativos à primeira infecção (RILEY, 1996). Como em nosso trabalho não avaliamos amostras sequenciais dos pacientes não é possível saber se este fenômeno está ocorrendo para *P. vivax* na população avaliada. No entanto, no trabalho de BASTOS e colaboradores (2007), os autores não evidenciaram a presença de anticorpos com especificidade fixa a alguma variante da PvMSP-1 que tenha sido detectada em amostras seqüenciais de soro.

Anticorpos induzidos durante infecções naturais por *Plasmodium* são associados ao tempo de exposição em áreas endêmicas, um fenômeno que tem sido frequentemente relatado para vários antígenos do parasito, refletindo provavelmente exposição ao parasito em associação à maturação do sistema imune (SOE et al., 2001; DODOO et al., 2008). Nesta direção, observou-se que a proporção de respostas positivas para IgG que reconhecem uma variante antigênica do bloco 10 e a proteína conservada MSP1₁₉ aumentaram de acordo com o aumento do número de episódios prévios de malária. Embora os dados verificados para as demais variantes antigênicas do bloco 10 não apresentaram diferenças estatísticas, observamos uma tendência para o aumento de anticorpos dirigidos contra a região C-terminal em associação com o número de exposições prévias. Esta tendência não foi observada para as proteínas recombinantes da região N-terminal da PvMSP-1 (bloco 2).

Nossos dados contrastam com os resultados de um estudo conduzido em Rondônia, onde foi observada associação entre resposta de anticorpos contra a proteína ICB2-5 (que inclui os blocos 1 a 5 da região N-terminal da PvMSP-1) e exposição à malária, enquanto a resposta contra proteína MSP1₁₉

não foi associada (NOGUEIRA et al., 2006). Além dos fatores relacionados às diferenças nas endemicidades destas duas áreas de estudo, bem como da população avaliada, uma possível explicação para estas diferenças entre os dois estudos pode se basear na sequência da proteína recombinante utilizada nos ensaios sorológicos. Como a proteína ICB2-5 compreende os blocos conservados 1, 3 e 5 pode ser que esta associação com exposição deva-se aos anticorpos dirigidos contra os epitopos de células B conservados presentes nestes blocos. Estes dados podem ser importantes para o desenvolvimento de uma vacina contra malária, já que se espera que a exposição natural ao parasito re-estimele a resposta imune produzida pela imunização mantendo a proteção a longo prazo.

Certamente, uma importante contribuição de nosso trabalho foi a possibilidade de análise da associação de parâmetros clínicos associados à morbidade, como a anemia e plaquetopenia e resposta de anticorpos naturalmente adquirida contra PvMSP-1, um importante candidato a compor uma vacina antimalária.

Alterações hematológicas são algumas das complicações mais comuns na malária que desempenham um importante papel na patologia da doença. Essas mudanças envolvem os principais tipos celulares, como hemácias, leucócitos e plaquetas. A anemia constitui uma complicação comum, especialmente em crianças e mulheres grávidas em áreas de alta transmissão (MENENDEZ et al., 2000), apontada como uma das principais causas de morbidade e mortalidade associadas à malária (CHANG et al., 2004). Sabe-se que esta alteração hematológica é resultado de uma combinação de mecanismos hemolíticos que incluem a retirada acelerada dos eritrócitos parasitados e não parasitados, somados a uma eritropoiese suprimida e ineficaz. Além disso, durante as infecções por *Plasmodium*, níveis elevados anormais do fator de necrose tumoral (TNF) são associados à supressão da medula óssea, bem como ao desequilíbrio em marcadores de superfície de eritrócitos tais como o receptor CR1 (revisto por MAINA et al., 2010). Apesar destes fatos, a patogênese da anemia ainda não é completamente conhecida.

Estudos de modelagem matemática com dados hematológicos de pacientes infectados com *P. falciparum* sugerem que para cada eritrócito infectado até doze eritrócitos não infectados são removidos da circulação (EVANS et al., 2006; JAKEMAN et al., 1999), sugerindo que a destruição dos eritrócitos não infectados possa ser a principal causa para explicar a perda de hemoglobina observada na malária (EKVALL, 2003). Uma possível razão para esta remoção prematura das hemácias não infectadas está relacionada ao reconhecimento, por anticorpos, de antígenos do parasito presentes na superfície das hemácias, ou ainda, à deposição de imunocomplexos na superfície destas células, estimulando a fagocitose (LAYEZ et al., 2005; AWAH et al., 2009; 2011).

As evidências do envolvimento de anticorpos específicos contra antígenos de merozoítos de *P. falciparum* na destruição dos eritrócitos não infectados nos motivou a investigar a associação da resposta humoral variante-específica contra a PvMSP-1 e parâmetros clínicos de anemia e plaquetopenia, até então nunca investigados na malária por *P. vivax*.

Em um primeiro momento, durante as análises univariadas, chamamos a atenção para as correlações negativas observadas entre os níveis séricos de hemoglobina dos pacientes avaliados e os níveis de IgG detectados contra as proteínas recombinantes correspondentes à região C-terminal da PvMSP-1 (bloco 10 e MSP1₁₉). Além das correlações negativas, verificamos que as frequências e os níveis de IgG dirigidos contra a região C-terminal da PvMSP-1 foram significativamente maiores em pacientes anêmicos quando comparados aos não anêmicos. Diante destes resultados intrigantes e considerando que os fatores como exposição, idade e carga parasitária podem influenciar na determinação da anemia; em uma segunda análise, comparamos os grupos de indivíduos anêmicos e não anêmicos quanto à idade, número de episódios prévios de malária e carga parasitária, buscando alguma característica que pudesse estar associada e ajudasse a explicar as diferenças observadas no padrão de reconhecimento humoral dos antígenos da PvMSP-1. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos.

Com o intuito de avaliar se estas observações não foram ao acaso, partimos para uma segunda análise estatística, mas agora utilizando uma abordagem multivariada, a fim de avaliar se em um sistema múltiplo estas associações entre anemia e resposta de anticorpos contra PvMSP-1 se mantinham. Além disso, como a resposta imune não age isoladamente, o emprego de uma técnica estatística multivariada, tornava a nossa análise biologicamente mais significativa, pois esta análise não ignora a influência das interações nem o efeito combinado dos anticorpos num sistema.

Os dados da análise fatorial de componentes principais geraram três padrões de resposta: IgG anti-região N-terminal da PvMSP-1 versus IgG anti-BR07 e anti-BP13 (bloco 10) versus IgG anti-BP29 e anti-BP01 (bloco 10).

