

LILIAN LACERDA BUENO

***Plasmodium vivax*: EFEITO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES
CANDIDATOS À VACINA, AMA-1 E MSP-1₁₉, NA RESPOSTA IMUNE INATA**

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Belo Horizonte

2008

LILIAN LACERDA BUENO

***Plasmodium vivax*: EFEITO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES
CANDIDATOS À VACINA, AMA-1 E MSP-1₁₉, NA RESPOSTA IMUNE INATA**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia

Orientadora: Prof.^a Érika Martins Braga

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Belo Horizonte

2008

Trabalho realizado no Laboratório de Malária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Bolsa de Mestrado/2006-2008) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), processo número CBB 625/06.

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG em 10 de abril de 2007 (Parecer número ETIC 060/07).

A Maria Ferreira, que não sabia sobre a Ciência, mas sabia mais...

"Sou um guardador de rebanhos,
O rebanho é os meus pensamentos
E os meus pensamentos são todos sensações.
Penso com os olhos e com os ouvidos
E com as mãos e os pés
E com o nariz e a boca
Pensar uma flor é vê-la e cheirá-la
E comer um fruto é saber-lhe o sentido.
Por isso quando num dia de calor
Me sinto triste de gozá-lo tanto,
E me deito ao comprido na erva,
E fecho os olhos quentes,
Sinto todo o meu corpo deitado na realidade,
Sei a verdade e sou feliz."

Alberto Caeiro, O guardador de rebanhos

Agradeço especialmente ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, na pessoa de seu coordenador Dr. Pedro Marcos Linardi, pela oportunidade de realização desta Dissertação de Mestrado, pela oportunidade de crescimento e aprendizado científico

AGRADECIMENTOS

À Érika, muito obrigada pela orientação, por ter me recebido de braços abertos, por acreditar nas minhas idéias, pela confiança, enfim, por tudo.

À Irene Soares, pela colaboração nesse trabalho.

Ao meu amor, Ricardo, você sabe de tudo. Esse trabalho é uma conquista nossa. Muito obrigada pelas discussões a respeito da imunologia, parasitologia, pela paciência, pela amizade, pela confiança e pelo amor.

Aos meus pais, Vicente e Nazaré, que são os meus exemplos, por sempre apoiarem os estudos e as nossas escolhas.

Aos meus queridos irmãos Cynthia, Du e Lé, obrigada pelo apoio, por estarmos sempre juntos, por sermos irmãos.

Aos meus sogros, Cida e Kimiaki, que sempre me apoiam incondicionalmente.

Aos meus cunhados, Gustavo, Vi e Júnior, pela presença sempre amiga.

À Sumara, por resolver sempre tudo da melhor forma, pela amizade, pela paciência.

Aos professores, Ricardo Wagner, Evaldo Nascimento, Marcos Horácio e Nelder Gontijo por permitirem o acesso aos seus laboratórios.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Parasitologia pelos ensinamentos.

À minha turma de Mestrado, Lara, Érika, Natasha, Norin Ana, Fátima (agregada), Juliana (por aguentar as minhas reclamações), Léo, Vladimir, Erlisson, o meu muito obrigada.

Às meninas do laboratório, Cristiane, Nayara, Kézia, pela amizade, companheirismo e por sempre estarem dispostas a ajudar.

Aos demais colegas de laboratório Matheus, Mateus e Rafael pelo apoio e à Márcia por sempre estar disposta a ajudar.

À Rosa do Laboratório de Toxoplasmose pela atenção, ajuda e disponibilidade.

Às amigas Cris e Márcia porque estamos juntas há muitos anos e sempre dividimos as alegrias e tristezas.

Aos amigos Thales, Jozi e Carol por estarem sempre presentes.

À todos os colegas do Departamento de Parasitologia, principalmente àqueles que colaboraram de alguma forma para a finalização deste trabalho, muito obrigada.

Aos colegas do Departamento de Imunologia, Microbiologia e Medicina Tropical da The George Washington University, em especial à minha amiga Yan Wang, Jeffrey Bethony e ao Peter Hotez que me apoiaram bastante na continuação dos estudos e por mostrarem como a Ciência deve ser dinâmica.

E por fim agradeço acima de tudo a Deus porque sem ele nada é possível.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1. Situação atual da malária.....	1
1.2. O ciclo dos plasmódios nos seus hospedeiros.....	6
1.3. Antígenos candidatos à vacina	8
1.3.1. <i>Antígeno 1 de membrana apical (AMA-1)</i>	8
1.3.2. <i>Proteína 1 de superfície de merozoítos (MSP-1)</i>	11
1.4. Resposta imune contra malária.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Indivíduos e área de estudo.....	22
4.2. Antígenos	23
4.2.1. <i>Fragmento de 19 kDa da região C-terminal da Proteína 1 de Superfície de Merozoóto de P. vivax (Pv-MSP-1₁₉)</i>	23
4.2.2. <i>Antígeno 1 da Membrana Apical de P. vivax (Pv-AMA-1)</i>	24
4.2.3. <i>Teste de contaminação por endotoxinas</i>	25
4.3. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico.....	26
4.4. Diferenciação de células dendríticas na presença dos antígenos recombinantes Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1 ₁₉	26
4.5. Culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	27
4.6. Perfil fenotípico de células dendríticas diferenciadas na presença ou ausência dos antígenos recombinantes Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1 ₁₉	27
4.7 Determinação da produção de citocinas por “cytometric bead array” (CBA)	28

4.8. Determinação da produção de citocinas e quimiocinas por ELISA de captura ...	29
4.9. Determinação dos níveis de óxido nítrico em sobrenadantes de culturas de PBMCs estimuladas com Pv-AMA-1 ou Pv-MSP-1 ₁₉	30
4.10. Análise estatística	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Estabelecimento de condições de cultura para diferenciação de monócitos em células dendríticas	31
5.2. Alterações induzidas por antígenos recombinantes de P. vivax na expressão de moléculas de superfície de células dendríticas derivadas de monócitos	34
5.3. Expressão diferencial de quimiocinas em sobrenadantes de cultura de células dendríticas derivadas de monócitos	39
5.4. Cinética da produção de quimiocinas em culturas de PBMC estimuladas com Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1 ₁₉	42
5.5. Produção de citocinas em sobrenadantes de culturas de células dendríticas derivadas de monócitos diferenciadas na presença de Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1 ₁₉ , e de PBMCs estimuladas com Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1 ₁₉	45
5.6. Produção de óxido nítrico em sobrenadantes de cultura de PBMCs estimuladas com Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1 ₁₉	49
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÕES.....	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
9. ANEXOS.....	80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Distribuição geográfica e endemicidade da malária no mundo. Fonte: WHO (2005) e malária ocorridos na Região Não-Amazônica, 1999 a 2004.....4**
- Tabela 2. Quantificação de citocinas em sobrenadantes culturas de células dendríticas imaturas (iDC), células dendríticas maduras (mDC), e células dendríticas diferenciadas na presença de Pv-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉.....45**
- Tabela 3. Razão de citocinas em sobrenadantes de culturas de PBMCs após 6 dias de estímulo com antígenos recombinantes de *P. vivax*48**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica e endemicidade da malária no mundo. Fonte: WHO(2005).....	2
Figura 2. Mapa de risco da malária nos Estados da Amazônia legal no ano de 2004.....	4
Figura 3. Desenho experimental.....	22
Figura 4. Desenho esquemático da MSP-1 de <i>P. vivax</i> , representando os blocos conservados entre as espécies de <i>Plasmodium</i> (ICB), regiões semiconservadas (CB) e variáveis, assim como o fragmento de 19 kDa derivado de um segundo processamento da MSP-1 (adaptado de Del Portillo et al., 1991).....	24
Figura 5. Antígeno de Membrana Apical 1. A) Estrutura terciária do gene PvAMA-1: verde = domínio I, azul = domínio II e verde = domínio III. Figura extraída de Pizarro et al, 2005). B) Esquema do Antígeno de Membrana Apical 1: PS = Peptídeo sinal, PD = Pró-domínio, Dom I = Domínio I, Dom II = Domínio II, Dom III = Domínio III, DT = Domínio transmembrano e CC = Cauda citoplasmática. Figura adaptada de Hodder et al, 1996.....	25
Figura 6. Análise de pureza e rendimento após isolamento de monócitos a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). A) Perfil fenotípico de PBMCs B) Análise da expressão de CD45 (FL1) e CD14 (FL2). C) Perfil fenotípico de monócitos após seleção positiva em colunas magnéticas. D) Análise da expressão de CD45 (FL1) e CD14 (FL2), representando a pureza da população de monócitos. E) Perfil fenotípico de células não selecionadas em colunas magnéticas. F) Análise da expressão de CD45 (FL1) e CD14 (FL2), representando o rendimento de monócitos obtidos no processo de isolamento.....	32

Figura 7. Análise de diferenciação de monócitos em células dendríticas pela expressão relativa de CD11c.....33

Figura 8. Análise por citometria de fluxo de células dendríticas derivadas de monócitos. (A) Expressão do marcador de superfície celular CD11c. DCs imaturas (iDCs), DCs maturadas por LPS (mDCs), DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-AMA-1 (mDCs/Pv-AMA-1) and DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-MSP-1₁₉ (mDCs/Pv-MSP-1₁₉). Intensidade média de fluorescência indicada no eixo X. Dados representativo de uma entre 13 amostras. (B) Intensidade média de fluorescência (MFI) ± erro padrão da expressão de CD11c. Controle (DCs maturadas por LPS) e DCs maturadas incubadas com Pv-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉ (n = 13). Intensidade média de fluorescência está representada no eixo Y.....35

Figura 9. Análise por citometria de fluxo de células dendríticas derivadas de monócitos. (A) Expressão dos marcadores de superfície celular CD40, C e CD86. DCs imaturas (iDCs), DCs maturadas por LPS (mDCs), DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-AMA-1 (mDCs/Pv-AMA-1) and DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-MSP-1₁₉ (mDCs/Pv-MSP-1₁₉). Intensidade média de fluorescência indicada no eixo X. Dados representativos de uma entre treze amostras. (B) Intensidade média de fluorescência (MFI) ± erro padrão da expressão de CD40, CD80 e CD86. Controles (DCs maturadas por LPS) e DCs maturadas incubadas com Pv-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉ (n = 13). Intensidade média de fluorescência está representada no eixo Y.....36

Figura 10. Análise por citometria de fluxo de células dendríticas derivadas e monócitos. (A) Expressão dos marcadores de superfície celular CD16 e CD64. DCs imaturas (iDCs), DCs maturadas por LPS (mDCs), DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-AMA-1 (mDCs/Pv-AMA-1) and DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-MSP-1₁₉ (mDCs/Pv-MSP-1₁₉). Intensidade média de fluorescência indicada no eixo X. Dados representativos de uma entre treze amostras. (B) Intensidade média de fluorescência (MFI) ± erro padrão da expressão de CD16 e CD64. Controles (DCs maturadas por LPS) e DCs maturadas incubadas com v-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉ (n = 13). Intensidade média de fluorescência está representada no eixo Y.....37

Figura 11. Análise por citometria de fluxo de células dendríticas derivadas de monócitos. (A) Expressão dos marcadores de superfície celular CD1a, HLA-DR e HLA-A,B,C. DCs imaturas (iDCs), DCs maturadas por LPS (mDCs), DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-AMA-1 (mDCs/Pv-AMA-1) and DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-MSP-1₁₉ (mDCs/Pv-MSP-1₁₉). Intensidade média de fluorescência indicada no eixo X. Dados representativos de uma entre treze amostras. (B) Intensidade média de fluorescência (MFI) ± erro padrão da expressão de CD1a, HLA-DR e HLA-A,B,C. Controles (DCs maturadas por LPS) e DCs maturadas incubadas com Pv-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉ (n = 13). Intensidade média de fluorescência está representada no eixo Y.....38

Figura 12. Produção de CCL3 e CCL17 por células dendríticas derivadas de monócitos. (A) Produção de CCL3 em DCs imaturas (iDC), DCs maturadas por LPS (mDC), DCs maturadas por LPS e cultivadas com Pv-AMA-1 (mDC + Pv-AMA-1) e DCs maturadas por LPS e cultivadas com Pv-MSP-1₁₉ (mDC + Pv-MSP-1₁₉). (B) Produção de CCL17 nas mesmas condições.....40

Figura 13. Produção de CCL5 e CXCL10 por células dendríticas derivadas de monócitos. (A) Produção de CCL5 em DCs imaturas (iDC), DCs maturadas por LPS (mDC), DCs maturadas por LPS e cultivadas com Pv-AMA-1 (mDC + Pv-AMA-1) e DCs maturadas por LPS e cultivadas com Pv-MSP-1₁₉ (mDC + Pv-MSP-1₁₉). (B) Produção de CXCL10 nas mesmas condições.....41

Figura 14. Cinética da produção de CCL3 (A) e CCL17 (B) em PBMCs estimulados com Pv-AMA-1 (círculos fechados) ou Pv-MSP-1₁₉ (quadrados fechados). Culturas adicionais apenas com PBMCs (círculo aberto) foram realizadas como controle. Gráficos à esquerda representam a produção de quimiocinas nos dias 1, 2, 4 e 6. Gráficos à direita mostram a produção de quimiocinas no sexto dia de cultura (caixas pontilhadas dos gráficos à esquerda). (n=9).....43

Figura 15. Cinética da produção de CCL5 (A) e CXCL10 (B) em PBMCs estimulados com Pv-AMA-1 (círculos fechados) ou Pv-MSP-1₁₉ (quadrados fechados). Culturas adicionais apenas com PBMCs (círculo aberto) foram realizadas como controle. (n=9).....44

Figura 16. Cinética da produção de citocinas por PBMCs estimuladas com Pv-AMA-1 (círculo fechado) ou Pv-MSP-1₁₉ (quadrado fechado), e PBMCs sem estímulo como controle (círculo aberto), até 6 dias. (A) Detecção de IFN- γ , (B) TNF- α e (C) IL-10.....47

LISTA DE ABREVIATURAS

AMA-1 – Antígeno 1 de membrana apical

ANOVA – Análise de variância

CBA – “Cytometric bead array”

CCL – “Chemokine (C motif) ligand”/ ligante de quimiocinas com motivo C

CCL17/TARC – “Thymus and activation-regulated chemokine”/ quimiocina de Timo e regulada por ativação

CCL3/MIP-1a – “Macrophage inflammatory protein 1 alpha”/ proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa

CCL5/RANTES – “Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted”/ proteína expressa e secretada de células T normais, reguladas após ativação

CD – “Cluster of differentiation”/grupamento de diferenciação

CXCL – “Chemokine (C-X-C motif) ligand”/ ligante de quimiocinas com motivo CXC

CXCL10/IP-10 – “10 kDa IFN- γ -induced protein”/ proteína de 10 kDa induzida por IFN- γ

DC – Célula dendrítica

Fc γ R – Receptor de IgG

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GM-CSF – Fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos

HLA-DR – “Histocompatibility leukocyte antigen – Molecule DR”/ Molécula do complexo de histocompatibilidade principal de classe II

iDC – Células Dendríticas imaturas

IFN- γ – Interferon gamma

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

LPS - Lipopolissacarídeo

MACS – “Magnetic activated cell sorting”/ separação celular ativada por magnetismo

MFI – Intensidade média de fluorescência

MSP-1₁₉ – Fragmento de 19 kDa da proteína 1 de superfície de merozoíto

NK – “Natural Killer”

NO – Óxido nítrico

OPD – “O-phenylenediamine”

PBMC – “Peripheral blood mononuclear cells”/ Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Tampão fosfato salina

PCR – Reação da cadeia de polimerase

PE – Ficoeritrina

PE-Cy5 – Ficoeritrina conjugada com a molécula “cychrome 5”

Th – Células auxiliaadoras

TNF-a – Fator de necrose tumoral alfa

WHO – “World Health Organization”/ Organização Mundial de Saúde

RESUMO

A malária é uma das principais causas de morbidade e mortalidade nas áreas tropicais e subtropicais do mundo. Uma vez que a disseminação da malária tende a aumentar, uma vacina efetiva contra essa doença parasitária é necessária. Dois principais candidatos à vacina contra a fase eritrocítica do parasito são o antígeno 1 de membrana apical (AMA-1) e o fragmento de 19 kDa da proteína de superfície de merozoíto (MSP-1₁₉). A maioria dos estudos clínicos utilizando esses antígenos apresenta maior enfoque na identificação de proteínas que desencadeiam uma resposta protetora do que necessariamente no entendimento de seus mecanismos efetores. Além disso, devido a natureza do processo de imunização, os estudos sobre a resposta imune de candidatos à vacina são voltados principalmente para a imunidade adaptativa. Neste estudo investigamos o efeito dos candidatos a vacina Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉ na resposta imune de doadores nunca expostos à infecção por malária. Células dendríticas derivadas de monócitos, maturadas na presença de Pv-AMA-1, apresentaram alteração de fenótipo celular, como evidenciado pelo aumento da expressão de CD80 e CD64 e redução da expressão de CD11c, CD86 e CD40. Além disso, Pv-AMA-1 induziu um aumento da produção de MIP-1a/CCL3 e queda nos níveis de TARC/CCL17 tanto em células dendríticas quanto em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Finalmente, uma resposta pró-inflamatória significativa foi observada em culturas de PBMCs estimuladas por Pv-AMA-1. Esses resultados sugerem que o antígeno recombinante Pv-AMA-1 pode atuar diretamente na resposta imune inata contribuindo para a eliminação do parasito.

ABSTRACT

Malaria is one of the main causes of morbidity and mortality in the tropics and subtropics areas of the world. An effective vaccine against this parasitic disease is needed as its dissemination tends to increase. The recombinant apical membrane antigen 1 (AMA-1) and 19-kDa fragment of merozoite surface protein (MSP-1₁₉) are the lead candidates for inclusion in a vaccine against blood stages of malaria due to encouraging protective studies in humans and animals. Vaccine-related research has focused on identifying antigen that result in protective immunity rather than determining the nature of anti-malarial immune effector mechanisms. Moreover, emphasis has been placed on adaptive rather than innate immune response. In this study, we investigated the effect of *Plasmodium vivax* vaccine candidates Pv-AMA-1 and Pv-MSP-1₁₉ on the immune response of malaria-naïve donors. Pv-AMA-1 but not Pv-MSP-1₁₉ alters the maturation of monocyte-derived dendritic cells as observed by upregulation of CD80 and CD64 expression and concomitant downmodulation in the CD11c, CD40 and CD86 cell surface molecules expression. In addition, Pv-AMA-1 induced an increased production of MIP-1a/CCL3 and decreased production of TARC/CCL17 levels both DCs and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Finally, a significant pro-inflammatory response was elicited by Pv-AMA-1-stimulated PBMCs. These results suggest that the recombinant vaccine candidate Pv-AMA-1 may play a direct role on innate immune response and might be involved in parasite destruction.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A malária é causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, à família *Plasmodiidae* e ao gênero *Plasmodium*. Quatro espécies de *Plasmodium* são reconhecidas como parasitos naturais do homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. A infecção por essas espécies de *Plasmodium* tem suas características próprias, bem como diferença nas suas áreas de distribuição (BRAGA et al., 2002a; BLEDSOE, 2005). Dentre essas espécies, *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes no mundo, sendo o *P. falciparum* considerado a espécie de maior impacto devido aos altos níveis de mortalidade, sua resistência a drogas antimaláricas e sua dominância sobre o continente africano. Entretanto, a infecção debilitante por *P. vivax* tem causado um profundo impacto na saúde pública, na longevidade e na prosperidade de grande parte da população humana (MENDIS et al., 2001).

1.1. Situação atual da malária

A malária é a doença parasitária mais comum e causadora de mortalidade e morbidade em países localizados em regiões tropicais e subtropicais e continua sendo o maior desafio em saúde pública em todo o mundo (DOOLAN et al., 2003; WHO, 2004; GOOD et al., 2005). Embora tenha sido descrito há cerca de cento e vinte anos, a doença tem resistido a todas as formas de controle empregadas até hoje (WHO, 2004; GOOD et al., 2005). A doença é endêmica em mais de cem países e a cada ano é estimado que cerca de 300-500 milhões de pessoas fiquem doentes devido à infecção por malária e mais de um milhão dessas morram, sendo a maioria crianças. Hoje em dia é estimado que 40% da população do mundo permaneçam sob o risco de infecção por malária (WHO, 2004; GOOD et al., 2005). Estimativas recentes indicam que a população sob risco de malária *falciparum* e *vivax* seja de 2,5 e 2,6 bilhões de pessoas, respectivamente (GUERRA et al., 2006). Para infecção por *P. vivax*, ao

contrário dos 70-80 milhões de casos anuais descritos (MENDIS et al., 2001), é estimado que esse número alcance de 130 a 435 milhões de casos a cada ano (HAY et al., 2004). A elevada ocorrência de malária vivax importada observada nos últimos anos tem alertado as autoridades governamentais em muitos países desenvolvidos (WHO, 2004). Além disso, estudos recentes sugerem que o impacto cíclico causado por essa infecção tem sido subestimado e que seu impacto econômico nunca foi adequadamente considerado (WHO, 2004).

Embora a grande maioria das mortes causadas por malária ocorra na África, a doença encontra-se amplamente distribuída na América Latina, Sudeste Asiático e Oceania. Enquanto *P. falciparum* prevalece no continente africano, o *P. vivax* é a espécie prevalente na Ásia e América Latina (PALMER et al., 1998; SHARMA, 1999; SAN SEBASTIAN et al., 2000).

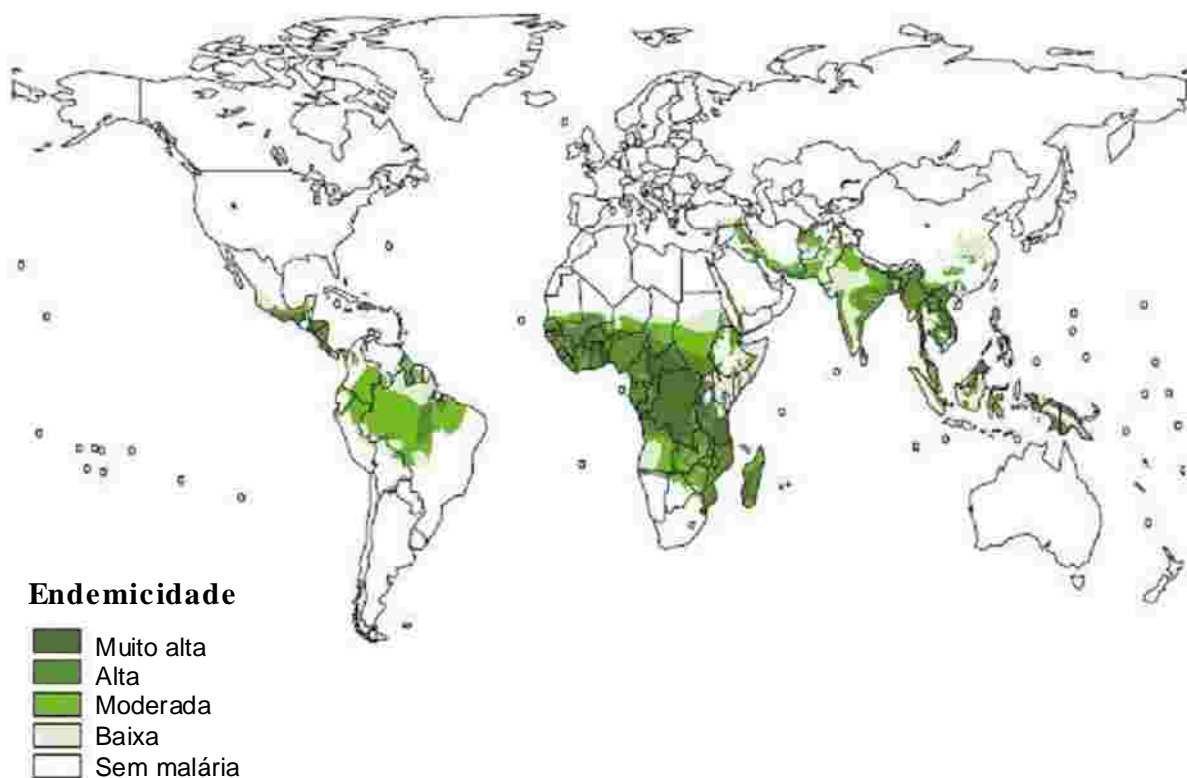


Figura 1: Distribuição geográfica e endemicidade da malária no mundo. Fonte: WHO (2005)

Na América Latina, a malária representa um problema sério de saúde pública, afetando a vida e a saúde de determinados grupos sociais, particularmente aqueles voltados para as atividades econômicas relacionadas à floresta, mineração e ao trabalho na construção de estradas e usinas hidrelétricas (MARQUES, 1987).