Nas análises subseqüentes, observamos que somente as respostas de IgG dirigidas contra o bloco 10 da PvMSP-1, especificamente contra as variantes antigênicas BR07 e BP13 mantiveram associação com anemia. A magnitude da resposta (proporções e níveis de IgG) contra estas duas variantes antigênicas do bloco 10 está, de alguma maneira, associada com a anemia observada nos pacientes avaliados.

Considerando que os dados de sequenciamento do bloco 10 evidenciaram uma maior prevalência de parasitos com sequências homólogas ao antígeno BR07 em indivíduos anêmicos, este fato poderia justificar os maiores níveis e proporções de IgG anti-BR07 nestes indivíduos, uma vez que observamos uma correspondência considerável entre as respostas de IgG anti-BR07 e a variante homóloga presente nos parasitos infectantes. Estes dados poderiam ser extrapolados para o antígeno BP13, pois ele apresenta alta identidade de sequência com a variante BR07 (93,4%). Apesar do número de amostras sequenciadas ser muito pequeno para análises estatísticas significativas, os resultados apontam para o possível envolvimento da especificidade de anticorpos e uma variante particular da PvMSP-1 no estado de anemia observada durante a infecção aguda por *P. vivax*.

A associação entre anticorpos anti-bloco 10 da PvMSP-1 específicos para as variantes BR07 e BP13 e anemia pode ser atribuída a epitopos

imunodominantes que modulam as respostas de células B, induzindo a produção de anticorpos ligados à morbidade. Estes anticorpos podem estar envolvidos em algum possível mecanismo imune que participe do processo de destruição de eritrócitos não infectados na malária pelo *P. vivax*, provavelmente via participação de anticorpos por opsonização ou ativação do sistema do complemento.

O papel dos complexos antígeno-anticorpo na sensibilização de eritrócitos não infectados e sua remoção por células do sistema reticuloendotelial, foi estudado pela primeira vez, em crianças do Gâmbia (FACER et al., 1980). Estudos recentes com *Plasmodium falciparum* demonstraram que as proteínas associadas às roptrias são capazes de se aderir à superfície de eritrócitos não infectados induzindo a sua destruição (AWAH et al., 2010; 2011).

Neste sentido buscamos investigar as sequências dos antígenos do bloco 10 a fim de verificar se a associação das variantes antigênicas BR07 e BP13 com anemia poderia ser atribuída às diferenças em relação ao número de epitopos de células B presentes nas sequências ou mesmo às diferenças na entropia destes epitopos. Utilizando o programa BepiPred para predição de epitopos lineares de células B (LARSEN et al., 2006) observamos que os escores dos epitopos preditos para as sequências primárias de todos os antígenos do bloco 10 eram similares, evidenciando uma considerável imunogenicidade para estas regiões da PvMSP-1. É importante ressaltar que este programa não faz predição de epitopos conformacionais; assim, se este tipo de epitopo para células B estiver envolvido nas diferenças destas regiões em relação ao reconhecimento por anticorpos, esta análise não nos possibilitou descobrir.

Analisando os dados do trabalho desenvolvido por RODRÍGUEZ e colaboradores (2002) sobre o mapeamento das regiões da PvMSP-1 (cepa Belém) possivelmente envolvidas na interação do parasito com a membrana dos reticulócitos/eritrócitos durante o processo de invasão, observamos que a região da PvMSP-1 que apresenta maior ligação a eritrócitos maduros

corresponde a uma sequência de aminoácidos que inclui uma região presente nos antígenos do bloco 10. Especificamente esta sequência de 20 aminoácidos faz parte da região conservada do bloco 9 que flanqueia as sequências dos antígenos recombinantes do bloco 10 (RODRIGUEZ et al., 2002). Os autores observaram uma forte interação entre esta região da proteína PvMSP-1, nomeada como peptídeo 1724 (¹¹²⁰YKARAKYYIGEPFPLKTLSE¹¹³⁹), e receptores presentes na membrana dos eritrócitos maduros.

Diante deste fato, podemos especular que durante o processo de invasão dos eritrócitos, o processamento proteolítico sofrido pela PvMSP-1 libera na circulação fragmentos polipeptídicos, entre eles o fragmento de 38kDa que inclui os blocos 8, 9 e 10. Na circulação, estes fragmentos podem se aderir à superfície de eritrócitos infectados e não infectados e serem reconhecidos por imunoglobulinas específicas, estimulando a fagocitose ou a lise mediada pela ativação do complemento. Neste sentido especulamos que a associação com anemia observada somente para as variantes BR07 e BP13 e não com as outras variantes que também incluem a sequência do bloco 9 em sua composição, possa estar relacionada a maior prevalência da variante BR07 nos parasitos circulantes locais e à alta similaridade de sequência entre BR07 e BP13. Estes dados abrem perspectivas para futuras investigações a respeito do possível envolvimento de anticorpos contra outras regiões da PvMSP-1 na anemia observada durante a malária por *P. vivax*.

Uma outra questão observada em nosso estudo que merece discussão, é o padrão de reconhecimento distinto observado entre as regiões N- e C-terminais da PvMSP-1. A presença de anemia não foi associada às respostas de anticorpos contra as proteínas que representam o bloco 2 N-terminal da PvMSP-1, até mesmo para a variante antigênica BR07 que foi reconhecida com níveis e proporções similares à proteína correspondente no bloco 10. Estudos prévios sobre a resposta de anticorpos naturalmente adquiridos contra a PvMSP-1 mostraram que uma grande proporção de indivíduos expostos ao *P. vivax* contem anticorpos IgG contra diferentes regiões da molécula (SOARES et al., 1997; SOARES et al., 1999b; MORAIS et al., 2005). Diferenças no reconhecimento das regiões N- e C- terminais da proteína em relação à

idade já foram observadas para as respostas de subclasses de IgG de indivíduos expostos ao *P. vivax* no Brasil e em Papua Nova Guiné (FERNANDEZ-BECERRA et al., 2010).

Diferenças entre estas duas regiões também já foram verificadas em um estudo prévio sobre associação com proteção clínica (NOGUEIRA et al., 2006). Neste trabalho, os autores demonstraram que anticorpos predominantemente da classe IgG3 direcionados para a extremidade N-terminal da PvMSP-1 estavam associados ao reduzido risco de adquirir malária e/ou proteção clínica, enquanto anticorpos contra a região conservada C-terminal não apresentaram esta associação. Tendo em vista estes resultados previamente publicados em associação aos dados agora apresentados, pode-se sugerir um possível envolvimento da porção N-terminal da PvMSP-1 na indução de uma resposta humoral protetora. Portanto, torna-se fundamental, em futuros estudos, a caracterização comparativa da resposta de subclasses dirigidas aos antígenos das porções N- e C- terminais de PvMSP-1 para confirmação do papel de anticorpos citofílicos e não-citofílicos na imunidade ou morbidade na malária.

No Brasil, com exceção de nossos estudos, a influência de determinada variante alélica na definição do caráter clínico da infecção malárica, bem como sobre a intensidade dos sintomas referentes à doença, não têm sido investigada. Além disso, também não há especulações sobre o papel de anticorpos alelo-específicos na modulação da expressão clínica da infecção. Em *P. falciparum*, vários estudos evidenciam a importância do polimorfismo antigênico na determinação da resposta imune protetora. É sugerido que o polimorfismo presente em antígenos alvo da imunidade protetora aumente a habilidade do parasito de evadir da resposta imune do hospedeiro e como resultado, selecione parasitos resistentes à vacina utilizada. Este fenômeno já foi observado em um estudo de fase II b realizado na Papua Nova Guiné, onde a vacinação de crianças com o antígeno MSP-2 de *P. falciparum*, forma alélica 3D7, favoreceu a infecção por parasitos, expressando a família alélica FC27 (GENTON et al., 2002). Uma observação recente proveniente de um ensaio clínico de fase 2 envolvendo uma vacina baseada na proteína AMA-1 de *P. falciparum* (AMA-1-C1/Alhydrogel) mostrou um forte efeito desta vacina na

incidência de anemia nas crianças vacinadas (ELLIS et al., 2011). Considerando o possível envolvimento dos anticorpos anti-proteínas do parasito na lise de eritrócitos, podemos questionar se a vacina poderia estar selecionando cepas de parasitos mais imunogênicas. De fato, estes dados nos chamam a atenção para a necessidade de mais estudos sobre a etiologia da anemia na malária, o que pode ser fundamental para a escolha de vacinas baseadas em antígenos de estágios sanguíneos do *Plasmodium*.

Apesar de nenhuma associação com a resposta de anticorpos ter sido verificada para plaquetopenia, já foi sugerido que as complicações decorrentes da redução de plaquetas estão relacionadas a mecanismos imunes, nos quais a ligação de IgG a plaquetas recobertas por proteínas do parasito estimularia a fagocitose por macrófagos ou monócitos (KELTON et al., 1983; LACERDA, 2007). O polimorfismo presente em genes que codificam proteínas imunogênicas presentes nas formas sanguíneas do parasito também já foi sugerido como um fator importante associado à plaquetopenia na malária por *P. vivax* (GRYNBERG et al., 2007).

Sabendo-se que a PvMSP-1 constitui uma das mais promissoras candidatas a compor uma vacina contra estágios sanguíneos de *P. vivax*, a potencial importância da imunidade variante-específica contra esta proteína deve ser considerada em adição à imunidade dirigida a epitopos conservados da molécula. Apesar da caracterização da resposta imune de anticorpos contra variantes dos blocos polimórficos 2 e 10 já ter sido descrita em indivíduos expostos ao plasmódio no Estado do Acre (BASTOS et al., 2007), nossos dados contribuem para ampliar o conhecimento a respeito da resposta de anticorpos variante-específicos contra PvMSP-1 em indivíduos expostos à condições epidemiológicas distintas das quais os indivíduos envolvidos no estudo anterior estavam expostos; um aspecto essencial na busca de vacinas. É importante salientar que esta é a primeira vez em que associações entre parâmetros clínicos relacionados à morbidade na malária, como anemia e plaquetopenia e resposta imune humoral variante-específica dirigida contra variantes dos domínios polimórficos 2 e 10 da PvMSP-1 foi investigada.

Assim, acredita-se que o trabalho possa contribuir para o entendimento da dinâmica da resposta imune humoral variante-específica em populações expostas ao *P. vivax* no Brasil, uma abordagem relativamente pouco explorada nas infecções por esta espécie de plasmódio, mas com sérias implicações para escolha de antígenos candidatos a compor uma vacina efetiva.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Nossos estudos nos permitem concluir que:

- A região conservada C-terminal da PvMSP-1 (PvMSP-1₁₉) é imunodominante em relação às regiões polimórficas correspondentes aos blocos 2 e 10 da PvMSP-1.
- A exposição esteve associada à resposta de anticorpos IgG contra o epitopo conservado C-terminal da PvMSP-1, não interferindo na resposta de anticorpos contra as variantes desta molécula.
- Nossos dados sugerem uma associação entre a especificidade dos anticorpos circulantes e a maior prevalência da variante BR07 detectada em isolados de parasitos circulantes na região de estudo.
- A resposta de anticorpos variante-específicos dirigida contra a região C-terminal da PvMSP-1 foi associada à anemia presente em pacientes infectados com *P. vivax* e residentes em regiões hipoendêmicas no Brasil.
- Anticorpos variante-específicos contra a PvMSP-1 são importantes na imunidade naturalmente adquirida contra malária, o que pode ter implicações para o desenvolvimento de vacinas baseadas na PvMSP-1.
- Alótipos GM de imunoglobulinas contribuem para a resposta de anticorpos naturalmente adquirida contra antígenos de *P. vivax*, em indivíduos expostos a diferentes níveis de transmissão de malária no Brasil, gerando implicações para a eficácia de vacinas baseadas nas proteínas de estágios sanguíneos do parasito, PvMSP-1₁₉ e PvAMA-1.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI H, WILLIAMS LJ. Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews Computational Statistics*, v.2, p.433-459, 2010.
- ALECRIM MG (2000) Estudo clínico da resistência e polimorfismo parasitário na malária pelo *Plasmodium vivax* em Manaus (AM). Brasília, Universidade de Brasília.
- ALEXANDRE A (2004) Estudo clínico e epidemiológico dos casos graves de malária vivax em pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Brasil. Manaus, Universidade do Estado do Amazonas.
- ALVES FP, DURLACHER RR, MENEZES MJ, KRIEGER H, SILVA LH, CAMARGO EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg*, v.66, p.641-648, 2002.
- AMINO R, THIBERGE S, SHORTE S, FRISCHKNECHT F, MÉNARD R. Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *C R Biol*, v.329, p.858-862, 2006.
- ANDRADE AL, MARTELLI CM, OLIVEIRA RM, ARIAS JR, ZICKER F, PANG L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. *Clin Infect Dis*, v.20, p. 475, 1995.
- ARÉVALO-HERRERA M, CHITNIS C, HERRERA S. Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. *Hum Vaccin*, v.6, p.124-132, 2010.
- AWAH N, BALOGUN H, ACHIDI E, MARIUBA LA, NOGUEIRA PA, ORLANDI P, TROYE-BLOMBERG M, GYSIN J, BERZINS K. Antibodies to the *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RAP-2/RSP-2 in relation to anaemia in Cameroonian children. *Parasite Immunol*, v.33, p.104-115, 2011.
- AWAH NW, TROYE-BLOMBERG M, BERZINS K, GYSIN J. Mechanisms of malarial anaemia: potential involvement of the *Plasmodium falciparum* low molecular weight rhoptry-associated proteins. *Acta Trop*, v.112, p.295-302, 2009.
- BABON JJ, MORGAN WD, KELLY G, ECCLESTON JF, FEENEY J, HOLDER AA. Structural studies on *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1. *Mol Biochem Parasitol*, v.153, p.31-40, 2007.
- BAIRD JK, JONES TR, DANUDIRGO EW, ANNIS BA, BANGS MJ, BASRI H, PURNOMO, MASBAR S. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg*, v.45, p.65-76, 1991.
- BAIRD JK, PURNOMO BASRI H, BANGS MJ, ANDERSEN EM, JONES TR, MASBAR S, HARJOSUWARNO S, SUBIANTO B, ARBANI PR. Age-specific prevalence of *Plasmodium falciparum* among six populations with limited histories of exposure to endemic malaria. *Am J Trop Med Hyg*, v.49, p.707-719, 1993.
- BAIRD JK. Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol*, v.92, p.367-390, 1998.
- BAIRD JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother*, v.48, p.4075-4083, 2004.