No Brasil a malária é endêmica na região amazônica; mas de 99% dos casos notificados ocorrem na região Norte e parte da região Centro-Oeste, nos estados do Pará, Amazonas, Rondônia, Acre, Amapá, Maranhão, Tocantins e Mato Grosso. Em 2005, foram notificados pelo menos 513.013 casos autóctones e 7.334 casos importados, sendo o *P. vivax* a espécie prevalente no Brasil com 75,99% dos casos (SIVEP, 2005), e, apesar de não ser letal, as manifestações clínicas geram uma alta carga sócio-econômica para as grandes cidades e área rural na região intra-amazônica (COURA et al., 2006). O padrão de transmissão da malária no Brasil é diferente do observado nas áreas hiper-holoendêmicas, caracterizando-se como hipomesoendêmica, de transmissão instável e com flutuações sazonais anuais (CAMARGO et al., 1996; BRAGA et al., 2002b; COURA et al., 2006). A malária não se apresenta distribuída uniformemente em toda região amazônica, uma vez que se observam áreas com diferentes níveis de transmissão da doença. As áreas de maior transmissão são frequentemente aquelas de colonização recente, principalmente garimpos, (SAWYER, 1993), populações ribeirinhas no rio Madeira (Porto Chuelo) e assentamentos ao longo do rio Ji-Paraná (Rondônia) (ALVES et al., 2002), onde as condições precárias de moradia associadas aos hábitos da população proporcionam condições favoráveis para a transmissão. Por outro lado, com o avanço do desmatamento florestal e o estabelecimento da agricultura, pastos e desenvolvimento urbano, a transmissão da malária parece substancialmente reduzida, sendo o risco de novas infecções direcionados por fatores do comportamento humano (DE CASTRO et al., 2006).

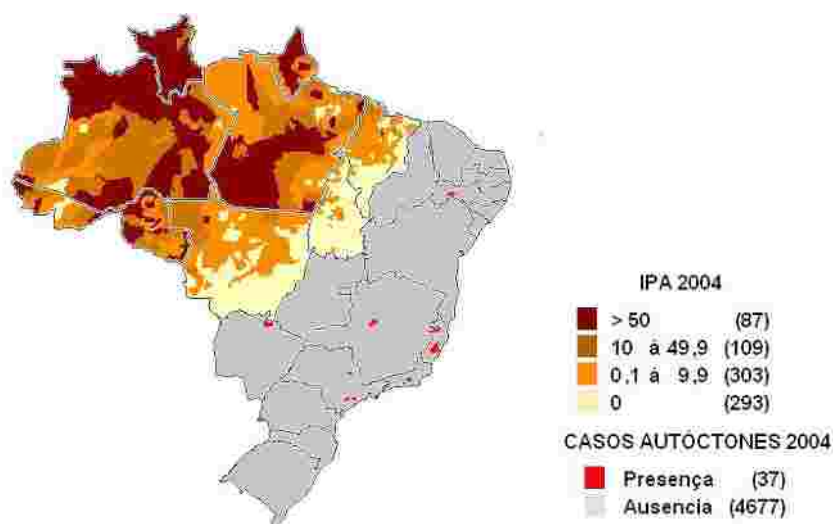


Figura 2: Mapa de risco da malária nos Estados da Amazônia legal no ano de 2004. Ministério da Saúde (2005)

Na região extra-amazônica, onde a malária não apresenta caráter endêmico, vários surtos foram notificados, como demonstrado na Tabela 1. Esse é um quadro bastante preocupante, pois essas regiões reúnem condições favoráveis ao estabelecimento e manutenção da transmissão, como população susceptível e presença do vetor, além de boas condições ecológicas, geográficas e econômicas para o estabelecimento do foco malarígeno (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Tabela 1: Surtos de malária ocorridos na Região Não-Amazônica, 1999 a 2004

Estados	1999	2000	2001	2002	2003	2004*
Piauí	3	29	13	9	38	89
Ceará	0	2	0	402	4	29
Bahia	0	1	72	14	71	3
Paraná	47	16	27	106	5	42
Mato Grosso do Sul	0	0	133	38	0	12
Minas Gerais	0	0	2	1	31	13
Espírito Santo	13	5	14	0	0	81
Goiás	2	24	0	5	0	13
Rio de Janeiro	1	0	0	1	19	8
São Paulo	0	3	0	4	20	11
Pernambuco	0	0	0	0	0	19
Total	66	80	261	530	188	320

Fonte: Ministério da Saúde (Brasil), 2005

A estratégia de controle estabelecida na Conferência Mundial de Amsterdã, promovida pela Organização Mundial de Saúde, se baseia em um rápido diagnóstico da infecção, bem como no tratamento apropriado realizado de forma ordenada (LOIOLA et al., 2002; WHO, 2004; COURA et al., 2006). Entretanto, casos de resistência às drogas, como cloroquina, mefloquina e primaquina, utilizadas contra a malária, vêm sendo reportados desde a década de 60 (ALECRIM et al., 1982; ALECRIM et al., 1999; BAIRD, 2007). Dessa forma, novas alternativas de controle têm sido estudadas. Dentre elas, uma vacina eficaz seria considerada uma medida de maior custo-benefício para controle dessa infecção (GOOD et al., 2005). Contudo, apesar dos avanços tecnológicos obtidos neste campo de pesquisa, vacinas eficazes contra malária ainda não estão disponíveis (KOCKEN et al., 1999; WYKES e GOOD, 2007).

Diante do quadro de gravidade registrado pelo alarmante número de casos no ano de 1999 (637.470), o Ministério da Saúde (MS) lançou, no ano de 2000, um importante plano de intensificação das ações de controle de malária (PIACM) para a Amazônia Legal. Neste plano, o MS comprometeu-se a reduzir em 50% o número de casos de malária até o final do ano de 2001 em comparação com o ano de 1999, e em 50% a mortalidade por malária até o final do ano 2002, também em comparação com os dados registrados para o ano de 1999 (LOIOLA et al., 2002). Estima-se que o resultado desse programa de controle tenha evitado 1,5 milhões de casos novos da doença entre os anos de 2000 a 2002 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). O programa de controle em operação atualmente no Brasil é o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM). Este programa tem como principal objetivo a redução da incidência e da taxa de mortalidade, além de eliminar a transmissão dentro de áreas urbanas das capitais brasileiras, e manter a ausência de transmissão em localidades onde a transmissão foi eliminada (COURA et al., 2006)

1.2. O ciclo dos plasmódios nos seus hospedeiros

O ciclo do parasito no hospedeiro invertebrado se inicia quando macrogametócitos e microgametócitos são ingeridos pela fêmea do mosquito *Anopheles sp.* durante o repasto sanguíneo no homem. Inicia-se então uma fase sexuada no interior de seu estômago, resultando na fecundação e formação de um ovo ou zigoto (oocineto). Posteriormente, o zigoto migra através da camada única de células do estômago do mosquito, posicionando-se entre esta e sua membrana basal. Assim, por esporogonia, resultam centenas de formas infectantes (esporozoítos) que migram para as glândulas salivares do mosquito vetor, quais poderão, no momento da picada, serem inoculadas no homem (BLEDSOE, 2005).

A infecção no homem tem início nesse momento, quando os esporozoítos são inoculados juntamente com a saliva na circulação sanguínea e/ou no tecido subcutâneo do hospedeiro (MOTA et al., 2001; AMINO et al., 2006). Apenas uma proporção dos parasitos entra nos capilares sanguíneos enquanto outros são drenados para os vasos linfáticos, atingindo os linfonodos (AMINO et al., 2006). Os esporozoítos que atingem os linfonodos podem se desenvolver como formas exo-eritrocíticas, porém, são degradados por leucócitos. Apenas aqueles que atingem a circulação sanguínea são capazes de se desenvolverem após infectarem os hepatócitos (AMINO et al., 2006). Antes de invadir as células hospedeiras, os esporozoítos migram por várias células do hospedeiro (MOTA et al., 2001; FREVERT, 2004), danificando a membrana plasmática nesse processo (transmigração do esporozoíto). Algumas células são capazes de reparar o dano enquanto outras morrerão por necrose em poucos minutos (MOTA et al., 2001). Essa passagem pelas células hospedeiras antes de atingirem os hepatócitos parece ser fundamental para o ciclo de vida dos plasmódios, induzindo a secreção de uma substância chamada fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), a qual torna tais células mais susceptíveis à infecção (MOTA et al., 2001; CARROLO et al., 2003). O reconhecimento e a invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos parecem envolver a participação de pelo menos duas proteínas: a proteína circum-esporozoíto (CS) (KAPPE et al., 2003) e a proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP) (TROTTEIN 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* (KROTOSKI, 1985). Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, durante a fase exo-eritrocítica, podem surgir formas latentes denominadas hipnozoítos que permanecem nas células do fígado por tempo variável, causando recaídas da doença (KROTOSKI, 1985).

Os merozoitos 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 a liberação de merozoítos vivos diretamente na circulação sanguínea. Foi demonstrado que essa forma e tiva manipula as células do hospedeiro de forma a prevenir a exposição de fosfatidilserina na camada externa da membrana plasmática de hepatócitos parasitados, protegendo assim da fagocitose por células de Kupffer e outras células fagocíticas presentes nos sinusóides hepáticos (STURM et al., 2006). Estima-se que cada hepatócito parasitado libera até 40.000 merozoítos (NARDIN e NUSSENZWEIG, 1993; GOOD et al., 2005), que infectarão eritrócitos e começarão um novo ciclo de reprodução assexuada, que levará a uma lise das células vermelhas a cada 48 a 72 horas (ciclo eritrocítico). Esse sincronismo é o que causa o cenário de febres cíclicas em infecções estabelecidas. Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, uma pequena proporção destes parasitos se diferencia em estágios sexuados, os gametócitos, que o arão esporozoítos no inseto vetor, após novo repasto sanguíneo. Ainda não se sabe ao certo qual é o estímulo ou mensagem responsável pela produção de gametócitos, a partir dos merozoítos ou esquizontes, mas existem duas hipóteses: a primeira sugere que os merozoítos já estão predeterminados a evoluírem em formas assexuadas ou sexuadas antes de invadirem a hemácia; outra hipótese, ao contrário, sugere que fatores ambientais ou estresse determinem a diferenciação dos merozoítos em gametócitos (DYER e DAY, 2000).

O desenvolvimento de vacinas contra a malária, sobretudo o na busca de um imunógenos efetivos e de baixo custo, representa um desafio científico significativo no

controle dessa infecção. Entretanto, seu progresso ainda é limitado pela complexidade do ciclo de vida do *Plasmodium*, que resulta em uma resposta imunológica específica para cada forma evolutiva, e pelo fato do parasito ter desenvolvido diversas estratégias de defesa contra a resposta imune do hospedeiro (GOOD et al., 2005).

1.3. Antígenos candidatos à vacina

Diversos antígenos de estágios assexuados sangüíneos têm despertado interesse como alvos potenciais de uma possível vacina protetora. Dentre estes antígenos, as proteínas MSP-1 (*m*erozoite *s*urface *p*rotein) e AMA-1 (*a*pical *m*embrane *a*ntigen) têm se destacado como principais objetos de diferentes estudos em malária vivax (HERRERA et al., 2007).

1.3.1. Antígeno 1 de membrana apical (AMA-1)

O antígeno 1 de membrana apical (AMA-1) é uma proteína de 83 kDa sintetizada por estágios sanguíneos maduros do parasito e também por esporozoítos (SILVIE et al., 2004), sendo localizado inicialmente nos micronemas (KOCKEN et al., 2002; FENG et al., 2005). A estrutura primária deduzida da sua sequência gênica sugere que o AMA-1 apresenta características estruturais de uma proteína integral de membrana tipo 1, com um curto domínio transmembrana e uma pequena cauda citoplásmica na região C-terminal (PETERSON et al., 1989; PIZARRO et al., 2005). Em todos os genes caracterizados de AMA-1 de *Plasmodium*, 16 resíduos invariantes de cisteína estão codificados na região ectoplasmática, e a análise do padrão de pontes dissulfeto sugere uma divisão em três domínios distintos, I, II e III, que são estabilizados, respectivamente, com três, duas e três pontes dissulfeto (HODDER et al., 1996; NAIR et al., 2002).

Antes da invasão dos merozoítos nos eritrócitos a proteína AMA-1 é processada em um produto de 66 Kda e então liberada na superfície do merozoíto momentos antes ou durante o processo de invasão (NAIR et al., 2002; PIZARRO et al., 2005). O grau de conservação presente entre as sequências desta proteína implica que sua função biológica seja conservada entre as diferentes espécies de *Plasmodium* (LI et al., 2002) e talvez entre outros apicomplexa (CHESNE-SECK et al., 2005).

Acredita-se que umas das funções desta proteína seja facilitar a reorientação do merozoíto após adesão inicial, de modo que as roptrias e os complexos micronemas sejam expostos na superfície dos eritrócitos durante a invasão do parasito (CHITNIS e BLACKMAN, 2000; MITCHELL et al., 2004), ou ainda, iniciar o contato entre o parasito e o eritrócito, ação dependente da ligação de proteína Duffy (MITCHELL et al., 2004). Além disso, a análise cristalográfica da AMA-1 de *P. vivax* revelou que os seus domínios I e II são estruturalmente similares entre si e pertencem à superfamília PAN de proteínas. Esses domínios PAN fazem parte de proteínas micronemais de Apicomplexa, que desempenham importante papel na invasão ao hospedeiro (PIZARRO et al., 2005).

O potencial antigênico da proteína AMA-1 foi observado, inicialmente, após a imunização de macacos *Rhesus* com a proteína nativa purificada de *P. knowlesi* (PK66), a qual foi capaz de induzir proteção parcial contra a infecção (DEANS et al., 1988). Além disso, imunizações experimentais em roedores e primatas utilizando a proteína recombinante AMA-1 evidenciaram proteção contra malária (KOCKEN et al., 2002; STOWERS et al., 2002). Ensaio clínico de Fase 1, realizados em humanos, demonstraram que AMA-1 de *P. falciparum*, expressa tanto em *Pichia pastoris* quanto em *Escherichia coli* associada a adjuvantes do tipo Alhydrogel ou AS02A é segura e imunogênica, desencadeando potente resposta humoral, celular e de citocinas do tipo IFN- γ e IL-5 quando administrada em indivíduos adultos saudáveis nunca expostos à infecção (MALKIN et al., 2005; DICKO et al., 2007; POLHEMUS et al., 2007). Foi também verificado nesses estudos o desencadeamento de atividade biológica contra malária em ensaio de inibição de invasão in vitro (MALKIN et al., 2005).

Na África, em um estudo soropidemiológico foi observado que crianças maiores de dois anos e adultos apresentavam anticorpos que reconhecem uma proteína

recombinante correspondente a AMA-1 de *P. falciparum*, a PF83 (THOMAS et al., 1994). No Quênia, estudo longitudinal realizado em população residente em área endêmica para *P. falciparum* observou uma considerável proporção de indivíduos portadores de anticorpos naturalmente adquiridos e reatividade celular frente a AMA-1 (UDHAYAKUMAR et al., 2001).

Dos poucos estudos soropidemiológicos descritos na literatura, a maioria tem sido realizada em áreas holo-hiperendêmicas e utilizam como alvo a AMA-1 de *P. falciparum* (MORAIS et al., 2006). No Brasil, a resposta contra AMA-1 de *P. vivax* (Pv-AMA-1) foi avaliada em indivíduos expostos à transmissão e regiões do Estado do Pará; a proteína foi reconhecida por grande parte de indivíduos naturalmente expostos (85%), apresentando predomínio da resposta do tipo IgG1 (RODRIGUES et al., 2005). Outro estudo realizado no Brasil (MORAIS et al., 2006) demonstrou que a proteína AMA-1 de *P. vivax* é naturalmente imunogênica em brasileiros que apresentam diferentes graus de exposição a infecção por malária. Neste estudo, foi observado que a prevalência e os níveis de IgG, IgG1 e IgG3 anti-Pv-AMA-1 aumentam com o tempo de exposição à infecção. Além disso, a frequência de resposta positiva e os níveis de IgG foram maiores em áreas onde a prevalência de malária apresentou maior intensidade (MORAIS et al., 2006).

O polimorfismo dessa proteína ocorre de forma não-aleatória na região codificadora dentro do ectodomínio, especialmente no domínio I (domínio mais polimórfico), sugerindo que essa região seja principal alvo da resposta imune (NATARAJAN et al., 2001). Esse polimorfismo pode ser determinante para a morbidade da doença uma vez que já foi demonstrado forte associação entre forma clínica e os resíduos Glu₁₈₇ e Glu₂₄₃ no gene AMA-1 de *P. falciparum* (FRANKE-FAYARD et al., 2004), e entre trombocitopenia e a presença dos resíduos Y₁₉₃ e S₂₁₀ (GRYNBERG et al., 2007).

De modo geral, apesar de AMA-1 constituir um alvo potencial para inclusão em uma vacina protetora contra malária, existem poucos estudos sobre a caracterização da resposta imune de humanos contra esta proteína (MORAIS, 2005). A maioria dos estudos que vem sendo realizados têm como foco o aspecto imunopidemiológico, notadamente a resposta imune humoral. Dessa forma, estudos direcionados para o

entendimento da interação entre antígenos vacinais e resposta imune do hospedeiro seriam necessários para determinar o papel dessas proteínas na geração de uma resposta imune protetora.

1.3.2. Proteína 1 de superfície de merozoítos (MSP-1)

A proteína 1 de superfície de merozoítos (MSP-1) tem sido intensivamente estudada como alvo potencial para proteção imune (HOLDER, 1988). Essa proteína é sintetizada como um precursor de alto peso molecular (180 a 230 kDa) durante a esquizogonia, e é depois processada em quatro principais fragmentos de proteínas de superfície de merozoítos, de aproximadamente 83, 30, 3 e 42 kDa (HODDER et al., 1996). Em um segundo processamento, ocorre a clivagem do fragmento C-terminal do fragmento de 42 kDa em um peptídeo de 33 kDa, que é liberado na circulação, e em outra porção de 19 kDa, que permanece ancorada, via âncora de glicofosfatidilinositol (GPI), sobre a superfície do merozoíto (BLACKMAN et al., 1990). Esses eventos de clivagem parecem ser essenciais para a invasão do parasito (Blackman et al., 1994). Essa proteína de 19 kDa da região C-terminal da MSP-1 (MSP-1₁₉) é considerada uma das principais candidatas à vacina contra *Plasmodium* (GOOD et al., 2005).

Embora a função precisa da MSP-1₁₉ ainda não seja conhecida, a análise estrutural de cristais de MSP-1₁₉ indica a presença de dois domínios similares ao fator de crescimento epidermal (EGF) (LIM et al., 2004), sendo que a comparação de sequências sugere que a mesma conformação esteja presente em todas as espécies de *Plasmodium* (CHITARRA et al., 1999). De fato, a homologia entre MSP-1₁₉ de *P. vivax* e *P. falciparum* é estimada em torno de 35%, mas sua função parece ser conservada entre as espécies (O'DONNELL et al., 2001).

Em certas condições a MSP-1₁₉ pode induzir imunidade em macacos (KUMAR et al., 2000) e em camundongos (DALY e LONG, 1995; LING et al., 1995; HIRUNPETCHARAT et al., 1997). A vacinação com MSP-1₁₉ de *P. cynomolgi* foi altamente efetiva, induzindo altos títulos de anticorpos contra merozoítos e reduzindo significativamente a parasitemia após o desafio de macacos com as formas sanguíneas

desse parasito (PERERA et al., 1998). Proteção parcial contra a infecção com formas sanguíneas de *P. vivax* também foi obtida em macacos imunizados com a proteína recombinante MSP-1₁₉ (YANG et al., 1999). Em humanos, ensaios de fase 1 evidenciaram a segurança e imunogenicidade da MSP-1₁₉, na qual a imunização de voluntários não-expostos à infecção com diferentes formas alélicas da proteína recombinante induziu altos níveis de citocinas Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4 e IL-10) antígeno-específicos (LEE et al., 2002). Além disso, altos títulos de anticorpos específicos acompanhados de altos índices de proliferação celular e pronunciada resposta de memória detectada por ELISPOT foram demonstrados para essa proteína (OCKENHOUSE et al., 2006). De forma geral, altos títulos de anticorpos anti-MSP-1₁₉ parecem ser essenciais para proteção contra altas parasitemias (GOOD et al., 2005).

A MSP-1₁₉ apresenta polimorfismos (JONGWUTIWES et al., 1993; MILLER et al., 1993; FERREIRA et al., 2003), apesar do efeito desses na imunidade induzida por vacinas em humanos não ser conhecida (GOOD et al., 2005). A análise da sequência de nucleotídeos da MSP-1₁₉ 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 produzidos por indivíduos naturalmente expostos reconhecem predominantemente epítopos conservados presentes em ambas as formas alélicas da proteína (SOARES et al., 1999a).

Em contraste com os intensos estudos realizados com MSP-1₁₉ de *P. falciparum*, poucos estudos são conduzidos utilizando a proteína correspondente de *P. vivax* (MORAIS, 2005). No Brasil, poucos estudos imunoepidemiológicos têm sido conduzidos e normalmente são limitados a uma área de transmissão focal (SOARES et al., 1997; SOARES et al., 1999a; SOARES et al., 1999b). Da mesma forma que para AMA-1, ainda são necessários estudos que demonstrem a interação entre antígenos das vacinas com células do hospedeiro e a geração de resposta imune protetora.

1.4. Resposta imune contra Plasmodium

A resposta imune contra *Plasmodium* pode ser desenvolvida especificamente contra cada um dos estágios do parasito (GOOD et al., 2005). Tem sido demonstrado em modelos experimentais que a sobrevivência à malária é ligada à habilidade de controlar a reprodução dos estágios sanguíneos do parasito nas primeiras semanas após a infecção (STEVENSON e RILEY, 2004). De fato, as formas sanguíneas dos plasmódios são as responsáveis pelas manifestações patológicas da doença, uma vez que os sintomas clínicos são decorrentes do desenvolvimento parasitário durante o ciclo assexuado sanguíneo. A imunidade frente a esses estágios sanguíneos poderia contribuir para a redução ou a eliminação dos parasitos e, conseqüentemente, as manifestações clínicas da doença.

Diversas evidências sugerem que uma imunidade protetora naturalmente adquirida contra a malária seja obtida após infecções sucessivas (COHEN et al., 1961; MCGREGOR, 1974; BAIRD et al., 1991). Crianças intensamente expostas à transmissão apresentam sucessivos episódios clínicos de malária. Com o passar da idade, os sintomas clínicos da doença são menos pronunciados, embora os indivíduos possam apresentar altas parasitemias sanguíneas (EGAN et al., 1996). Em adultos, observa-se parasitemia baixa, refletindo um equilíbrio da relação parasito-hospedeiro e refletindo um estado de premunicação que pode ser bem observado em áreas onde a malária é holo-hiperendêmica (DRUILHE e KHUSMITH, 1987). De uma maneira geral, a imunidade naturalmente adquirida é parcialmente cepa-específica e leva primeiramente a uma redução da taxa de mortalidade e da incidência de complicações e, mais tarde, a um decréscimo da incidência da doença. Por último, essa imunidade naturalmente adquirida leva a uma queda da parasitemia a níveis baixos ou mesmo níveis indetectáveis (WEBSTER e HILL, 2003).