- BAIRD JK. Neglect of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol*, v.23, p.533-539, 2007.
- BASTOS MS, DA SILVA-NUNES M, MALAFRONTA 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. *Clin Vaccine Immunol*, v.14, p.1249-1259, 2007.
- BLACKMAN MJ, HEIDRICH HG, DONACHIE S, MCBRIDE JS, HOLDER AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med*, v.172, p.379-382, 1990.
- BLACKMAN MJ, LING IT, NICHOLLS SC, HOLDER AA. Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. *Mol Biochem Parasitol*, v.49, p.29-33, 1991.
- BLACKMAN MJ, SCOTT-FINNIGAN TJ, SHAI S, HOLDER AA. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. *J Exp Med*, v.180, p.389-393, 1994.
- BRAGA EM, KRETTLI AU. Immune response to sporozoite and blood stage antigens among subjects exposed to malaria in Brazil: A review. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v.52, p.246-253, 2000.
- BRAGA EM, CARVALHO LH, FONTES CJ, KRETTLI AU. Low cellular response in vitro among subjects with long-term exposure to malaria transmission in Brazilian endemic areas. *Am J Trop Med Hyg*, v.66, p.299-303, 2002.
- BRUCE MC, GALINSKI MR, BARNWELL JW, SNOUNOU G, DAY KP. Polymorphism at the merozoite surface protein-3alpha locus of *Plasmodium vivax*: global and local diversity. *Am J Trop Med Hyg*, v.61, p.518-525, 1999.
- CALVO PA, DALY TM, LONG CA. Both epidermal growth factor-like domains of the merozoite surface protein-1 from *P. yoelii* are required for protection from malaria. *Ann NY Acad Sci*, v.797, p.260-262, 1996.
- CAMARGO LMA, FERREIRA UM, KRIEGER H, CAMARGO EP, PEREIRA DA SILVA LH. Unstable hypoendemic malaria in Rondônia (Western Amazon Region, Brazil): Epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agroindustrial rural settlement. *Am J Trop Med Hyg*, v.51, p.16-26, 1994.
- CAMARGO LMA, COLLETTI GMDD, FERREIRA UM, GURGEL SM, ESCOBAR AL, MARQUES A, KRIEGER H, CAMARGO EP, SILVA LHP. Hypoendemic malaria in Rondônia (Brazil, western Amazon region): seasonal variation and risk groups in a urban locality. *Am J Trop Med Hyg*, v.55, p.32-38, 1996.
- CAMARGO, E.P.; ALVES, F.; DA SILVA, L.H.P. Symptomless *Plasmodium vivax* infections in native Amazonians. *Lancet*, v.353, p. 1415-1416, 1999.
- CAVANAGH DR, MCBRIDE JS. Antigenicity of recombinant proteins derived from *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Mol Biochem Parasitol*, v.85, p.197-211, 1997.
- CAVANAGH, D.R.; DOBANO, C.; ELHASSAN, I.M.; MARSH, K.; ELHASSAN, A.; HVIID, L.; KHALIL, E.A.; THEANDER, T.G.; ARNOT, D.E.; MCBRIDE, J.S. Differential patterns of human immunoglobulin G subclass responses to distinct regions of a single protein, the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*, v.69, p.1207-1211, 2001.

- CERAMI C, FREVERT U, SINNIS P, TAKACS B, CLAVIJO P, SANTOS MJ, NUSSENZWEIG V. The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Cell*, v.70, p.1021–1033, 1992.
- CHANG, S.P.; GIBSON, H.L.; LEE, N.C.; BARR, P.J.; HUI, G.S. A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp 195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth. *J Immunol*, v.149, p. 548-555, 1992.
- CHAPPEL JA, HOLDER AA. Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion *in vitro* recognize the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. *Mol. Biochem Parasitol*, v.60, p.303-312, 1993.
- CHEESMAN S, O'MAHONY E, PATTARADILOKRAT S, DEGNAN K, KNOTT S, CARTER R. A single parasite gene determines strain-specific protective immunity against malaria: the role of the merozoite surface protein I. *Int J Parasitol*, v.40, p.951-961, 2010.
- CHITARRA V, HOLM I, BENTLEY GA, PETRES S, LONGACRE S. The crystal structure of C-terminal merozoite surface protein 1 at 1.8 Å resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. *Mol Cell*, v.3, p.457-64, 1999.
- CHIZZOLINI C, TROTTEIN F, BERNARD FX, KAUFMANN MH. Isotypic analysis, antigen specificity, and inhibitory function of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Gabonese newborns. *Am J Trop Med Hyg*, v.45, p.57-64, 1991.
- COLLINS WE, JEFFERY GM. A retrospective examination of sporozoite- and trophozoite-induced infections with *Plasmodium falciparum* in patients previously infected with heterologous species of *Plasmodium*: effect on development of parasitologic and clinical immunity. *Am J Trop Med Hyg*, v.61, p.36-43, 1999.
- COHEN S, MC GI, CARRINGTON S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*, v.192, p.733-737, 1961.
- COHEN S, BUTCHER GA. Serum antibody in acquired malarial immunity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.65, p.125-135, 1971.
- CONWAY DJ. Natural selection on polymorphic malaria antigens and the search for a vaccine. *Parasitol Today*, v.13, p.26-29, 1997.
- CONWAY DJ, CAVANAGH DR, TANABE K, ROPER C, MIKES ZS, SAKIHAMA N, BOJANG KA, ODUOLA AM, KREMSNER PG, ARNOT DE, GREENWOOD BM, MCBRIDE JS. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med*, v.6, p.689-692, 2000.
- COURA JR, SUAREZ-MUTIS M, LADEIA-ANDRADE S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection-a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.101, p.229-237, 2006.
- 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. *Clin Infect Dis*, v.46, p.165-171, 2008.
- 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*, v.68, p.613-619, 2003.

- DA SILVEIRA LA, DORTA ML, KIMURA EA, KATZIN AM, KAWAMOTO F, TANABE K, FERREIRA MU. Allelic diversity and antibody recognition of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 during hypoendemic malaria transmission in the Brazilian amazon region. *Infect Immun*, v.67, p.5906-5916, 1999.
- DEANE LM. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, v.38, p.223-230, 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.88, p.4030-4034, 1991.
- DODOO D, AIKINS A, KUSI KA, LAMPTEY H, REMARQUE E, MILLIGAN P, BOSOMPRAH S, CHILENGI R, OSEI YD, AKANMORI BD, THEISEN M. Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. *Malar J*, 7:142, 2008.
- DRUILHE P, KHUSMITH S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria-immune status. *Infect Immun*, v.55, p.888-891, 1987.
- DRUILHE P, PERIGNON JL. Mechanisms of defense against *Plasmodium falciparum* asexual blood stages in humans. *Immun Letters*, v.41, p.115-120, 1994.
- DUBOIS P, PEREIRA DA SILVA L. Towards a vaccine against asexual blood stage infection by *Plasmodium falciparum*. *Res Immunol*, v.146, p.263-275, 1995.
- EKVALL, H. Malaria and anaemia. *Curr Opin Haematol*, v.10, p.108-114, 2003.
- EGAN AF, MORRIS J, BARNISH G, ALLEN S, GREENWOOD BM, KASLOW DC, HOLDER AA, RILEY EM. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J Infect Dis*, v.173, p.765-769, 1996.
- EGAN A, WATERFALL M, PINDER M, HOLDER A, RILEY E. Characterization of human T- and B-cell epitopes in the C terminus of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1: evidence for poor T-cell recognition of polypeptides with numerous disulfide bonds. *Infect Immun*, v.65, p.3024-3031, 1997.
- EGAN AF, BURGHAUS P, DRUILHE P, HOLDER AA, RILEY EM. Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro. *Parasite Immunol*, v. 21, p. 133-139, 1999.
- EGAN AF, BLACKMAN MJ, KASLOW DC. Vaccine efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in malaria-naive, -exposed, and/or -rechallenged *Aotus vociferans* monkeys. *Infect Immun*, v.68, p.1418-1427, 2000.
- ELLIS RD, FAY MP, SAGAR I, DICKO A, MIURA K, GUINDO MA, GUINDO A, SISSOKO MS, DOUMBO OK, DIALLO D. Anaemia in phase 2 study of a blood stage falciparum malaria vaccine.. *Mal J*, 10:13, 2011.
- ESCALANTE AA, LAL AA, AYALA FJ. Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genetics*, v.149, p.189-202, 1998.
- EVANS KJ, HANSEN DS, VAN ROOIJEN N, BUCKINGHAM LA & SCHOFIELD L. Severe malarial anaemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood*, v.107, p.1192-1199, 2006.

- FADOK VA, DE CATHELINÉAU A, DALEKE DL, HENSON PM, BRATTON DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*, v.276, p. 1071-1077, 2001.
- FERNANDEZ-BECERRA C, SANZ S, BRUCET M, STANISIC DI, ALVES FP, 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. *Malar J*, 9:29, 2010.
- FONTES CJF (2001) Malária assintomática em áreas de garimpo no Brasil: estudos de fatores de risco. Faculdade de Medicina. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais: 178.
- FREVERT U, SINNIS P, CERAMI C, SHREFFIER W, TAKACS B, NUSSENZWEIG, V. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med*, v.177, p.287-298, 1993.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Informe epidemiológico do Centro Nacional de Epidemiologia do Ministério da Saúde. Programa de intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal, 2002.
- GARRAUD O, POINGT JP, PERRAUT R, GYSIN J. Peripheral blood mononuclear cells in the squirrel monkey *Saimiri sciureus*: characterization and functional aspects of T lymphocytes. *Res Immunol*, v.140, p.857-874, 1989.
- GARRAUD O, PERRAUT R, GYSIN J, BEHR C, DUBOIS P, BONNEMAINS B, JOUIN H, MICHEL JC, PEREIRA DA SILVA L. Manipulating blood T cells and B cells from squirrel monkeys: some technical considerations. *J Immunol Methods*, v.173, p.165-173, 1994.
- GENTON B, REED ZH. Asexual blood-stage malaria vaccine development: facing the challenges. *Curr Opin Infect Dis*, v.20, p.467-475, 2007
- GOLENDÁ CF, LI J, ROSENBERG R. Continuous in vitro propagation of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.94, p.6786-6791, 1997.
- GOOD MF, KASLOW DC, MILLER LH. Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annu Rev Immunol*, v.16, p.57-87, 1998.
- GOOD MF, XU H, WYKES M, ENGWERDA CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol*, v.23, p.69-99, 2005.
- GOZALO A, LUCAS C, CACHAY M, WELLDE BT, HALL T, BELL B, WOOD J, WATTS D, WOOSTER M, LYON JA, MOCH JK, HAYNES JD, WILLIAMS JS, HOLLAND C, WATSON E, KESTER KE, KASLOW DC, BALLOU WR. Passive transfer of growth-inhibitory antibodies raised against yeast-expressed recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1(19). *Am J Trop Med Hyg*, v.59, p.991-997, 1998.
- GRYNBERG P, FERNANDES FONTES CJ, BRAGA EM. Association between particular polymorphic residues on apical membrane antigen 1 (AMA-1) and platelet levels in patients with vivax malaria. *Clin Microbiol Infect*, v.13, p.1089-1094, 2007.
- GUADAGNOLI E, VELICER WF. Relation of sample size to the stability of component patterns. *Psychol. Bull*, v.103, p.265-275, 1988.