Em regiões de transmissão intensa e estável, onde o *P. falciparum* é espécie predominante, os recém-nascidos são resistentes à infecção durante os primeiros três meses de vida. Essa resistência tem sido atribuída principalmente à transferência passiva de anticorpos protetores IgG da mãe imune para o feto durante a gestação (SEHGAL et al., 1989; CHIZZOLINI et al., 1991; HOGH et al., 1995). De fato,

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 (COHEN e 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).

Na resposta contra os estágios sanguíneos, a eliminação do parasito parece ocorrer após desenvolvimento de uma resposta específica de anticorpos a antígenos variantes de superfície (GOOD et al., 2005). Evidências obtidas na última década mostraram que pelo menos dois mecanismos estão envolvidos, quais sejam, 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 (subclasses IgG1 e IgG3, em humanos) que promovem a inibição do crescimento do parasito intra-eritrocítico em associação com monócitos (DRUILHE e KHUSMITH, 1987; LUNEL e DRUILHE, 1989). Entretanto, apesar dos anticorpos contra as formas sanguíneas ser um importante fator na eliminação do parasito, a imunidade mediada por células contribui nesse processo (GOOD et al., 2005).

Pombo e colaboradores (2002) descreveram a resposta celular obtida em voluntários não-imunes após inóculo de doses ultrabaixas de formas sanguíneas do parasito, observando resposta proliferativa de células T envolvendo células CD4⁺ e CD8⁺ e, ainda, uma produção de citocinas, primariamente de IFN- γ , porém não de IL-4 e IL-10, consistindo em uma resposta imunológica do tipo Th1. De fato, IFN- γ e células CD4⁺ são capazes de ativar macrófagos que fagocitariam eritrócitos infectados e merozoítos livres (STEVENSON e RILEY, 2004). Além disso, foi observada também uma alta concentração da atividade da enzima óxido nítrico sintase em células mononucleares do sangue periférico em indivíduos subsequentemente desafiados com o parasito (POMBO et al., 2002).

Ao contrário do demonstrado para infecções por outros antígenos intracelulares, incluindo vírus (LEHNER et al., 2007), bactérias (MEDZHITOV, 2007) e alguns protozoários (HONDOWICZ e SCOTT, 1999; GOLGHER e GAZZINELLI, 2004; NG

et al., 2007), em que o papel da resposta imune inata tem sido bastante investigado, relativamente poucos estudos são direcionados para a resposta inata à malária. As interações iniciais entre estágios sanguíneos do parasito e as células do sistema imune inato são consideradas importantes para moldar a resposta imune adaptativa contra a infecção (ING et al., 2006). Além disso, a resposta imune inata é essencial não somente para limitar a fase inicial de multiplicação do parasito como também a primeira onda de parasitemia, controlando a infecção até que a imunidade adaptativa seja estabelecida (STEVENSON e RILEY, 2004). A indução dos mecanismos que caracterizam a imunidade inata independe do contato prévio do hospedeiro com o patógeno, indicando que sua ativação é mediada por moléculas conservadas entre as diferentes espécies ou cepas do microorganismo (STEVENSON e RILEY, 2004).

Dentre os componentes envolvidos na imunidade inata se encontram as células “Natural Killer” (NK), células NKT, células T $\gamma\delta$, os macrófagos e as células dendríticas. A localização das células NK na medula óssea, baço e sangue periférico permite que essas células tenham maior probabilidade de contato com eritrócitos parasitados.

Na resposta imune inata, as células NK representam uma importante fonte inicial de IFN- γ e são responsáveis pela eliminação do parasito devido aos processos de citotoxicidade desencadeados em resposta ao parasito (OJO-AMAIZE et al., 1984; DOOLAN e HOFFMAN, 1999; ARTAVANIS-TSAKONAS e RILEY, 2002). Tanto as células NKT quanto as células T $\gamma\delta$ contribuem para imunidade antimalárica, desempenhando papel crucial no desenvolvimento das respostas inata e adaptativa (STEVENSON e RILEY, 2004). Enquanto as células NKT atuam contra o desenvolvimento de formas pré-eritrocíticas em hepatócitos (SCHMIEG et al., 2003), as células T $\gamma\delta$ são encontradas em maior número nas infecções agudas por *P. falciparum* e *P. vivax*, desencadeam a produção de IFN- γ , e possuem funções antiparasitárias (ELLOSO et al., 1994; LANGHORNE et al., 1994; HENSMANN e KWIATKOWSKI, 2001). Durante a infecção por *Plasmodium*, além de atuarem como células apresentadoras de antígenos, os macrófagos apresentam um importante papel na imunidade inata devido a sua habilidade de fagocitar eritrócitos infectados na ausência de anticorpos específicos citofílicos e/ou opsonizantes, em uma interação envolvendo o

receptor de superfície CD36 e a proteína PfEMP-1 (*P. falciparum*-encoded erythrocyte membrane protein 1) (SERGHIDES et al., 2003).

Um dos componentes da resposta imune inata raramente explorado na malária humana são as células dendríticas, responsáveis pela iniciação da resposta pró-inflamatória após apresentação de antígenos para as células T do hospedeiro (LANGHORNE et al., 2004). Durante a última década, enfoque tem sido dado à importância das células dendríticas na iniciação da resposta imune adaptativa e definição do tipo da resposta imunológica (BANCHEREAU et al., 2000). As células dendríticas são as únicas células apresentadoras de antígenos capazes de ativar células T não-primadas (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998). Além disso, tem se tornado evidente que as células dendríticas desempenham um papel crítico na amplificação da resposta imune inata, particularmente estimulando a ativação de células NK (FERLAZZO et al., 2002; GEROSA et al., 2005). Dessa forma, as células dendríticas também possuem um papel central tanto na resposta imune inata quanto na resposta imune adaptativa (STEVENSON e RILEY, 2004).

Os principais estudos associando a infecção malárica e o papel de células dendríticas têm sido realizados em modelo murino (SEIXAS et al., 2001; LUYENDYK et al., 2002; OCANA-MORGNER et al., 2003). Dentre eles, um resultado interessante apresentado por Ocana-Morger e colaboradores (2003) demonstrou que as células dendríticas parecem ser responsáveis pela inibição da resposta de células T CD8⁺; a maturação de células dendríticas derivadas de medula óssea é inibida e a sobrevivência de células dendríticas é aumentada após sua exposição aos parasitos sanguíneos. Além disso, esses autores demonstraram que o padrão e secreção de citocinas por células dendríticas é profundamente modificado após contato com o parasito, e que somente as formas sanguíneas são responsáveis pela inibição de células T CD8⁺.

Poucos estudos visam à compreensão do papel das células dendríticas humanas na resposta a antígenos de plasmódios (URBAN e ROBERTS, 2003; VICHCHATHORN et al., 2006). Um estudo consistente com os achados em modelo murino demonstra que eritrócitos infectados por *P. falciparum*, quando cultivados *in vitro* com células dendríticas derivadas de monócitos do sangue periférico, inibem sua

maturação e sua subsequente habilidade em ativar células T após o contato direto por citoaderência (URBAN et al., 1999). Essa citoaderência de eritrócitos infectados a células dendríticas resultaram no aumento da secreção de IL-10 e inibição de células T CD4⁺ primárias e secundárias (URBAN et al., 2001b). Outro estudo demonstrou que células dendríticas circulantes no sangue periférico de crianças quenianas que apresentaram malária falciparum grave ou moderada tiveram expressão de HLA-DR diminuída em comparação a crianças saudáveis, apesar de não ser observada alteração no número total dessas células (URBAN et al., 2001a). Para *P. vivax*, o único estudo descrito até o momento envolvendo células dendríticas mostrou apenas uma resposta frente ao estágio pré-eritrocítico do parasito. Nesse estudo foi demonstrado que células dendríticas estimuladas por esporozoítos foram capazes de ativar linfócitos citotóxicos, levando a uma eliminação específica de hepatócitos infectados (VICHCHATHORN et al., 2006).

No desenvolvimento de vacinas contra a malária, devido à natureza do processo de imunização, um enfoque maior tem sido dado para a imunidade adaptativa. Assim, o estudo da interação das células dendríticas com antígenos candidatos à vacina contribui para o entendimento da geração da resposta imune protetora e para o desenvolvimento de possíveis vacinas efetivas no futuro.

2. JUSTIFICATIVA

A malária é uma das doenças parasitárias de maior importância global e uma das principais causas de morbidade e mortalidade nas áreas tropicais e subtropicais do mundo. É estimado que mais de 2,7 milhões de pessoas, sua maioria crianças, morram a cada ano, e que mais de 2 bilhões residam em regiões endêmicas para a doença (WEBSTER e HILL, 2003). No Brasil, a malária é endêmica na Amazônia brasileira, onde ocorre a transmissão simultânea do *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, sendo *P. vivax* a espécie prevalente, responsável por cerca de 80% dos casos registrados (SIVEP, 2005). Diferentemente de *P. falciparum*, a infecção por *P. vivax* raramente leva a quadros letais, causando a forma maliciosa denominada terço benigna. Entretanto, a prostração constante causada pela sua infecção não pode ser considerada benigna, sendo causa importante de morbidade e perdas socioeconômicas (CUI et al., 2003). Além disso, ao contrário do *P. falciparum*, que pode ser facilmente cultivado *in vitro*, o cultivo de *P. vivax* ainda é restrito a poucos laboratórios (GOLENDÁ et al., 1997), o que restringe os estudos sobre os mecanismos imunológicos que operam durante a infecção por esta espécie.

A disseminação da malária tende a aumentar continuamente conforme ocorra dispersão da resistência ao tratamento, aumento da resistência do *Anopheles* a inseticidas e, ainda, falta de infra-estrutura necessária para o combate do problema. Esse aumento ocorre a despeito da evidência de que certos mecanismos de controle, tais como uso de inseticidas e desenvolvimento de novas drogas, têm provado sua eficiência (NEVILL et al., 1996; WINSTANLEY et al., 1997). Portanto, como ferramenta adicional de controle, uma vacina efetiva contra essa doença parasitária é urgentemente necessária (CUI et al., 2003).

Diversos antígenos de estágios assexuados sanguíneos têm despertado interesse como alvos potenciais de uma vacina protetora. Dentre esses antígenos, as proteínas AMA-1 (Apical Membrane Antigen 1) e MSP-1 (Merozoite Surface Protein 1) têm se destacado como principais objetos em diferentes estudos em malária. A maioria dos estudos clínicos utilizando esses antígenos é voltada para um enfoque

soroepidemiológico, tentando esclarecer o papel da dinâmica de transmissão na resposta imune naturalmente adquirida e no entendimento dos possíveis mecanismos humorais envolvidos na proteção contra a malária. Apesar desses estudos terem contribuído para o conhecimento da resposta imune naturalmente adaptativa contra a malária, que é um pré-requisito para o desenvolvimento de uma vacina, pouco ainda é conhecido sobre os mecanismos de resposta imune celular que desencadeiam esta proteção.

Devido à natureza do processo de imunização, os estudos sobre resposta imune de candidatos à vacina são voltados principalmente para a imunidade adaptativa. No entanto, pouco ainda é conhecido sobre a imunidade inata associada à essas proteínas, sendo essencial para limitar a fase inicial de multiplicação do parasito, controlar a primeira onda de parasitemia e moldar a resposta adaptativa (STEVENSON e RILEY, 2004).

Um dos componentes da resposta imune inata raramente explorado na malária humana são as células dendríticas, responsáveis pela iniciação da resposta pró-inflamatória após apresentação de antígenos para as células T do hospedeiro (LANGHORNE et al., 2004). As células dendríticas possuem um papel central tanto na resposta imune inata quanto na resposta imune adaptativa (STEVENSON e RILEY, 2004). Alguns estudos em malária humana e murina sugerem que função das células dendríticas pode ser modulada por eritrócitos infectados, incluindo a inibição da maturação das células dendríticas (URBAN et al., 1999; OCANA-MORGNER et al., 2003).

Assim, no presente trabalho, investigamos o efeito dos candidatos à vacina contra *P. vivax*, AMA-1 e MSP-1₁₉, na resposta imune de indivíduos não-expostos à infecção malárica, representando a imunidade inata desencadeada por esses antígenos.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Avaliar aspectos da resposta imune inata frente a antígenos recombinantes de *P. vivax* (AMA-1 e MSP-1₁₉) em indivíduos não expostos à infecção por malária.

3.2. *Objetivos específicos*

- Definir as condições ideais para a realização de um ensaio *in vitro* para diferenciação de células mononucleares do sangue periférico em células dendríticas;
- Verificar a expressão de moléculas de superfície, incluindo moléculas de apresentação de antígenos (CD1a, HLA-A,B,C e HLA-DR), moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86), moléculas receptor de imunoglobulinas (CD16 e CD64) e integrina de membrana (CD11c), em células dendríticas derivadas de monócitos diferenciadas na presença dos antígenos recombinantes de *P. vivax*;
- Avaliar a produção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-12) e quimiocinas (CCL3/MIP1- α , CCL5/RANTES, CCL17/TARC e CXCL10/IP-10) secretadas por células dendríticas derivadas de monócitos diferenciadas na presença de Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉;
- Avaliar a cinética da produção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-12) e quimiocinas (CCL3/MIP1- α , CCL5/RANTES, CCL17/TARC e CXCL10/IP-10) em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉;

- Determinar a produção de óxido nítrico nos sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas por Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉ de indivíduos não expostos à infecção por *P. vivax*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Indivíduos e área de estudo

Dezoito indivíduos adultos, do gênero masculino ou feminino, nunca expostos à malária foram selecionados na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, área não-endêmica para malária. Amostras de sangue de 13 indivíduos foram utilizadas para os experimentos de células dendríticas e de nove indivíduos, para experimentos com PBMCs. O tamanho amostral foi calculado pelo software Sample Size Calculator (Creative Research Systems, USA). 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 no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais em 10 de Abril de 2007/ ETIC 060/07). Amostras de sangue foram coletadas em 4 tubos heparinizados. O desenho experimental utilizado encontra-se descrito na Figura 3.

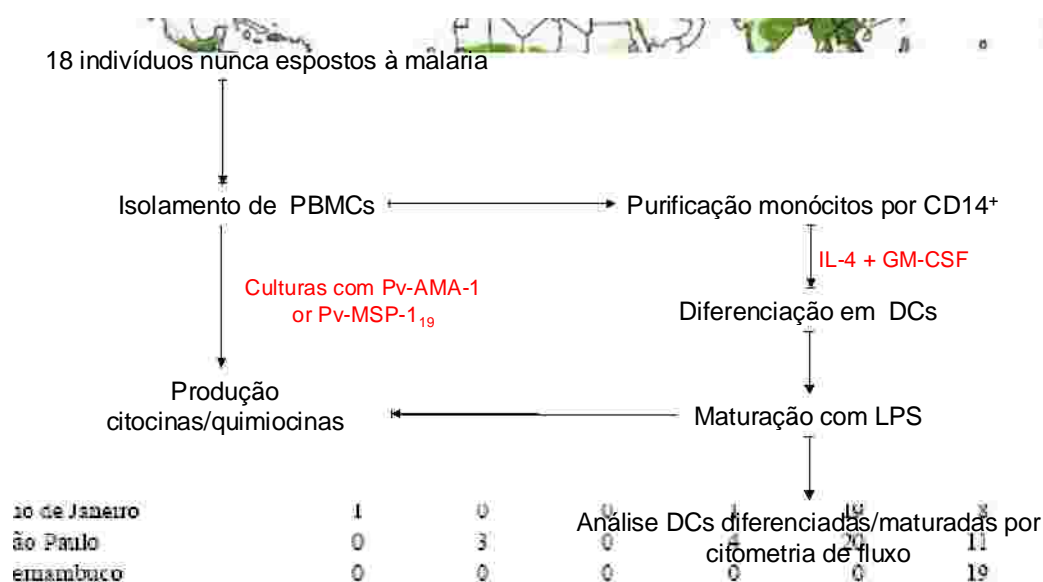


Figura 3. Desenho experimental.

4.2. Antígenos

Duas proteínas recombinantes representando antígenos de estágios sanguíneos de *P. vivax* foram utilizadas nos ensaios para avaliação da resposta imune celular, o fragmento de 19 kDa da região C-terminal da Proteína 1 de Superfície de Merozoíto (Pv-MSP-1₁₉) e o Antígeno 1 de Membrana Apical (Pv-AMA-1). Estes antígenos recombinantes nos foram gentilmente cedidos pelo Dr^a. Irene Soares, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, USP.

4.2.1. Fragmento de 19 kDa da região C-terminal da Proteína 1 de Superfície de Merozoíto de *P. vivax* (Pv-MSP-1₁₉)

A proteína recombinante correspondente ao fragmento de 19 kDa da região C-terminal da MSP-1 de *P. vivax* (aminoácidos 1616-1704; cepa Belém) consiste em uma proteína de fusão de peso molecular aparente de 36 kDa, expressa em *E. coli* (DH5a) juntamente com o gene da glutathione S transferase (GST de *Schistosoma japonicum*, a partir do vetor de expressão pGEX-3x. A proteína encontra-se esquematicamente representada na Figura 4.

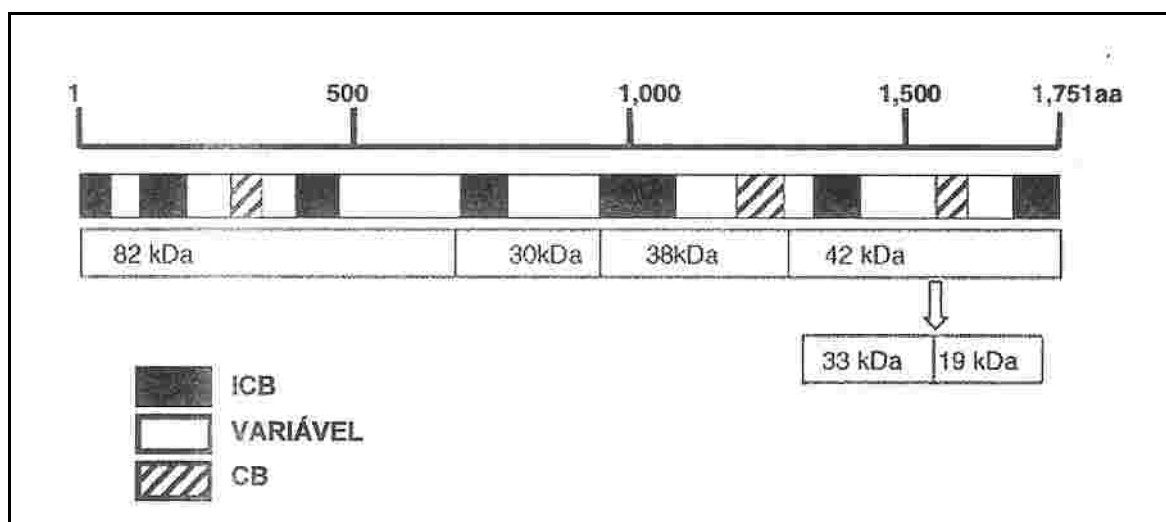


Figura 4. Desenho esquemático da MSP-1 de *P. vivax*, representando os blocos conservados entre as espécies de *Plasmodium* (ICB), regiões semiconservadas (CB) e variáveis, assim como o fragmento de 19 kDa derivado de um segundo processamento da MSP-1 (adaptado de Del Portillo et al., 1991).

4.2.2. Antígeno 1 da Membrana Apical de *P. vivax* (Pv-AMA-1)

A proteína recombinante de 66 kDa correspondente ao Antígeno 1 de Membrana Apical de *P. vivax* (Pv-AMA-1) foi produzida em *E. coli* a partir do vetor de expressão pET-22b abrangendo as regiões codificadoras dos ectodomínios I, II e III da proteína, como representado na Figura 5.

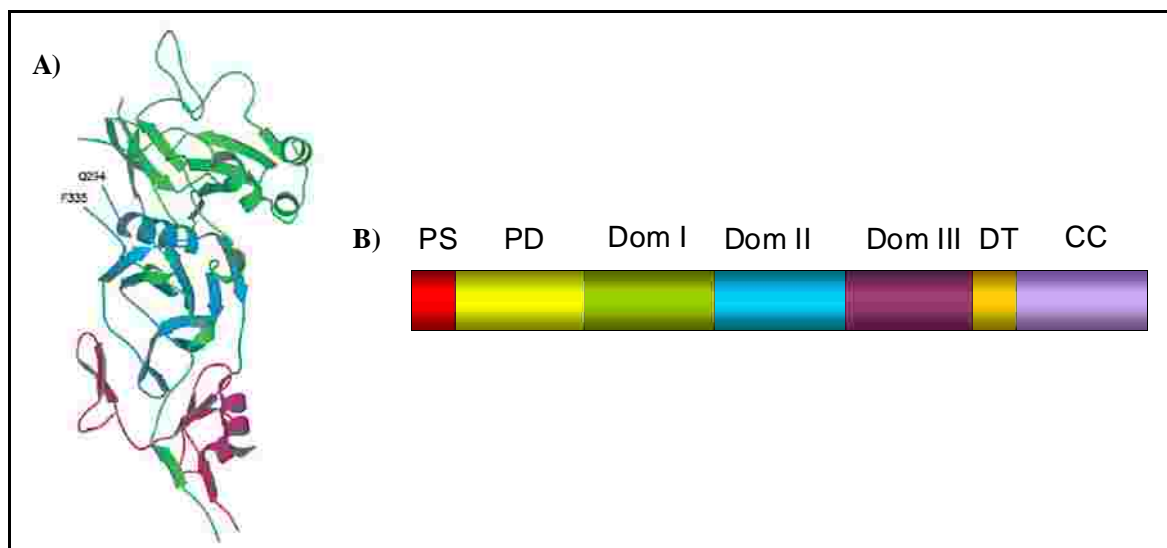


Figura 5. Antígeno de Membrana Apical 1. A) Estrutura terciária do gene PvAMA-1: verde = domínio I, azul = domínio II e verde = domínio III. Fig. a extraída de Pizarro et al, 2005). B) Esquema do Antígeno de Membrana Apical 1: PS = Peptídeo sinal, PD = Pró-domínio, Dom I = Domínio I, Dom II = Domínio II, Dom III = Domínio III, DT = Domínio transmembrano e CC = Cauda citoplasmática. Figura adaptada de Hodder et al, 1996.

4.2.3. Teste de contaminação por endotoxinas

Considerando que os antígenos recombinantes de malária utilizados neste trabalho (Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉) foram produzidos em *E. coli*, foi realizado um teste para determinação da presença de endotoxinas de bactérias gram-negativas (LPS), usando o kit comercial cromogênico de lisado de amebócito de *Limulus* (*Limulus* Amebocyte Lysate test, QCL-1000, Cambrex, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Esse teste também foi aplicado para todos os reagentes de cultura utilizados no estudo.

Os resultados do teste demonstraram que as preparações antigênicas bem como os demais reagentes de cultura apresentaram níveis não significativos de endotoxinas, ou seja, níveis menores do que o limite de detecção do ensaio (5 EU/mL), garantindo a qualidade dos resultados obtidos.