- GUERRA CA, HOWES RE, PATIL AP, GETHING PW, VAN BOECKEL TP, TEMPERLEY WH, KABARIA CW, TATEM AJ, MANH BH, ELYAZAR IR, BAIRD JK, SNOW RW, HAY SI. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis*, 4:e774, 2010.
- GUERRA CA, SNOW RW, HAY SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol*, v.22, p.353-358, 2006.
- GUPTA S, SNOW RW, DONNELLY CA, MARSH K, NEWBOLD C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med*, v.5, p.340-343, 1999.
- HAWKING F. Milk, p-aminobenzoate and malaria of rats and monkeys. *Br Med J*, v.43, p.47-61, 1965.
- HENSMANN M, LI C, MOSS C, LINDO V, GREER F, WATTS C, OGUN SA, HOLDER AA, LANGHORNE J. Disulfide bonds in merozoite surface protein 1 of the malaria parasite impede efficient antigen processing and affect the in vivo antibody response. *Eur J Immunol*, v.34, p.639-648, 2004.
- HERRERA S, CORRADIN G, ARÉVALO-HERRERA M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitol*, v.23, p.122-128, 2007.
- HOGH B, MARBIAH NT, BURGHHAUS PA, ANDERSEN PK. Relationship between maternally derived anti-*Plasmodium falciparum* antibodies and risk of infection and disease in infants living in an area of Liberia, west Africa, in which malaria is highly endemic. *Infect Immun*, v.63, p.4034-4038, 1995.
- HOLDER AA, FREEMAN RR. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. *J Exp Med*, v.156, p.1528-1538, 1982.
- HUAMAN MC, MARTIN LB, MALKIN E, NARUM DL, MILLER LH, MAHANTY S, LONG CA. Ex vivo cytokine and memory T cell responses to the 42-kDa fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in vaccinated volunteers. *J Immunol*, v.180, p.1451-1461, 2008.
- HUGHES AL. Positive selection and interallelic recombination at the merozoite surface antigen-1 (MSA-1) locus of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*, v.9, p.381-393, 1992.
- JAKEMAN GN, SAUL A, HOGARTH WL, COLLINS WE. Anaemia of acute malaria infection in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitology*, v.119, p.127-133, 1999.
- JANGPATARAPONGSA K, SIRICHAISINTHOP J, SATTABONGKOT J, CUI L, MONTGOMERY SM, LOOAREESUWAN S, TROYE-BLOMBERG M, UDOMSANGPETCH R. Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection. *Microbes Infect*, v.8, p.680-686, 2006.
- JOLLIFE IT. Principal component analysis, 2nd ed. Springer, New York, NY, 2002.
- JOUIN H, ROGIER C, TRAPE JF, MERCEREAU-PUIJALON O. Fixed, epitope-specific, cytophilic antibody response to the polymorphic block 2 domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSP-1 in humans living in a malaria-endemic area. *Eur J Immunol*, v.31, p.539-550, 2001.
- KELTON JG, KEYSTONE J, MOORE J, DENOMME G, TOZMAN E, GLYNN M, NEAME PB, GAULDIE J, JENSEN J. Immune-mediated thrombocytopenia of malaria. *J Clin Invest*, v.71, p.832-836, 1983.

- KOCHAR DK, SAXENA V, SINGH N, KOCHAR SK, KUMAR SV, DAS A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerg Infect Dis*, v.11, p.132-134, 2005.
- KOCHAR DK, DAS A, KOCHAR SK, SAXENA V, SIROHI P, GARG S, KOCHAR A, KHATRI MP, GUPTA V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *Am J Trop Med Hyg*, v.80, p.194-198, 2009.
- KROTOSKI WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malaria relapse. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.79, p.1-11, 1985.
- KUMAR S, YADAVA A, KEISTER DB, TIAN JH, OHL M, PERDUE-GREENFIELD KA, MILLER LH, KASLOW DC. Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in *Aotus* monkeys. *Mol Med*, v.1, p.325-332, 1995.
- KUMAR S, COLLINS W, EGAN A, YADAVA A, GARRAUD O, BLACKMAN MJ, GUEVARA PATINO JA, DIGGS C, KASLOW DC. Immunogenicity and efficacy in aotus monkeys of four recombinant *Plasmodium falciparum* vaccines in multiple adjuvant formulations based on the 19-kilodalton C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect Immun*, v.68, p.2215-2223, 2000.
- KUMAR S, MELZER M, DODDS P, WATSON J, ORD R. *P. vivax* malaria complicated by shock and ARDS. *Scand J Infect Dis*, v.39, p.255-256, 2007.
- LACERDA MV (2007) Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária. Faculdade de Medicina. Brasília, Universidade de Brasília: 395.
- LACERDA MV, HIPOLITO JR, PASSOS LN. Chronic *Plasmodium vivax* infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.41, p.522-523, 2008.
- LADEIA-ANDRADE S, FERREIRA MU, SCOPEL KK, BRAGA EM, BASTOS MDA S, WUNDERLICH G, COURA JR. Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)-1(19) and cumulative exposure to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.102, p.943-951, 2007.
- LARSEN JE, LUND O, NIELSEN M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*, 2: 2, 2006.
- LAYEZ C, NOGUEIRA P, COMBES V, et al. *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage. *Blood*, v.106, p.3632-3638, 2005.
- 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. *Int J Parasitol*, v.39, p.1125-1128, 2009.
- LENOIR AA, PANDEY JP, GRANOFF DM. Antibody responses of black children to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide- *Neisseria meningitidis* outer-membrane protein conjugate vaccine in relation to the Km(1) allotype. *J Infect Dis*, v.157, p.1242-1245, 1988.
- LI MO, SARKISIAN MR, MEHAL WZ, RAKIC P, FLAVELL RA. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science*, v.302, p.1560-1563, 2003.
- LING IT, OGUN SA, HOLDER AA. The combined epidermal growth factor-like modules of *Plasmodium yoelii* Merozoite Surface Protein-1 are required for a protective immune response to the parasite. *Parasite Immunol*, v.17, p.425-433, 1995.

- LUCHAVEZ J, ESPINO F, CURAMENG P, ESPINA R, BELL D, CHIODINI P, NOLDER D, SUTHERLAND C, LEE KS, SINGH B. Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. *Emerg Infect Dis*, v.14, p.811-813, 2008.
- LUNEL F, DRUILHE P. Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages in vitro. *Infect Immun*, v.57, p.2043-2049, 1989.
- MAINA RN, WALSH D, GADDY C, HONGO G, WAITUMBI J, OTIENO L, JONES D, OGUTU BR. Impact of *Plasmodium falciparum* infection on haematological parameters in children living in Western Kenya. *Malar J*, 9 (Suppl 3):S4, 2010.
- MALÁRIA/SVS/MS: Malária em "Doenças de A a Z". SVS/ Ministério da Saúde; 2009. http://portalsaude.gov.br/portal/saude/profissional/areacfm?id_area=1526.
- MANCILLA LI, LEVITUS G, KIRCHGATTER K, MERTENS F, HERRERA S, DEL PORTILLO HA. *Plasmodium vivax*: dimorphic DNA sequences from the MSP-1 gene code for regions that are immunogenic in natural infections. *Exp Parasitol*, v.79, p.148-158, 1994.
- MARQUES AC, PINHEIRO EA, SOUZA AG. Um estudo sobre a dispersão de casos de Malária no Brasil. *Rev Bras Mal D Trop*, v.38, p.51-75, 1986.
- 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 U S A*, v.102, p.814-819, 2005.
- McCOLL DJ, SILVA A, FOLEY M *et al.* Molecular variation in a novel polymorphic antigen associated with *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol*, v.68, p.53-67, 1994.
- McGREEVY PB, DIETZE R, PRATA A, HEMBREE SC. Effects of immigration on the prevalence of malaria in rural areas of the Amazon basin of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.84, p.485-491, 1989.
- McGREGOR IA. The passive transfer of human malaria immunity. *Am J Trop Med Hyg*, v.13, p.237-239, 1964.
- MERCEREAU-PUIJALON O, FANDEUR T, GUILLOT M, BONNFOY S. Parasite features impeding malaria immunity: antigenic diversity; antigenic variation and poor immunogenicity. *Res Immunol*, v.142, p.691-697, 1991.
- MENDIS K, SINA BJ, MARCHESINI P, CARTER R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, v.64, p.97-106, 2001.
- MENENDEZ C, FLEMING AF, ALONSO PL: Malaria-related anaemia. *Parasitol Today*, v.16, p.469-476, 2000.
- MORAIS CG, SOARES IS, CARVALHO LH, FONTES CJ, KRETTLI AU, BRAGA EM. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. *Parasitol Res*, v.95, p.420-426, 2005.
- MORAIS CG, SOARES IS, CARVALHO LH, FONTES CJ, KRETTLI AU, BRAGA EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg*, v.75, p.582-587, 2006.