4.3. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico

Para separação dos PBMCs, aproximadamente 35 mL de sangue periférico de cada indivíduo, coletados em tubos heparinizados, foram aplicados lentamente sobre 10 mL de solução de Ficoll-Hypaque (Histopaque[®] 1.077, Sigma, EUA) em tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon 2074, BD Biosciences, EUA), e foram centrifugados a 400 g por 40 minutos em temperatura ambiente. O anel contendo as células mononucleares, formado na interface entre plasma e eritrócitos, foi coletado e lavado por duas vezes a 400 g por 10 minutos com meio DMEM (Sigma, EUA). Ao final, as células foram ressuspensas para 1 mL e foi realizada a contagem das mesmas. Para contagem celular foi utilizada a câmara hemocitométrica de Neubauer estando as células diluídas (1:20) em Solução de Turcks. O volume final foi ajustado para 1×10^7 células/mL.

4.4. Diferenciação de células dendríticas na presença dos antígenos recombinantes Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉

Para a diferenciação em células dendríticas, monócitos foram isolados a partir de suspensão de PBMC obtida conforme descrito acima.

Para o isolamento de monócitos, foi utilizada a técnica de separação celular por colunas magnéticas (MACS, magnetic activated cell sorting). Em resumo, os monócitos (células CD14⁺) foram magneticamente marcados com microesferas anti-CD14. Em seguida, a suspensão celular foi transferida para colunas LS e então foram colocadas em campo magnético de um separador MACS (QuadroMACS[®], Miltenyi Biotec, EUA). Células não marcadas passaram pela coluna na presença de campo magnético. Após remoção da coluna do campo magnético, as células CD14⁺ magneticamente retidas (seleção positiva) foram eluídas (PBS pH 7,2 com 0,5% BSA e 2 mM EDTA), lavadas (PBS), contadas em câmara de Neubauer, e distribuídas em tubo de poliestireno

(1×10^6 monócitos/tubo) contendo meio de cultura completo (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 40 mg/L de gentamicina e 300 µg de L-glutamina a 2 mM).

A diferenciação de monócitos foi realizada pela presença das citocinas humanas IL-4 e GM-CSF, segundo protocolo descrito por Urban et al. (1999). Resumidamente, 1 µg/mL de IL-4 e de GM-CSF (PeproTech, EUA) foram acrescentados nos dias 1, 3 e 5, em culturas com presença ou ausência dos antígenos Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉ (1 µg/tubo) adicionados nos mesmos dias de cultura, gerando células dendríticas imaturas (iDCs). No sétimo dia de cultura, as células foram maturadas na presença de 10 µg/mL de LPS (Sigma, EUA) por 48 horas, resultando em células dendríticas maduras (mDCs). As culturas em diferenciação e maturação foram mantidas em estufa humidificada a 37 °C e 5% CO₂.

4.5. Culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Células mononucleares do sangue periférico (5×10^5) foram distribuídas em placas de cultura de 48 wells (Corning, USA), estimuladas com Pv-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉ na concentração de 1 µg/poço, e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 1, 2, 4 e 6 dias. Culturas adicionais estimuladas com mitógeno PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma) foram realizadas como controles positivos. Para a determinação de produção de citocinas e quimiocinas, sobrenadantes foram coletados, aliqüotados e estocados a – 80°C até a realização dos ensaios.

4.6. Perfil fenotípico de células dendríticas diferenciadas na presença ou ausência dos antígenos recombinantes Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉

Após diferenciação e maturação, o perfil fenotípico das células dendríticas foi determinado por citometria de fluxo, avaliando a expressão de moléculas de superfície, incluindo moléculas de apresentação de antígenos (CD1a, HLA-A,B,C e HLA-DR),

moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86), moléculas receptor de imunoglobulinas (CD16 e CD64) e integrina de membrana (CD11c), esta última para determinar o processo de diferenciação. Os anticorpos utilizados foram específicos para os marcadores celulares humanos CD1a PE-Cy5 (conjugado com ficoeritrina e Cy5, fusionados), HLA-A,B,C PE (conjugado com ficoeritrina), HLA-DR PE-Cy5, CD40 PE, CD80 FITC (conjugado com isotiocianato de fluoresceína), CD86 PE, CD16 PE, CD64 FITC e CD11c PE (BD Pharmingen, EUA).

A marcação celular foi realizada pela incubação de células dendríticas diferenciadas e maturadas com os respectivos anticorpos, em temperatura ambiente por 20 minutos; lavados com PBS e centrifugados por 10 minutos a 400 g. As células marcadas foram ressuspensas em 50 µL de PBS e analisadas em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, EUA).

4.7 Determinação da produção de citocinas por “cytometric bead array” (CBA)

Sobrenadantes de culturas foram coletados para determinação da produção das seguintes citocinas: IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ (Th1/Th2 kit Cytometric Bead Array – CBA, BD Pharmingen, EUA), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O princípio da técnica de CBA baseia-se no uso de seis populações de microesferas com diferentes intensidades de fluorescência; cada população de microesferas foi sensibilizada com anticorpos de captura específicos para IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ . Essas microesferas específicas para determinadas citocinas foram detectadas em citômetro de fluxo e a quantidade de citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura foi determinada pela intensidade de fluorescência. Resumidamente, uma alíquota (50 µL) de sobrenadante foi incubada com 15 µL da mistura de microesferas específicas anticitocinas por 3 horas à temperatura ambiente, seguida por uma lavagem com tampão contendo 1% BSA em PBS e centrifugação a 600 g por 7 minutos. Após o descarte dos sobrenadantes, as microesferas foram

incubadas com 18 μ L da mistura de anticorpos anticitocinas humanas conjugadas com PE, por 30 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Finalmente, as microesferas foram lavadas novamente e ressuspensas em 100 μ L do tampão de lavagem, e então analisadas no citômetro de fluxo (FACScan[®], BD Biosciences, EUA). Para quantificação da citocinas, padrões contendo concentrações conhecidas de cada citocina foram processados em paralelo. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software BD CBA (BD Biosciences, EUA). Resultados foram obtidos em pg/mL, e os limites de detecção foram de: 2,6 pg/mL para IL-2 e IL-4; 2,8 pg/mL para IL-10 e TNF- α ; 2,4 pg/mL para IL-5; e 7,1 pg/mL para IFN- γ .

As razões entre as citocinas TNF- α /IL-10 e IFN- γ /IL-10 foram calculadas para determinar o perfil pró ou anti-inflamatório resultante nas culturas, conforme descrito previamente (RHEE et al., 2001).

4.8. Determinação da produção de citocinas e quimiocinas por ELISA de captura

As citocinas IL-12 e TGF- β , e as quimiocinas CCL3/MIP-1a, CCL5/RANTES, CCL17/TARC e CXCL10/IP-10 foram detectadas e quantificadas nos sobrenadantes de cultura utilizando-se kits comerciais (R&D Systems, EUA). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Para detecção do ensaio foram utilizados anticorpos de detecção biotinilados combinados com estreptavidina-HRP (Amersham Biosciences, EUA) e o cromógeno OPD (Sigma). A reação colorimétrica foi analisada em um leitor de microplacas de ELISA (492 nm). O cálculo das concentrações finais de citocinas e quimiocinas a partir dos valores médios de densidade óptica foi obtido pela interpolação de uma curva padrão utilizando-se o software SOFTmax[®] Pro 4.8. Resultados foram obtidos em pg/mL, e os limites de detecção foram de: 15,6 pg/mL para CXCL10; TGF- β e IL-12; 7,8 pg/mL para CCL5; e 3,9 pg/mL para CCL3 e CCL17.

4.9. Determinação dos níveis de óxido nítrico em sobrenadantes de culturas de PBMCs estimuladas com Pv-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉

A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada pela reação de Griess, em um ensaio colorimétrico baseado na análise indireta dos níveis de nitrito presentes em sobrenadantes de cultura estimulados (GREEN et al., 1982). Resumidamente, em 100 µL de sobrenadante foram adicionados uma mistura de 50 µL de 0,1% N-(1-Naftil)-etilenodiamina) e 50 µL de 1,0% de Sulfanilamida em 3,0% de ácido fosfórico (Sigma, EUA), a temperatura ambiente. A absorbância foi lida após 5 minutos de reação em um leitor de microplacas de ELISA no comprimento de onda de 550 nm. A concentração de nitrito das amostras foi determinada pela interpolação a partir de uma curva padrão de solução de nitrito de sódio, e o limite de detecção foi de 0,78 µM.

4.10. Análise estatística

O teste Kolmogorov-Smirnoff foi inicialmente utilizado para determinar a normalidade dos dados. Para variáveis com distribuição gaussiana, o teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para comparar média de grupos independentes, seguido pelo teste t de comparação múltipla de Dunnet, utilizado para comparar culturas estimuladas com antígenos em relação à cultura controle. As diferenças obtidas foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de P foi igual ou menor que 0,05; todos os valores de P refletem uma análise bimodal. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando-se os pacotes Prism for Windows 4.0 (GraphPad, Inc) e SPSS 16.0 for Windows (SPSS, Inc).

5. RESULTADOS

5.1. Estabelecimento de condições de cultura para diferenciação de monócitos em células dendríticas

Para o estabelecimento das condições de diferenciação de monócitos em células dendríticas foram utilizados protocolos já descritos na literatura (URBAN et al., 1999; SEMNANI et al., 2001; SEMNANI et al., 2003; VICHATHORN et al., 2006). Na implementação do procedimento no Laboratório de Malária (ICB – UFMG) foram testadas diferentes condições experimentais, com variação para concentrações de microesferas magnéticas específicas para o receptor CD14, número de passagem de células em colunas magnéticas, tempo de cultura, concentração dos fatores de diferenciação (IL-4 e GM-CSF) e de antígenos recombinantes de *P. vivax*, e tempo de maturação celular.

Após otimização do processo, observou-se que a melhor separação de monócitos a partir de PBMCs foi obtida quando utilizada uma concentração 7 μ L de microesferas anti-CD14 para cada 10^7 células mononucleares do sangue periférico. No teste de número de passagens de células em colunas magnéticas, observou-se que após uma passagem foi obtida uma pureza média de 97,4% de monócitos e um rendimento médio de 97,9% após separação (Figura 6). Para duas ou mais passagens, a pureza média aumentou para 98,2%, enquanto o rendimento médio foi de 98,6%, não representando aumento significativo quando comparado a rendimento obtido após somente uma passagem. Devido ao custo-benefício do procedimento, foi definido que apenas uma passagem em coluna magnética seria utilizada nos procedimentos de separação.

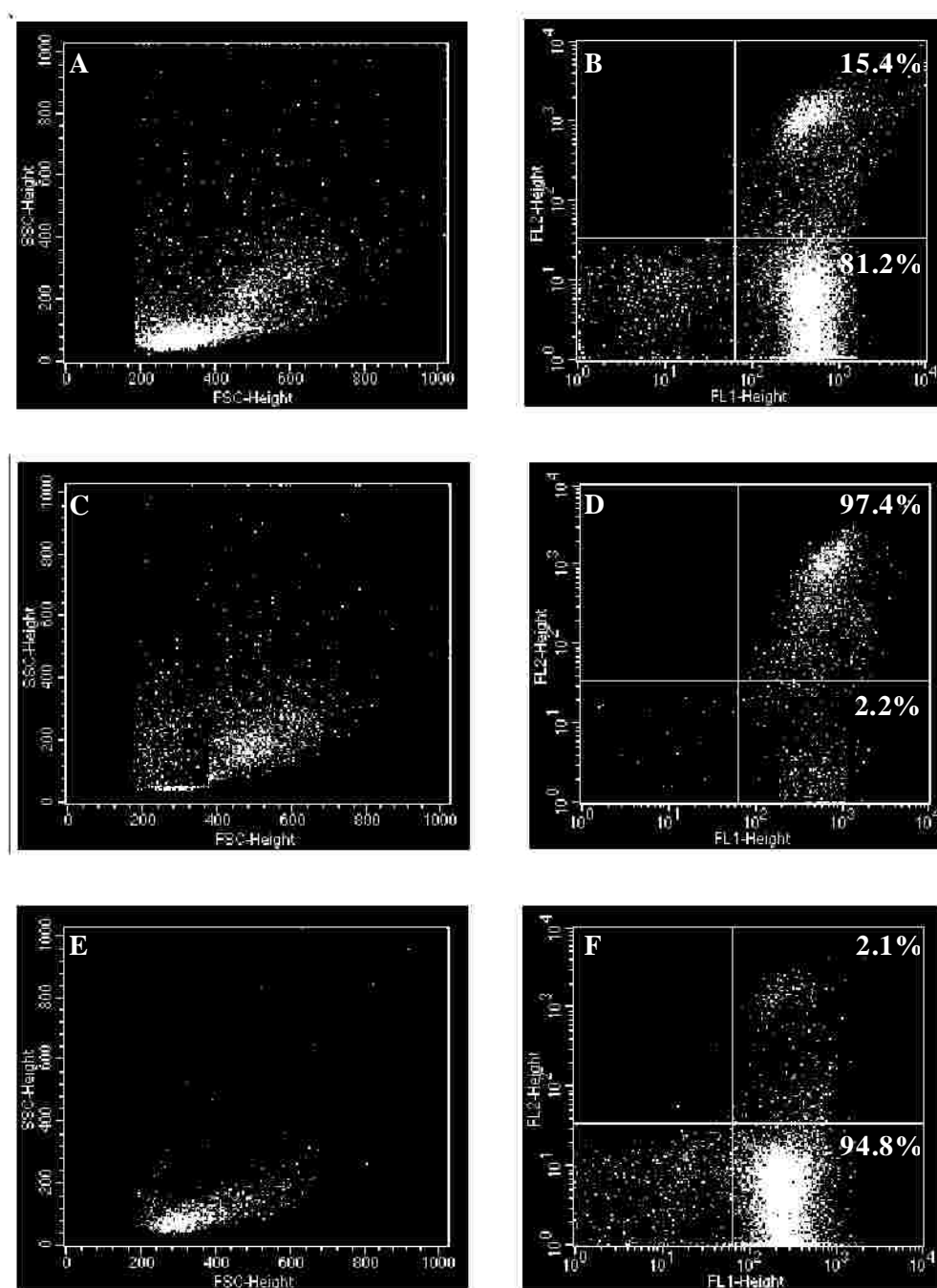


Figura 6. Análise de pureza e rendimento após isolamento de monócitos a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). A) Perfil fenotípico de PBMCs B) Análise da expressão de CD45 (FL1) e CD14 (FL2). C) Perfil fenotípico de monócitos após seleção positiva em colunas magnéticas. D) Análise da expressão de CD45 (FL1) e CD14 (FL2), representando a pureza da população de monócitos. E) Perfil fenotípico de células não selecionadas em colunas magnéticas. F) Análise da expressão de CD45 (FL1) e CD14 (FL2), representando o rendimento de monócitos obtidos no processo de isolamento.

O tempo de cultura, concentração dos fatores utilizados na diferenciação e tempo de maturação celular foram determinados a partir do aumento de expressão da integrina de membrana CD11c, que determina a diferenciação de monócitos em células dendríticas. Conforme descritos na metodologia, as melhores condições determinadas foram de sete dias de diferenciação, na presença de antígenos e adição de fatores de diferenciação em dias alternados, e utilização de 1 µg/poço de IL-4 e GM-CSF, e 1 µg/poço de cada antígeno recombinante testado. O tempo de maturação celular por LPS foi definido em 48 horas de cultura. A Figura 7 demonstra o processo final de diferenciação de monócitos em células dendríticas evidenciado pelo aumento relativo da expressão de CD11c.

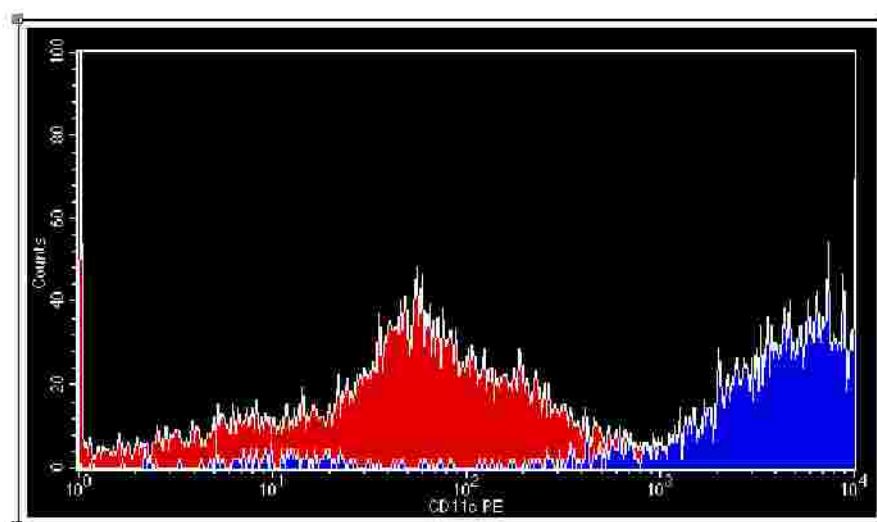


Figura 7. Análise de diferenciação de monócitos em células dendríticas pela expressão relativa de CD11c. Em vermelho, expressão de CD11c em monócitos. Em azul, expressão de CD11c em monócitos diferenciados em células dendríticas.

5.2. Alterações induzidas por antígenos recombinantes e P. vivax na expressão de moléculas de superfície de células dendríticas derivadas de monócitos

A análise da expressão de marcadores de superfície celular de células dendríticas derivadas de monócitos mostraram que somente Pv-AMA-1 induziu uma expressão molecular alterada quando comparada à DCs maduras e imaturas (Figuras 8, 9, 10 e 11). Nenhuma alteração substancial foi observada na expressão de marcadores de superfície celular de DCs derivadas de monócitos diferenciadas na presença de Pv-MSP-1₁₉, quando comparada aos controles apropriados. A diferenciação de monócitos em DCs na presença de Pv-AMA-1 induziu um decréscimo significativo na expressão da integrina de membrana CD11c ($P = 0,0290$) (Figuras 8A e B), e também de moléculas co-estimulatórias CD40 ($P = 0,0260$) e CD86 ($P = 0,0280$, Figuras 9A e B). Além disso, essa mesma proteína gerou um aumento significativo na expressão da molécula co-estimulatória CD80 e no receptor de imunoglobulina CD64/Fc γ RI ($P = 0,0330$ and $P = 0,0340$, respectivamente) (Figuras 9A, 9B, 10A e 10B). Nenhuma alteração significativa foi observada na expressão de moléculas apresentadoras de antígenos (HLA-DR, HLA-A,B,C e CD1a) (Figuras 11A e 11B), e no receptor de imunoglobulinas CD16/Fc γ RIII (Figuras 11 A e B) quando os monócitos foram diferenciados na presença de Pv-AMA-1.

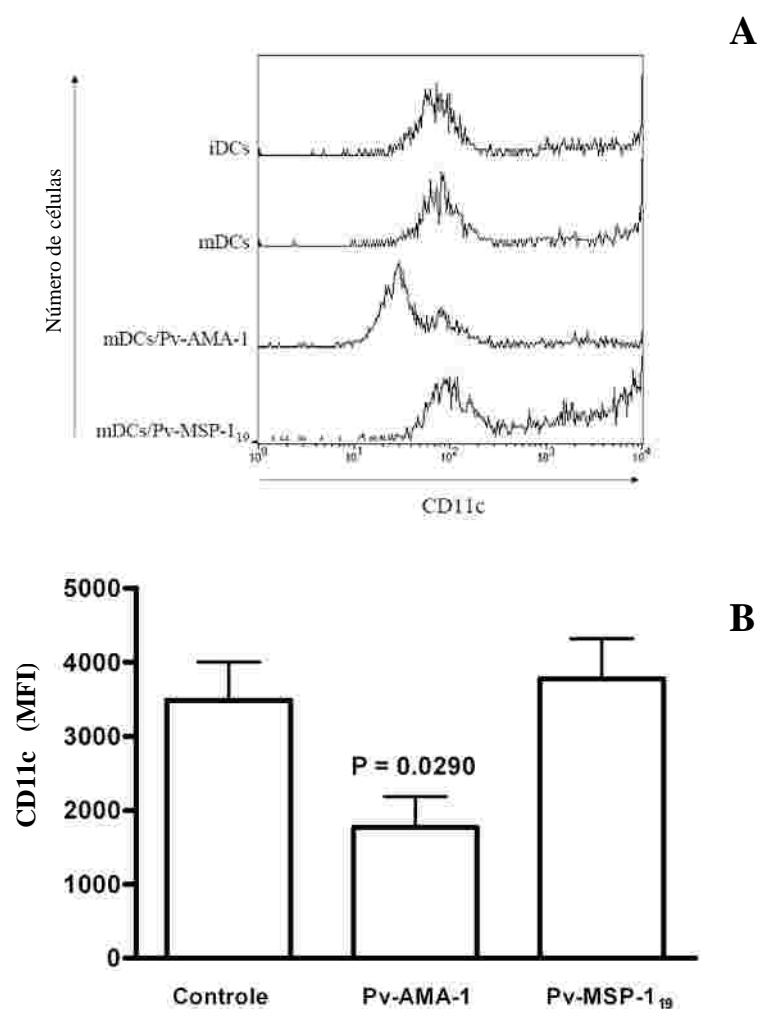


Figura 8. Análise por citometria de fluxo de células dendríticas derivadas e monócitos. (A) Expressão do marcador de superfície celular CD11c. DCs imaturas (iDCs), DCs maturadas por LPS (mDCs), DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-AMA-1 (mDCs/Pv-AMA-1) and DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-MSP-1₁₉ (mDCs/Pv-MSP-1₁₉). Intensidade média de fluorescência indicada no eixo X. Dados representativos de uma entre 13 amostras. (B) Intensidade média de fluorescência (MFI) \pm erro padrão da expressão de CD11c. Controle (DCs maturadas por LPS) e DCs maturadas incubadas com Pv-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉ (n = 13). Intensidade média de fluorescência está representada no eixo Y.