- MSHANA RN, BOULANDI J, MAYOMBO J, MENDOME G. In vitro lymphoproliferative responses to malaria antigens: a prospective study of a holoendemic area with perennial malaria transmission. *Parasite Immun*, v.15, p.35-45, 1993.
- NARDIN EH, NUSSENZWEIG RS. T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages. *Annu Rev Immunol*, v.11, p.687-727, 1993.
- NG OT, OOI EE, LEE CC, LEE PJ, NG LC, PEI SW, TU TM, LOH JP, LEO YS. Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. *Emerg Infect Dis*, v.14, p.814-816, 2008.
- 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. *Infect Immun*, v.74, p.2726-2733, 2006.
- OCANA-MORGNER C, MOTA MM, RODRIGUEZ A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med*, v.197, p.143-151, 2003.
- OEUVRAY C, BOUHAROUN-TAYOUN H, GRASS-MASSE H, BOTTIUS E, KAIDOH T, AIKAWA M, FILGUEIRA MC, TARTAR A, DRUILHE P. Merozoite surface protein 3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood*, v.84, p.1594-1602, 1994.
- OLIVEIRA-FERREIRA J, LACERDA MV, BRASIL P, LADISLAU JL, TAUIL PL, DANIEL-RIBEIRO CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*, 9:115, 2010.
- OSIER FH, POLLEY SD, MWANGI T, LOWE B, CONWAY DJ, MARSH K. Naturally acquired antibodies to polymorphic and conserved epitopes of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3. *Parasite Immunol*, v.29, p.387-394, 2007.
- PARK JW, MOON SH, YEOM JS, LIM KJ, SOHN MJ, JUNG WC, CHO YJ, JEON KW, JU W, KI CS, OH MD, CHOE K. Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.8, p. 14-20, 2001.
- PASVOL G, WEATHERALL DJ, WILSON RJM. Effects of foetal haemoglobin on susceptibility of red cells to *Plasmodium falciparum*. *Nature*, v.270, p.171-173, 1977.
- PALMER CJ, MAKLER M, KLASKALA WI, LINDO JF, BAUM MK, AGER AL. Increased prevalence of *Plasmodium falciparum* malaria in Honduras, Central America. *Rev Panam Salud Publica*, v.4, p.40-42, 1998.
- PERERA KL, HANDUNNETTI SM, HOLM I, LONGACRE S, MENDIS K. Baculovirus merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant antigens are highly protective in a natural primate model for human *Plasmodium vivax* malaria. *Infect Immun*, v.66, p.1500-1506, 1998.
- PLAYFAIR JH, TAVERNE J, BATE CA, DE SOUZA JB. The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease? *Immunol Today*, v.11, p.25-27, 1990.
- POLLEY SD, TETTEH KK, LLOYD JM, AKPOGHENETA OJ, GREENWOOD BM, BOJANG KA, CONWAY DJ. *Plasmodium falciparum* Merozoite surface protein 3 is a target of allele-specific immunity and alleles are maintained by natural selection. *J Infect Dis*, v.195, p.279-287, 2007.

- PRATA A, URDANETA M, MCGREEVY PB, TADA MS. Infrequency of asymptomatic malaria in an endemic area in Amazonas, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 21, p. 51-52, 1988.
- PRICE RN, TJITRA E, GUERRA CA, YEUNG S, WHITE NJ, ANSTEY NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg*, v.77, p.79-87, 2007.
- PUTAPORNTIP C, JONGWUTIWES S, SAKIHAMA N, FERREIRA MU, KHO WG, KANEKO A, KANBARA H, HATTORI T, TANABE K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, p.16348-16353, 2002.
- PUTAPORNTIP C, JONGWUTIWES S, IWASAKI T, KANBARA H, HUGHES AL. Ancient common ancestry of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* as inferred from its homologue in *Plasmodium knowlesi*. *Mol Biochem Parasitol*, v.146, p.105-108, 2006.
- RILEY EM, ALLEN SJ, WHEELER JG, BLACKMAN MJ, BENNETT S, TAKACS B, SCHÖNFELD HJ, HOLDER AA, GREENWOOD BM. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol*, v.14, p.321-337, 1992.
- RILEY EM, MORRIS-JONES S, BLACKMAN MJ, GREENWOOD BM, HOLDER AA. A longitudinal study of naturally acquired cellular and humoral immune responses to a merozoite surface protein (MSP1) of *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal malaria transmission. *Parasite Immunol*, v.15, p.513-524, 1993.
- ROBSON KJH, FREVERT U, RECHMANN I, COWAN G, BEIER J, SCRAGG IG, et al. Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum*: expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes. *EMBO J*, v.14, p. 3883–3894, 1995.
- RODRIGUES MH, CUNHA MG, MACHADO RL, FERREIRA OC JR, 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. *Malar J*, v. 2, 2003.
- RODRÍGUEZ LE, URQUIZA M, OCAMPO M, CURTIDOR H, SUÁREZ J, GARCÍA J, VERA R, PUENTES A, LÓPEZ R, PINTO M, RIVERA Z, PATARROYO ME. *Plasmodium vivax* MSP-1 peptides have high specific binding activity to human reticulocytes. *Vaccine*, v. 20, p.1331-1339, 2002.
- ROJANASTHIEN S, SURAKAMOLLEART V, BOONPUCKNAVIG S, ISARANGKURA P. Hematological and coagulation studies in malaria. *J Med Assoc Thai*, v.75 (1),p.190-194, 1992.
- SABCHAREON A, BURNOUF T, OUATTARA D, ATTANATH P, BOUHAROUN-TAYOUN H, CHANTAVANICH P, FOUCAULT C, CHONGSUPHAJAISIDDHI T, DRUILHE P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*, v.45, p.297-308, 1991.
- SACHDEVA S, AHMAD G, MALHOTRA P, MUKHERJEE P, CHAUHAN VS. Comparison of immunogenicities of recombinant *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 19- and 42-kiloDalton fragments expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, v.72, p.5775-5782, 2004.
- SAN SEBASTIAN M, JATIVA R, GOICOLEA I. Epidemiology of malaria in the Amazon basin of Ecuador. *Rev Panam Salud Publica*, v.7, p.24-28, 2000.

- SANTOS-CIMINERA PD, ROBERTS DR, ALECRIM MG, COSTA MR, QUINNAN GV, JR. Malaria diagnosis and hospitalization trends, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v.13, p.1597-1600, 2007.
- SCOPEL K.K.G (2003). Infecção assintomática por Plasmodium sp na Amazônia Brasileira: detecção por PCR e Resposta de Anticorpos Anti-Proteína 1 de Merozoíto de *Plasmodium falciparum*. Departamento de Parasitologia. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais: 130.
- SCOPEL KK, DA SILVA-NUNES M, MALAFRONTA 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*, v.76, p.1084-1091, 2007.
- SCOPEL KK, FONTES CJ, FERREIRA MU, BRAGA EM. *Plasmodium falciparum*: IgG subclass antibody response to merozoite surface protein-1 among Amazonian gold miners, in relation to infection status and disease expression. *Exp Parasitol*, v.109, p.124-134, 2005.
- SEHGAL VM, SIDDIQUI WA, ALPERS MP. A seroepidemiological study to the role passive maternal immunity to malaria in infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.83, p.105-106, 1989.
- SERRANO ML, PÉREZ HA, MEDINA JD. Structure of C-terminal fragment of merozoite surface protein-1 from *Plasmodium vivax* determined by homology modeling and molecular dynamics refinement. *Bioorg Med Chem*, v.14, p.8359-8365, 2006.
- SHAI S, BLACKMAN MJ, HOLDER AA. Epitopes in the 19kDa fragment of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1 (PfMSP-1(19)) recognized by human antibodies. *Parasite Immunol*, v.17, p.269-275, 1995.
- SHARMA A, KHANDURI U. How benign is benign tertian malaria? *J Vector Borne Dis*, v.46, p.141-144.
- SHARMA VP. Current scenario of malaria in India. *Parassitologia*, v.41, p.349-353, 1999.
- SHI YP, SAYED U, OARI SH, ROBERTS JM, UDHAYAKUMAR V, OLOO AJ, HAWLEY WA, KASLOW DC, NAHLEN BL, LAL AA. Natural Immune Response to the C-terminal 19-kilodalton Domain of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1. *Infect Immun*, v.64, p.2716-2723, 1996.
- SIERRA AY, BARRERO CA, RODRIGUEZ R, SILVA Y, MONCADA C, VANEGAS M, PATARROYO MA. Splenectomised and spleen intact Aotus monkeys' immune response to *Plasmodium vivax* MSP-1 protein fragments and their high activity binding peptides. *Vaccine*, v. 21, p. 4133-4144, 2003.
- SNOW RW, TRAPE JF, MARSH K. The past, present and future of childhood malaria mortality in Africa. *Trends Parasitol*, v.17, p.593-597, 2001.
- SNOW RW, GUERRA CA, NOOR AM, MYINT HY, HAY SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, v.434, p.214-217, 2005.
- 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 Immun*, v.65, p.1606-1614, 1997.

- SOARES IS, BARNWELL JW, FERREIRA MU, GOMES DA CUNHA M, LAURINO JP, CASTILHO BA, RODRIGUES MM. A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. *Mol Med*, v.5, p.459-470, 1999a.
- SOARES IS, DA CUNHA MG, SILVA MN, SOUZA JM, DEL PORTILLO HA, RODRIGUES MM. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Am J Trop Med Hyg*, v.60, p.357-363, 1999b.
- SOARES IS, OLIVEIRA SG, 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 Trop*. v. 72, p. 13-24, 1999c.
- STEVENSON MM, RILEY EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*, v.4, p.169-180, 2004.
- STOWERS AW, CIOCE V, SHIMP RL, LAWSON M, HUI G, MURATOVA O, KASLOW DC, ROBINSON R, LONG CA, MILLER LH. Efficacy of two alternate vaccines based on *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in an *Aotus* challenge trial. *Infect Immun*, v.69, p.1536-1546, 2001.
- STURM A, AMINO R, VAN DE SAND C, REGEN T, RETZLAFF S, RENNENBERG A, KRUEGER A, POLLOK JM, MENARD R, HEUSSLER VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, v.313, p.1287-1290, 2006.
- SVS, Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica: Situação Epidemiológica da Malária no Brasil 2008. <http://portal.saude.gov.br>.
- TANABE K, MACKAY M, GOMAN M, SCAIFE JG. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol*, v.195, p.273-287, 1987.
- THEANDER T.G. Defense mechanism and immune evasion in the interplay between the human immune system and *Plasmodium falciparum*. *Dan Med Bull*, v.39, p.49-63, 1992.
- UDHAYAKUMAR V, ANYONA D, KARIUKI S, SHI YP, BLOLAND PB, BRANCH OH, WEISS W, NAHLEN BL, KASLOW DC, LAL AA. Identification of T and B cell epitopes recognized by humans in the C-terminal 42-kDa domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein (MSP)-1. *J Immunol*, v.154, p.6022-6030, 1995.
- VERHOVEN B, SCHLEGEL RA, WILLIAMSON P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*, v.182, 1995.
- VERRA F, HUGHES AL. Evidence for ancient balanced polymorphism at the Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) locus of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, v.105, p.149-153, 2000.
- HOLDER, A.A. Malaria vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, p.1167-1169, 1999.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION, Roll Back Malaria. 2004. <http://www.rbm.who.int>.

YANG C, COLLINS WE, SULLIVAN JS, KASLOW DC, XIAO L, LAL AA. Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in *Saimiri* monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. *Infect Immun*, v.67, p.342-349, 1999.

ZAKERI S, MEHRIZI AA, ZOGHI S, DJADID ND. Non-variant specific antibody responses to the C-terminal region of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium falciparum* (PfMSP-1₁₉) in Iranians exposed to unstable malaria transmission. *Malar J*, 9:257, 2010.