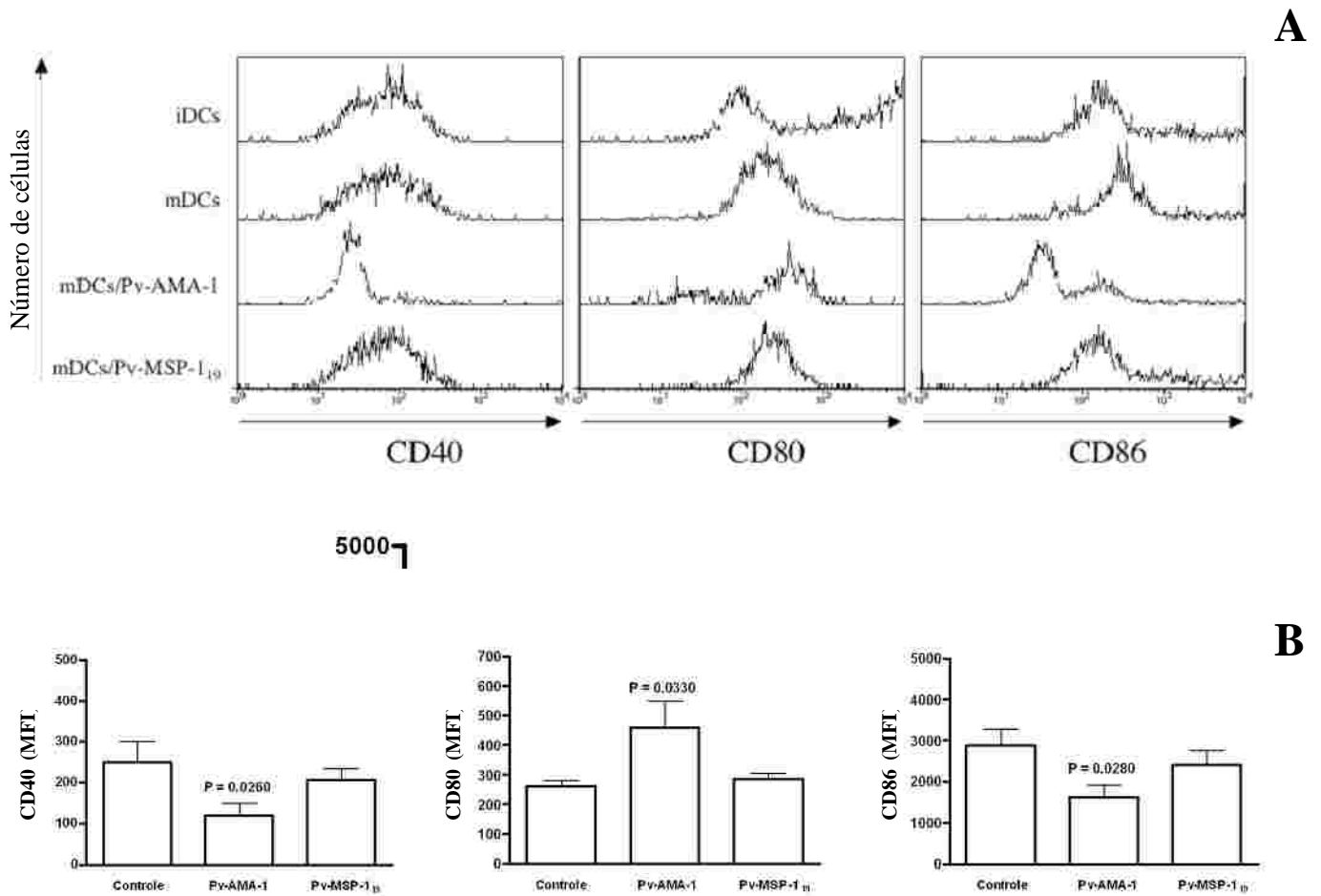


Figura 9. Análise por citometria de fluxo de células dendríticas derivadas e monócitos. (A) Expressão dos marcadores de superfície celular CD40, CD80 e CD86. DCs imaturas (iDCs), DCs maturadas por LPS (mDCs), DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-AMA-1 (mDCs/Pv-AMA-1) and DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-MSP-1₁₉ (mDCs/Pv-MSP-1₁₉). Intensidade média de fluorescência indicada no eixo X. Dados representativos de uma entre treze amostras. (B) Intensidade média de fluorescência (MFI) \pm erro padrão a expressão de CD40, CD80 e CD86. Controles (DCs maturadas por LPS) e DCs maturadas incubadas com Pv-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉ (n = 13). Intensidade média de fluorescência está representada no eixo Y.

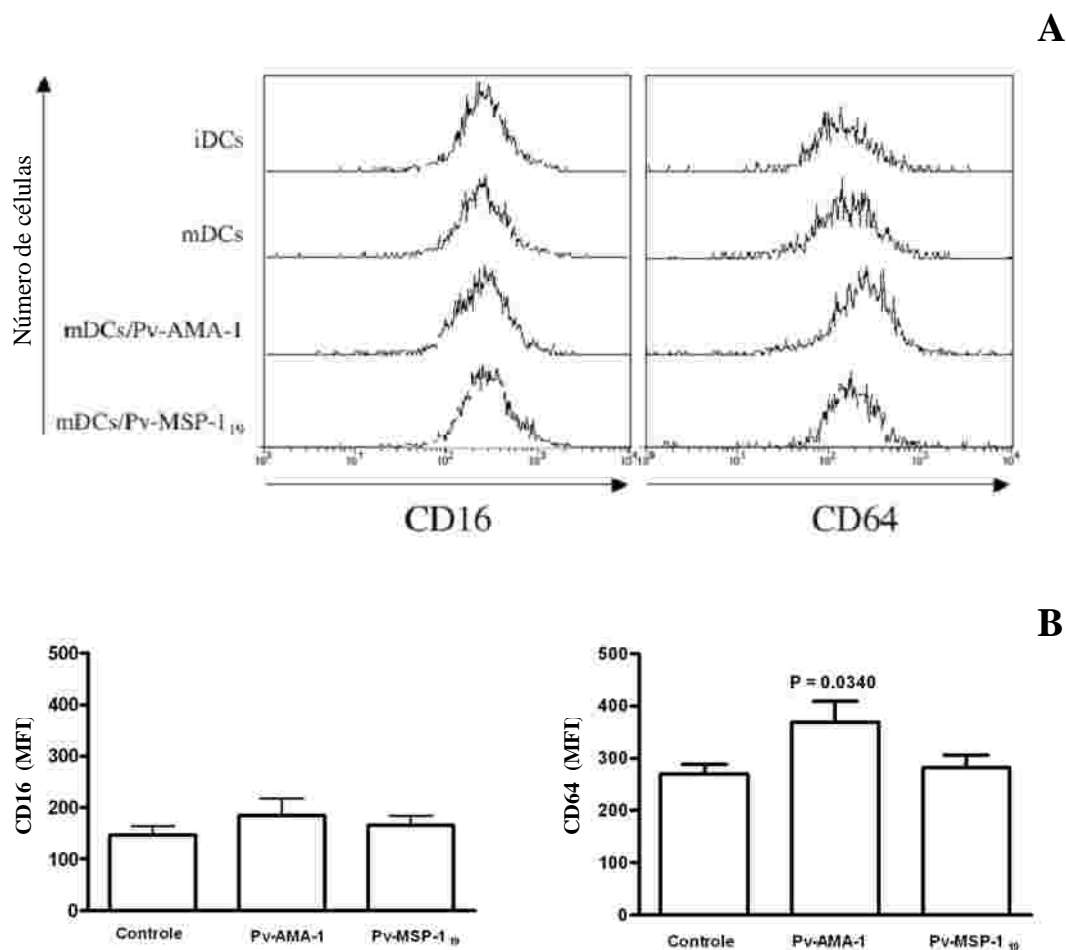


Figura 10. Análise por citometria de fluxo de células dendríticas derivadas e monócitos. (A) Expressão dos marcadores de superfície celular CD16 e CD64. DCs imaturas (iDCs), DCs maturadas por LPS (mDCs), DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-AMA-1 (mDCs/Pv-AMA-1) and DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-MSP-1₁₉ (mDCs/Pv-MSP-1₁₉). Intensidade média de fluorescência indicada no eixo X. Dados representativos de uma entre treze amostras. (B) Intensidade média de fluorescência (MFI) ± erro padrão da expressão de CD16 e CD64. Controles (DCs maturadas por LPS) e DCs maturadas incubadas com v-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉ (n = 13). Intensidade média de fluorescência está representada no eixo Y.

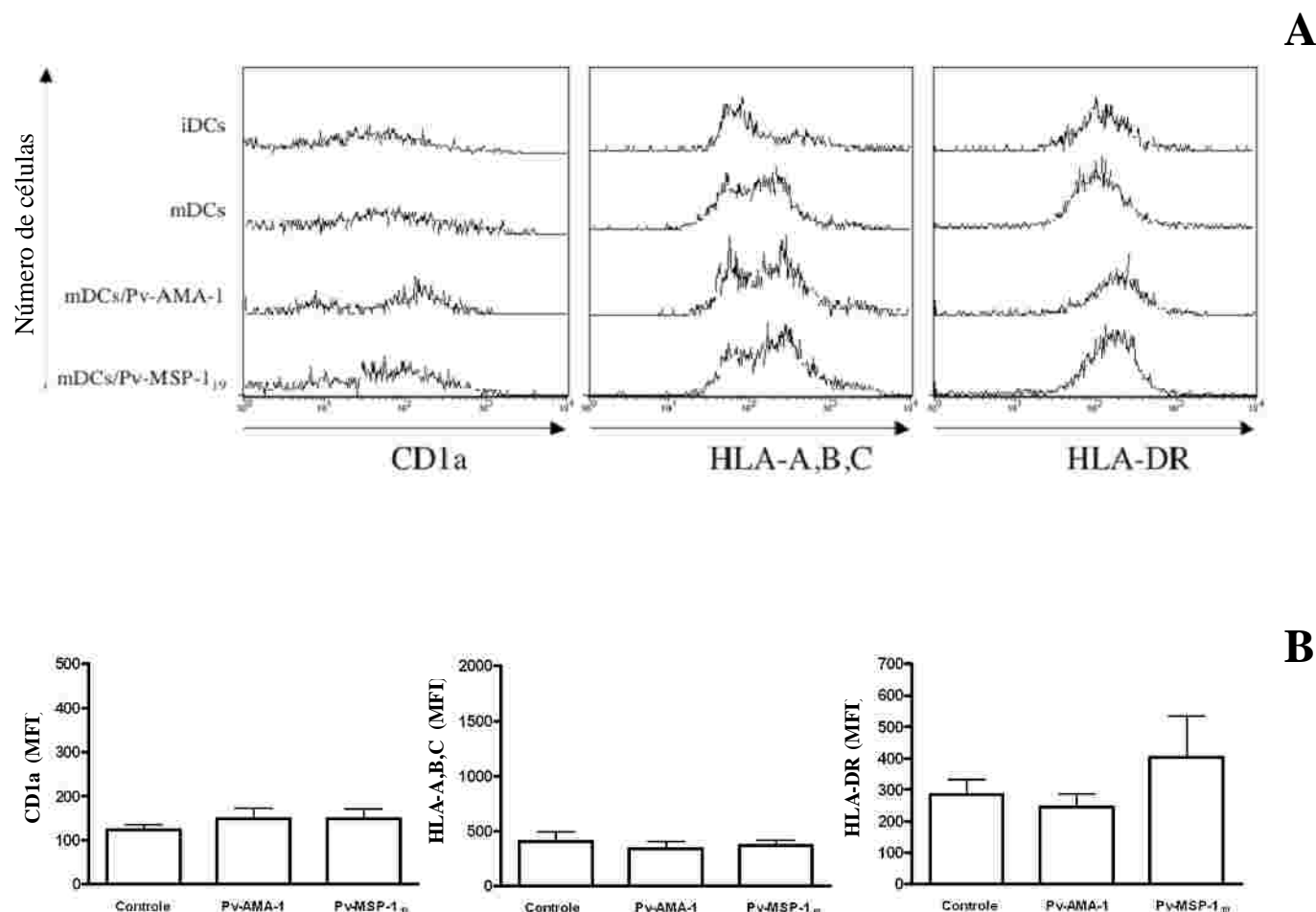


Figura 11. Análise por citometria de fluxo de células dendríticas derivadas de monócitos. (A) Expressão dos marcadores de superfície celular CD1a, HLA-DR e HLA-A,B,C. DCs imaturas (iDCs), DCs maturadas por LPS (mDCs), DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-AMA-1 (mDCs/Pv-AMA-1) and DCs maturadas por LPS cultivadas com Pv-MSP-1₁₉ (mDCs/Pv-MSP-1₁₉). Intensidade média de fluorescência indicada no eixo X. Dados representativos de uma entre treze amostras. (B) Intensidade média de fluorescência (MFI) ± erro padrão da expressão de CD1a, HLA-DR e HLA-A,B,C. Controles (DCs maturadas por LPS) e DCs maturadas incubadas com Pv-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉ (n = 13). Intensidade média de fluorescência está representada no eixo Y.

5.3. Expressão diferencial de quimiocinas em sobrenadantes de cultura de células dendríticas derivadas de monócitos

Para determinar se as proteínas recombinantes candidatas a vacina poderiam alterar as funções das DCs derivadas de monócitos, foi avaliada a produção das quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CCL17/TARC e CXCL10/IP-10 em sobrenadantes de culturas de células dendríticas diferenciadas na presença de Pv-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉. Dentre todas as quimiocinas testadas foram observadas diferenças estatísticas significantes somente em relação às concentrações das quimiocinas CCL3 e CCL17, em sobrenadantes de culturas de DCs diferenciadas na presença de Pv-AMA-1.

A proteína recombinante Pv-AMA-1 induziu o aumento da produção dos níveis de CCL3 ($P = 0,0476$) (Figura 12A) enquanto reduziu concomitantemente a concentração dos níveis de CCL17 ($P = 0,0122$) (Figura 12B), quando comparada aos níveis presentes nos sobrenadantes de culturas controle. Nenhuma alteração significativa foi observada nos sobrenadantes de culturas para as quimiocinas CCL5 e CXCL10 (Figuras 13A e 13B).

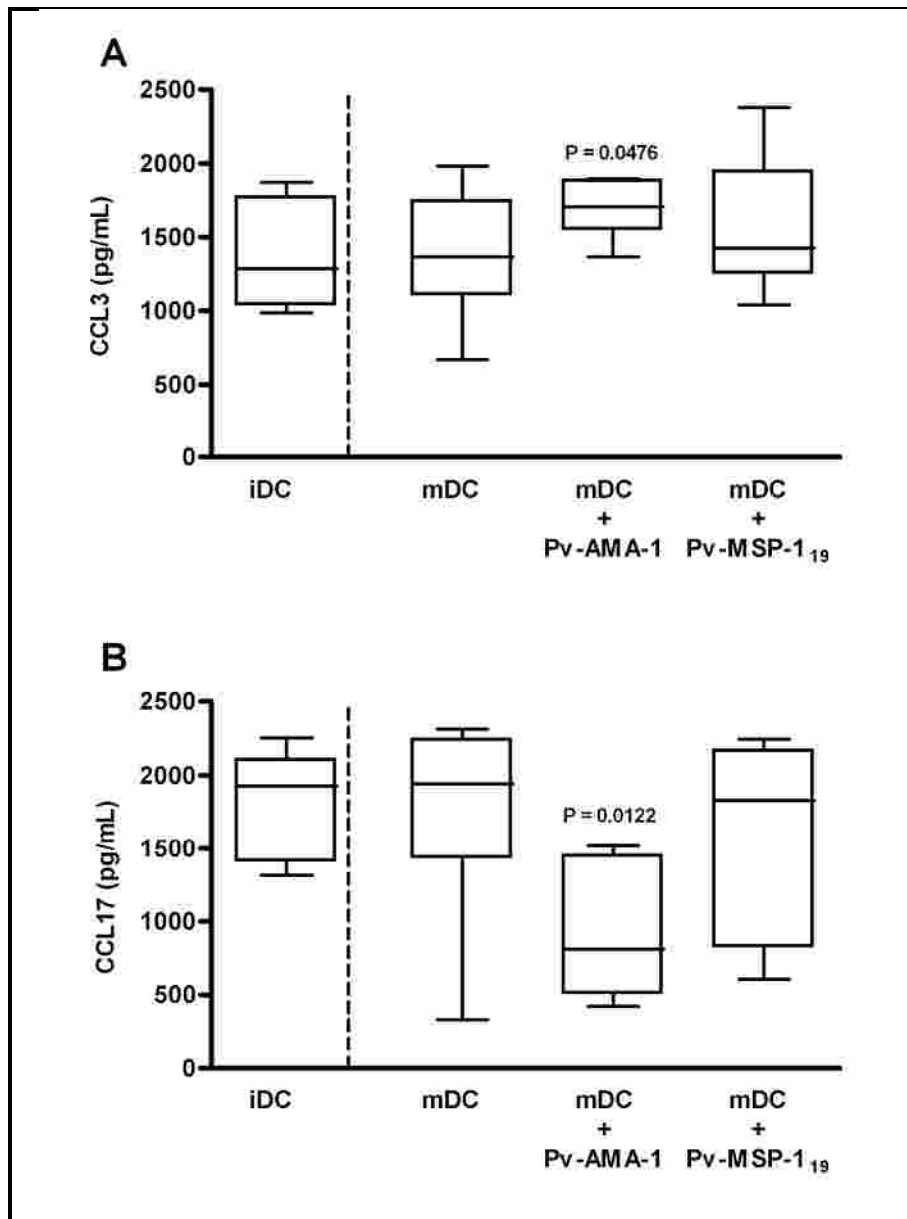


Figura 12. Produção de CCL3 e CCL17 por células dendríticas derivadas de monócitos. (A) Produção de CCL3 em DCs imaturas (iDC), DCs maturadas por LPS (mDC), DCs maturadas por LPS e cultivadas com Pv-AMA-1 (mDC + Pv-AMA-1) e DCs maturadas por LPS e cultivadas com Pv-MSP-1₁₉ (mDC + Pv-MSP-1₁₉). (B) Produção de CCL17 nas mesmas condições. Resultados expressos como variação de valores (“box”), desvio-padrão (barras), e mediana (barra interna).

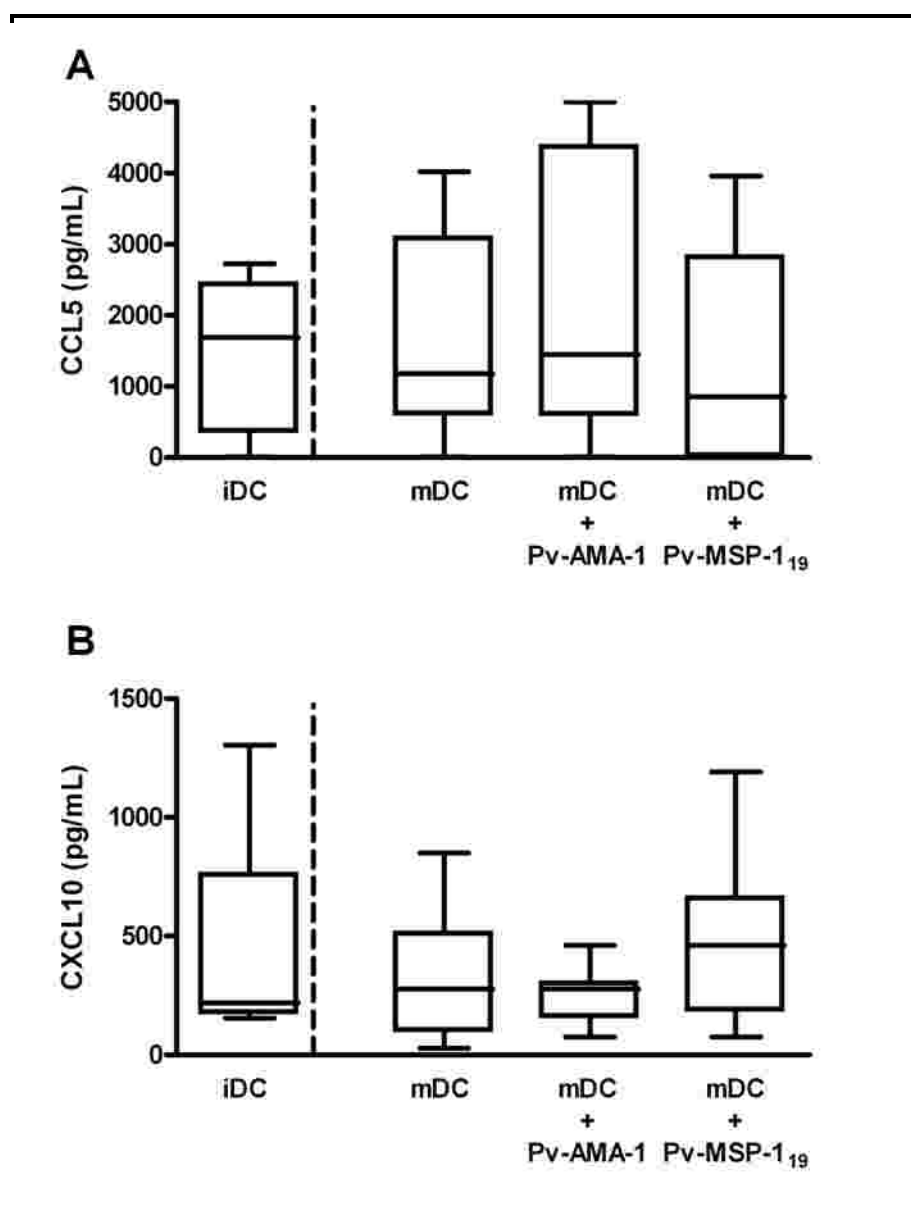


Figura 13. Produção de CCL5 e CXCL10 por células dendríticas derivadas de monócitos. (A) Produção de CCL5 em DCs imaturas (iDC), DCs maturadas por LPS (mDC), DCs maturadas por LPS e cultivadas com Pv-AMA-1 (mDC + Pv-AMA-1) e DCs maturadas por LPS e cultivadas com Pv-MSP-1₁₉ (mDC + Pv-MSP-1₁₉). (B) Produção de CXCL10 nas mesmas condições.

5.4. Cinética da produção de quimiocinas em culturas de PBMC estimuladas com Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉

Visto que a diferenciação de células dendríticas e sua maturação é decorrente de longo tempo de cultura, não foi possível determinar quando as quimiocinas CCL3 e CCL17 foram produzidas, e em que momento ocorriam as diferenças previamente observadas entre as culturas controles e diferenciadas na presença de Pv-MSP-1₁₉ em relação às diferenciadas na presença de Pv-AMA-1. Dessa forma, para averiguar o efeito de Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉ na produção dessas quimiocinas e determinar em que momento ocorriam diferenças em seus níveis, culturas de PBMCs estimuladas com os antígenos recombinantes candidatos a vacina foram realizadas. Assim, foi observado que somente no sexto dia de cultura houve um aumento significativo da produção de CCL3 em PBMCs estimulados com Pv-AMA-1 em comparação às culturas controles e às estimuladas com Pv-MSP-1₁₉ ($P = 0,0280$, Figura 14A). Da mesma forma, a produção de CCL17 por PBMCs estimulados com Pv-AMA-1 apresentou níveis mais baixos dessa quimiocina no sexto dia de cultura ($P = 0,0486$, Figura 14B). As quimiocinas CCL5 e CXCL10 produzidas por PBMCs estimuladas por Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉ não apresentaram níveis aumentados quando comparados àqueles observados para células não estimuladas, em todos os tempos de cultura observados (Figuras 15A e 15B).

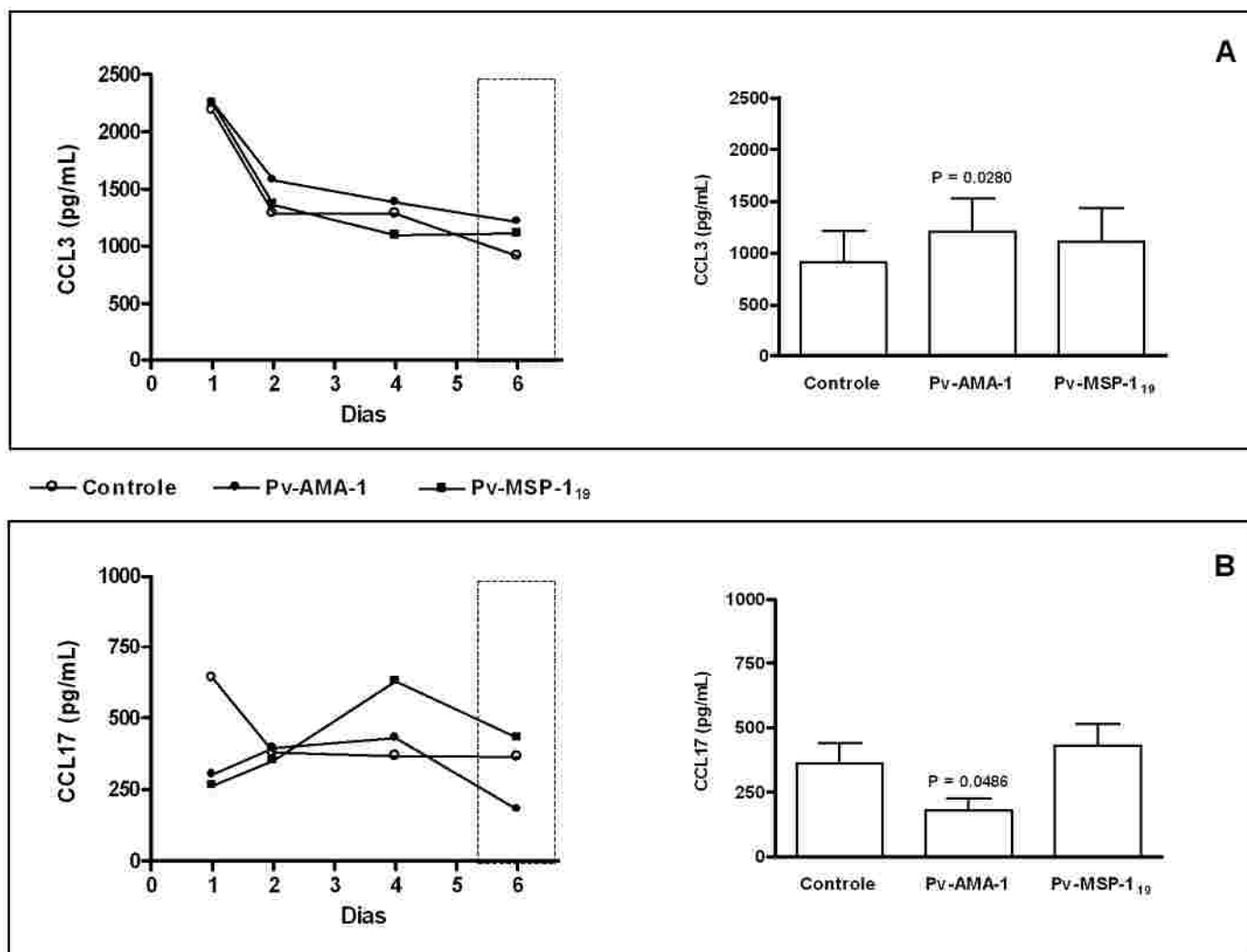


Figura 14. Cinética da produção de CCL3 (A) e CCL17 (B) em PBMCs estimulados com Pv-AMA-1 (círculos fechados) ou Pv-MSP-1₁₉ (quadrados fechados). Culturas adicionais apenas com PBMCs (círculo aberto) foram realizadas como controle. Gráficos à esquerda representam a produção de quimiocinas nos dias 1, 2, 4 e 6. Gráficos à direita mostram a produção de quimiocinas no sexto dia de cultura (caixas pontilhadas dos gráficos à esquerda). Resultados foram expressos como média da produção (pg/mL, gráfico à esquerda) ou média da produção \pm desvio padrão (pg/mL, gráfico à direita) (n=9).

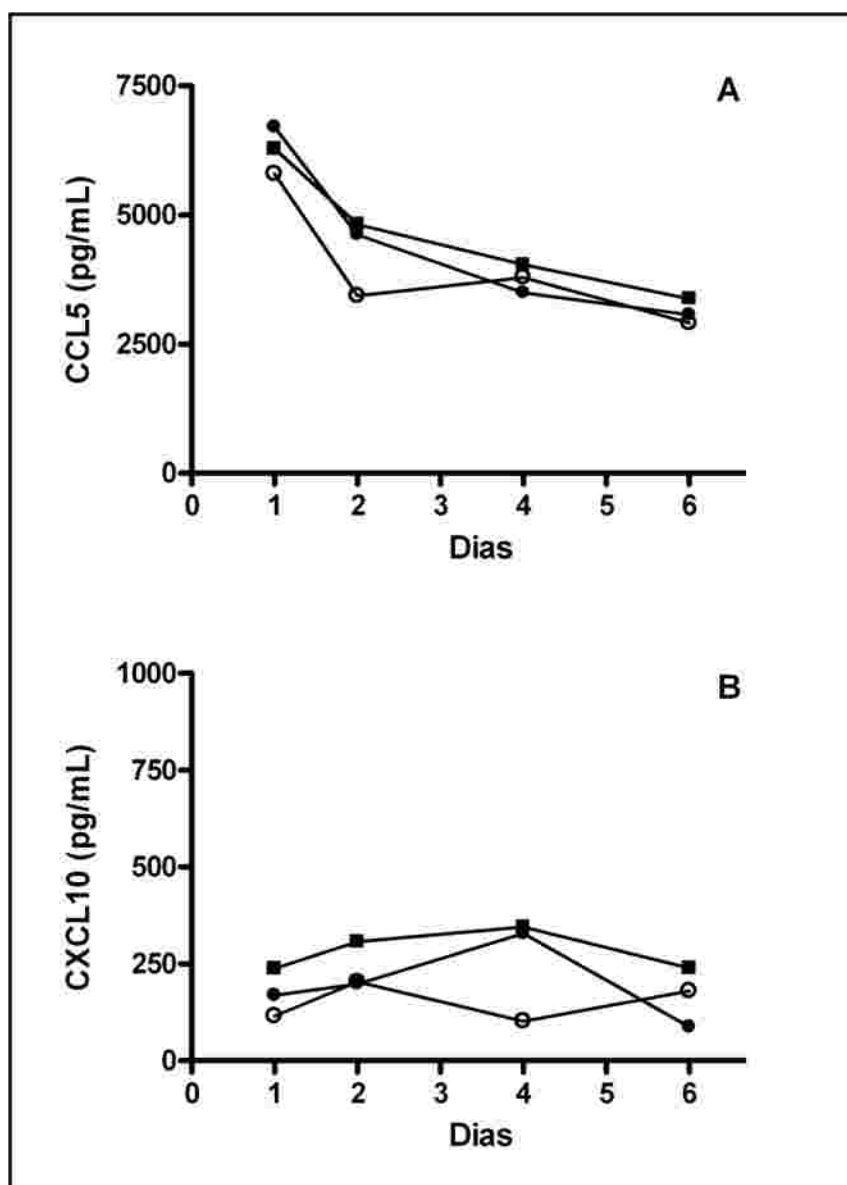


Figura 15. Cinética da produção de CCL5 (A) e CXCL10 (B) em PBMCs estimulados com Pv-AMA-1 (círculos fechados) ou Pv-MSP-1₁₉ (quadrados fechados). Culturas adicionais apenas com PBMCs (círculo aberto) foram realizadas como controle. Resultados foram expressos como médias da produção de citocinas (pg/mL) (n=9).

5.5. Produção de citocinas em sobrenadantes de culturas de células dendríticas derivadas de monócitos diferenciadas na presença de Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉, e de PBMCs estimuladas com Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉

Na Tabela 2 encontram-se os valores obtidos de citocinas em sobrenadantes de cultura de DCs. Diferenças significativas na produção de citocinas não foram observadas entre os grupos avaliados. Dentre as citocinas determinadas foi observada uma maior produção de IL-10 e, principalmente de IL-4 (dados não mostrados), que apresentou valores acima do limite máximo de detecção, sendo este um provável efeito da adição desta citocina durante o processo de diferenciação. Não foi detectada a presença de IL-12p70, IFN- γ , IL-2 e TGF- β nos sobrenadantes de culturas de células dendríticas.

Tabela 2. Quantificação de citocinas em sobrenadantes de culturas de células dendríticas imaturas (iDC), células dendríticas maduras (mDC), e células dendríticas diferenciadas na presença de Pv-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉

Citocinas*	iDC	mDC	Pv-AMA-1	Pv-MSP-1₁₉
TNF-a	30,77 \pm 49,85	96,07 \pm 78,38	98,36 \pm 124,06	229,37 \pm 353,63
IL-10	803,91 \pm 1386,43	1937,65 \pm 2682,31	1604,48 \pm 1894,64	1876,78 \pm 3053,79
IL-5	1,80 \pm 2,27	4,23 \pm 0,91	4,11 \pm 1,28	3,77 \pm 0,78

* resultados expressos em pg/mL

Tendo em vista a possível interferência de IL-4 exógena nas culturas de células dendríticas, a qual poderia modular a presença das demais citocinas avaliadas, optou-se por reproduzir este experimento utilizando-se culturas de PBMCs estimuladas com os antígenos recombinantes Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉. PBMCs incubadas com Pv-AMA-1 apresentaram uma maior produção de IFN- γ ($427,6 \pm 509,8$ pg/mL) após seis dias de cultura, quando comparadas às culturas controle ($111,7 \pm 117,8$ pg/mL) ou culturas estimuladas com Pv-MSP-1₁₉ ($121,2 \pm 128,0$ pg/mL) ($P = 0,0141$, Figura 16A). A produção de TNF- α foi significativamente elevada em culturas estimuladas com Pv-AMA-1 em todos os tempos experimentais avaliados, quando comparada aos demais grupos (Dia 1, $P = 0,0029$; Dia 2, $P = 0,0141$; Dia 4, $P = 0,0164$; e Dia 6, $P = 0,0078$; Figura 16B). Além disso, para as mesmas culturas estimuladas com Pv-AMA-1, uma produção significativa de IL-10 foi observada nos dias 1 ($P = 0,0303$), 4 ($P = 0,0115$) e 6 ($P = 0,0075$), quando comparada ao grupo controle (Figura 16C). Nenhuma diferença significativa na produção de citocinas foi detectada nos sobrenadantes de culturas estimuladas com Pv-MSP-1₁₉ (Figura 16). Além disso, como descrito para sobrenadantes de culturas de DCs, também não foi observada a produção de IL-12p70 e TGF- β em todas as culturas de PBMCs realizadas.

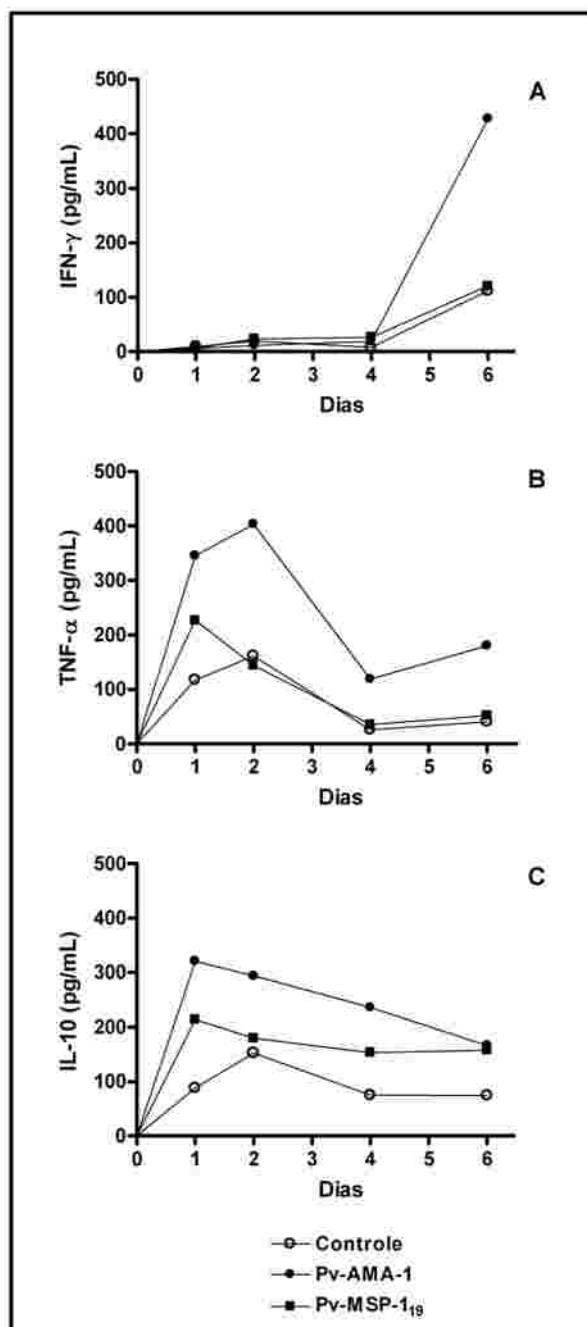


Figura 16. Cinética da produção de citocinas por PBMCs estimuladas com Pv-AMA-1 (círculo fechado) ou Pv-MSP-1₁₉ (quadrado fechado), e PBMCs sem estímulo como controle (círculo aberto), até 6 dias. (A) Detecção de IFN- γ , (B) TNF- α e (C) IL-10. Resultados foram expressos como médias das concentrações de citocinas (pg/mL).

Considerando que houve uma produção de citocinas pró-inflamatórias e modulatórias (IL-10), a relação de IFN- γ :IL-10 e TNF- α :IL-10 foram calculadas para o dia 6 de cultura, para determinar o perfil predominante de citocinas no sobrenadante de culturas (Tabela 3). A média das razões individuais de IFN- γ :IL-10 e TNF- α :IL-10 foram significativamente elevadas em culturas estimuladas com Pv-AMA-1, indicando uma produção predominante de citocinas pró-inflamatórias, mesmo após uma elevada produção de IL-10 ($P = 0,0001$ e $P = 0,0170$, respectivamente). As razões de IFN- γ :IL-10 e TNF- α :IL-10 para as culturas estimuladas com Pv-MSP-1₁₉ foram similares às culturas controle.

Tabela 3. Razão de citocinas em sobrenadantes de culturas de PBMCs após 6 dias de estímulo com antígenos recombinantes de *P. vivax*

Razão de citocinas*	Controle	Pv-AMA-1	Pv-MSP-1 ₁₉
IFN-γ: IL-10	5,56 \pm 2,74	9,30 \pm 3,66 ($P = 0,0001^{**}$)	5,04 \pm 2,73
TNF-α: IL-10	1,75 \pm 1,44	4,24 \pm 2,24 ($P = 0,0170^{**}$)	1,84 \pm 1,45

*pg/mL citocina A: pg/mL citocina B \pm SE

**Valor de P quando estatisticamente significativo, em comparação ao grupo controle

5.6. Produção de óxido nítrico em sobrenadantes de cultura de PBMCs estimuladas com Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na produção de óxido nítrico em sobrenadantes de culturas tanto de PB Cs estimulados com Pv-AMA-1 ou Pv-MSP-1₁₉. A produção de óxido nítrico em todas as culturas foi relativamente reduzida, atingindo níveis aproximados aos limites de detecção do ensaio (dados não mostrados).

6. DISCUSSÃO

A disseminação da malária tende a aumentar continuamente conforme a dispersão da resistência ao tratamento, aumento da resistência do *Anopheles* a inseticidas e, ainda, falta de infra-estrutura necessária para o combate ao problema. Esse aumento ocorre mesmo com a evidência de que certos mecanismos de controle, tais como uso de inseticidas e desenvolvimento de novas drogas, tenham provado sua eficiência (NEVILL et al., 1996; WINSTANLEY et al., 1997). Contudo, as estratégias de controle contra a malária atualmente utilizadas não tem se mostrado eficazes em locais que apresentam condições ambientais, econômicas e sociais favoráveis à propagação da doença. Portanto, como ferramenta adicional de controle, uma vacina efetiva contra essa doença parasitária é urgentemente necessária (CUI et al., 2003).

O desenvolvimento de uma vacina é amplamente reconhecido como uma das melhores estratégias custo-efetiva de se melhorar a saúde pública e proteger a população contra doenças infecciosas (GOOD, 2005). Mas, historicamente, sabe-se que o desenvolvimento de uma vacina contra um patógeno é mais fácil quando este induz uma resposta imune natural após uma única infecção, fato este não verificado após infecção por plasmódios. Um significativo progresso já foi atingido com a identificação de alguns antígenos candidatos a vacina antimalárica (GOOD, 2005).

Nos últimos anos, muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de determinar os mecanismos imunes desencadeados durante imunizações experimentais e em ensaios clínicos utilizando antígenos de *Plasmodium* spp. As proteínas de estágios sanguíneos tais como a proteína majoritária da superfície de merozoítos (MSP-1) e o antígeno 1 de membrana apical (AMA-1) destacam-se como moléculas promissoras para comporem uma vacina de subunidades (HOLDER, 1988; COLLINS et al., 1994; KUMAR et al., 2000; LEE et al., 2002; MALKI et al., 2005; OCKENHOUSE et al., 2006; DICKO et al., 2007; POLHEMUS et al., 2007). Contudo, a maioria dos estudos clínicos utilizando esses antígenos é voltada para um enfoque soropidemiológico, tentando esclarecer o papel da dinâmica de transmissão na resposta imune naturalmente adquirida e no entendimento dos possíveis mecanismos

humorais envolvidos na proteção contra a malária. Apesar desses estudos terem contribuído para o conhecimento da resposta imune naturalmente adaptativa contra a malária, que é um pré-requisito para o desenvolvimento de uma vacina, pouco ainda se conhece a respeito do papel desses antígenos no sistema imune inato. Devido à própria natureza do processo de imunização, esses conhecimentos são dirigidos para o entendimento da resposta imune adaptativa.

Um aspecto relevante no estudo da malária é que a maioria do conhecimento a seu respeito é voltado para o *P. falciparum*, que é a espécie associada à malária grave, cujas pesquisas concentram maior quantidade de recursos investidos. Por outro lado, a malária vivax tem sido negligenciada (BAIRD, 2007). Um estudo recente mostrou que o número de pessoas vivendo sob o risco de contrair o *P. falciparum* ou *P. vivax* é aproximado, representando 2,5 e 2,6 bilhões de pessoas, respectivamente (GUERRA et al., 2006). Além disso, o verdadeiro número de infecções anuais pelo *P. vivax*, ao contrário do sempre citado de 70 a 80 milhões, seria da ordem de 130 a 435 milhões (HAY et al., 2004). E mesmo considerando a menor das estimativas, o número de infecções por *P. vivax* já seria igual ao da dengue e cinco vezes mais o da febre tifóide (BAIRD, 2007). Apesar de sempre ter sido considerada benigna, estudos recentes utilizando a técnica de PCR para diagnóstico da infecção demonstrou que alguns pacientes infectados apenas com *P. vivax* apresentavam quadros de malária cerebral, síndrome aguda do estresse respiratório, além de falência renal (BEG et al., 2002; KOCHAR et al., 2005; SALERI et al., 2006; KUMAR et al., 2007).

É importante ressaltar que, como observado para *P. falciparum*, a resistência do *P. vivax* aos quimioterápicos convencionais tem emergido. A resistência à cloroquina já foi reportada na Indonésia, Miamar, Índia, Austrália, Guiana e América do Sul (BAIRD, 2004).

Vários fatores têm contribuído para escassez de pesquisas em malária vivax como, por exemplo, uma subestimada prevalência mundial, uma percepção errada de que o *P. vivax* não levaria às mesmas complicações relatadas em infecções por *P. falciparum*, além da dificuldade de se manter culturas do parasito in vitro, sendo restrita a poucos laboratórios (GOLENDÁ et al., 1997). Considerando também que *P. vivax* é a

espécie prevalente no Brasil (80% das infecções de malária), esses fatores reforçaram a necessidade de focar nossos estudos nesta última espécie.

Um dos primeiros eventos que ocorre durante a resposta imune inata contra a malária é a ativação de células dendríticas, e possivelmente de macrófagos (STEVENSON e RILEY, 2004). Diversos estudos em humanos e modelo murino demonstraram que o contato de eritrócitos parasitados, ou mesmo de extrato bruto de *Plasmodium* spp com células dendríticas, pode induzir a sua capacidade de primar linfócitos virgens e estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias (BRUNAROMERO e RODRIGUEZ, 2001; PICHYANGKUL et al., 2004; IN et al., 2006). Por outro lado, outros trabalhos mostraram que esse mesmo processo pode ser bloqueado seletivamente pelos mesmos eritrócitos parasitados, os quais podem levar à inibição do processo de maturação de células dendríticas (URBAN et al., 1999; URBAN et al., 2001a; OCANA-MORGNER et al., 2003).

Na primeira parte do nosso trabalho, demonstramos o efeito das proteínas recombinantes Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉ na resposta de pacientes nunca expostos à infecção, utilizando um modelo “in vitro” de diferenciação de monócitos em células dendríticas. A capacidade de monócitos em diferenciar-se em células dendríticas foi originalmente descrita nos anos 90 (SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994), com a geração dessas células após cultivo de monócitos com as citocinas GM-CSF e IL-4. Nos últimos 10 anos, o uso dessa técnica tem propiciado vários estudos sobre células dendríticas humanas, antes limitados pela dificuldade de trabalhar com células isoladas diretamente de humanos (LEON et al., 2005). Por outro lado, a possibilidade de que monócitos sejam precursores de células dendríticas em condições fisiológicas ainda permanece controversa, porém essa técnica tem provado ser uma ferramenta útil no estudo do processo de diferenciação e maturação de células dendríticas (LEON et al., 2005; TACKE e RANDOLPH, 2006).

De forma geral, para o sistema murino e humano, monócitos cultivados com GM-CSF e IL-4 se diferenciam em células dendríticas imaturas, caracterizadas pela ainda reduzida expressão de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias (SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994; LEON et al., 2004). A diferenciação de monócitos humanos requer um longo tempo de cultura para gerar células dendríticas,

como previamente descrito (ARDAVIN et al., 2001), apesar de métodos alternativos de diferenciação reportarem a geração de células dendríticas a partir de monócitos humanos após 24 horas de cultura (DAUER et al., 2003; OBERMAIER et al., 2003). Células dendríticas imaturas podem ser subsequentemente maturadas após o tratamento com LPS, TNF- α , IFN- γ ou CD40L (ARDAVIN et al., 2001), e esse processo de maturação determina a regulação positiva de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias, aliadas à mudanças na capacidade de processamento e de apresentação de antígenos, comportamento de migração celular, e ainda, na capacidade de induzir e modular resposta a partir de linfócitos (PALUCKA et al., 1999). Diante da variada possibilidade de protocolos de geração de células dendríticas maduras, foram determinadas neste trabalho as melhores condições de cultura aplicadas ao Laboratório de Malária – ICB – UFMG, conforme estabelecido na metodologia (item 4.4, Diferenciação de células dendríticas na presença dos antígenos recombinantes Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉).

Nossos resultados demonstraram que Pv-AMA-1 altera a diferenciação/maturação de células dendríticas, resultando em uma expressão reduzida da integrina de membrana CD11c e das moléculas co-estimulatórias CD40 e CD86, de forma semelhante aos trabalhos previamente publicados que sugerem a modulação de células dendríticas pelos produtos do parasita. Esta observação sugere que AMA-1 pode estar envolvida em uma possível modulação de células apresentadoras de antígenos durante a infecção por *P. vivax*. De forma interessante, não foi observada nenhuma alteração no processo de diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos quando em contato com Pv-MSP-1₁₉. Isso sugere que características inerentes às proteínas do parasito podem ser importantes no desencadeamento de resposta imune inata durante a infecção no hospedeiro.

A proteína AMA-1, inicialmente localizada nas micronemas, é redistribuída por toda a superfície de merozoítos maduros após a ruptura do esquizonte (NARUM e THOMAS, 1994; HEALER et al., 2002). Durante sua relocação para a superfície do merozoíto ela sofre duas clivagens em sua porção C-terminal, originando as formas solúveis de 48 kDa e 44kDa (NARUM e THOMAS, 1994; HOWELL et al., 2001); essa proteína também está presente em esporozoítos (SILVIE et al., 2004). Dessa forma, a

AMA-1 poderia entrar em contato com células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, durante o processo de invasão em novos eritrócitos ou durante a transmissão pelo vetor. Já a MSP-1₁₉ é uma fração não-solúvel e permanece ancorada à superfície do merozoíto por uma âncora de GPI (FREEMAN e HOLDER, 1983; BLACKMAN et al., 1990), o que dificultaria a sua apresentação.

Em nosso modelo “in vitro” de culturas de células dendríticas derivadas de monócitos e de PBMCs, a ausência de resposta frente à Pv-MSP-1₁₉ sugere que essa proteína não interfere diretamente com a resposta imune inata e, mais especificamente, com células apresentadoras de antígenos. Por outro lado, é conhecido que MSP-1₁₉ induz uma resposta imune adaptativa exuberante, como o observado após imunização ativa tanto em modelos animais quanto em humanos (DALY e LONG, 1995; KUMAR et al., 1995; HIRUNPETCHARAT et al., 1997; KUMAR et al., 2000; LEE et al., 2002; OCKENHOUSE et al., 2006), e na resposta humoral de indivíduos residentes em áreas endêmicas para malária (MORAIS, 2005; RODRIGUES et al., 2005). Entretanto, mesmo em face dessa resposta adaptativa gerada por MSP-1₁₉, isso não necessariamente implica na sua ação durante a resposta imune inata.

Apesar da diferenciação de monócitos em células dendríticas na presença de Pv-AMA-1 sugerir que essa proteína possa bloquear esse processo, por outro lado mostramos que a AMA-1 induziu um aumento da expressão das moléculas de superfície CD80 e CD64, levando a uma ativação celular. Além disso, em contraste do previamente reportado (URBAN et al., 1999; URBAN et al., 2001a), a redução da expressão de HLA-DR não foi detectada após a diferenciação, de forma que as células resultantes não necessariamente se encontram reguladas negativamente.

As moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 expressas em células apresentadoras de antígenos, e seu ligante expresso na célula T (CD28), contribuem para uma importante via co-estimulatória durante o processo de apresentação celular, promovendo a proliferação de linfócitos e produção de citocinas (LINSLEY e LEDBETTER, 1993). Pv-AMA-1 leva a um aumento dos níveis de CD80, de forma contraditória à regulação negativa observada na expressão de CD86, porém o efeito biológico desse fenótipo diferencial é desconhecido. No entanto, já foi demonstrado que protozoários podem alterar ativamente a expressão de moléculas co-

estimulatórias, levando a esse mesmo fenótipo diferencial (SOUZA et al., 2007). Possivelmente, a elevada expressão de CD80 poderia compensar os níveis reduzidos de CD86 e, portanto, providenciar o sinal acessório mínimo necessário para apresentação de antígenos e consequente ativação de células T auxiliares. Além disso, uma vez que CD80 não é expresso em células apresentadoras de antígenos não-ativadas (HATHCOCK et al., 1994), é provável que AMA-1 possa induzir ativação de células dendríticas.

Células dendríticas geradas na presença de Pv-AMA-1 demonstraram uma regulação positiva da expressão da molécula CD64, também denominada Fc γ RI, um receptor efetivo para imunoglobulinas das subclasses IgG1 e IgG3 em humanos (DOUGHERTY et al., 1987). Apesar das subclasses IgG1 e IgG3 estarem implicadas na imunidade protetora mediada por anticorpos pela inibição celular dependente de anticorpos (ADCI), ainda não foi provado o papel do receptor Fc γ RI (CD64) neste processo, como já demonstrado para Fc γ RIIA (BOUHAROUN-TAYOUN et al., 1995) e Fc γ RIII (CD16) (JAFARSHAD et al., 2007). Entretanto, a importância do receptor Fc γ RI na proteção contra a malária já foi evidenciada em um ensaio em que a eficácia antimalárica de anticorpos humanos foi determinada pelo uso de parasitos e camundongos transgênicos para antígenos de *P. falciparum* e receptores de imunoglobulinas humanas, respectivamente (MCINTOSH et al., 2007). Neste estudo, a proteção dos animais curados de uma infecção letal após uso de anticorpos humanos da subclasse IgG1 demonstrou ser dependente do receptor Fc γ RI (CD64). Além disso, foi descrito que este receptor pode estar envolvido na secreção de TNF- α (DEBETS et al., 1990), no processo de fagocitose (JAFARSHAD et al., 2007), principalmente pela sua particular capacidade de internalizar imunocomplexos (RAVETCH e BOLLAND, 2001) e, ainda, no aumento da apresentação celular em células dendríticas (RAVETCH e BOLLAND, 2001).

O aumento da expressão de moléculas consideradas importantes na resposta imune contra o parasito, mesmo diante de uma regulação negativa de alguns marcadores de diferenciação e co-estimulação, sugere que a diferenciação de células dendríticas com Pv-AMA-1 poderia resultar em células funcionalmente ativas, tornando-se um mecanismo alternativo para o controle da carga parasitária. Apesar da célula

dendrítica diferenciada na presença de Pv-AMA-1 não se encontrar totalmente madura, evidenciada pela reduzida expressão fenotípica de CD11c, CD40 e CD86, este fato não descarta que essa célula seja de fato imunogênica, ou seja, induza propriamente a resposta imune necessária contra o parasito (REIS E SOUSA, 2006).

A pré-ativação *in vitro* de células dendríticas com Pv-AMA-1 resultou em uma secreção de altos níveis da quimiocina CCL3 e queda na produção de CCL17, sugerindo uma atração preferencial de células T auxiliares com fenótipo Th1. De fato, as quimiocinas possuem o papel primordial de direcionar populações celulares específicas, particularmente linfócitos, para o sítio de infecção, de acordo com sua expressão de receptores de quimiocinas (BORISH e STEINKE, 2003). Enquanto a quimiocina CCL3 atrai linfócitos Th1, que expressam o receptor CCR5 e reforça a interação entre células T e células dendríticas, CCL17 promove a quimioatração de células Th2, que expressam CCR4 (ROSSI e ZLOTNIK, 2000; ZLOTNIK e YOSHIE, 2000; BORISH e STEINKE, 2003; BACHMANN et al., 2006). Além disso, em experimentos utilizando camundongos, foi demonstrado que CCL3 possui um papel determinante na maturação de células dendríticas (TRIFILO e LANE, 2004), e que a ausência dessa quimiocina resultou em um retardo da maturação de células dendríticas maduras, levando a uma consequente redução na produção de IFN- γ por células T (TRIFILO e LANE, 2004).

De forma geral, a produção de quimiocinas pode ser desencadeada por um perfil de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, uma vez que a diferenciação de células dendríticas requer a presença de IL-4, o efeito de citocinas pró-inflamatórias neste microambiente seria inconclusivo. Assim, devido à presença de IL-4 exógena e ainda, à dificuldade de se estabelecer em que momento essas quimiocinas são secretadas após estimulação, uma vez que a cultura de células dendríticas requer um longo tempo de cultura, culturas de PBMCs estimuladas com os antígenos recombinantes Pv-AMA-1 e Pv-MSP-1₁₉ foram realizadas e constituíram a segunda parte deste trabalho.

Culturas de PBMCs estimuladas com Pv-AMA-1 resultaram na produção do mesmo padrão de quimiocinas observado em sobrenadantes de células dendríticas. No entanto, com esta abordagem foi possível determinar que o padrão diferencial na produção de quimiocinas somente ocorre após 6 dias de cultura, sugerindo que a AMA-

1 poderia atuar diretamente nas células apresentadoras de antígenos, tanto em células dendríticas quanto em monócitos presentes no PBMC, de forma a estimular a produção de quimiocinas durante a resposta inata. No entanto, não é possível excluir que essa produção diferencial de quimiocinas seja resultante da presença de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α , nas primeiras horas de cultura. De fato, foi detectado um aumento significativo das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 em sobrenadantes de culturas de PBMCs estimuladas com Pv-AMA-1. Em parte, a produção tardia de IFN- γ , provavelmente por linfócitos, pode ser explicada pela secreção de CCL3 pelas células apresentadoras de antígenos, uma vez que essa quimiocina está implicada na ativação direta de células T (TRIFILO e LANE, 2004; BACHMANN et al., 2006), fato corroborado pela produção significativa de IFN- γ somente aos 6 dias de cultura, coincidente com a produção também significativa de CCL3. A ausência das citocinas do tipo Th2 e, ainda, as razões observadas de IFN- γ :IL-10 e TNF- α :IL-10 sugerem um perfil pró-inflamatório (RHEE et al., 2001). IFN- γ e TNF- α têm sido implicados como mediadores essenciais na imunidade protetora contra malária murina (SHEAR et al., 1989; STEVENSON et al., 1995; JACOBS et al., 1996). Além disso, em humanos, a produção de IFN- γ é correlacionada positivamente com resistência à reinfeção por malária (LUTY et al., 1999) e com a proteção contra malária clínica (DODOO et al., 2002). Já a TNF- α é associada com a resolução da febre causada pela infecção e com a eliminação do parasito (KREMSNER et al., 1996). Assim, podemos concluir que a produção de CCL3, que é consequente à ativação por TNF- α (BORISH e STEINKE, 2003; BACHMANN et al., 2006), pode atuar diretamente em linfócitos Th1 levando a um aumento da produção de IFN- γ . Os elevados níveis de IFN- γ , observados em nossas culturas, sugerem uma produção por via independente de IL-12, que se encontrou ausente em todos os tempos de cultura observados. Estudo realizado com indivíduos nunca expostos à malária submetidos a infecções experimentais por *P. falciparum* demonstrou um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IFN- γ , após o primeiro contato com eritrócitos parasitados (HERMSEN et al., 2003), mostrando que proteínas do parasito apresentadas às células do hospedeiro, entre elas AMA-1, pode determinar um perfil pró-inflamatório de resposta imune.

Apesar do aumento significativo nos níveis de IFN- γ e TNF- α observados nos sobrenadantes de cultura de PBMCs estimulados com Pv-AMA-1, não foi possível detectar um aumento significativo correspondente na produção de óxido nítrico. Já foi descrito que IFN- γ é responsável por promover a transcrição da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que por sua vez atua na produção de óxido nítrico em macrófagos (DING et al., 1988); TNF- α apresenta efeito sinérgico com IFN- γ na indução de iNOS e consequente liberação de óxido nítrico (DENG et al., 1993). Nossos dados sugerem que a quantidade dessas citocinas derivadas da estimulação por AMA-1 sejam apenas suficientes para direcionar a resposta imune celular de forma a eliminar o parasito pois, os níveis precisos de citocinas inflamatórias necessárias para induzir a produção de óxido nítrico ainda não foram exatamente determinados. No entanto, já é conhecido que a atividade da enzima óxido nítrico sintase contribui para imunidade à malária humana (ROCKETT et al., 1991; ANSTEY et al., 1996; BOUTLIS et al., 2003). De fato, Pombo e colaboradores (2002) detectaram um aumento de óxido nítrico em voluntários imunizados com doses ultra-baixas de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, levando a uma proteção após subsequente desafio com o parasito.

Os mecanismos moleculares envolvidos na resposta imune inata à malária são pouco conhecidos. No entanto, sabe-se que a resposta inata pode ser desencadeada por diversos componentes derivados de microorganismos ou do próprio hospedeiro, pela ativação de receptores de reconhecimento padrão (“pattern-recognition receptors”, PRRs) (COBAN et al., 2007). Dentre esses, podemos citar os receptores Toll-like (TLRs), expressos na membrana plasmática de células dendríticas, macrófagos e células B; e os receptores Nod-like (NLRs) e RIG-like (RLRs), expressos no citoplasma celular (CREAGH e O'NEILL, 2006; MEYLAN et al., 2006; COBAN et al., 2007). O papel desses receptores na resposta imune inata à malária ainda não está totalmente estabelecido, no entanto, foi descrito recentemente que TLR2 e TLR9 estão envolvidos no reconhecimento de metabólitos do parasito, como as glicoproteínas de GPI e hemozoína (associadas ou não ao DNA do parasito), respectivamente por uma sinalização através da molécula adaptadora MyD88 (CAMPOS et al., 2001; COBAN et al., 2005; KRISHNEGOWDA et al., 2005; COBAN et al., 2007; PARROCH et al., 2007). É possível que a ação do antígeno recombinante candidato à vacina Pv-AMA-1 sobre

células apresentadoras de antígenos seja mediada por receptores Toll-like, possivelmente pela estimulação da via TLR9-MyD88 dependente, uma vez que já foi demonstrado que eritrócitos infectados com esquizontes de *P. falciparum* estimulam essa via e resultam na produção de IFN- γ e TNF- α (LANGHORNE et al., 2004). Além disso, para suportar essa hipótese foi descrito que essa mesma via pode induzir a produção de IL-10 na infecção por malária (SCHOFIELD e GRAU, 2005). No entanto, estudos nesse sentido são ainda necessários e fazem parte de perspectivas futuras de trabalho do Laboratório de Malária – ICB – UFMG.

Nossos achados demonstraram que a Pv-AMA-1 induz uma alteração no perfil de resposta inata, associado às células dendríticas e eritrócitos presentes no PBMCs. Uma vez que a resposta imune inata pode iniciar e moldar a subsequente resposta adaptativa, esse efeito pode contribuir para o controle do parasito pelo hospedeiro. Baseado nos estudos utilizando eritrócitos parasitados por *Plasmodium* spp (URBAN et al., 1999; OCANA-MORGNER et al., 2003; ING et al., 2006), é possível inferir que a regulação negativa da resposta inata possa ser benéfica para a sobrevivência parasitária, de forma que isso resulte na diminuição da resposta inflamatória do hospedeiro. Portanto, esse mecanismo de escape da resposta imune poderia reduzir a possibilidade de uma resposta exuberante e potencialmente prejudicial contra o parasito. Por outro lado, a resposta inflamatória induzida por Pv-AMA-1 sugere que a imunização com este antígeno recombinante poderia contribuir para um melhor direcionamento da resposta adaptativa contra a infecção. Entretanto, uma vez que um antígeno recombinante é preferencialmente associado a adjuvantes no processo de vacinação, deve-se levar em conta que a natureza desse adjuvante e sua consequente ação na resposta imunológica poderia alterar a contribuição do antígeno durante a resposta inata.

Finalmente, nossos resultados evidenciam que um antígeno candidato a vacina pode atuar na resposta imune inata, o que representa, a nosso ver, contribuição para o entendimento da resposta imunológica desencadeada por produtos do parasito, principalmente de moléculas que possam vir a compor uma vacina de subunidades utilizada para o controle da infecção por *Plasmodium*. Esses dados enfatizam ainda a

necessidade de investigar a importância funcional da resposta inata induzida por AMA-1 na infecção malária.

7. CONCLUSÕES

- Pv-AMA-1 apresentou efeito significativo na resposta imune inata induzindo alteração do perfil fenotípico de células dendríticas derivadas de monócitos, resultando no retardo do processo de maturação/diferenciação enquanto propicia um estado de ativação celular.
- Pv-MSP-1₁₉ não apresentou efeito significativo na diferenciação células dendríticas e na produção de citocinas e quimiocinas em culturas celulares de indivíduos nunca expostos à infecção.
- Pv-AMA-1 induz uma produção diferencial de quimiocinas, observada pelo aumento da produção de CCL3 e redução de CCL17, após 6 dias de cultura.
- Estimulação por Pv-AMA-1 resulta em uma produção significativa de IFN- γ , TNF- α e IL-10 indicando um perfil pró-inflamatório de resposta imunológica.
- A resposta imune inata conferida por Pv-AMA-1 pode contribuir para a subsequente resposta adaptativa, tanto no processo de acinação quanto na própria infecção malárica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALECRIM MS, ALECRIM WD, ALBUQUERQUE BC, DOURADO HV, WANSSA MD. Resistance of *Plasmodium falciparum* in the Brazilian Amazon to the combination of sulfadoxine and pyremethamine. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.24, p.44-7, 1982.
- ALECRIM MS, ALECRIM DW, MACEDO V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine in Brazilian Amazon Region. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.32, p.67-8, 1999.
- 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.641-8, 2002.
- AMINO R, THIBERGE S, SHORTE S, FRISCHKNECHT F, MENARD R. Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *C R Biol*, v.329, p.858-62, 2006.
- ANSTEY NM, WEINBERG JB, HASSANALI MY, MWAIKAMBO ED, MACHANGA D, MISUKONIS MA, ARNELLE DR, HOLLIS D, MCDONALD MI, GRANGER DL. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med*, v.184, p.557-67, 1996.
- ARDAVIN C, MARTINEZ DEL HOYO G, MARTIN P, ANJUERE F, ALFONSO CF, MARIN AR, RUIZ S, PARRILLAS V, HERNANDEZ H. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol*, v.22, p.691-700, 2001.
- ARTAVANIS-TSAKONAS K, RILEY EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol*, v.169, p.2956-63, 2002.
- BACHMANN MF, KOPF M, MARSLAND BJ. Chemokines: more than just road signs. *Nat Rev Immunol*, v.6, p.159-64, 2006.
- BAIRD JK, JONES TR, DANUDIRGO EW, ANNIS BA, BANGS MJ, MASRI 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. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother*, v.48, p.4075-83, 2004.

- BAIRD JK. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol*, v.23, p.533-9, 2007.
- BANCHEREAU J, STEINMAN RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, v.392, p.245-52, 1998.
- BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C, DAVOUST J, LEBECQUE S, LIU YJ, PULENDRAN B, PALUCKA K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, v.18, p.767-811, 2000.
- BEG MA, KHAN R, BAIG SM, GULZAR Z, HUSSAIN R, SMEGO RA JR. Cerebral involvement in benign tertian malaria. *Am J Trop Med Hyg*, v.67, p.230-2, 2002.
- 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.379-82, 1990.
- BLEDSOE GH. Malaria primer for clinicians in the United States. *South Med J*, v.98, p.1197-204; quiz 205, 230, 2005.
- BORISH LC, STEINKE JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*, v.111, p.S460-75, 2003.
- BOUHAROUN-TAYOUN H, OEUVRAY C, LUNEL F, DRUILHE P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med*, v.182, p.409-18, 1995.
- BOUTLIS CS, LAGOG M, CHAISAVANEEYAKORN S, MISUKONIS MA, KARIE MJ, MGONE CS, WANG Z, MORAHAN G, WEINBERG JB, UDHAYAKUMAR V, ANSTEY NM. Plasma interleukin-12 in malaria-tolerant papua new guineans: inverse correlation with *Plasmodium falciparum* parasitemia and peripheral blood mononuclear cell nitric oxide synthase activity. *Infect Immun*, v.71, p.6354-7, 2003.
- BRAGA EM, BARROS RM, REIS TA, FONTES CJ, MORAIS CG, MANSUR MS, KRETTLI AU. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg*, v.66, p.461-6, 2002a.
- 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, 2002b.
- BRUNA-ROMERO O, RODRIGUEZ A. Dendritic cells can initiate protective immune responses against malaria. *Infect Immun*, v.69, p.5173-6, 2001.

- CAMARGO LM, DAL COLLETO GM, FERREIRA MU, GURGEL SDE M, ESCOBAR AL, MARQUES A, KRIEGER H, CAMARGO EP, DA SILVA LH. Hypoendemic malaria in Rondonia (Brazil, western Amazon region): seasonal variation and risk groups in an urban locality. *Am J Trop Med Hyg*, v.55, p.32-8, 1996.
- CAMPOS MA, ALMEIDA IC, TAKEUCHI O, AKIRA S, VALENTE EP, PROCOPIO DO, TRAVASSOS LR, SMITH JA, GOLENBOCK DT, GAZZINELLI RT. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol*, v.167, p.416-23, 2001.
- CARROLO M, GIORDANO S, CABRITA-SANTOS L, CORSO S, VIGARIO AM, SILVA S, LEIRIAO P, CARAPAU D, ARMAS-PORTELA R, COMOGLIO PM, RODRIGUEZ A, MOTA MM. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nat Med*, v.9, p.1363-9, 2003.
- CHESNE-SECK ML, PIZARRO JC, VULLIEZ-LE NORMAND B, COLLINS CR, BLACKMAN MJ, FABER BW, REMARQUE EJ, KOCKEN CH, THOMAS AW, BENTLEY GA. Structural comparison of apical membrane analogues and paralogues in apicomplexan parasites. *Mol Biochem Parasitol*, v.144, p.55-67, 2005.
- 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.
- CHITNIS CE, BLACKMAN MJ. Host cell invasion by malaria parasites. *Parasitol Today*, v.16, p.411-5, 2000.
- 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.
- COBAN C, ISHII KJ, KAWAI T, HEMMI H, SATO S, UEMATSU S, AMAMOTO M, TAKEUCHI O, ITAGAKI S, KUMAR N, HORII T, AKIRA S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment zoin. *J Exp Med*, v.201, p.19-25, 2005.
- COBAN C, ISHII KJ, HORII T, AKIRA S. Manipulation of host innate immune responses by the malaria parasite. *Trends Microbiol*, v.15, p.271-8, 2007.
- COHEN S, MC GIL, CARRINGTON S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*, v.192, p.733-7, 1961.

- COHEN S, BUTCHER GA. Serum antibody in acquired malarial immunity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.65, p.125-35, 1971.
- COLLINS WE, PYE D, CREWTHORPE PE, VANDENBERG KL, GALLAND ULZER AJ, KEMP DJ, EDWARDS SJ, COPPEL RL, SULLIVAN JS, ET AL. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. *Am J Trop Med Hyg*, v.51, p.711-9, 1994.
- 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.229-37, 2006.
- CREAGH EM, O'NEILL LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol*, v.27, p.352-7, 2006.
- CUI L, ESCALANTE AA, IMWONG M, SNOUNOU G. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. *Trends Parasitol*, v.19, p.220-6, 2003.
- DALY TM, LONG CA. Humoral response to a carboxyl-terminal region of the merozoite surface protein-1 plays a predominant role in controlling blood-stage infection in rodent malaria. *J Immunol*, v.155, p.236-43, 1995.
- DAUER M, OBERMAIER B, HERTEN J, HAERLE C, POHL K, ROTH SSER S, SCHNURR M, ENDRES S, EIGLER A. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol*, v.170, p.4069-76, 2003.
- DE CASTRO MC, MONTE-MOR RL, SAWYER DO, SINGER BH. Malaria risk on the Amazon frontier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.103, p.2452-7, 2006.
- DEANS JA, KNIGHT AM, JEAN WC, WATERS AP, COHEN S, MITCHELL GH. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. *Parasite Immunol*, v.10, p.535-52, 1988.
- DEBETS JM, VAN DE WINKEL JG, CEUPPENS JL, DIETEREN IE, BUURMAN WA. Cross-linking of both Fc gamma RI and Fc gamma RII induces secretion of tumor necrosis factor by human monocytes, requiring high affinity Fc-Fc gamma R interactions. Functional activation of Fc gamma RII by treatment with proteases or neuraminidase. *J Immunol*, v.144, p.1304-10, 1990.
- DENG W, THIEL B, TANNENBAUM CS, HAMILTON TA, STUEHR DJ. Synergistic cooperation between T cell lymphokines for induction of the nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages. *J Immunol*, v.151, p.322-9, 1993.
- DICKO A, DIEMERT DJ, SAGARA I, SOGOBA M, NIAMBELE MB, ASSADOU MH, GUINDO O, KAMATE B, BABY M, SISSOKO M, MALKIN EM, FAYAT P, THERA

- MA, MIURA K, DOLO A, DIALLO DA, MULLEN GE, LONG CA, SAUL A, DOUMBO O, MILLER LH. Impact of a *Plasmodium falciparum* AMA1 Vaccine on Antibody Responses in Adult Malians. *PLoS ONE*, v.2, p.e1045, 2007.
- DING AH, NATHAN CF, STUEHR DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*, v.141, p.2407-12, 1988.
- DODOO D, OMER FM, TODD J, AKANMORI BD, KORAM KA, RILEY M. Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*, v.185, p.971-9, 2002.
- DOOLAN DL, HOFFMAN SL. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J Immunol*, v.163, p.884-92, 1999.
- DOOLAN DL, SOUTHWOOD S, FREILICH DA, SIDNEY J, GRABER NL, SHATNEY L, BEBRIS L, FLORENS L, DOBANO C, WITNEY AA, APPELLA E, HOFFMAN SL, YATES JR, 3RD, CARUCCI DJ, SETTE A. Identification of *Plasmodium falciparum* antigens by antigenic analysis of genomic and proteomic data. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.100, p.9952-7, 2003.
- DOUGHERTY GJ, SELVENDRAN Y, MURDOCH S, PALMER DG, HOGG N. The human mononuclear phagocyte high-affinity Fc receptor, FcRI, defined by a monoclonal antibody, 10.1. *Eur J Immunol*, v.17, p.1453-9, 1987.
- 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.888-91, 1987.
- DYER M, DAY KP. Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*, v.16, p.102-7, 2000.
- 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.765-9, 1996.
- ELLOSO MM, VAN DER HEYDE HC, VANDE WAA JA, MANNING DD, WEIDANZ WP. Inhibition of *Plasmodium falciparum* in vitro by human gamma delta T cells. *J Immunol*, v.153, p.1187-94, 1994.
- FENG ZP, KEIZER DW, STEVENSON RA, YAO S, BABON JJ, MURPHY VJ, ANDERS RF, NORTON RS. Structure and inter-domain interactions of domain II from the

- blood-stage malarial protein, apical membrane antigen 1. *J Mol Biol*, v.350, p.641-56, 2005.
- FERLAZZO G, TSANG ML, MORETTA L, MELIOLI G, STEINMAN RM, MUNZ C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med*, v.195, p.343-51, 2002.
- FERREIRA MU, RIBEIRO WL, TONON AP, KAWAMOTO F, RICH SM. Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate e merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*. *Gene*, v.304, p.65-75, 2003.
- FRANKE-FAYARD B, TRUEMAN H, RAMESAR J, MENDOZA J, VAN DER KEUR M, VAN DER LINDEN R, SINDEN RE, WATERS AP, JANSE CJ. A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol*, v.137, p.23-33, 2004.
- FREEMAN RR, HOLDER AA. Surface antigens of malaria merites. A high molecular weight precursor is processed to an 83,000 mol wt form expressed on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. *J Exp Med*, v.158, p.1647-53, 1983.
- FREVERT U. Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol*, v.20, p.417-24, 2004.
- 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.857-74, 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.165-73, 1994.
- GEROSA F, GOBBI A, ZORZI P, BURG S, BRIERE F, CARRA G, TRINCHIERI G. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol*, v.174, p.727-34, 2005.
- GOLENDA 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.6786-91, 1997.
- GOLGHER D, GAZZINELLI RT. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*, v.37, p.399-409, 2004.
- GOOD MF. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends Parasitol*, v.21, p.29-34, 2005.

- 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.
- GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK , TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, v.126, p.131-8, 1982.
- 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.1089-94, 2007.
- GUERRA CA, SNOW RW, HAY SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol*, v.22, p.353-8, 2006.
- HATHCOCK KS, LASZLO G, PUCILLO C, LINSLEY P, HODES RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med*, v.180, p.631-40, 1994.
- HAY SI, GUERRA CA, TATEM AJ, NOOR AM, SNOW RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis*, v.4, p.327-36, 2004.
- HEALER J, CRAWFORD S, RALPH S, MCFADDEN G, COWMAN AF. $\text{CD}8^+$ dependent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infect Immun*, v.70, p.5751-8, 2002.
- HENSMANN M, KWIATKOWSKI D. Cellular basis of early cytotoxic response to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*, v.69, p.2364-71, 2001.
- HERMSEN CC, KONIJNENBERG Y, MULDER L, LOE C, VAN DEUREN M, VAN DER MEER JW, VAN MIERLO GJ, ELING WM, HACK CE, SAUERWEIN R . Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental *Plasmodium falciparum* infections. *Clin Exp Immunol*, v.132, p.467-72, 2003.
- HERRERA S, CORRADIN G, AREVALO-HERRERA M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitol*, v.23, p.122-8, 2007.
- HIRUNPETCHARAT C, TIAN JH, KASLOW DC, VAN ROOIJEN N, KUMAR S, BERZOFKY JA, MILLER LH, GOOD MF. Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1[19]) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: correlation of protection with antigen-

- specific antibody titer, but not with effector CD4+ T cells. *J Immunol*, v.159, p.3400-11, 1997.
- HODDER AN, CREWTER PE, MATTHEW ML, REID GE, MORITZ RL, SIMPSON RJ, ANDERS RF. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem*, v.271, p.29446-52, 1996.
- HOGH B, MARBIAH NT, BURGHAUS 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.4034-8, 1995.
- HOLDER AA. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog Allergy*, v.41, p.72-97, 1988.
- HONDOWICZ B, SCOTT P. Influence of host and parasite factors on the innate immune response and Th2 stability following infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect*, v.1, p.65-71, 1999.
- HOWELL SA, WITHERS-MARTINEZ C, KOCKEN CH, THOMAS AW, BLACKMAN MJ. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem*, v.276, p.31311-20, 2001.
- ING R, SEGURA M, THAWANI N, TAM M, STEVENSON MM. Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. *J Immunol*, v.176, p.441-50, 2006.
- JACOBS P, RADZIOCH D, STEVENSON MM. A Th1-associated increase in tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *Infect Immun*, v.64, p.535-41, 1996.
- JAFARSHAD A, DZIEGIEL MH, LUNDQUIST R, NIELSEN LK, SINGH S, DRUILHE L. A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcγRII and FcγRIII. *J Immunol*, v.178, p.3099-106, 2007.
- JONGWUTIWES S, TANABE K, KANBARA H. Sequence conservation in the C-terminal part of the precursor to the major merozoite surface proteins (MSP1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. *Mol Biochem Parasitol*, v.59, p.95-100, 1993.
- KAPPE SH, KAISER K, MATUSCHEWSKI K. The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. *Trends Parasitol*, v.19, p.135-43, 2003.
- KOCHAR DK, SAXENA V, SINGH N, KOCHAR SK, KUMAR SV, DAS A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerg Infect Dis*, v.11, p.132-4, 2005.

- KOCKEN CH, DUBBELD MA, VAN DER WEL A, PRONK JT, WATERS AP, LANGERMANS JA, THOMAS AW. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. *Infect Immun*, v.67, p.43-9, 1999.
- KOCKEN CH, WITHERS-MARTINEZ C, DUBBELD MA, VAN DER WEL A, HACKETT F, VALDERRAMA A, BLACKMAN MJ, THOMAS AW. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infect Immun*, v.70, p.4471-6, 2002.
- KREMSNER PG, WINKLER S, WILDLING E, PRADA J, BIENZLE U, GRANINGER W, NUSSLER AK. High plasma levels of nitrogen oxides are associated with severe disease and correlate with rapid parasitological and clinical cure in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.90, p.44-7, 1996.
- KRISHNEGOWDA G, HAJJAR AM, ZHU J, DOUGLASS EJ, UEMATSU , AKIRA S, WOODS AS, GOWDA DC. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem*, v.280, p.8606-16, 2005.
- KROTOSKI WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial 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.325-32, 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.2215-23, 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.255-6, 2007.
- LANG C, GROSS U, LUDER CG. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*, v.100, p.191-203, 2007.

- LANGHORNE J, MORRIS-JONES S, CASABO LG, GOODIER M. The response of gamma delta T cells in malaria infections: a hypothesis. *Res Immunol*, v.145, p.429-36, 1994.
- LANGHORNE J, ALBANO FR, HENSMANN M, SANNI L, CADMAN E, VOISINE C, SPONAAS AM. Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. *Immunol Rev*, v.201, p.35-47, 2004.
- LEE EA, PALMER DR, FLANAGAN KL, REECE WH, ODHIAMBO K, MARSH K, PINDER M, GRAVENOR MB, KEITEL WA, KESTER KE, DIGGS C, KASLOW D, APOSTOLOPOULOS V, BALLOU WR, HILL AV, KRZYCH U, PLEBANSKI M. Induction of T helper type 1 and 2 responses to 19-kilodalton merozoite surface protein 1 in vaccinated healthy volunteers and adults naturally exposed to malaria. *Infect Immun*, v.70, p.1417-21, 2002.
- LEHNER T, WANG Y, PIDO-LOPEZ J, WHITTALL T, BERGMEIER LA, BABAAHMADY K. The emerging role of innate immunity in protection against HIV-1 infection. *Vaccine*, 2007.
- LEON B, MARTINEZ DEL HOYO G, PARRILLAS V, VARGAS HH, SANCHEZ-MATEOS P, LONGO N, LOPEZ-BRAVO M, ARDAVIN C. Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic cells. *Blood*, v.103, p.2668-76, 2004.
- LEON B, LOPEZ-BRAVO M, ARDAVIN C. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol*, v.17, p.313-8, 2005.
- LI F, DLUZEWSKI A, COLEY AM, THOMAS A, TILLEY L, ANDERS RF, FOLEY M. Phage-displayed peptides bind to the malarial protein apical membrane antigen-1 and inhibit the merozoite invasion of host erythrocytes. *J Biol Chem*, v.277, p.50303-10, 2002.
- LIM KJ, PARK JW, YEOM JS, LEE YH, YOO SB, OH JH, SOHN MJ, BAHK YY, KIM YS. Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can be remembered for more than 30 years in persons exposed to *Plasmodium vivax*. *Parasitol Res*, v.92, p.384-9, 2004.
- 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.425-33, 1995.
- LINSLEY PS, LEDBETTER JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol*, v.11, p.191-212, 1993.

- LOIOLA CC, DA SILVA CJ, TAUIL PL. [Malaria control in Brazil: 1965 to 2001]. *Rev Panam Salud Publica*, v.11, p.235-44, 2002.
- 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.2043-9, 1989.
- LUTY AJ, LELL B, SCHMIDT-OTT R, LEHMAN LG, LUCKNER D, GREVE B, MATOUSEK P, HERBICH K, SCHMID D, MIGOT-NABIAS F, DELORON P, NUSSENZWEIG RS, KREMSNER PG. Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children. *J Infect Dis*, v.179, p.980-8, 1999.
- LUYENDYK J, OLIVAS OR, GINGER LA, AVERY AC. Antigen-presenting cell function during *Plasmodium yoelii* infection. *Infect Immun*, v.70, p.2941-9, 2002.
- MALKIN EM, DIEMERT DJ, MCARTHUR JH, PERREAULT JR, MILES AP, GIERSING BK, MULLEN GE, ORCUTT A, MURATOVA O, AWKAL M, ZHOU H, WANG J, STOWERS A, LONG CA, MAHANTY S, MILLER LH, SAUL A, DURBIN AP. Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: a asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*, v.73, p.3677-85, 2005.
- MARQUES A. Human migration and spread of malaria in Brazil. *Parasitol Today*, v.3, p.166-70, 1987.
- MCGREGOR IA. Mechanisms of acquired immunity and epidemiological patterns of antibody responses in malaria in man. *Bull World Health Organ*, v.50, p.259-66, 1974.
- MCINTOSH RS, SHI J, JENNINGS RM, CHAPPEL JC, DE KONING-WARD TF, SMITH T, GREEN J, VAN EGMOND M, LEUSEN JH, LAZAROU M, VAN DE WINKEL J, JONES TS, CRABB BS, HOLDER AA, PLEASS RJ. The importance of human FcγRI in mediating protection to malaria. *PLoS Pathog*, v.3, p.e72, 2007.
- MEDZHITOV R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, v.449, p.819-26, 2007.
- 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.
- MEYLAN E, TSCHOPP J, KARIN M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, v.442, p.39-44, 2006.
- MILLER LH, ROBERTS T, SHAHABUDDIN M, MCCUTCHAN TF. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem Parasitol*, v.59, p.1-14, 1993.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE B, 2005. <http://saude.gov.br>.
- MITCHELL GH, THOMAS AW, MARGOS G, DLUZEWSKI AR, BANNIS R LH. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect Immun*, v.72, p.154-8, 2004.
- MORAIS CG (2005). Resposta humoral de isotipos de IgG às proteínas MSP-1₁₉ e AMA-1 de *Plasmodium vivax* em indivíduos expostos a diferentes situações de transmissão de malária no Brasil. Departamento de Parasitologia. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais: 102.
- MORAIS CG, SOARES IS, CARVALHO LH, FONTES CJ, KRETTLI 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.582-7, 2006.
- MOTA MM, PRADEL G, VANDERBERG JP, HAFALLA JC, FREVERT NUSSENZWEIG RS, NUSSENZWEIG V, RODRIGUEZ A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, v.291, p.141-4, 2001.
- NAIR M, HINDS MG, COLEY AM, HODDER AN, FOLEY M, ANDERS RF, NORTON RS. Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate, *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1). *J Mol Biol*, v.322, p.741-53, 2002.
- 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.
- NARUM DL, THOMAS AW. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol*, v.67, p.59-68, 1994.
- NATARAJAN R, THATHY V, MOTA MM, HAFALLA JC, MENARD R, VERNICK KD. Fluorescent *Plasmodium berghei* sporozoites and pre-erythrocytic stages: a new tool to study mosquito and mammalian host interactions with malaria parasites. *Cell Microbiol*, v.3, p.371-9, 2001.
- NEVILL CG, SOME ES, MUNG'ALA VO, MUTEMI W, NEW L, MARS K, LENGELER C, SNOW RW. Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Trop Med Int Health*, v.1, p.139-46, 1996.

- OBERMAIER B, DAUER M, HERTEN J, SCHAD K, ENDRES S, EIGER A.
Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online*, v.5, p.197-203, 2003.
- OCANA-MORGNER C, MOTA MM, RODRIGUEZ A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med*, v.197, p.143-51, 2003.
- OCKENHOUSE CF, ANGOVE E, KESTER KE, DIGGS C, SOISSON L, CUMMINGS JF, STEWART AV, PALMER DR, MAHAJAN B, KRZYCH U, TORNIEPORT N, DELCHAMBRE M, VANHANDENHOVE M, OFORI-ANYINAM O, COHEN J, LYON JA, HEPNER DG. Phase I safety and immunogenicity trial of FMP1/AS02A, a *Plasmodium falciparum* MSP-1 asexual blood stage vaccine. *Vaccine*, v.24, p.3009-17, 2006.
- O'DONNELL RA, DE KONING-WARD TF, BURT RA, BOCKARIE M, REEDER JC, COWMAN AF, CRABB BS. Antibodies against merozoite surface protein 1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J Exp Med*, v.193, p.1403-12, 2001.
- OJO-AMAIZE EA, VILCEK J, COCHRANE AH, NUSSENZWEIG RS. *Plasmodium berghei* sporozoites are mitogenic for murine T cells, induce interferon, and activate natural killer cells. *J Immunol*, v.133, p.1005-9, 1984.
- 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.40-2, 1998.
- PALUCKA KA, TAQUET N, SANCHEZ-CHAPUIS F, GLUCKMAN JC.
Lipopolysaccharide can block the potential of monocyte to differentiate into dendritic cells. *J Leukoc Biol*, v.65, p.232-40, 1999.
- PARROCHE P, LAUW FN, GOUTAGNY N, LATZ E, MONKS BG, VISINTIN A, HALMEN KA, LAMPHIER M, OLIVIER M, BARTHOLOMEU DC, GAZZINELLI RT, GOLENBOCK DT. Malaria hemozoin is immunologically potent but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.104, p.1919-24, 2007.
- 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.1500-6, 1998.
- PETERSON MG, MARSHALL VM, SMYTHE JA, CREWETHER PE, LEW A, SILVA A, ANDERS RF, KEMP DJ. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol*, v.9, p.3151-4, 1989.

- PICHYANGKUL S, YONGVANITCHIT K, KUM-ARB U, HEMMI H, AKIRA S, KRIEG AM, HEPPNER DG, STEWART VA, HASEGAWA H, LOOAREESUWAN S, SHANKS GD, MILLER RS. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *J Immunol*, v.172, p.4926-33, 2004.
- PIZARRO JC, VULLIEZ-LE NORMAND B, CHESNE-SECK ML, COLLINS CR, WITHERS-MARTINEZ C, HACKETT F, BLACKMAN MJ, FABER BW, REMARQUE EJ, KOCKEN CH, THOMAS AW, BENTLEY GA. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science*, v.308, p.408-11, 2005.
- POLHEMUS ME, MAGILL AJ, CUMMINGS JF, KESTER KE, OCKENHOUSE CF, LANAR DE, DUTTA S, BARBOSA A, SOISSON L, DIGGS CL, ROBINSON SA, HAYNES JD, STEWART VA, WARE LA, BRANDO C, KRZYCH U, BOWDEN RA, COHEN JD, DUBOIS MC, OFORI-ANYINAM O, DE-KOCK E, BALLOU WR, HEPPNER DG, JR. Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* apical membrane protein (AMA-1) FMP2.1, adjuvanted with AS02A, in malaria-naive adults at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine*, v.25, p.4203-12, 2007.
- POMBO DJ, LAWRENCE G, HIRUNPETCHARAT C, RZEPczyk C, BRENNEN M, CLOONAN N, ANDERSON K, MAHAKUNKIJCHAROEN Y, MARTIN LB, WILSON D, ELLIOTT S, EISEN DP, WEINBERG JB, SAUL A, GOOD MF. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet*, v.360, p.610-7, 2002.
- RAVETCH JV, BOLLAND S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*, v.19, p.275-90, 2001.
- REIS E SOUSA C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*, v.6, p.476-83, 2006.
- RHEE MS, AKANMORI BD, WATERFALL M, RILEY EM. Changes in cytokine production associated with acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol*, v.126, p.503-10, 2001.
- ROCKETT KA, AWBURN MM, COWDEN WB, CLARK IA. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immun*, v.59, p.3280-3, 1991.
- RODRIGUES MH, RODRIGUES KM, OLIVEIRA TR, COMODO AN, RODRIGUES MM, KOCKEN CH, THOMAS AW, SOARES IS. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int J Parasitol*, v.35, p.185-92, 2005.

- ROSSI D, ZLOTNIK A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*, v.18, p.217-42, 2000.
- SABCHAREON A, BURNOUF T, OUATTARA D, ATTANATH P, BOUHA OUN-TAYOUN H, CHANTAVANICH P, FOUCAULT C, CHONGSUPHAJASIDDHI 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.
- SALERI N, GULLETTA M, MATTEELLI A, CALIGARIS S, TOMASONI LR, ANTONINI B, PERANDIN F, CASTELLI F. Acute respiratory distress syndrome in *Plasmodium vivax* malaria in traveler returning from Venezuela. *J Travel Med*, v.13, p.112-3, 2006.
- SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulate tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, v.179, p.1109-18, 1994.
- SAN SEBASTIAN M, JATIVA R, GOICOLEA I. Epidemiology of malaria in the Amazon basin of Ecuador. *Rev Panam Salud Publica*, v.7, p.24-8, 2000.
- SAWYER D. Economic and social consequences of malaria in new colonization projects in Brazil. *Soc Sci Med*, v.37, p.1131-6, 1993.
- SCHMIEG J, GONZALEZ-ASEGUINOLAZA G, TSUJI M. The role of natural killer T cells and other T cell subsets against infection by the pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Microbes Infect*, v.5, p.499-506, 2003.
- SCHOFIELD L, GRAU GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*, v.5, p.722-35, 2005.
- SEHGAL VM, SIDDJIQUI WA, ALPERS MP. A seroepidemiological study to evaluate the role of passive maternal immunity to malaria in infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.83 Suppl, p.105-6, 1989.
- SEIXAS E, CROSS C, QUIN S, LANGHORNE J. Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Eur J Immunol*, v.31, p.2970-8, 2001.
- SEMNANI RT, SABZEVARI H, IYER R, NUTMAN TB. Filarial antigens impair the function of human dendritic cells during differentiation. *Infect Immun*, v.69, p.5813-22, 2001.
- SEMNANI RT, LIU AY, SABZEVARI H, KUBOFCIK J, ZHOU J, GLEDEN JK, NUTMAN TB. *Brugia malayi* microfilariae induce cell death in human dendritic cells and inhibit

- their ability to make IL-12 and IL-10, and reduce their capacity to activate CD4+ T cells. *J Immunol*, v.171, p.1950-60, 2003.
- SERGHIDES L, SMITH TG, PATEL SN, KAIN KC. CD36 and malaria: friends or foes? *Trends Parasitol*, v.19, p.461-9, 2003.
- SHARMA VP. Current scenario of malaria in India. *Parassitologia*, v.41, p.349-53, 1999.
- SHEAR HL, SRINIVASAN R, NOLAN T, NG C. Role of IFN-gamma in lethal and nonlethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. *J Immunol*, v.143, p.2038-44, 1989.
- SILVIE O, FRANETICH JF, CHARRIN S, MUELLER MS, SIAU A, BODESCOT M, RUBINSTEIN E, HANNOUN L, CHAROENVIT Y, KOCKEN CH, THOMAS AW, VAN GEMERT GJ, SAUERWEIN RW, BLACKMAN MJ, ANDERS RF, PLUSCHKE G, MAZIER D. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem*, v.279, p.9490-6, 2004.
- SIVEP, Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica em malária, 2005.
<http://portal.saude.gov.br>.
- 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.1606-14, 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.459-70, 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.357-63, 1999b.
- SOUZA PE, ROCHA MO, MENEZES CA, COELHO JS, CHAVES AC, GOLLOB KJ, DUTRA WO. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun*, v.75, p.1886-94, 2007.
- STEVENSON MM, TAM MF, WOLF SF, SHER A. IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and

- occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol*, v.155, p.2545-56, 1995.
- STEVENSON MM, RILEY EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*, v.4, p.169-80, 2004.
- STOWERS AW, KENNEDY MC, KEEGAN BP, SAUL A, LONG CA, MILLER LH. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. *Infect Immun*, v.70, p.6961-7, 2002.
- 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.1287-90, 2006.
- TACKE F, RANDOLPH GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*, v.211, p.609-18, 2006.
- THOMAS AW, TRAPE JF, ROGIER C, GONÇALVES A, ROSÁRIO VE, NARUM DL. High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.51, p.730-40, 1994.
- TRIFILO MJ, LANE TE. The CC chemokine ligand 3 regulates CD11c+CD11b+CD8alpha- dendritic cell maturation and activation following viral infection of the central nervous system: implications for a role in T cell activation. *Virology*, v.327, p.8-15, 2004.
- TROTTEIN F, TRIGLIA T, COWMAN AF. Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and plasmodia. *Mol Biochem Parasitol*, v.74, p.129-41, 1995.
- UDHAYAKUMAR V, KARIUKI S, KOLCZACK M, GIRMA M, ROBERTS JM, OLOO AJ, NAHLEN BL, LAL AA. Longitudinal study of natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII. *Am J Trop Med Hyg*, v.65, p.100-7, 2001.
- URBAN BC, FERGUSON DJ, PAIN A, WILLCOX N, PLEBANSKI M, AUSTYN JM, ROBERTS DJ. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature*, v.400, p.73-7, 1999.

- URBAN BC, MWANGI T, ROSS A, KINYANJUI S, MOSOBO M, KAI OWE B, MARSH K, ROBERTS DJ. Peripheral blood dendritic cells in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood*, v.98, p.2859-61, 2001a.
- URBAN BC, WILLCOX N, ROBERTS DJ. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.98, p.8750-5, 2001b.
- URBAN BC, ROBERTS DJ. Inhibition of T cell function during malaria: implications for immunology and vaccinology. *J Exp Med*, v.197, p.137-41, 2003.
- VICHCHATHORN P, JENWITHISUK R, LEELAUDOMLIPI S, TUNGPRADABKUL S, HONGENG S, CUI L, SATTABONGKOT J, UDOMSANGPETCH R. Induction of specific immune responses against the *Plasmodium vivax* liver-stage via in vitro activation by dendritic cells. *Parasitol Int*, v.55, p.187-93, 2006.
- WEBSTER D, HILL AV. Progress with new malaria vaccines. *Bull World Health Organ*, v.81, p.902-9, 2003.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION, Roll Back Malaria. 2004.
<http://www.rbm.who.int>.
- WINSTANLEY P, WATKINS W, MUHIA D, SZWANDT S, AMUKOYE E, MARSH K. Chlorproguanil/dapsone for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in young children: pharmacokinetics and therapeutic range. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.91, p.322-7, 1997.
- WYKES M, GOOD MF. A case for whole-parasite malaria vaccines. *Int J Parasitol*, v.37, p.705-12, 2007.
- 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.342-9, 1999.
- ZLOTNIK A, YOSHIE O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, v.12, p.121-7, 2000.

9. ANEXOS